

UNIVERSITE BLIDA 1
SAAD DAHLAB
Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT ES-SCIENCES
en Sciences Vétérinaires

**Étude du Pestivirus responsable de la pestivirose chez
les petits ruminants : étude générale et situation en
Algérie**

Par

Naouel Feknous

Devant le jury composé de :

A. BERBER	Professeur, U. Blida 1	Président
N. SAHRAOUI	Professeur, U. Blida 1	Examinatrice
N. AZZAG	Maitre de conférences A ; ENSV	Examinatrice
A. HAKEM	Professeur, C.R. Djelfa	Examineur
L. AOUN	Professeur, U. El Taref	Examinatrice
A. BOUYOUCHEF	Professeur, U. Blida 1	Promoteur

Blida, 2020

RESUME

La Border Disease (BD) est une maladie à répartition mondiale causée par un « Border Disease Virus » ou (BDV), infectant communément les ovins, caprins et bovins, causant chez les ruminants des pertes économiques considérables. Les animaux infectés de façon permanente (IPI) constituent la principale source d'infection dans un troupeau.

Notre travail a été mené entre 2015 et 2016, ayant pour objectif essentiel la détermination des statuts sérologiques des cheptels ovins vis-à-vis de la BD ainsi que l'étude d'influence de quelques facteurs de risque associés. Au total, 56 troupeaux de neuf wilayas ont été visités et 689 échantillons de sang ont été prélevés chez des ovins adultes âgés de 6 à 24 mois (n = 576) et chez des agneaux âgés de moins de 6 mois (n = 113). Les sérums des échantillons d'adultes ont été testés par ELISA-Ac pour détecter des anticorps spécifiques ; 197 parmi eux ont ensuite été caractérisés par le test de neutralisation virale (virus neutralisation test ou VNT) pour la détection d'anticorps spécifiques neutralisants du BDV et le Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV-1 et BVDV-2).

Cinquante Cinq (55) troupeaux (avec un pourcentage de 98%) avaient au moins un animal séropositif et la séoprévalence apparente au sein du troupeau était estimée à 60,17% (IC à 95%: 52,96-66,96). La véritable séoprévalence fondée sur la sensibilité et la spécificité estimées de l'ELISA-Ac était de 68,20% (IC à 95%: 60,2-76,3). Ces taux de séoprévalence élevés suggèrent que le BDV est répandu avec une allure enzootique dans toute la région d'étude. Ils témoignent, d'une part, d'une forte circulation du virus et d'autre part, d'une infection récente étant donné que seuls les animaux âgés de 6 à 24 mois ont été échantillonnés. Dans cette enquête, des

différences régionales marquées en matière de séroprévalence intra-troupeau sont enregistrées avec des taux estimés entre 18 et 100% selon les wilayas ; cependant ces différences n'étaient pas statistiquement significatives. Une faible performance de l'ELISA-Ac a été observée, en particulier pour la spécificité qui a été estimée à 84%, ce taux relativement faible pourrait être expliqué par le fait que le Kit utilisé est plus adapté aux souches européennes de *Pestivirus*.

Cent quarante-quatre (144) sérums étaient positifs en VNT avec des titres supérieurs de deux à trois fois pour le BDV que pour le BVDV-1 ou le BVDV-2 nous laisse dire que le virus qui circule en Algérie est celui de la maladie frontalière plutôt que celui du BVDV. En revanche 2 sérums étaient fortement positifs pour le BVDV-2, signalé pour la première fois dans nos cheptels ovins en Algérie. Plusieurs facteurs de risque ont été étudiés tels que le climat, le relief, la gestion des troupeaux et la présence d'autres espèces de ruminants ont été identifiés comme étant liés au BDV. Cependant, ils doivent être considérés comme spécifiques au contexte algérien et généralisés avec prudence aux autres pays endémique, en raison du nombre limité de troupeaux et d'animaux testés ainsi que la zone d'étude.

Aucun antigène viral n'a pu être isolé. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'un nombre limité d'animaux de moins de 6 mois a été testé dans chaque troupeau.

Des études complémentaires sont nécessaires pour détecter et isoler les souches de virus circulant dans le pays et comprendre leurs distributions et impact sur nos troupeaux.

Mots clés : Border Disease Virus; *Pestivirus*; séroprévalence; ovin; Algérie; infecté permanent immunotolérant (IPI).

ABSTRACT

The Border Disease (BD) is a worldwide disease caused by a «Border Disease Virus» or (BDV), commonly infecting sheep, goats and cattle, causing considerable economic loss to ruminants. Permanently infected animals (IPI) are the main source of infection in a flock.

Our work was carried out between 2015 and 2016, with the essential objective of determining the serological status of sheep flocks regarding BD and the study of the influence of some associated risk factors. A total of 56 flocks from nine departments were visited and 689 blood samples were taken from adult sheep with 6-24 months of age (n = 576) and from lambs less than 6 months of age (n = 113). The sera from the adult samples were tested by ELISA-Ab to detect specific antibodies; 197 sera were then characterized by the viral neutralization test (or VNT) for the detection of specific antibodies neutralizing BDV and the Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV-1 and BVDV-2).

Fifty-five (55) herds (98%) had at least one seropositive animal and the apparent seroprevalence within the herd was estimated at 60.17% (95% CI: 52.96-66.96). The true seroprevalence based on the estimated sensitivity and specificity of ELISA-Ac was 68.20% (95% CI 60.2-76.3). These high seroprevalence rates suggest that BDV is prevalent with an enzootic appearance throughout the study region. On the one hand they show a strong circulation of the virus and on the other hand a recent infection since only animals aged 6 to 24 months were sampled. In this survey, marked regional differences in intra-herd seroprevalence are recorded with rates estimated between 18 and 100% depending on the departments; however, these differences were not statistically significant. A poor performance of ELISA-Ab was

observed, in particular for the specificity which was estimated at 84%, this relatively low rate could be explained by the fact that the Kit used is more suitable for European strains of Pestivirus.

One hundred and forty-four (144) sera were positive for VNT with titers of two to three times higher for BDV than for BVDV-1 or BVDV-2 which could be explained by the fact that the virus circulating in Algeria is that of border disease rather than that of BVDV. On the other hand, 2 sera were strongly positive for BVDV-2, reported for the first time in our sheep flocks in Algeria. Several risk factors have been studied such as climate, relief, herd management and the presence of other ruminant species have been identified as being linked to BDV. However, they must be considered as specific to the Algerian context and generalized with caution to other endemic countries, due to the limited number of herds and animals tested as well as the study area. No viral antigen could be detected. This could be explained by the fact that a limited number of animals less than 6 months old were tested in each herd.

Additional studies are necessary to detect and isolate the circulating strains of virus in the country and understand their distribution and impact on our herds.

Keys words : Border Disease Virus; *Pestivirus*; seroprevalence; ovine; Algeria; immunotolerant permanent infected (IPI).

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apportées leurs aides et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

A monsieur Berber A., professeur à l'Université de Blida 1, qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Hommages respectueux.

A madame Sahraoui N., professeur à l'Université de Blida, qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse. Hommage respectueux.

A monsieur Hakem M., professeur directeur Centre de recherche en agropastoralisme de Djelfa, qui nous fait l'honneur d'accepter d'être membre de mon jury de thèse. Hommage respectueux.

A madame Azzag N., maître de conférences A, à l'ENSV, qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse. Hommage respectueux.

A madame Aoun L., professeur à l'université de d'el Taref, qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse. Hommage respectueux.

Au professeur BOUYOUCHEF A., mon directeur de thèse, qui a accepté d'être mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet, pour votre disponibilité et vos conseils, pour votre soutien illimité et votre savoir faire. Pour m'avoir encadrée dans mon travail, sincères remerciements.

A monsieur KHALED H., maître de conférence A, à l'institut des sciences vétérinaires à l'université SAAD DAHLAB BLIDA et chargé de cours du module de Microbiologie spéciale, pour son implication dans ma thèse, sa gentillesse et son professionnalisme. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Madame KAY.A. B., chef de département, Unité enzootique et maladie émergentes, Uccle Belgique, qui m'a ouvert les portes du laboratoire CODA CERVA

et a accepté d'être mon maître de stage. Pour sa grande disponibilité, pour ses conseils et ses encouragements et tous les moyens mis a ma disposition. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.

A monsieur Hanon J B., epidémiologiste et chercheur au CODA CERVA, Uccle Belgique, de m'avoir aidé à faire ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements et mon grand respect.

A madame Thoraval. C, technicienne au laboratoire CODA CERVA, pour son aide précieuse et le temps qu'elle m'a consacré. Qu'elle soit assurée de mes vifs remerciements.

A madame Tignon M, attachée de recherche, au CODA CERVA, pour avoir travaillé ensemble, qu'elle trouve ici l'hommage de mes vives reconnaissances.

A mon mari, pour m'avoir encouragé, aidé et soutenu tout au long de ma thèse.

A mon cher fils Simo, qui m'a apporté beaucoup de courage et de joie.

A monsieur Bachir Cherif M, professeur de langue française, pour toute l'aide précieuse qu'il m'a apportée. Qu'il trouve ici l'hommage de mes vives reconnaissances

A monsieur Bellabes R, maitre de conférences A, Madame Ezzeroug R maitre assistante A à l'institut des sciences vétérinaires à l'université SAAD DAHLAB BLIDA, mes parents, ma sœur sarrah pour leurs aides. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon grand respect.

Aux vétérinaires praticiens qui ont participé à ce travail, pour leurs aides précieuses. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
RESUME EN ANGLAIS	4
REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	12
INTRODUCTION	16
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. HISTORIQUE	18
2. EPIDEMIOLOGIE DE LA BORDER DISEASE	20
2.1. Epidémiologie commune à la BD et au BVD/MD	20
2.2. Espèces hôtes des <i>pestivirus</i>	20
2.3. Transmission	20
2.3.1. Sources de virus et modes de contamination	20
2.3.2. Expansion de la maladie	22
2.3.3. Présence d'IPI et répartition des anticorps en fonction de l'âge	24
2.4. Répartition et prévalence du BD/ BVD	24
2.4.1. Le BDV	24
2.4.2. Le BVDV	25
2.5. Séroprévalence des infections à <i>pestivirus</i>	27
2.5.1. Séroprévalence de l'infection par le BDV	28
2.5.2. Prévalence en IPI	39
2.5.3. Séroprévalence de l'infection par le BVDV	30
2.5.4. Prévalence en IPI	31
3. VIROLOGIE	33
3.1. Taxonomie	33
3.2. Caractères morphologiques	34
3.3. Génétique	35
3.3.1. Génome	35
3.3.2. Principales protéines virales structurales	36
3.3.3. Variabilité génétique	39

3.3.4. Classification sérologique et relations antigéniques	40
3.4. Immunogénicité	40
3.5. Cycle réplicatif	41
3.6. Infecté permanent immunotolérant (IPI)	43
3.7. Tropisme cellulaire	43
3.8. Virulence	43
3.9. Sensibilité des <i>Pestivirus</i>	44
4. CLINIQUE	45
4.1. Infection d'un individu non IPI, non gestant	45
4.1.1. Forme sub-clinique	45
4.1.2. Forme clinique plus ou moins sévères	45
4.1.3. Infection vénérienne	45
4.2. Infection d'une femelle gestante	46
4.2.1. Infection fœtale	46
4.2.2. Fœtus de moins de 15 jours	46
4.2.3. Fœtus de 15 à 60 jours	46
4.2.4. Fœtus de 60 à 85 jours	47
4.2.5. Fœtus de plus de 85 jours	48
4.3. Maladie d'apparition retardée chez les ovins infectés virémique persistants	48
4.4. Pronostic	48
4.5. Excrétion virale et voies de transmission	50
4.6. Infection expérimentale	50
4.7. Lésions nécropsiques	50
5. DIAGNOSTIC	54
5.1. Choix des prélèvements	54
5.2. Méthodes de diagnostic	54
5.2.1. Diagnostic indirect (Épreuves sérologiques)	54
5.2.2. Diagnostic direct	56

6. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	59
6.1. Prophylaxie et moyens de lutte	59
6.2. Moyen de lutte chez les ovins	60
6.2.1. Gestion sanitaire	61
PARTIE EXPERIMENTALE	
7. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	64
8. MATERIEL ET METHODES	66
8.1. Régions d'étude	68
8.2. Période d'étude	70
8.3. Enquête sur le terrain	70
8.4. Choix des élevages et des animaux	72
8.5. Choix des prélèvements	73
8.5.1. Nature des prélèvements	74
8.5.2. Types de prélèvements en fonction de l'âge des animaux	74
Sur l'animal âgé entre 6 et 24 mois	74
Sur l'animal âgé de moins de 6 mois	75
8.6. Laboratoire d'analyse	76
8.7. Méthodes de diagnostic	79
8.7.1. Technique ELISA-Ac	79
8.7.2. Test de séroneutralisation	79
8.7.3. Technique ELISA-Ag	80
8.7.4. Technique PCR quantitative (en temps réel)	81
8.8. Analyses statistiques	82
8.8.1. Estimation de la séroprévalence	82
8.8.2. Comparaison entre les résultats ELISA- Ac et VNT	82
8.8.3. Statistiques descriptives et facteurs de risque	83

9. RESULTATS ET DISCUSSION	84
9.1. Enquête sur le terrain	84
9.2. Résultats	84
9.2.1. Détermination de la séroprévalence par ELISA-Ac	84
9.2.2. Détermination des facteurs de risques	85
9.2.3. Détermination des résultats obtenus par VNT et leur comparaison aux résultats de l'ELISA-Ac	95
9.2.4. Résultats obtenus par ELISA-Ag et PCR-RT	99
9.3. Discussion	100
9.3.1. Séroprévalence	100
9.3.2. Différences régionales de la séroprévalence	101
9.3.3. Circulation du virus	102
9.3.4. Etude des facteurs de risque	102
9.3.5. Etude comparative entre VTN et ELISA-Ac	105
9.3.6. Détection IPI par ELISA-Ag et PCR-RT	107
10. DISCUSSION GENERALE	109
CONCLUSION GENERALE	112
CONSEILS ET RECOMMANDATIONS	114
PERSPECTIVES	116
APPENDICE	117
Liste des abréviations	117
Questionnaire des Participants de l'Etude BD	119
Principaux résultats de l'étude	121
Test ELISA-AC	127
Test ELISA-Ag	135
Technique PCR-RT	143
Test de séroneutralisation	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 3.1	structure générale d'un <i>Flaviviridae</i>	35
Figure 3.2.a	organisation générale du génome d'un <i>Pestivirus</i>	36
Figure 3.2.b	conservation des séquences génomiques	36
Figure 3.3	modalités d'entrée des virus enveloppés : endocytose via les vésicules à clathrine, puis fusion des membranes pH dépendante	42
Figure 3.4	cycle viral des <i>pestivirus</i>	42
Figure 4.1	conséquences d'une infection congénitale en fonction du stade de gestation chez les ovins	49
Photographie 4.2	agneau atteint de BD	51
Photographie 4.3	position caractéristique d'un agneau atteint de BD	51
Photographie 4.4	anomalie de toison chez un agneau atteint de BD	52
Photographie 4.5	mort-né avec hyperflexion des carpes et tarses et malformations faciales	52
Photographie 4.6	coupes histopathologique de cerveaux atteints de BD	53
Figure 6.1	moyen de lutte contre la pestivirose ovine	63
Figure 8.1	organigramme général de l'étude	66
Figure 8.2	représentation géographique des régions d'études	69
Figure 8.3	bloc de récolte d'échantillons de 96 puits	77
Figure 8.4	échantillons de sang récoltés dans des tubes vacutainer	77
Figure 8.5	caisse UN3373 dotée de gaz carbonique	77
Figure 8.6	caisse UN3373	77
Figure 8.7	sac UN3373 destinés à l'envoi d'échantillons biologiques	77
Figure 8.8	blocs d'échantillons de plasma et de sérum	77
Figure 8.9	autorisation de réception des échantillons	78
Figure 9.1	détermination de la séroprévalence par wilaya	85

Figure 9.2	séroprévalence selon le climat	87
Figure 9.3	séroprévalence par relief	88
Figure 9.4	séroprévalence selon la race	88
Figure 9.5	séroprévalence selon la présence de maladies cliniques	89
Figure 9.6	séroprévalence suite aux taux d'avortements	89
Figure 9.7	séroprévalence selon le type de stabulation	90
Figure 9.8	séroprévalence par taille de troupeau	90
Figure 9.9	séroprévalence selon la présence de bovins	91
Figure 9.10	séroprévalence selon la présence de caprins	91
Figure 9.11	séroprévalence selon l'achat de nouveaux animaux	92
Figure 9.12	séroprévalence selon l'origine du reproducteur	92
Figure 9.13	séroprévalence selon la vaccination	93
Figure 9.14	Courbes d'amplification sur le lecteur PCR-RT	99
Photographie C.1	plaque ELISA-Ac	133
Photographie C.2	polymicropipette	133
Photographie C.3	kit SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking	133
Photographie C.4	etuve pour incubation des plaques	133
Photographie C.5	agitateur de plaque	133
Photographie C.6	laveur de plaque	133
Photographie C.7	agitateur de sérum	133
Photographie C.8	lecteur de plaque ELISA	133
Photographie D.1	kit ELISA-Ag	142
Photographie D.2	réalisation de l'ELISA-Ag	142
Photographie D.3	incubation des plaques ELISA-Ag	142

Photographie D.4	micropipette électronique	142
Photographie E.1	bloc de pouls de 10	146
Photographie E.2	préparation des pouls	146
Photographie E.3	kit ELISA A-Ag	146
Photographie E.4	Extraction d'ARN	146
Photographie E.5	Préparation des Mixes	146
Tableau 2.1	liste des principaux sous groupes de BDV	25
Tableau 2.2	répartition des différentes espèces et sous-espèces de BVDV dans plusieurs pays	27
Tableau 2.3	différentes études de séroprévalence en Espagne	28
Tableau 2.4	séroprévalence et viroprévalence de l'infection par le BDV	30
Tableau 2.5	séroprévalence et viroprévalence de l'infection par le BVDV	32
Tableau 3.1	classification des 11 espèces du genre <i>pestivirus</i> selon l'ICTV	34
Tableau 3.2	principales protéines virales des <i>Pestivirus</i>	38
Tableau 8.1	importance de l'élevage dans différentes wilaya choisies dans notre étude, selon le recensement du Ministère de l'Agriculture l'année 2014	68
Tableau 8.2	le nombre de troupeaux prélevé dans chaque wilaya	71
Tableau 8.3	distribution des troupeaux intégrés dans l'étude selon leurs principales caractéristiques	71
Tableau 8.4	population ovine (nombre de troupeaux) et échantillonnage réalisé	73
Tableau 8.5	organisation des prélèvements dans les blocs	78
Tableau 9.1	population ovine (nombre de troupeaux), échantillonnage effectué et estimation de la séroprévalence (apparente) (avec un IC à 95%) de la BD, par Wilaya, selon le modèle GEE.	86
Tableau 9.2	facteurs de risque de séropositivité pour la Border Disease avec le nombre et la proportion d'échantillons positifs correspondants (séroprévalence apparente), nombre d'échantillons négatifs et	87

ratio associé (avec IC de 95%)

Tableau 9.3	caractéristiques descriptives et résultats obtenus par troupeau par la méthode ELISA-Ac.	94
Tableau 9.4	Nombre de cas positifs, négatifs et douteux en ELISA-Ac, conformément au seuil recommandé par le fabricant, par rapport au titre VNT pour le BDV, en considérant un titre sur 1/8 comme seuil pour le VNT	97
Tableau 9.5	Nombre de cas positifs, négatifs et douteux en ELISA-Ac comparés au ratio du titre VNT-BDV comparé au titre VNT-BVDV-1 et BVDV-2	98
Tableau 9.6	caractéristiques d'élevage	121
Tableau 9.7	analyse statistique des facteurs de risqué et séroprévalence	122
Tableau 9.8	tableau récapitulatif des résultats de la séroprévalence par troupeaux	124
Tableau 9.9	plan de plaque pour ELISA-Ac	128
Tableau 9.10	Composition et conservation du kit ELISA-Ac	128
Tableau 9.11	plan de plaque pour ELISA-Ag	136
Tableau 9.12	composition et conservation du kit	137
Tableau 9.13	récapitulatif des cellules et stocks viraux utilisées pour le VNT	150
Tableau 9.14	récapitulatif du milieu et les volumes utilisés pour le VNT	152

INTRODUCTION

La production animale peut être considérée comme une solution pertinente à la mise en place d'un système durable de développement. L'élevage des petits ruminants est un des atouts de cette filière, qui joue un rôle très important sur le plan économique et social, il représente plus de 92% de l'effectif global des animaux de rente [1]. Selon les statistiques du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural pour l'année 2015, le cheptel ovin est estimé à plus de 28 millions de têtes, dont 15 millions de brebis, plus de 4,5 millions de caprins dont 2,5 millions de chèvres. Ces données permettent à cette filière d'être un vrai atout pour le développement non seulement de l'agriculture mais aussi de l'économie du pays [2].

Les troubles de la reproduction représentent un des problèmes les plus importants dans la production animale, surtout ceux causés par les maladies infectieuses [3], parmi elles, la Border Disease, causée par un *Pestivirus*. Conformément au Comité International de la Taxonomie des Virus (ICTV), le BDV appartient à la famille des Flaviviridae qui comprend quatre genres: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus*, et *Pestivirus* [4]. Ce dernier comprend 11 espèces classées de A à K à savoir : le virus de la maladie des frontières (BDV), diarrhée virale bovine type1 (BVDV-1), et type 2 (BVDV-2) et le virus de la peste porcine classique (CSFV) ainsi que 7 autres isolées récemment. Elles sont nommées en fonction de leur parenté antigénique dans un schéma indépendant de l'hôte [5]

Le BVDV peut infecter les bovins, les ovins, les chèvres, les porcs et d'autres espèces d'ongulés [6.7]. Une infection des moutons par BVDV-1 et BVDV-2 dans des conditions naturelles et expérimentales ont été démontrées [8]; et même dans certaines régions, la prévalence de BVDV chez les ovins peut être supérieure à celle de BDV [9]. Par contre, le virus de la peste porcine semble être limité aux porcs et aux sangliers [10.11]. Bien que le BDV soit généralement considéré comme un agent de la maladie du mouton, il n'est pas strictement spécifique à l'hôte et peut infecter de manière croisée les bovins, les ovins, les caprins, les porcins et les espèces non domestiquées [12]; la transmission du virus BDV entre petits ruminants et bovins a été décrite par plusieurs auteurs [13-14.15] ce qui peut entraîner des pertes économiques considérables pour l'industrie ovine en raison de son impact sur la

reproduction et la santé animale vu les problèmes d'infertilité, des avortements, les mort-nés à la naissance, et autres.

Cette affection congénitale, virulente et contagieuse atteint et le fœtus et les jeunes agneaux se caractérisant cliniquement par des anomalies de la toison « Hairy shaker ou hirsutisme, des tremblements musculaires, des déformations du squelette ; et une hypomyélogénèse congénitale [16.17.18].

Elle est présente sur plusieurs continents et les taux de séroprévalence chez les ovins varient de 5% à 50% selon les pays ou les régions d'un même pays [19]. Cependant, la prévalence de la maladie, en Algérie, reste totalement inconnue et à notre connaissance, il n'y a pas eu à ce jour de publication scientifique sur le sujet.

Ce travail a fait partie d'un groupe de recherche sur les maladies abortives en Algérie et des thèses dans ce sens ont déjà été soutenues, à savoir : la fièvre Q, la Brucellose, la Chlamydie. De notre part, dans le cadre d'une stratégie globale de notre équipe, nous nous sommes penchés à étudier la BD ; nous voulions avoir l'idée de la part qu'occupe le BDV parmi les maladies responsables d'avortement ne serait-ce-que pour voir la circulation du virus dans nos cheptels.

Notre travail a commencé par une étude bibliographique pour nous éclairer sur les différents aspects de la BD comme : la répartition géographique ; les caractéristiques du virus ; les manifestations cliniques ; les modalités de transmission ; les méthodes de diagnostic et les mesures de prophylaxie.

Ensuite, sur la base des informations recueillies, nous avons abordé certains aspects relatifs à cette maladie à savoir :

- **épidémiologie descriptive** : Cette étude à été menée entre 2015 et 2016 visant à identifier les facteurs de risque associés par le biais d'une enquête sur le terrain auprès des éleveurs et des vétérinaires praticiens et à estimer la séroprévalence chez les troupeaux ovins par la technique ELISA-Ac et séroneutralisation pour déterminer le statut sérologique des troupeaux vis-à-vis de cette maladie.
- **biotechnologies** : le recours à l'ELISA-Ag, et PCR quantitative est une nécessité afin de déterminer le statut excréteur des animaux.

CHAPITRE 1

HISTORIQUE

Le premier génotype de *pestivirus* identifié fut le CSFV, mis en évidence au XIX^{ème} siècle aux USA [20]. Le virus du BVD a été isolé et identifié pour la première fois en 1946 [21], dans le cadre d'une infection de nature épidémique, avec des diarrhées aiguës de gravité moindre sur des bovins adultes. On parlait alors de « grippe intestinale ». Quelques années plus tard, ce virus a de nouveau été isolé mais cette fois-ci sur de jeunes bovins de 6 mois à 2 ans. L'infection était alors de nature sporadique, avec une létalité de 100%, de la diarrhée et des ulcères buccaux. A l'autopsie, les lésions étaient nombreuses caractérisées par une stomatite marquée et des ulcères sur tous les épithéliums pavimenteux malpighiens. Ce tableau clinique et lésionnel fut appelé « maladie des muqueuses » [22]. Dans les années 60, les deux entités que sont la maladie des muqueuses et la diarrhée virale bovine sont reconnues comme étant dues à un même agent [23].

En 1959, la Border Disease ou maladie des frontières fut décrite pour la première fois chez des moutons [24] dans la région frontalière (BORDER) de l'Angleterre avec le pays de Galle, d'où le nom donné à cette maladie. En Europe, elle a été détectée dans les îles Britanniques [25.24.18.26]. Puis en Suisse [27], en Allemagne [28.29], en Grèce [30], en France [31], ainsi que plusieurs autres pays dans le monde.

Dans le début des années 1960, une parenté antigénique entre le CSFV et le BVDV a été établie [32]. Quelques temps après, des réactions immunitaires croisées entre la peste porcine classique, la diarrhée virale bovine et la Border Disease ont été mises en évidence [33]. Et en 1967, Dickinson et Barlow ont obtenu la transmission expérimentale de cette maladie en inoculant des brebis pleines avec des broyats de rate et de cerveau d'agneaux atteints. Cette expérience a démontré l'étiologie infectieuse de la Border Disease [34], et quelques années après, une autre étude a démontré que les *pestivirus* peuvent franchir la barrière des espèces, où Ward en 1971 a inoculé le virus de la maladie des muqueuses (virus BVD/MD) à des brebis ce qui a provoqué chez ces dernières des troubles de la reproduction [35].

C'est vers la fin des années 80, début des années 90, que le développement des outils de diagnostique a permis de révolutionner la compréhension de la diarrhée

virale bovine et de mettre au point des méthodes de diagnostique et de dépistage adaptées. Cependant, les *pestivirus* n'atteignent pas seulement les animaux domestiques, ils peuvent également infecter les animaux sauvages [11]. Ils ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces d'artiodactyles comme l'isard, le chamois ainsi que d'autres espèces animales.

CHAPITRE 2

EPIDEMIOLOGIE DE LA BORDER DISEASE

Comme ce sont des virus très répandus dans le monde, l'étude de leurs caractéristiques épidémiologiques est primordiale pour mettre en place des plans d'éradication, comme c'est déjà le cas dans plusieurs pays.

2.1. Epidémiologie commune à la BD et au BVD/MD

La BD et le BVD/MD sont deux maladies dues à un même genre viral, présentant ainsi des caractéristiques épidémiologiques en commun.

A cause de leur mode de transmission, de l'irrégularité de leur période d'incubation, de la fréquence des infections inapparentes ou non diagnostiquées et de la présence d'IPI, l'épidémiologie des pestivirus reste complexe.

2.2. Espèces hôtes des pestivirus

Les *pestivirus* infectent naturellement seulement les artiodactyles. Parmi les espèces domestiques concernées, on note les ovins, les bovins, les porcins, les caprins, les cervidés, ainsi que certains camélidés (lama, chameau, alpaga). Cela dit, d'autres espèces de ruminants peuvent être infectées (chamois, mouflons...) [36.37].

2. 3. Transmission

2. 3.1. Sources de virus et modes de contamination

Plusieurs sources sont indiquées :

a. Infectés permanents immunotolérants IPI

C'est la source principale de virus, permettant une transmission horizontale grâce à l'excrétion de grandes quantités de virus tout au long de leur vie [38.39.40], par toutes les sécrétions du corps, particulièrement : la salive, le jetage, l'urine, les fèces, le placenta, de fluides utérins. Le virus a notamment pu être isolé d'écouvillons nasaux, génitaux, conjonctivales, d'aérosols. L'inhalation ou l'ingestion sont les modes les plus fréquents de contamination horizontale. Par conséquent, les élevages favorisant les contacts nez à nez sont particulièrement à risque [40]. Chez

le mouton, il a été montré que les agents viraux peuvent infecter efficacement un nouvel hôte à travers les muqueuses, même si les membranes sont intactes [37]. Si les IPI femelles arrivent à se reproduire, elles donneront naissance à d'autres IPI assurant ainsi une transmission verticale (chez les ovins plus que chez les bovins).

b. Infectés transitoires

Les individus infectés transitoirement peuvent aussi être source de contamination, mais il est communément admis que leur virémie de courte durée, environ de 10 jours [41], fait d'eux une source très minoritaire.

Cependant, il existe des exemples où malgré l'élimination des IPI, l'infection par le BVDV dans un troupeau persistait parfois jusqu'à 2 ans après l'élimination du dernier IPI [42].

c. Mâles infectés

Le virus peut être présent dans la semence de mâles contaminés, utilisée pour les inséminations artificielles. La qualité de cette semence est en générale altérée et peu fertile mais hautement infectante. Même chose pour le transfert d'embryons contaminés qui peut être une autre source de virus. Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté l'existence de virus dans les tissus reproducteurs après une infection aiguë, jusqu'à 60 jours post-infection dans du tissu ovarien et 7 mois dans la semence de mâle [43].

d. Actes d'élevage

L'injection à l'aide de seringues contaminées, le tatouage, la castration, le biberonnage et la palpation transrectale sont des actes pouvant être à l'origine de la transmission de la maladie [44.45.46]. Les vaccins à virus vivants modifiés préparés sur des cultures cellulaires originaires de ruminants ont un grand risque d'être contaminés par du *pestivirus* et constituent donc une source supplémentaire de virus [47]. Un cas similaire a été rapporté en Tunisie où des épidémies de BD ont été enregistrées, liées directement à l'utilisation de lots de vaccins contaminés anti-clavelée [48]. Comme cela a été rapporté en Norvège lors d'une vaccination contre l'ecthyma contagieux [49].

e. Insectes et d'autres vecteurs

Une transmission indirecte peut survenir par le biais de vecteurs mécaniques (Insectes ou personnes et matériel) [37].

2. 3.2. Expansion de la maladie

D'après plusieurs études de pestiviroses, la dissémination du BDV parmi les ovins et le BVDV parmi les bovins dépend de certains facteurs tels que le type de production, la taille du troupeau, la saison de reproduction et de la conduite d'élevage.

a. Conditions d'élevage et densité animale

Les moutons maintenus en bâtiment avec un contact nez-à-nez [40.50] sont plus exposés au virus que les animaux élevés en plein air. Dans des conditions extensives, la dissémination de la maladie peut ainsi prendre jusqu'à 1an [51]. Même constat pour le BVDV [52], où des transmissions indirectes se produisent régulièrement entre les bovins qui sont séparés par moins de dix mètres [46]. Enfin, le regroupement pendant le début de gestation constitue également un facteur favorisant chez les ovins [53], faisant de la BD une maladie saisonnière.

b. Partage de pâtures et transhumance

Le fait d'avoir assisté à une transhumance représente un facteur de dissémination de *BDV*, plusieurs épidémies le confirment, on peut citer :

En Suisse : les pâturages alpins représentent un excellent moyen de mélange des individus [54], optimisant la dissémination du virus. La prévalence de ces troupeaux de moutons était estimée à 80% contrairement aux animaux qui n'étaient pas en contact avec d'autres troupeaux (27.4%). Le risque d'introduction d'un IPI est aggravé par les pratiques de marché intensif et de la transhumance qui concernent 25% du cheptel [55.56].

En Inde : En effet, Mishra et al. Indiquent dans leur étude de 2008 qu'une haute similarité génétique a été constatée alors qu'il y avait une distance importante entre les fermes suggérant ainsi que cette similarité était le résultat de mouvements incontrôlés des individus et de l'utilisation de semence pour la reproduction locale [57].

En Autriche : le rôle de la transhumance dans l'augmentation du risque de transmission d'agents de maladies infectieuses entre les différentes espèces a été mis en évidence dans le pays [9].

En Syrie : selon une étude réalisée dans le pays, la distribution des anticorps anti-BD semblait être liée à deux aspects : la gestion des troupeaux et la distance de transhumance [58]. Et la prévalence élevée enregistrée dans ces troupeaux transhumants pourrait être liée à un risque plus élevé de contacts avec des IPI. De même, le stress dû au logement dans des abris humides et mal ventilés peut faciliter l'apparition de l'infection par rapport à ceux des zones sèches. Cela a été lié à l'inactivation rapide du virus par dessiccation.

c. Présence d'IPI dans le troupeau

La source de virus peut influencer le taux de transmission entre les troupeaux par conséquent leur infection survient surtout lors de l'achat d'un IPI ou d'une femelle gestante portant un IPI [59].

d. Souche virale

Chez les ovins, une lente dissémination du BDV pourrait être liée à la souche infectieuse [50].

e. Taille du troupeau

La prévalence d'anticorps est positivement corrélée à la taille du troupeau [60.61], et cela pour les deux maladies (BD, BVD). Les raisons sont inconnues, probablement à cause d'achats plus nombreux ou parce qu'ils ont plus de contacts avec d'autres animaux.

f. Autres facteurs de risque

Une étude faite aux Pays-Bas a analysé l'effet de certains facteurs de risque potentiels sur la dissémination de virus, mais aucun de ces derniers (présence de bovins dans l'exploitation, de chiens, l'occurrence d'avortements chez les moutons, l'achat de ruminants) n'a été significatif [62].

2.3.3. Présence d'IPI et répartition des anticorps en fonction de l'âge

En général, le nombre d'individus séropositifs dans un troupeau augmente avec l'âge [63]. Dans une étude réalisée au pays Basque, plusieurs IPI ont été détectés dans un groupe d'ovins âgés entre 5 mois et 3 ans, et la séroprévalence des moutons en contact était de 29% et 33% dans deux groupes âgés de 5-6 mois, 67 et 88% chez les agneaux d'un an, plus de 86% chez les moutons plus âgés [64]. Même constat retrouvé chez les bovins avec le BVDV [50]. Ces résultats montrent que la transmission peut être relativement lente, prenant plusieurs années avant que l'infection ne se répande. Et les IPI peuvent survivre jusqu'à l'âge adulte et peuvent avoir une descendance infectée avant d'être identifiée comme IPI [40]. De ce fait, il est nécessaire de prendre en compte les ovins adultes dans la recherche d'IPI dans un troupeau. La tranche d'âge de ces animaux a été rapportée dans plusieurs études, comme celle de Rufenacht et al, où 100% des IPI avaient moins de 30 mois [63]. Et Houe rapporte que 82,9% d'IPI au Danemark et 71,4% d'IPI dans le Michigan avaient moins de 24 mois [65]. Même constat rapporté par Presi et al où le taux d'IPI était estimé à 80% (sujets moins de 24 mois, avec une moyenne d'âge de 9 mois) [66].

2.4. Répartition et prévalence du BD/ BVD

2.4.1. BDV

a. Présence dans le monde

Dans les premières années qui ont suivi sa description et sa première identification, la BD a été décrite dans de nombreux pays, comme la Grande-Bretagne, en Nouvelle-Zélande, aux États-Unis, Australie, Ecosse, Irlande, Suisse, Grèce, Pays-Bas, Norvège, Allemagne, Syrie, en France, Suède, Italie, Hongrie, Danemark, Australie, Canada, Niger, Israël et Tunisie. C'était même une cause majeure d'avortement ovin au pays Basque, rapporté dans diverses provinces d'Espagne [67.64].

b. Répartition des différents géotypes

Les 7 géotypes identifiés sont représentés dans le tableau 2.1

Tableau 2.1 : liste des principaux sous groupes de BDV selon le génotype et l'ordre d'apparition

N°	Nom du sous groupe	Pays d'origine	Référence bibliographique
1	BDV-1	USA Angleterre	[8]
2	BDV-2	Allemagne	[10]
3	BDV-3	Suisse Autriche Allemagne	[68] [71] [10]
4	BDV-4	Espagne	[69] [70]
5	BDV-5	France Aveyron La région PACA	[71]
6	BDV-6	France Aveyron La région PACA	[71]
7	BDV-7	Italie	[72]

Cela dit, des souches virales ont été isolées dans un lot de vaccins atténués contre les poxvirus ovins tunisiens, classés ainsi parmi les BDV-Tunisian [48]. De plus, en Turquie deux souches ont été mises en évidence, qui seraient classées dans un nouveau sous-groupe appelé « BDV-Turkey » [73].

2.4.2. BVDV

La répartition et la prévalence du BVDV-1 et du BVDV-2 sont différentes et la répartition des sous-espèces est particulière à chaque pays, voire chaque région. Le tableau 2.2 présente un récapitulatif des espèces et sous-espèces de BVDV retrouvées dans différents pays.

a. BVDV-1

La présence de BVDV-1 chez les bovins a été détectée dans le monde entier. En Europe, de nombreuses études sur l'identification des isolats ont été réalisées notamment en Europe de l'Est, l'Autriche, la Suisse ou l'Allemagne [37].

b. BVDV-2

Le BVDV-2a, quant à lui, été identifié pour la première fois aux États-Unis et au Canada en 1993 [74.75]. C'était alors un variant émergent devenu très commun en Amérique du Nord depuis les années 80, mais qui est plutôt rarement décrit en Europe. Son identification reste sporadique.

Le BVDV-2b cependant été identifié en Europe plusieurs fois [76.77.78.79], au Japon [80], en Corée [80], en Chine [81], en Inde [57], et en Amérique du Sud [82].

Tableau 2.2 : répartition des différentes espèces et sous-espèces de BVDV dans plusieurs pays [37]

Pays	BVDV-1											BVDV-2		
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	a	b
Suisse		X			X			X			X			
Autriche	X	X		X	X	X	X	X			X			
France	X	X		X	X							X	X	
Italie	X	X		X	X	X		X		X			X	
Allemagne				X	X	X	X						X	
Danemark						X								
Portugal						X								X
Espagne						X								
Slovaquie						X								X
Royaume-Uni						X							X	
Belgique						X							X	
Australie			X										X	
États-Unis	X	X											X	X
Japon	X	X	X										X	
Argentine						X							X	
Brésil						X								X
Inde		X	X										X	X
Syrie						X							X	

2.5. Séroprévalence des infections à pestivirus

Les différentes séroprévalences de l'infection à BD et à BVDV sont présentées respectivement dans les tableaux 2.3 et 2.4.

2.5.1. Séroprévalence de l'infection par le BDV

La séroprévalence de troupeau = Pourcentage de troupeaux possédant au moins un individu séropositif.

La séroprévalence individuelle = Pourcentage d'individus séropositifs parmi la population du pays.

En ce qui concerne les ovins, la séroprévalence est très variable. Elle est parfois nulle, et l'infection peut présenter une répartition géographique bien particulière. Cependant elle peut varier de 5 à 50% selon les pays ou les régions d'un même pays [82.83]. En Europe, elle peut aller de 4,5% à 65% à l'échelle individuelle et de 8,3% à 67% à l'échelle du troupeau. Des variations géographiques marquées ont été notées dans plusieurs pays [60].

a. Espagne

L'étude de séroprévalence de la BD a été menée dans plusieurs régions du pays (tableaux 2.3), et cette infection était considérée comme la deuxième cause la plus commune des avortements (27%) [85].

Tableau 2.3 : différentes études de séroprévalence en Espagne

Région d'étude	Année d'étude	Séroprévalence du troupeau	Séroprévalence individuelle	auteurs
péninsule ibérique	2002	39-50%	17-18%	[67]
Castille et León et de Castille-la Mancha	2006	–	8 à 93%	[70]
Bizkaia/ Araba	2006	54-55% à 93%	-	[64]
Madrid	1989	50%	-	[67]
Castille-Leon	1989	48%	-	[67]
Asturie	1989	10%	-	[67]
Différentes régions d'Espagne	2008	17,6%	-	[70]

b. Autriche

29,4% sur le plan individuel et 62,9% au niveau du troupeau sont enregistrés avec des variations régionales variant de 23,8% en Basse-Autriche à 89,1% au Tyrol. Ces différences régionales constatées peuvent être dues aux pratiques d'élevage et à la géographie [9], car ces troupeaux partagent les pâtures alpines depuis des centaines d'années.

c. Pays-Bas

La séroprévalence chez les petits ruminants est d'environ 45% aux Pays-Bas ; au niveau individuel, la plupart des fermes ont un taux inférieur à 10%. Même valeur à l'échelle du troupeau, que ce soit pour le BVDV ou le BDV est enregistrée [62].

d. Québec

Un taux de 10.9% est relevé avec des variations significatives en fonction des régions [86]. Cette étude a montré la circulation de BDV au Québec malgré l'absence de signe clinique de cette maladie.

e. Royaume-Uni

Avec un taux supérieur à 90% [60.61].

2.5.2. Prévalence en IPI

Il est à noter que le plus grand taux d'IPI est trouvé chez les bovins comparé aux ovins [87].

Cette prévalence d'IPI est estimée entre 0,3% et 20% dans le monde, chez les troupeaux présentant des signes cliniques de BD [70]. Mais c'est surtout en Espagne que ces informations sont fournies où la prévalence parmi ces troupeaux était de 0,3 et 0,6% [70], en concordance avec les résultats que trouvèrent Berriatua *et al.* en 2004 [64] entre 0,5 et 0,7%.

Tableau 2.4 : séroprévalence et viroprévalence de l'infection par le BDV d'après la synthèse d'ELOISE Georgina, (2011) [37]

Pays	Prévalence troupeau (%)	Prévalence individuelle (%)	Prévalence en IP (%)	Prévalence de lait de tank (%)	Référence	Remarque
Tunisie	90	54			[88]	
Autriche -	62,9b	29,4b	0,32		[89]	
Espagne	10-93b 9c	4-21b 0,24f 7,1f 38,6d+f	0,3-20	54-55 à 93	[70] [90]	Abattoir Pris au hasard Engraissement
Pays-Bas		45d 28e			[62]	
Argentine		70a			[91]	
Turquie		2e			[73]	
Allemagne		30,2b			[9]	
Suède		1,1b			[9]	
Norvège		4,5b			[9]	
Irlande du nord	30,4b	5,3b			[60]	
Royaume-Uni		10,8b			[9]	
Egypte		27,5g			[92]	

a Séroprévalence, méthode non précisée

b ELISA-Ac = animal séropositif

c PCR-RT = animal viropositif

d ELISA-Ag = animal viropositif

e Neutralisation virale = animal viropositif

f IPMA= animal viropositif

g animal séropositif =

2.5.3. Séroprévalence de l'infection par le BVDV

Dans les années 90, la séroprévalence de troupeau variait de 28% en Norvège à 100% dans plusieurs pays (Belgique, Danemark, Suisse, États-Unis, Chili) [40]. Cependant, avec la mise en place de plans d'éradication, notamment dans les pays scandinaves et en Suisse, les valeurs de séroprévalence et de prévalence en animaux viropositifs ont beaucoup diminué [66].

a. Suisse

Avant la mise en place de plans d'éradication, la séroprévalence n'avait pas beaucoup changé depuis 30 ans dans le pays. La vaccination y était utilisée rarement. Dans cette situation, la séroprévalence retrouvée était d'environ 60%. Aucune ferme n'était indemne. Depuis la mise en place d'un plan d'éradication en 2008, la séroprévalence a beaucoup diminué ainsi que le nombre de nouveau-nés viropositifs qui a diminué de 1,8% à moins de 0,2% [66].

b. Argentine

En Argentine, la séroprévalence du BVDV chez les bovins adultes est d'environ 70% [91].

c. Corée du Sud

La séroprévalence individuelle est estimée à 58%. En termes de prévalence d'animaux viropositifs, par contre aucun IPI n'a été détecté par PCR-RT, mais ces auteurs précisent que lors d'une autre étude réalisée en Corée, 20 des 254 fœtus avortés testés étaient positifs par PCR-RT en virus BVDV [94].

d. Inde

Dans les années 80, la séroprévalence était de 40,6% [94]. Ensuite, dans une étude réalisée de 1999 à 2004, une séroprévalence de 30% a été retrouvée. Dans une autre étude datant de 2008, les auteurs trouvèrent une séroprévalence de 37,6% [95].

2.5.4. Prévalence des IPI

Parmi la population générale bovine elle est inférieure à 2% en Europe. A l'échelle du troupeau, la présence d'IPI peut être plus élevée [37]. En Italie, 70% des fermes possédaient des IPI, avec une moyenne de 3.9% par ferme [96]. Cela a été justifié par une entrée synchrone de plusieurs gestantes atteintes.

A l'échelle individuelle la population d'IPI générale détectée est plus faible, généralement inférieur à 1% pour la plupart des pays [97.65.98].

Tableau 2.5 : séroprévalence et viroprévalence de l'infection par le BVDV

Pays	Prévalence troupeau(%))	Prévalence Individuelle(%)	Prévalence en IPI (%)	Prévalence de lait de tank (%)	Référence
Maroc	44	[92]
Belgique	100 a	66 a	[99]
Danemark	100 a	64 a	[99]
Pays-Bas	...	65 a	[99]
Pologne	...	86 a	[99]
Ecosse	...	78 a	[99]
Slovénie	...	17 a	[99]
Espagne	86 a	21 a	[99]
Royaume-Uni	...	65 a	...	95 a	[99]
Suisse ³	...	60 a	0,6 a <0,2 a	...	[100] [66]
États-Unis	80 à 100 a	29 à 91a	<0,3	0 Troup. <100 vaches 12,8 Troup. >500 vaches	[101] [99]
Canada	...	53 a (allaitant) 38 a (laitier)	0,1	...	[99]
Mexique	...	71a (laitier) 63a (allaitant)	[99]
Brésil	90 a	56 a	[99]
Chili	100 a	74 a	[99]
Vénézuela	...	36 a	[99]
Tanzanie	...	34 a	[99]
Egypte	...	49,2	[102]
Inde	...	30a	[95]
Corée du Sud	>99b	58b 0c	[93]
Nouvelle-Zélande	78 a	63 a	[99]

a Séroprévalence, méthode non précisée

b ELISA-Ac = animal séropositif = > « séroprévalence »

c PCR-RT = animal viropositif

d ELISA-Ag = animal viropositif

... : Donnée non disponible

CHAPITRE 3

VIROLOGIE

3.1. Taxonomie

Les *pestivirus* ont longtemps été classés parmi les *Togaviridae* à cause de leur morphologie et de la polarité de leur génome et c'est en 1990 que le comité international de taxonomie des Virus (ICTV) les classe parmi les *Flaviviridae* qui comprennent quatre genres :

Flavivirus, *Hepacivirus*, *Pegivirus* et *pestivirus* et qui contiennent plus de 60 espèces. Le virus de la BD est classé dans [12] :

- **famille** : *Flaviviridae*
- **genre** : *pestivirus*
- **espèce** : onze espèces, classées de A à K (tableau 3. 1)

Depuis 2017, ces quatre espèces à savoir BDV.BVDV-1. BVDV-2. CSFV ont respectivement été renommées Pestivirus A, B, C et D. Sept autres espèces ont été ajoutées au genre, classées de E à K, dont le *Pestivirus* de girafe (*Pestivirus G*), le *Pestivirus* de type Hobi-like (*Pestivirus H*) et d'autres espèces atypiques isolées chez des mammifères sauvages et domestiques. Cette nouvelle classification est en fonction de la composition moléculaire, antigénique et l'hôte récepteur [5]. Le BVDV et le BDV ont des caractéristiques communes, dues à cette appartenance à un même genre, [103. 104], et 134 souches ont été déterminées pour l'espèce BDV [105]. Cependant, il n'existe pas de spécificité d'espèces, et de nombreuses infections croisées ont été décrites [12].

Tableau 3.1 : classification des 11 espèces du genre *pestivirus* selon l'ICTV

Code virus	Abreviation du virus	nomination
A	BVDV1	bovine viral diarrhea virus 1
B	BVDV2	bovine viral diarrhea virus 2
C	CSFV	classical swine fever virus
D	BDV	border disease virus
E	PAPeV	pronghorn antelope <i>pestivirus</i>
F	PPeV	porcine <i>pestivirus</i>
G	GPeV	giraffe <i>pestivirus</i>
H	HoBiPeV	oBi-like <i>pestivirus</i>
I	AydinPeV	Aydin-like
J	RPeV	rat <i>pestivirus</i>
K	APPeV	atypical porcine <i>pestivirus</i>

Les virus de la Border Disease ne sont officiellement pas subdivisés en différentes sous-espèces. Cependant, il ya neuf sous-groupes qui ont été décrits, qui correspondent principalement à des souches isolées chez des moutons ou des petits ruminants sauvages européens (voir chapitre 2 tableau 2.1).

Aucun virus de ce genre n'est une zoonose.

3.2. Caractères morphologiques

Ce sont des virus enveloppés, sphériques, symétriques et petits, mesurant 40 à 60 nanomètres (nm) de diamètre [106, 99]. La capsid est composée de la protéine C et contient un génome entouré d'une bicouche lipidique. Cette enveloppe lipidique, de forme hexagonale, mesurant environ 8 nm. Le cœur mesure environ 30 nanomètres (nm) de diamètre [106].

Un schéma de la structure générale d'un *Flaviviridae* est présenté dans la figure 3.1.

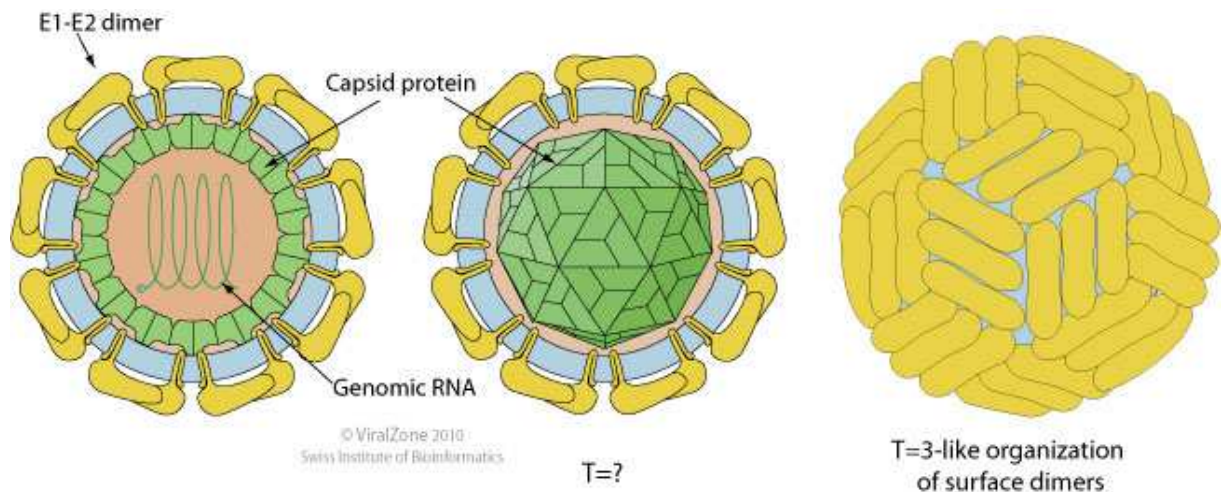


Figure 3.1 : structure générale d'un *Flaviviridae* [107]

3.3. Génétique

3.3.1. Génome

Le génome est un ARN positif monobrin de 12,5 kilobases (kb) de long [108.109]. Codant un seul cadre ouvert de lecture, appelé Open Reading Frame (ORF), encadré par des régions 5' et 3' non traduites (ou UTR pour UnTranslated Region) se terminant par une queue poly C. Cet ORF code des protéines constituées de 4000 acides aminés qui sont ensuite coupées en plusieurs protéines de taille plus petites par des enzymes virales et cellulaires [12.110]. Un schéma du génome et de la conservation des séquences génomiques est présenté par la figure 3.2 qui présente l'organisation du génome et le pourcentage d'identité entre les *pestivirus*.

La région 5' est composée de 360 à 385 bases et la région 3' de 228 bases. Du côté 5'-UTR, l'ORF code notamment quatre protéines structurales qui sont obtenues à partir d'une polyprotéine clivée en plusieurs protéines virales. La partie restante de l'ORF, du côté 3'-UTR, code quant à elle des protéines non structurales [12.110]. Par contre le reste de l'ORF (75% du génome complet) représente des régions non codantes. La région 5'-UTR est hautement conservée car elle code une structure tertiaire permettant l'internalisation du ribosome pour initier la traduction [111]. Un haut pourcentage d'identité est constaté entre les *pestivirus* au niveau de cette région.

La figure 3.2 (a,b) suivante présente l'organisation du génome et le pourcentage d'identité entre les *pestivirus*.

5'-UTR

3'-UTR

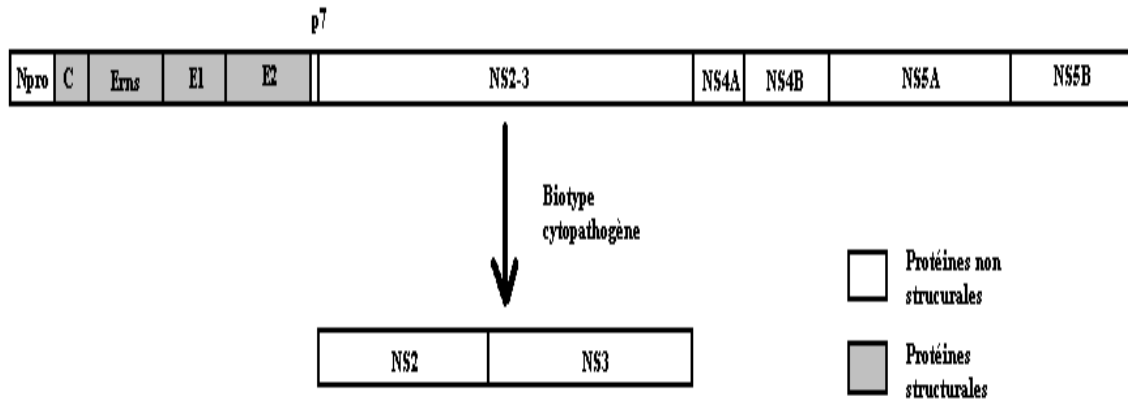


Figure 3.2.a : organisation générale du génome d'un *Pestivirus* [99]



Figure 3.2.b : conservation des séquences génomiques

Les résultats sont un mélange des comparaisons entre les quatre espèces reconnues (BVDV-1, BVDV-2, BDV, CSFV). La ressemblance entre les séquences est représentée par différents niveaux de gris.

3.3.2. Principales protéines virales structurales

Les principales protéines virales sont présentées dans le tableau 3.3. Sur la fin de la région 5' de l'ORF, la première protéine est une autoprotéase nommée p20 (ou Npro), sa seule fonction est de se cliver elle-même. Suivie par une protéine structurale, c'est la nucléocapside C (ou p14) qui constitue la capsid, après on a des glycoprotéines Erns (encore nommé E0 ou gp48), E1 (gp25) et E2 (gp53) appartiennent à la bicouche lipidique et impliquées dans la reconnaissance de l'hôte [110]. Les protéines Npro et Erns sont caractéristiques des *Pestivirus* car elles ne sont pas exprimées chez les autres *Flaviviridae*. D'autre part, il existe un complexe de protéine nommé NS2/3, parfois clivé en une protéine NS2 et une protéine NS3. A son tour, la gp53 (ou E2) est une protéine présente à la surface des virions matures

[112], elle induit une forte réponse en anticorps neutralisants lors d'infection naturelle ou suite à l'utilisation de vaccins. Ainsi, elle est utilisée pour la fabrication de vaccins, par contre la protéine p80 (NS3) est la clef du diagnostic d'une pestivirose par antigénémie ou par recherche d'anticorps anti-gp80. Elle permet de diagnostiquer la présence du virus en cours de réplication [113].

Tableau 3.2 : principales protéines virales des *Pestivirus* [99]

Protéine Virale	Taille estimée (Kilo Dalton)	Caractéristiques	Épitope(s) Neutralisant(s)	Fonction
Npro	20	Non structurale	Non	Autoprotéolyse
C	14	Structurale, hautement conservée	Non	Forme la nucléocapside des virions
E ^{ms}	48	Structurale, 7-9 sites de glycosylation	Oui	Glycoprotéine de l'enveloppe et activité ribonucléoclastique
E1	25	Structurale, 2-3 sites de glycosylation	Non	Glycoprotéine de l'enveloppe
E2	53	Structurale, 4-6 sites de glycosylation	Oui	Glycoprotéine de l'enveloppe
p7	7	Non structurale, région terminale hydrophobe	Non	Inconnue
NS 2/3	125	Non structurale, hautement conservée, NS 2/3 clivée en NS2 et NS3 dans le biotype cytopathogène	Non	Possède un domaine de protéase
NS2	54	Non structurale, hautement conservée, NS 2/3 clivée en NS2 et NS3 dans le biotype cytopathogène	Non	Domaine type en « doigt de zinc »
NS3	80	Non structurale, hautement conservée, NS 2/3 clivée en NS2 et NS3 dans le biotype cytopathogène	Non	Possède un domaine de protéase
NS4A	7,2	Non structurale, hydrophobe	Non	Co-facteur de protéase
NS4B	38-39	Non structurale, hydrophobe	Non	Composante de la réplication
NS5A	55-56	Non structurale, phosphorylée	Non	Composante de la réplication
NS5B	81-82	Non structurale	Non	ARN- polymérase ARN- dépendante

3.3.3. Variabilité génétique

Les *Pestivirus* possèdent une grande variabilité génétique en étant des virus à ARN car ils sont soumis à des recombinaisons et de nombreuses mutations ponctuelles [114] et ils sont dépourvus de mécanismes de correction.

a. Mutations

Une mutation apparaît à chaque cycle de réplication dans le génome d'un virion [115], ce qui peut conduire à plusieurs millions de mutations par jour au pic de l'infection [116]. La plupart de ces mutations concernent la partie du génome qui code la protéine E2. Elles permettent au virus de s'adapter à la pression de sélection exercée par la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, on constate l'apparition de quasi-espèces [117], Ce sont des génomes viraux non identiques mais très proches.

b. Recombinaisons

Le virus du BVDV peut intégrer des morceaux d'ARN originaires d'autres virus ou de l'hôte qui sont responsables du changement de biotype [118].

c. Biotypes

Les *Pestivirus* ont la particularité d'exister sous forme de deux biotypes : un biotype cytopathogène (cp) et un biotype non cytopathogène (ncp).

Le biotype cytopathogène détruit les tapis cellulaires *in vitro*, ce n'est pas le cas du biotype non cytopathogène. La différence entre les deux biotypes d'une même souche tient au fait que des insertions dans le génome de la souche cp entraînent l'expression de la protéine NS3 qui n'est plus fusionnée avec NS2 [119]. Cependant, c'est le biotype ncp qui est prédominant [12] et il est considéré comme le plus important car il est le seul à passer la barrière placentaire. Le biotype cp peut apparaître à la suite d'une mutation du biotype ncp infectant un IPI [120].

d. Sérotypes

Les sérotypes sont déterminés suivant la réactivité des antigènes aux anticorps. Comme pour les biotypes, les *Pestivirus*, présentent une fluctuation importante de leur génome et donc des modifications plus ou moins minimales au niveau des composants externes ou internes du virus, donc des antigènes. Ainsi un anticorps adapté à un sérotype reconnaîtra plus ou moins un autre [20].

3.3.4. Classification sérologique et relations antigéniques

Tous les *Pestivirus* sont à l'origine de réactions sérologiques croisées [121], qui ont été mises en évidence par différentes techniques : la diffusion sur gélose, la neutralisation croisée à l'aide d'antisérum polyclonal et l'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) [106].

a. Réactions antigéniques croisées

Ces réactions permettent de différencier les espèces, mais ne permettent pas de différencier les sérotypes. Et c'est la découverte de souches cytopathogènes qui a permis l'obtention de sérums neutralisants et la caractérisation des relations antigéniques entre les virus isolés de cas de BVD/MD.

Il est à noter que le test de séro-neutralisation reste toujours un test d'actualité [99].

b. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été produits vers la fin des années 80 pour différencier les espèces de *Pestivirus*. Leur spécificité était généralement dirigée contre la protéine E2, la protéine NS3 ou plus rarement contre la protéine E^{ms} [99].

Ils pouvaient à l'époque être séparés en 3 groupes : celui des AcMs spécifiques des *pestivirus* dans leur ensemble (pan-pestivirus-spécifiques), celui des AcMs spécifiques du CSFV, et celui des AcMs qui étaient plus sélectifs parmi les pestivirus. Les AcMs dirigés contre la protéine NS3 ont tendance à présenter une réaction croisée entre les *Pestivirus*, tandis que les AcMs dirigés contre les protéines E2 et Erns sont plus spécifiques des différentes espèces.

3.4. Immunogénicité

Dans les réactions de liaison aux récepteurs cellulaires et de neutralisation c'est la protéine E2 qui est immuno-dominante

- Les différents types d'anticorps (Ac) mis en jeu, ils sont synthétisés par l'hôte infecté [20] :
- Les Ac neutralisant, qui apparaissent précocement (dans les deux premières semaines) ;
- les Ac fixant le complément (IgM), présents 15 à 30 jours après inoculation ;

- les Ac précipitant qui sont eux plus tardifs, apparaissant 30 à 40 jours après inoculation (IgG).

➤ Protection croisée [38] :

Il a été constaté que des brebis ayant été naturellement en contact avec une souche de BVDV sont protégées, pour 50% d'entre elles, contre une souche de BDV l'année suivante.

3.5. Cycle répliatif

C'est au niveau des muqueuses oro-nasales, conjonctivales ou génitales que se fait l'entrée du virus dans l'organisme. Qui a un tropisme pour les cellules épithéliales et les cellules mononuclées sanguines. Une virémie transitoire apparaît deux à quatre jours post-infection ; le virus étant alors libre ou associé aux cellules mononuclées. Chez les ruminants, la protéine E2 est un déterminant majeur pour le tropisme et l'entrée dans la cellule [122]. L'internalisation se fait par un puit d'endocytose et est dépendante de la présence de la clathrine (protéine structurale constituant l'enveloppe des vésicules) [123]. La réplication de l'ARN est associée à la membrane cytoplasmique nécessitant l'intervention des protéines NS3 et NS5B, et certains composants cellulaires. Les protéines sont traduites en une seule longue polyprotéine d'environ 3400 acides aminés, clivée ensuite par des protéases virales et cellulaires. Les protéines structurales C, E^{ms}, E1, et E2 sont encodées au niveau de la partie 5' de l'ORF [123]. Des titres maximaux de virus sont atteints dans les 12 à 24 heures après infection (figures 3.3/3.4).

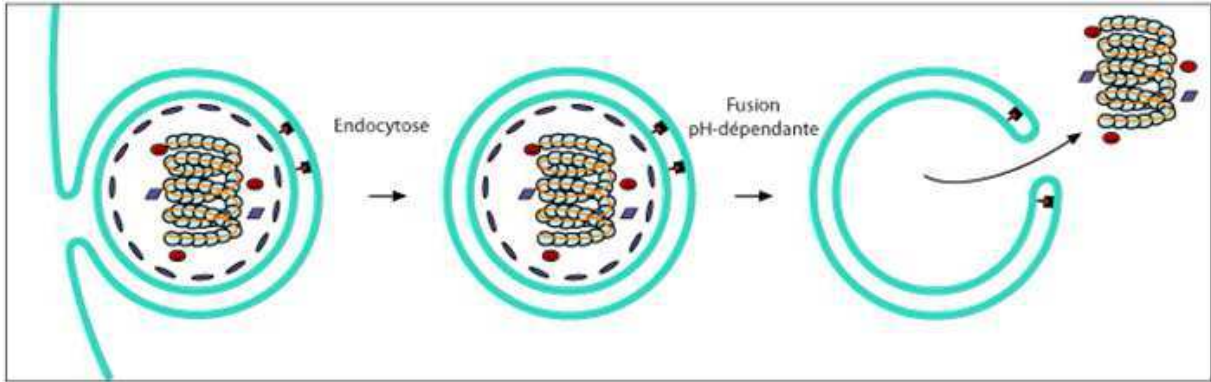


Figure 3.3 : modalités d'entrée des virus enveloppés : endocytose via les vésicules à clathrine, puis fusion des membranes pH dépendante (<http://www.afldd.org>)

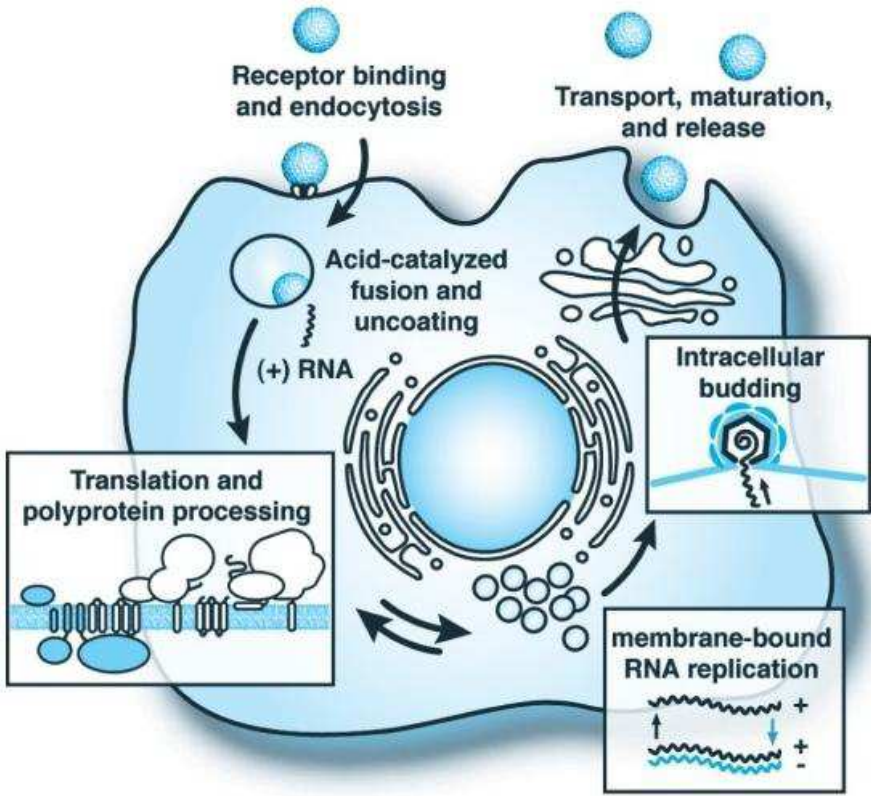


Figure 3.4 : cycle viral des pestivirus [124]

3.6. Infecté permanent immunotolérant (IPI)

Le premier contact du fœtus avec le virus s'est fait lors de la mise en place de son immunité où son système immunitaire commence à reconnaître le « soi » du « non-soi ». Le virus traverse la barrière placentaire. Ainsi le fœtus infecté (par le biais de la membrane placentaire) peut devenir immunotolérant vis-à-vis du virus [103]. Devenant par conséquent une source majeure et permanente d'excrétion virale ; avec peu de symptôme voire aucun, aussi en étant séronégatif vis-à-vis de la souche qui l'infecte. Par contre, parfois à la suite d'une mutation, la souche ncp infectant un IPI devienne cp. Et l'animal surinfecté par cette souche cp déclenche ainsi ce qu'on appelle la « Maladie des muqueuses ». Seuls les IPI peuvent être atteints par cette forme de la maladie.

3.7. Tropisme cellulaire

L'encéphale, le foie, la rate et les poumons sont les localisations préférentielles des *Pestivirus* [125.126.127], et les cellules infectées, sont principalement les cellules du système phagocytaire mononucléée (SPM), épithéliales, endothéliales et des cellules de l'immunité (lymphocytes et monocytes).

Comme on retrouve aussi des antigènes dans la langue, l'œsophage, les cryptes intestinales, la couche basale de la peau, les bronches, les cellules phagocytaires du thymus, les plaques de Peyer, la rate, les amygdales et les nœuds lymphatiques.

3.8. Virulence

Une différence de virulence existe entre les espèces et entre les différentes souches de virus. Dans une étude menée sur la présence de BVDV-2 chez le mouton [128], une corrélation a été établie entre la virulence élevée et deux nucléotides, l'uracile et la cytosine, positionnés respectivement en 219 et 278 de la séquence 5'-UTR. En revanche, cette règle de position n'est pas systématique, car on peut retrouver par exemple des souches hyper-virulentes avec une disposition nucléotidique du type de celle associée à une faible virulence. À l'inverse, une faible virulence a été notée quand ces deux nucléotides étaient inversés.

Cependant dans les souches responsables de BD, ces deux configurations étaient indifféremment présentes et elles peuvent induire différentes formes cliniques [129.40]. Les agneaux IPI ainsi nés peuvent succomber à une pneumonie ou à une maladie entérique, par contre les moutons IPI plus âgés ont montré des signes

systemiques, chroniques, inflammation multifocale comprenant néphrite, myocardite et pneumonie [130].

3.9. Sensibilité des Pestivirus

L'enveloppe lipidique des *pestivirus* est dérivée de la membrane cellulaire de l'hôte ; ce qui les rend sensibles aux détergents et à différents produits d'inactivation (comme les désinfectants usuels tels que les phénols, la chlorhexidine, les hypochlorites et les iodophores, les aldéhydes) [99].

Généralement, les Flaviviridae sont sensibles aux pH bas et aux pH hauts, cependant les *pestivirus* ont la particularité d'être assez résistants aux pH bas et instables à haute température.

CHAPITRE 4

CLINIQUE

Différents noms sont attribués à la Border disease représentant ainsi les différents aspects cliniques sous lesquels on peut rencontrer cette maladie: ainsi, on parle de « hairy shaker disease » ou maladie du tremblement avec hirsutisme, d'hypomyélogénèse congénitale, de « fuzzy lambs » ou agneaux à toison floue, d'encéphalopathie démyélinisante congénitale transmissible, de «congenital trembling» ou tremblement congénital [20].

4.1. Infection d'un individu non IPI, non gestant

L'infection d'un ovin non IPI par un BDV peut être à l'origine d'une maladie dont les formes et la gravité sont variées (sub-clinique à clinique plus ou moins sévère).

4.1.1. Forme sub-clinique

L'infection d'un adulte peut provoquer une courte virémie (détectable quatre à 14 jours post-infection), la plupart du temps elle est inapparente et les individus deviennent immunisés contre une réinfection. Il peut y avoir une légère fièvre transitoire et une leucopénie [19].

4.1.2. Forme clinique plus ou moins sévère

Certains isolats de BDV entraînent des symptômes plus importants comme : un sévère abattement, fièvre marquée, anorexie, conjonctivite, jetage, dyspnée, diarrhée, avortements parfois tardifs, naissance d'agneaux chétifs et peu viables, leucopénie importante et longue pouvant mener à une mortalité de 50% des agneaux âgés de 3 à 5 mois [131]. Un de ces isolats a été retrouvé en Aveyron en France en 1984 chez des ovins laitiers, et la maladie qui lui est due est aussi appelée « Aveyronite » [131].

4.1.3. Infection vénérienne

Parmi les animaux IPI qui arrivent à maturité sexuelle, ceux qui seront mis à la reproduction présenteront une fertilité réduite mais transmettront le virus à leur descendance [38.40].

4.2. Infection d'une femelle gestante

Les conséquences de la primo-infection d'une femelle gestante diffèrent en fonction du stade de gestation au moment de la contamination [132.133] :

4.2.1. Infection foétale

Suite à une virémie de la mère, le virus traverse la barrière placentaire et se distribue ainsi largement dans les tissus foétaux. Cependant, en fonction du stade de développement foetal et par conséquent du degré de maturité de son système immunitaire au moment de la contamination (système fonctionnel à partir du 60ème et complet au 85ème jour de gestation), cela dit les conséquences de l'atteinte foétale seront différentes.

4.2.2. Embryon de moins de 15 jours

Au stade pré-implantatoire, le fœtus n'est généralement pas infecté parce que le virus est éliminé avant qu'il puisse traverser le placenta. Vu que les anticorps maternels apparaissant environ 10 jours après une infection, la virémie peut s'arrêter avant que la caroncule et le trophoblaste ne s'unissent par des villosités (qui se produit vers le 28ème jour de gestation).

4.2.3. Fœtus de 15 à 60 jours

Si le fœtus est infecté avant le développement de son immunocompétence, on pourra observer une mortalité foétale, variable en fonction du degré de pathogénicité de la souche virale impliquée. Si le fœtus survit à l'infection par le BDV, il va se multiplier et persister dans tous les organes sans que cela ne provoque de réaction immunitaire : l'agneau va naître infecté permanent immunotolérant (IPI) et excrètera le virus de façon continue toute sa vie. En fonction de la souche virale en cause, à la naissance, l'agneau IPI est susceptible de présenter des signes cliniques fortement évocateurs de la Border Disease :

- Hypomyélogénèse congénitale :

C'est un déficit généralisé en myéline qui se traduit par des tremblements musculaires voire même du corps entier, de gravité variable, exacerbés quand l'animal est en mouvement. Ces signes diminuent avec l'âge ; pouvant même

disparaître vers 3 à 6 mois d'âge, mais réapparaissent parfois à l'occasion d'un stress.

- Anomalies de la peau et de la toison:

Les agneaux présentent une toison moins dense, à l'aspect hirsute avec parfois des anomalies de pigmentation, brunes ou noires, uniformes ou avec des taches. Ces anomalies touchent préférentiellement l'encolure et la ligne du dos et sont plus visibles sur les races à laine fine et non pigmentée [134].

- Anomalies morphologiques et troubles de la croissance:

En général, les agneaux IPI naissent chétifs et petits, avec un important retard de croissance : à 20 semaines d'âge leur poids est inférieur de 20% à celui d'agneaux sains du même âge [135]. En plus de la mauvaise conformation générale, peuvent s'associer des malformations du squelette: nanisme disharmonieux, prognathisme, brachygnathisme, allongement anormal des membres (pattes de chameau).

- Perturbation du système immunitaire :

L'immunité à médiation immune des agneaux IPI n'est affectée qu'en regard de leur incapacité à produire des anticorps dirigés contre le BDV qu'ils hébergent. La réponse humorale dirigée contre les autres agents pathogènes n'est pas compromise [136] mais l'immunité à médiation cellulaire, elle, est fortement affectée.

4.2.4. Fœtus de 60 à 85 jours

Si le fœtus est infecté durant cette période, on obtiendra, en fonction du degré de développement de son immunitaire, un agneau virémique séronégatif donc IPI ou un agneau séropositif non virémique. La mortalité fœtale liée à l'infection par le virus de la BD est rare au cours de cette période. L'infection virale à ce stade de gestation chez un agneau au système immunitaire compétent peut entraîner une violente réaction immunitaire avec une inflammation et une nécrose des tissus ayant pour conséquence des lésions nerveuses (l'hydranencéphalie, hypoplasie ou dysplasie cérébelleuse, porencéphalie). Certains agneaux souffrent aussi d'anomalies du développement osseux telles que l'arthrogrypose ou des pattes anormalement longues (pattes de dromadaire).

4.2.5. Fœtus de plus de 85 jours

Du point de vue immunitaire le fœtus ovin de plus de 85 jours est mature. Par conséquent, lors d'une infection, la mortalité fœtale liée au virus est rare, les agneaux naissent cliniquement sains, vironégatifs mais séropositifs [38]. Ils sont apparemment en bonne santé et pour la plupart normaux, mais certains peuvent apparaître faibles et peuvent mourir prématurés.

4.3. Maladie d'apparition retardée chez les ovins infectés virémiques persistants

Les agneaux IPI ne produisent pas d'anticorps neutralisants vis-à-vis du BDV, cependant s'ils sont surinfectés par une souche cytopathogène antigéniquement identique à une souche non cytopathogène qu'ils hébergent, ils peuvent développer une maladie similaire à la maladie des muqueuses des bovins [Gardiner 1983, Barlow 1983]. Cette dernière apparaît généralement entre 2 et 21 mois d'âge (mais peut se déclencher très tardivement, vers l'âge de 5 ans [40]).

Les animaux succombent en 2 à 4 semaines après avoir présenté des symptômes digestifs et/ou respiratoires comme une diarrhée incoercible parfois hémorragique associée à un syndrome de dépérissement chronique, jetage nasal et oculaire abondant parfois accompagné de détresse respiratoire.

4.4. Pronostic

- Pour l'animal

Si l'animal infecté par un virus peu virulent est un adulte en bonne santé, il n'y aura pas de répercussion sur lui. En revanche, les conséquences sont importantes lors d'un premier contact du virus avec une femelle gravide : avortement, mortinatalité, mortalité embryonnaire, naissance d'agneaux chétifs ou anormaux.

Par contre si le virus est de virulence élevée, le taux de mortalité peut atteindre 50% surtout chez les jeunes animaux.

- **Pour l'élevage**

C'est la première infection de l'élevage caractérisée par de fortes pertes économiques en raison des nombreux avortements et de la production d'agneaux qui sont des non-valeurs économiques.

Sans pour autant oublier que la circulation virale se fait en général à bas bruit avec peu de répercussions.

La figure 4.1 illustre les conséquences d'une infection congénitale en fonction du stade de gestation:

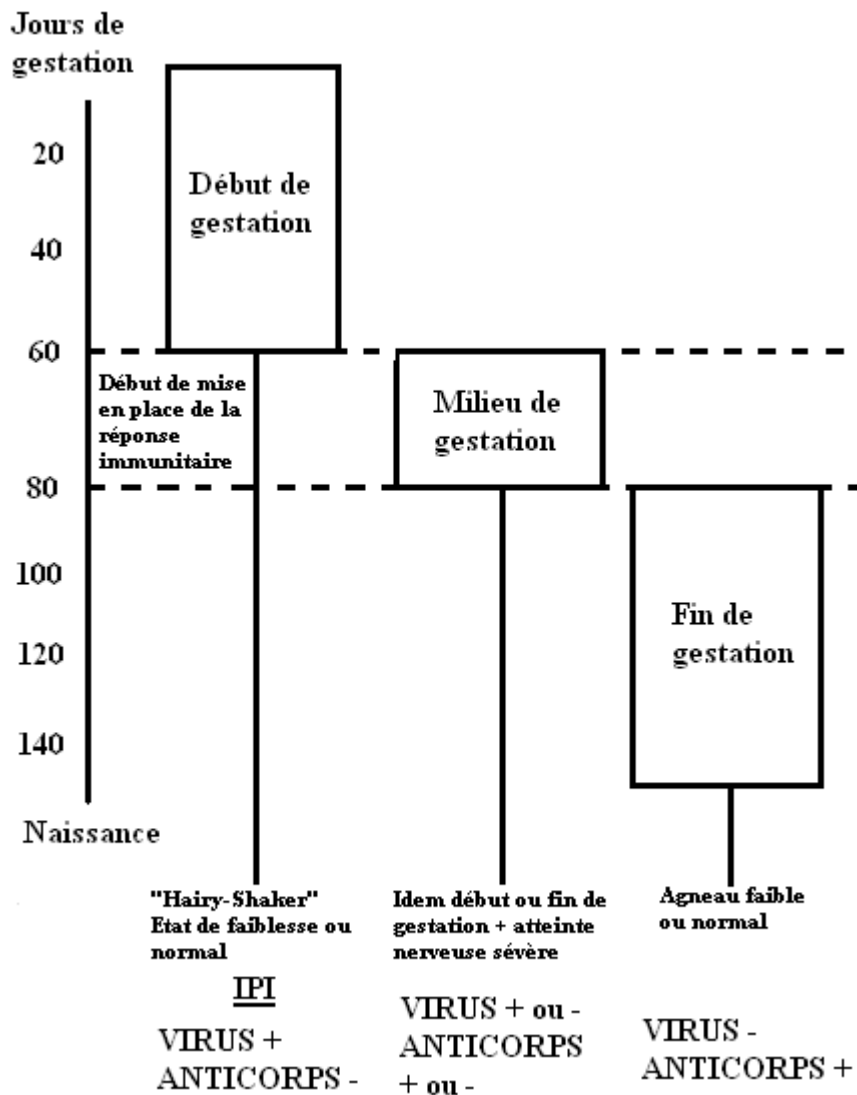


Figure 4.1 : conséquences d'une infection congénitale en fonction du stade de gestation chez les ovins [37].

4.5. Excrétion virale et voies de transmission.

Le virus peut être excrété dans la salive, les sécrétions nasales, l'urine et les matières fécales. Le placenta peut être aussi source de contamination. La brebis IPI présente une fertilité réduite mais, si elle arrive à terme de la gestation, elle produit des agneaux IPI qui excrètent des quantités très importantes de virus. Une transmission de *pestivirus* par des vecteurs mécaniques ou des insectes est possible. De plus, la contamination peut avoir lieu par contact direct avec des troupeaux infectés, par la nourriture ou des points d'abreuvement partagés, ce qui n'est pas sans conséquences dans les alpages notamment.

4.6. Infection expérimentale

Les études sur des infections expérimentales révèlent des symptômes ressemblant à ceux retrouvés sur le terrain, les agneaux sont soit normaux soit plus petits que la normale. Plusieurs expériences ont été faites à savoir : celle de Barlow *et al.* (1983b) [38] qui ont rapporté les signes suivants : diarrhée, abattement, des signes respiratoires, jetage. En 2009, Garcia-Perez *et al* [137] observent de l'hyperthermie et une diminution significative des leucocytes, suite à l'infection expérimentale de brebis avec du BDV-4. Par contre aucun signe d'hydrocéphalies, d'hydranencéphalies ou d'anomalie de toison n'a été constaté.

Les agneaux appartenant aux groupes de brebis infectées tôt au cours de la gestation étaient plus sévèrement affectés. De même, les agneaux du groupe inoculé le plus tardivement étaient de plus grande taille comparés au premier. Par contre un faible taux d'avortements a été constaté. Ils émettent l'hypothèse que cela peut être dû au statut immun des brebis, au moment de l'inoculation et à la dose utilisée. Ils évoquent aussi la possibilité que des facteurs de risque d'avortement habituellement présents dans les conditions naturelles ont été absents dans les conditions expérimentales [19].

4.7. Lésions nécropsiques

Des lésions sont visibles sur l'utérus de la mère et le placenta (inflammation, calcifications, hémorragies, nécrose, œdème,). Chez le fœtus avorté ou l'agneau, on constate parfois des lésions de microencéphalie, hydranencéphalie, avec un nombre anormalement moindre d'oligodendrocytes et un nombre élevé de cellules gliales.

L'apparence hirsute des agneaux est due à l'augmentation du nombre de follicules primaires et à une diminution du nombre de follicules secondaires lorsque l'infection s'est déroulée avant 96 jours de gestation.



Photographie 4.2 : agneaux atteint de BD www.oakhill-vets.com



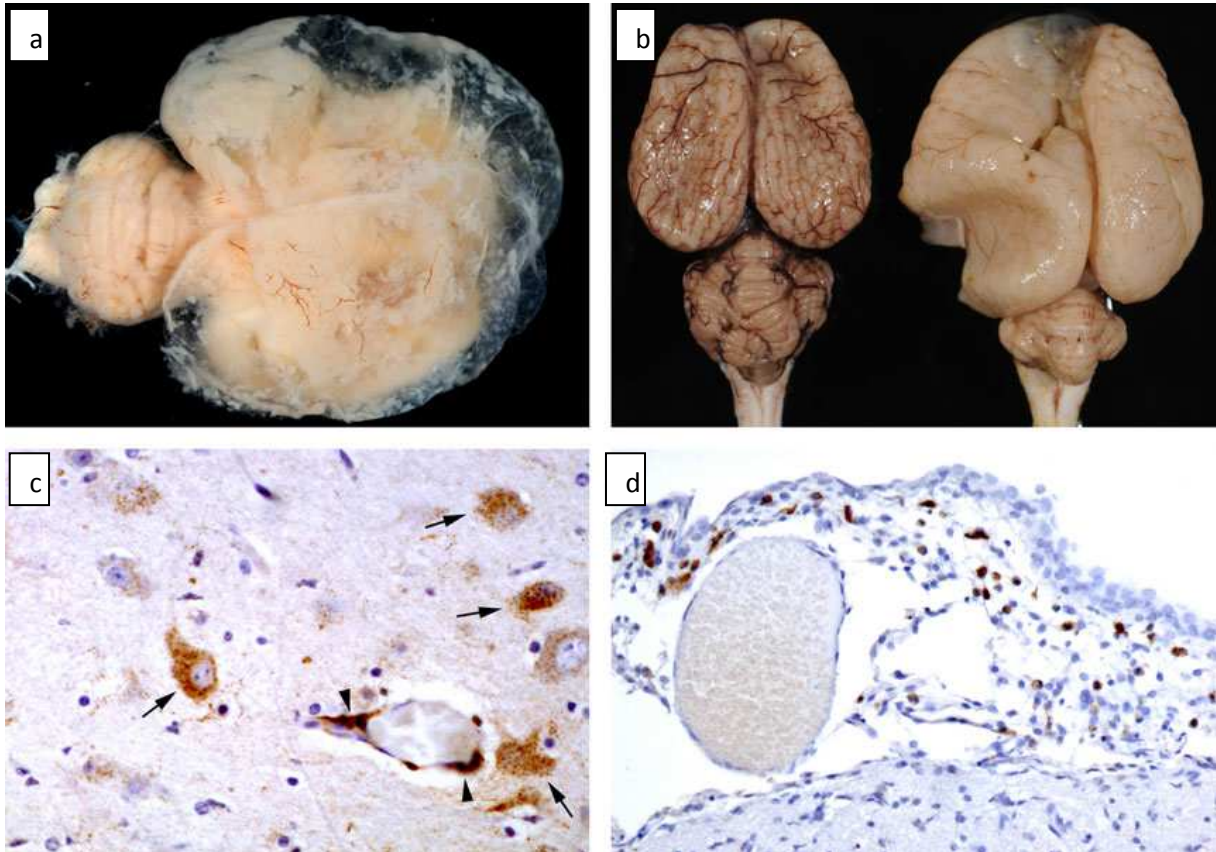
Photographie 4.3 : position caractéristique d'un agneau atteint de BD [53]



Photographie 4.4 : anomalie de toison chez un agneau atteint de BD [139]



Photographie 4.5 : mort-né avec hyperflexion des carpes et tarse et malformations faciales [140]



Photographie 4.6 : coupes histopathologique de cerveaux atteints de BD de gauche à droite [141]

- a- Hydranencéphalie chez un agneau. Le cortex cérébral est réduit à une membrane translucide.
- b- Cerveaux de deux agneaux affectés. Celui de gauche présente une microcéphalie, une polymicrogyrie et un cervelet normal tandis que celui de droite montre une hydranencéphalie et une atrophie cérébelleuse.
- c- Marquage positif de l'antigène pestiviral dans l'endothélium des capillaires cérébraux (pointes de flèches) et du cytoplasme des neurones (flèches).
- d- Marquage positif dans le cytoplasme des cellules rondes des méninges.

CHAPITRE 5

DIAGNOSTIC

5.1. Choix des prélèvements

Les prélèvements peuvent provenir des avortants (rate, foie, encéphale), des houppes cotylédonaires ou sur des nouveau-nés suspects comme les agneaux chétifs malformés, trembleurs, hirsutes avec une prise de sang sur tube EDTA (pour un diagnostic direct) ou tube sec (pour une sérologie pour le diagnostic indirect). Afin de réduire les coûts, des PCR mélange peuvent être réalisées (mélange de 3 organes maximum ou 10 tubes sanguin) [142].

5.2. Méthodes de diagnostic [84].

L'une des méthodes qui s'est avérée la plus sensible pour identifier le BDV reste l'isolement du virus. L'ELISA-Ag et la PCR (classique ou en temps réel), ainsi que l'immuno-fluorescence directe ou les autres techniques immuno-histochimiques sur coupes congelées, sont également valables pour identifier les animaux infectés par le BDV. Et les méthodes indirectes comme ELISA-Ac, séroneutralisation virale.

5.2.1. Diagnostic indirect (Épreuves sérologiques)

Les anticorps dirigés contre le BDV sont généralement détectés dans les sérums ovins par un test de séroneutralisation virale ou un ELISA. L'épreuve d'immunodiffusion en gélose peut aussi être utilisée, mais elle est moins sensible. Des témoins positifs et négatifs doivent être introduits dans toutes ces épreuves. Pour être considérés comme valides, les résultats de ces épreuves doivent être compris dans des limites prédéterminées. Pour déterminer la prévalence de la BD dans un troupeau, une région ou un pays, on peut ne faire qu'une prise de sang. Cependant Les investigations sérologiques ont l'inconvénient majeur de se renseigner sur l'exposition au germe, mais elles ne le détectent pas [143].

a. ELISA-Ac

Les puits de la microplaque sont sensibilisés par un antigène inactif viral. Les échantillons de sérum sont ajoutés aux puits et vont se fixer aux antigènes liés au support solide. Le matériel non lié est éliminé par un lavage après une période d'incubation appropriée. Le conjugué (anticorps couplé à la peroxydase) réagit avec les anticorps spécifiques liés à l'antigène. Le conjugué n'ayant pas réagi est éliminé par lavage après une période d'incubation appropriée. Le substrat d'enzyme est ajouté. Le taux de conversion du substrat est proportionnel à la quantité d'anticorps liés. La réaction est arrêtée après un temps adéquat et la quantité de développement de couleur est mesurée par spectrophotométrie [144].

b. Test de séroneutralisation virale

Pour ce test, une souche cytopathogène de référence comme la souche Moredun, par exemple, peut être engagée dans le test de VNT, réalisé sur des cellules de lignée semi-continu telle que la lignée FLM, suivant les étapes décrites ci-dessous :

- Les sérums à tester et les sérums témoins sont inactivés par chauffage durant 30 min à 56 °C ;
- À partir d'une dilution de départ au $\frac{1}{4}$, les sérums à analyser subissent une dilution sériée de raison 2 dans le milieu de culture placé dans une plaque de micro-titrage pour culture cellulaire à fond plat de 96 puits. Selon la précision que l'on souhaite obtenir pour le test, 2 ou 4 puits sont utilisés pour chaque échantillon et pour chacune des dilutions. La gamme des dilutions peut aussi varier. Habituellement, on fait une première recherche d'anticorps sur des sérums dilués au $\frac{1}{4}$ et on ne poursuit le titrage que sur ceux qui ont donné un résultat positif. Pour ce premier tri des sérums, il faut utiliser au moins 4 puits. Le volume de travail de base est de 25 μ l : 25 μ l du sérum dilué sont déposés dans chacun des puits ; 25 μ l de milieu sont ajoutés à chacun des puits témoins situés en bas de la plaque de titrage et 25 μ l de milieu contenant 100 DICT50 (dose infectieuse 50 % pour la culture tissulaire) de virus sont ajoutés à chacun des puits situés en haut de cette plaque. Des sérums témoins positifs et négatifs doivent être prévus pour chaque épreuve, ainsi qu'un titrage du virus ;

- Les plaques sont scellées avec un film ou un couvercle non toxiques, et incubées 1 h à 37 °C ;
- 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 2×10^5 cellules/ml sont ajoutées à chaque puits. Le sérum de foetus de veau, ou le sérum équivalent utilisé pour favoriser la croissance cellulaire doit être exempt d'anticorps du BDV ;
- La plaque est à nouveau scellée ou incubée en chambre humide à 5 % de CO₂ durant 4 jours à 37 °C ;
- L'effet cytopathogène (ECP) éventuel est recherché au microscope. Le titre de neutralisation virale de chaque sérum est exprimé par la dernière dilution à laquelle le virus a été neutralisé dans 50 % des puits, qui peut-être calculée en utilisant la méthode statistique de Spearman.Kärber. Le sérum d'un animal dit séronégatif ne neutralisera pas le virus à sa dilution la plus faible, c'est-à-dire au 1/4.

Le choix du virus d'épreuve est difficile du fait de la diversité antigénique des *pestivirus* [19].

On peut utiliser des souches de référence de BDV cytopathogènes et de cellules bovines. Les résultats obtenus avec la souche Oregon C24V sont mieux corrélés à ceux obtenus avec la souche Moredun que ne le sont ceux obtenus avec la souche NADL. Il n'y a pas de souche idéale. C'est la souche locale qui donne le titre d'anticorps le plus élevé parmi des sérums d'ovins séropositifs qui doit être retenue.

Pour savoir si les anticorps trouvés dans un troupeau sont dirigés contre un virus appartenant à une séro-groupe particulier de *Pestivirus*. Dans ce cas, on peut recourir à une épreuve de VNT différentielle dans laquelle les sérums seront titrés contre des virus représentant chacun des 4 groupes de *Pestivirus*, à savoir le BDV, les BVDV types 1 et 2, et le CSFV. C'est vis-à-vis du sérotype infectant que le titre du sérum sera le plus élevé, et on aura par la même occasion une idée des réactions croisées existantes avec les autres sérotypes.

5.2.2. Diagnostic direct

a. Immunohistochimie

L'antigène viral peut être détecté dans la plupart des organes d'animaux IPI [145.146]. Cette technique doit être faite à l'aide d'anticorps appropriés, appliqués sur des coupes à congélation de tissus fixées par l'acétone ou sur des prélèvements inclus dans de la paraffine. Les anticorps dirigés contre tous les *pestivirus*, mais ceux

qui sont spécifiques vis-à-vis de NS 2-3 conviennent bien. Les organes qui peuvent contenir une grande quantité d'antigène sont l'encéphale, la glande thyroïde et la muqueuse buccale. Les biopsies cutanées se sont révélées utiles pour le diagnostic *in vivo* des infections persistantes par le BDV.

b. Détection de l'antigène par ELISA

Un double ELISA de capture par 2 anticorps monoclonaux est utilisable chez les ovins et les bovins. Deux AcMs de capture tapissent les puits d'une plaque de microtitrage et deux autres AcMs, conjugués à la peroxydase, servent d'anticorps révélateurs [147]. Cette épreuve est très couramment employée pour identifier les moutons virémiques IPI, à partir de leucocytes lavés provenant de leurs sangs lysé par un détergent. La sensibilité de cette épreuve est proche de celle de l'isolement viral, et c'est une méthode pratique pour trier un grand nombre de prélèvements de sang. Comme dans le cas de l'isolement du virus, de hauts titres d'anticorps colostraux peuvent masquer une virémie persistante. En présence d'anticorps, l'ELISA est plus efficace que l'isolement viral, mais peut donner de faux résultats négatifs chez les agneaux virémiques âgés de moins de 2 mois. Généralement, l'ELISA n'est pas assez sensible pour détecter des infections aiguës par le BDV dans des prélèvements de sang. De même qu'il est utilisé pour détecter le virus dans les leucocytes, l'ELISA peut aussi être utilisée sur des suspensions d'organes, en particulier la rate, de moutons IPI suspects. Plusieurs méthodes ELISA de détection des *Pestivirus* ont été décrites et des kits de diagnostic permettant de détecter le BDV sont commercialisés. Les ELISAs qui utilisent des AcMs reconnaissant les épitopes de la protéine non-structurale NS 2-3, qui est conservée, devraient reconnaître toutes les souches de BDV.

c. Techniques de détection de l'acide nucléique

Pour les 3 BDV, les séquences génomiques complètes ont été déterminées et comparées à celle d'autres *Pestivirus* [148.149].

Le protocole de la PCR-RT classique est le suivant [84] :

1. L'ARN total est extrait par le phénol-chloroforme, le TRIZOL et l'isothiocyanate de guanidine (GITC), par une colonne spin disponible dans le commerce ou par une technique de séparation immuno-magnétique.

2. La PCR-RT est réalisée en deux temps :
 - a. Transcription réverse pour synthétiser l'ADNc à partir de l'ARN viral ;
 - b- Amplification par PCR de l'ADNc pour produire des quantités facilement détectable d'ADN double-brin.
3. Le produit spécifique est détecté par une des techniques suivantes :
 - a. Utilisation des amorces spécifiques du BDV dans la PCR-RT et visualisation après électrophorèse sur gel d'agarose, coloration au bromure d'éthidium et illumination aux rayons ultra-violet pour vérifier que l'amplicon est a la taille requise.
 - b. La PCR nichée qui utilise des amorces reconnaissant tous les *pestivirus* (habituellement dirigées vers la région 5'UTR) dans une première PCR suivie par une seconde PCR (nichée) avec des amorces spécifiques du BDV. Dans ce genre de tests, on compte classiquement environ 25 cycles au cours de la première PCR puis 30 à 35 cycles pendant la PCR nichée. Les amplicons sont détectés par visualisation après électrophorèse en gel d'agarose comme ci-dessus. Ces tests augmentent la spécificité et la sensibilité mais les risques de contamination sont élevés.
 - c. La PCR-RT en temps réel qui utilise des amorces spécifiques du BDV et/ou une sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome pour détecter le virus. Les avantages de cette méthode consistent en sa spécificité et en sa capacité à réduire les contaminations.

La construction des amorces et/ou des sondes oligonucléotidiques est d'une importance considérable pour le succès de ces techniques du fait de la grande variabilité génétique des isolats du BDV. Les amorces qui reconnaissent tous les *pestivirus* sont intéressantes pour dépister et typer toutes les espèces de *Pestivirus* [150.151]. Des amorces spécifiques des BDV ont aussi été décrites [152.153. 154].

CHAPITRE 6

TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

6.1. Prophylaxie et moyens de lutte

Tout traitement étant illusoire, la prophylaxie est le seul moyen de lutte, cependant les programmes prophylactiques n'existent que pour le BVDV, qui a pour but le contrôle et l'éradication de la maladie. Le contrôle aurait pour but de réduire le taux de prévalence à une valeur basse, sans pour autant parvenir à une totale disparition de la maladie, tandis que l'éradication aurait pour but l'élimination de toute circulation de l'agent pathogène. La vaccination est en général utilisée dans un but de contrôle et l'absence de vaccination, associée à des mesures strictes de biosécurité, vise à l'éradication [155].

Plus de 10 pays européens ont mis en place des plans d'éradication contre le BVD/MD dès le début des années 90 (Norvège, Suède, Danemark, Finlande) avec des résultats prometteurs [156].

Ainsi l'incidence annuelle du BVD dans ces pays a diminué à moins de 0,01%, et la prévalence était inférieure à 0,1% [155].

Le programme de contrôle systématique adopté n'utilise pas la vaccination, partagé en quatre phases :

- Une première phase de qualification du statut des troupeaux grâce à divers tests initiaux,
- une deuxième phase d'identification des animaux infectés au sein d'un troupeau,
- une troisième phase de suivi des troupeaux indemnes,
- une quatrième phase comprenant des tests inclus dans plusieurs autres mesures de biosécurité pour éviter toute réinfection.

Les tests de contrôle utilisés sont adaptés à chaque phase.

Durant la première phase, c'est le test ELISA-Ac qui est pratiqué à partir du lait de tank car le niveau d'Ac présent dans le lait de tank est bien corrélé au nombre d'animaux séropositifs dans le troupeau. Par sa haute sensibilité mais sa faible spécificité, ce test est utile pour identifier les troupeaux séropositifs, qu'il détecte

presque à chaque fois, mais il est nécessaire de confirmer les résultats positifs car il est susceptible de donner de nombreux résultats faussement positifs. En revanche, pour savoir si un IPI est toujours présent dans le troupeau, ce test ne sera pas adapté car il faut plusieurs années pour qu'il donne un résultat négatif après élimination du dernier IPI. Dans ce cas, les tests ponctuels des lots d'animaux jeunes sont plus adaptés car il suffit de quelques mois pour que ces lots soient séronégatifs après l'élimination du dernier IPI.

Pendant la deuxième phase, il faut identifier précisément les IPI dans les troupeaux où le test d'animaux jeunes a révélé leur présence. Il faut alors être attentif à d'éventuels signes cliniques évoquant la présence de BVDV. Dans le cas où il n'y en a pas, une procédure répandue est de tester tous les animaux de 3 mois ou plus pour savoir s'ils sont viropositifs.

Cependant, puisqu'on ne connaît pas le statut sérologique des animaux viropositifs, il est impossible d'identifier à coup sûr un IPI. Une autre procédure est alors d'identifier tous les animaux séronégatifs puis de les tester pour la présence de virus. L'inconvénient associé à cette dernière procédure est lié à la possibilité qu'un IPI soit séropositif suite à une exposition à une souche hétérologue.

Pour le suivi des troupeaux indemnes de BVDV, les méthodes sont similaires à celles utilisées pour établir le statut du troupeau (première phase). Chez les troupeaux vaccinés, garder quelques individus non vaccinés permet de mettre en place des sentinelles car le profil en Ac est le même chez les animaux des troupeaux vaccinés et non vaccinés contenant un IPI.

Dans un programme qui pour une raison ou pour une autre ne peut appliquer ce système, la vaccination systématique suite à la sortie du dernier IPI est utilisée pour minimiser le risque de dissémination de virus dans le troupeau. Les diverses phases évoquées dans cette approche sont toujours présentes. Comme la vaccination peut interférer avec le test sur lait de tank, il faut alors laisser quelques animaux non vaccinés en guise de sentinelle dans les troupeaux ayant éliminé le dernier IPI.

6.2. Moyen de lutte chez les ovins

Ayant le même objectif, le succès de la lutte contre la pestivirus ovine dépend de l'identification suivie de l'élimination des IPI et de l'immunisation des reproductrices avant la première gestation. La présence d'une immunité maternelle protège le fœtus d'une infection par un *pestivirus* homologue [157].

Le contrôle de l'infection par le BDV dépend en partie de l'excrétion de l'infection dans un troupeau :

- Si les épisodes sont sporadiques, ils peuvent être maîtrisés par le retrait et l'abattage des animaux suspectés d'avoir introduit l'infection, avant la saison de reproduction suivante.
- Si le troupeau est infecté de manière enzootique, les animaux destinés à la reproduction devraient être exposés, en dehors de la saison de reproduction, à l'infection par des animaux connus pour être des infectés persistants, et un contact étroit au minimum de trois semaines est nécessaire pour avoir la certitude que la transmission a bien eu lieu avant le début de la saison de reproduction.

Par contre dans des élevages reconnus indemnes, il faut surveiller l'introduction de nouveau sujet dans les troupeaux. Idéalement, les brebis de remplacement devraient provenir de l'élevage lui-même et les béliers de provenance extérieure devraient être soumis à un examen sanguin pour s'assurer qu'il ne s'agit pas d'IPI. Les brebis de provenance extérieure devraient être saillies et maintenues à l'extérieur du troupeau jusqu'à l'agnelage.

6.2.1. Gestion sanitaire

a. Sérologies sur sérum

Si on prend l'exemple du Bassin Roquefort, des sérologies annuelles sont réalisées dans tous les élevages ovins sur les prises de sang de prophylaxie (essentiellement printemps-été) :

- Dans un cheptel connu séronégatif : sérologies par mélange de 5 sur 35 brebis (sans distinction de classe d'âge).
- Dans un cheptel connu séropositif : sérologie par mélange de 5 sur 35 agneaux ou agnelles de 6 mois à 1 an afin de savoir si le virus circule dans le troupeau.

On peut ainsi donner un statut sanitaire BD à chaque troupeau : "troupeaux Virus (+)" et "troupeaux virus (-)".

De plus, un 2ème dépistage annuel est réalisé en cheptel laitier : analyse sérologique (kit Pourquoiier p80) sur un lait de mélange en hiver, avant la rentrée des agneaux en bergerie d'engraissement.

b. Éradication de la maladie : il faut éliminer les I.P.I.

Dépistage par PCR mélange de 20 PS (tubes secs ou EDTA). Afin de réduire les coûts, en cas de résultat positif, on fait une PCR sur des petits mélanges de 5, puis reprise individuelle. Une 2ème PCR, 1 à 2 mois après, peut être réalisée afin de savoir si c'est un IPI ou un Infecté transitoire. Le plus souvent les virémiques sont éliminés à la 1ère PCR.

c. Prévention

Il n'existe pas de vaccins spécifiques contre les pestiviroses 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 et le protocole vaccinal n'est pas clairement déterminé. Comme vaccins utilisés, on a le vaccin Bovilis® BVD et le vaccin Mucosiffa, au 1/3 ou mieux, à la ½ dose bovine [158], un à deux mois avant la mise à la reproduction, dans le but de protéger les brebis et d'éviter toute infection trans-placentaire [159]. Cependant des vaccins expérimentaux et commerciaux utilisant du BDV complet et inactivé ont été produits en Europe [145.160]. Cependant des échecs à la vaccination peuvent être observés avec des souches de *pestivirus* différentes des souches vaccinales [157].

La vaccination peut être associée à l'élimination des IPI. On surveillera la circulation du virus en réalisant des sérologies sur les agnelles avant vaccination. Lorsque le virus ne circulera plus, par précaution, on vaccinera les animaux pendant encore deux ans.

d. Protection d'un troupeau sain

Les achats ne seront faits que dans des troupeaux sains

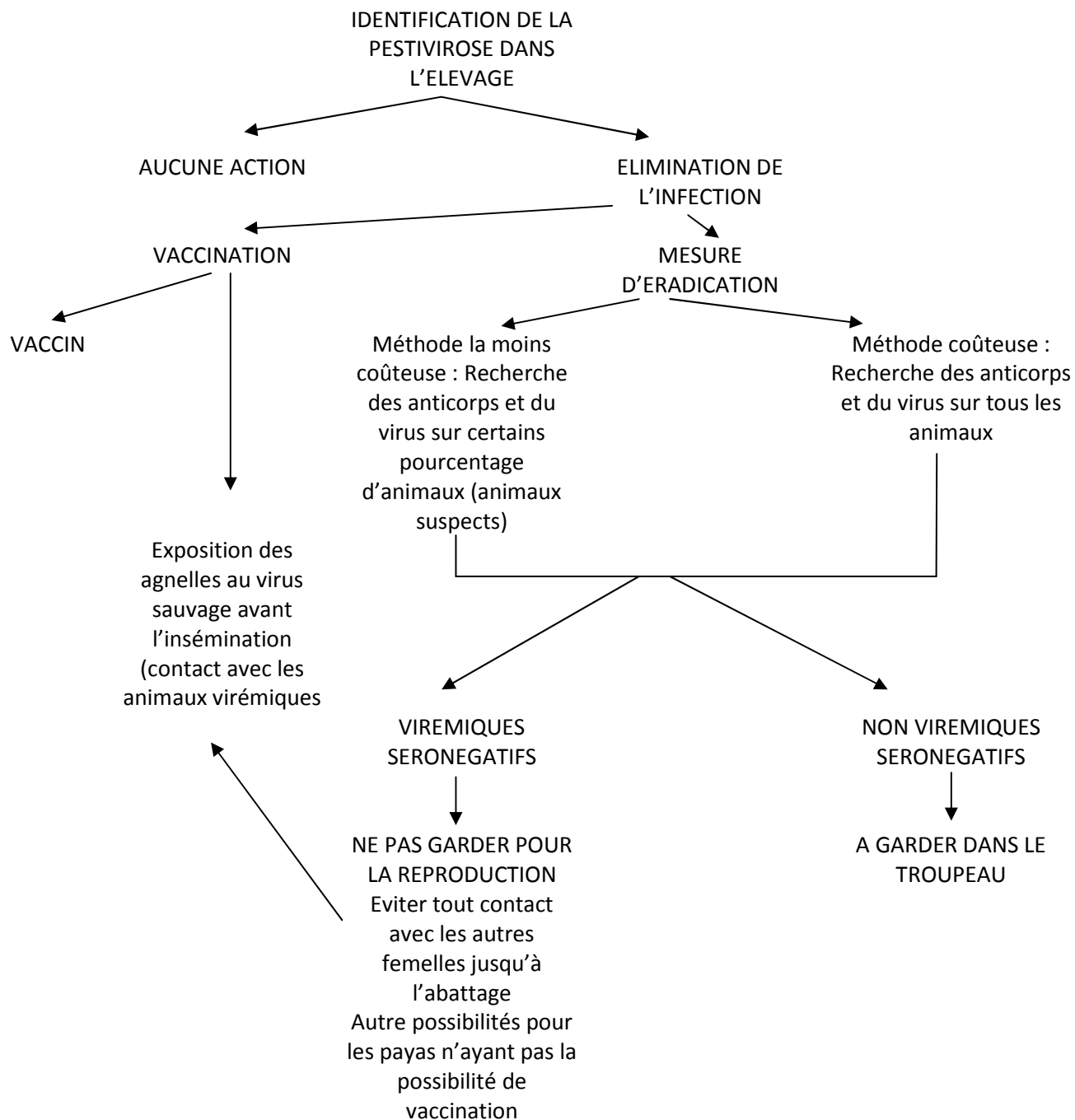


Figure 6.1 : moyen de lutte contre la pestivirose ovine [161].

CHAPITRE 7

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

La pestivirose chez les ovins est une épizootie largement rapportée à travers le monde. Sa pathogénie fut pendant longtemps mal connue car on ne recherchait pas systématiquement cette affection dans les cas d'avortements chez les brebis [162]. Par contre, elle est la principale maladie congénitale des ovins et des caprins, chez lesquels elle peut aussi entraîner des infections persistantes aiguës.

Cette pathologie à répartition mondiale, apparaît le plus souvent suite à l'introduction d'un animal atteint d'une infection persistante (IPI). Atteints durant le début de gestation, ces IPI présentent une virémie, n'ont pas d'anticorps et excrètent le virus en permanence qui passe donc d'un animal à un autre.

Jusqu'à aujourd'hui, cette infection présente une menace sévère au niveau mondial vu les pertes économiques considérables qu'elle engendre telles que : stérilité des brebis, avortement (pertes sèches de fœtus, entretien des femelles ayant avortées et retard de renouvellement des cheptels), mortalité des agneaux et naissance d'agneaux chétifs souffrant de tremblement, conformation anormale et toison hirsute. En plus de cette perte considérable, le virus de la Border Disease semble être également un virus immunosuppresseur pouvant favoriser la présence d'infections mixtes et peut ainsi compliquer gravement l'état de santé des troupeaux infectés [163].

La séroprévalence reste toujours très élevée au fil des années estimée entre 58 et 100% en Europe [70.164.60.89.36]. Et entre 17 et 74% dans certains pays d'Asie [165.166.167]. Des taux similaires ont été rapportés au Maroc (entre 40 et 28.9%) [168.169] ainsi que 95% en Tunisie [88]. Cependant le pâturage en commun entre les différentes espèces, la transhumance, certaines pratiques d'élevages, la présence d'IPI dans les troupeaux et l'absence de vaccins efficaces [170.15.171] sont mises en cause dans l'apparition de l'infection dans plusieurs études [88.9]. En revanche plusieurs contraintes font que la BD soit difficilement détectable, à savoir : la nature souvent asymptomatique de la maladie et difficulté de détection des IPI ; la grande fréquence des infections inapparentes par rapport aux infections symptomatiques ; la grande sensibilité du virus au milieu extérieur ; la culture délicate

et onéreuse nécessitant un laboratoire de confinement de niveau de sécurité élevé de type 3 ; la grande contagiosité de la maladie ; d'autant plus la BD est une maladie ayant un impact considérable sur la santé animale et non pas sur la santé humaine ce qui la rend négligeable surtout dans les pays émergents .

En Algérie, selon notre recherche bibliographique, la situation épidémiologique se caractérise par un manque énorme voire total d'informations relatives à cette maladie ; ce qui nous a incités à nous pencher sur certains aspects pouvant nous permettre ne serait-ce d'avoir une traçabilité et ce, en se fixant les objectifs suivants :

- Mener une enquête sur terrain concernant certains facteurs de risque pouvant influencer l'apparition de la maladie, menée au niveau de tous les élevages inclus dans l'étude.
- Déterminer les taux d'infection de la maladie chez les ovins dans la région d'étude ;
- Evaluer le pourcentage d'animaux porteurs et donc potentiellement excréteurs par identification de la présence de l'antigène (par ELISA-Ag et PCR-rt) ;
- Confirmer les résultats de l'ELISA-Ac par VNT.
- Evaluer la sensibilité et la spécificité du test ELISA.

Pour cela on a fait tout d'abord une enquête sur terrain aux niveaux de tous les stations d'élevage, suivit par des prélèvements sanguins pour la récolte du sérum et du plasma dans le but de la détection des animaux séropositifs et viropositifs.

CHAPITRE 8

MATERIEL ET METHODES

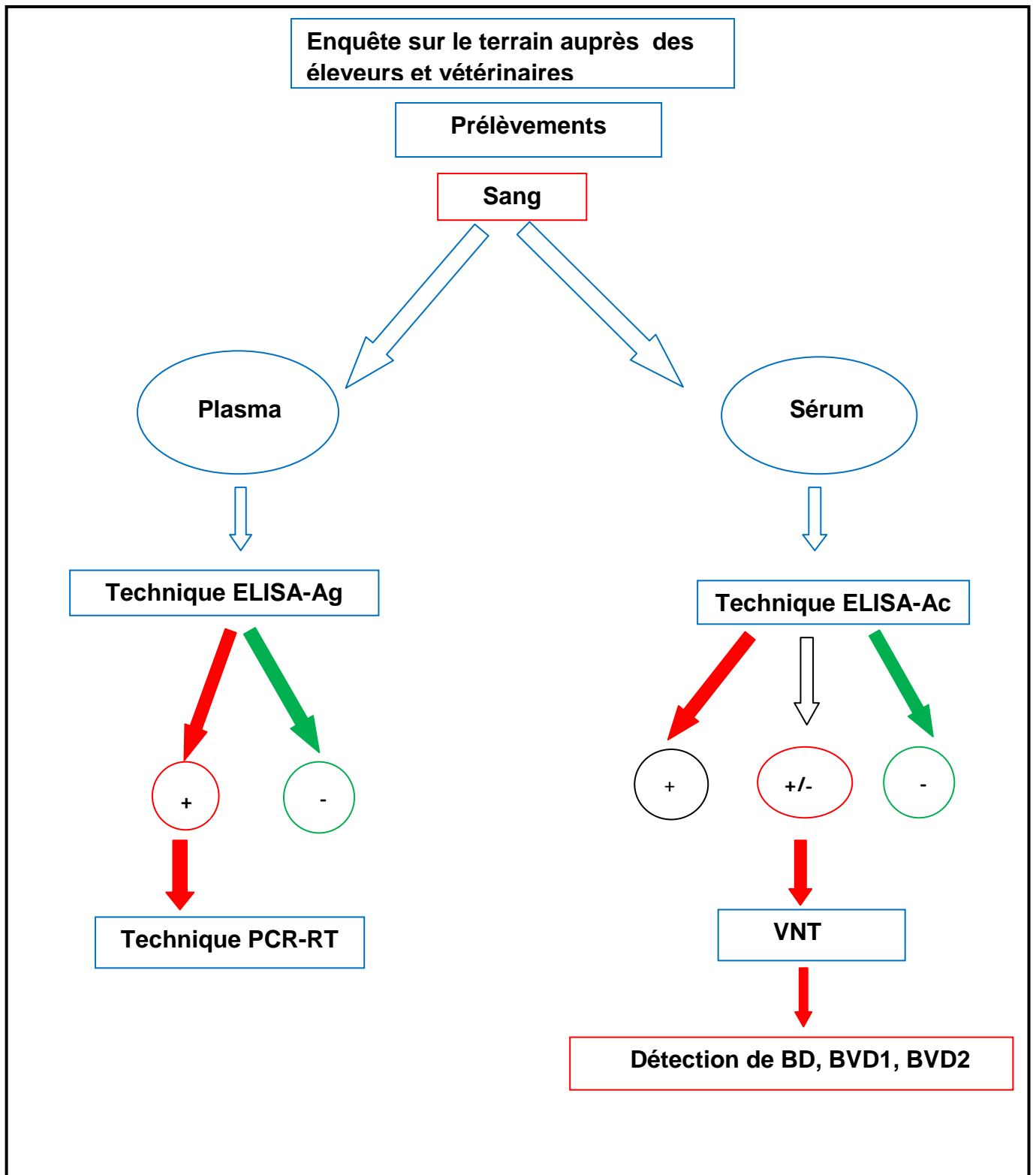


Figure 8.1: organigramme général de l'étude

8.1. Régions d'étude

Nous avons essayé d'assurer au maximum une diversité entre les régions choisies surtout en matière de : situation géographique ; climat ; relief ; type et taille d'élevage (tableau 8.1).

Au total, 9 wilayas ont fait l'objet de prélèvements :

Le nombre de communes prélevés par wilaya est présenté dans le tableau 8.2.

BORDJ BOUARIRIJ : Les prélèvements ont été pris dans la région est de la wilaya, dans les communes de : Bourdzemoura. Ras El oued. Tefreg.

SETIF : c'est dans la commune d'Ain Arnat que nos échantillons ont été prélevés.

MSILA : 7 régions ont fait l'objet de prélèvements, il s'agit des communes de Msila. Bir Fouda. Sidi Hadjres. Tarmount. Sidi Aissa. Ouled Slimen. Tamsa.

DJELFA : les prélèvements proviennent de 6 communes : Hassi Fadoul. Ben Har. Deldoul. Sidi Ladjel. El Khemis. Charef

LAGHOUAT : les échantillons proviennent de la région est de la wilaya, dans les communes de Hassi Delaa. Gueltat Sidi Saad. Sidi Makhlouf. Tadjrouna. Beidha. Hadj Mechri. Bennaceur Benchohra.

EL BAYEDH: les 7 élevages enquêtés étaient localisés dans les communes de Brezina. EL Bayedh. El Kheiter. El Bnou. Sidi Tifour. Arbaouat. Sidi Ameer

CHLEF: l'enquête a été réalisée dans les 5 régions suivantes : Boukadir. Sidi Akkacha. Oued Fodda. El Karimia. Breira.

SAIDA: vu l'importance du nombre de prélèvements dans cette wilaya, on a touché les régions est et ouest et au total 15 troupeaux ont été prélevés : Ouled Brahim. El Hassassna. Moulay Larbi. Ain Soltane. Sidi Ahmed. Sidi Boubeker. Saida. Ouled Khaled. Ain El Hadjar. Ain Skhouna. Sidi Amar. Maamora. Hounet. Youb. Tircine

TIZI OUZOU: les communes prélevées à Tizi Ouzou sont 5: Boghni. Draâ El Mizan. Tizi Rached. Ait Khellili. Illiten.

Tableau 8.1 : importance de l'élevage dans différentes wilaya choisies dans notre étude, selon le recensement du Ministère de l'Agriculture l'année 2014 [97].

Région	Effectif ovin
BORJ BOUARIRIJ	606000
SETIF	700000
MSILA	1700000
DJELFA	1483500
LAGHOUAT	1827000
EL BAYEDH	1868500
CHLEF	1102000
TIZI OUZOU	605000
SAIDA	5938666
Total	15830666

Ces wilayas ont été sélectionnées en raison de leur densité relativement élevée de petits ruminants (Fig. 8.2) qui représentent plus de 60% de l'effectif global. La population ovine en Algérie représente 80% du nombre total de ruminants; elle a augmenté de plus de 25%, passant de 21 millions à 26 millions de têtes entre 2010 et 2014 [172.173]. Ce type de production ovine est davantage concentré dans la zone de steppe (centre-nord du pays). Pendant la saison chaude, la transhumance et les activités nomades sont nécessaires, en particulier de mai à septembre, lorsque les pâturages ne peuvent plus satisfaire les besoins alimentaires des troupeaux.

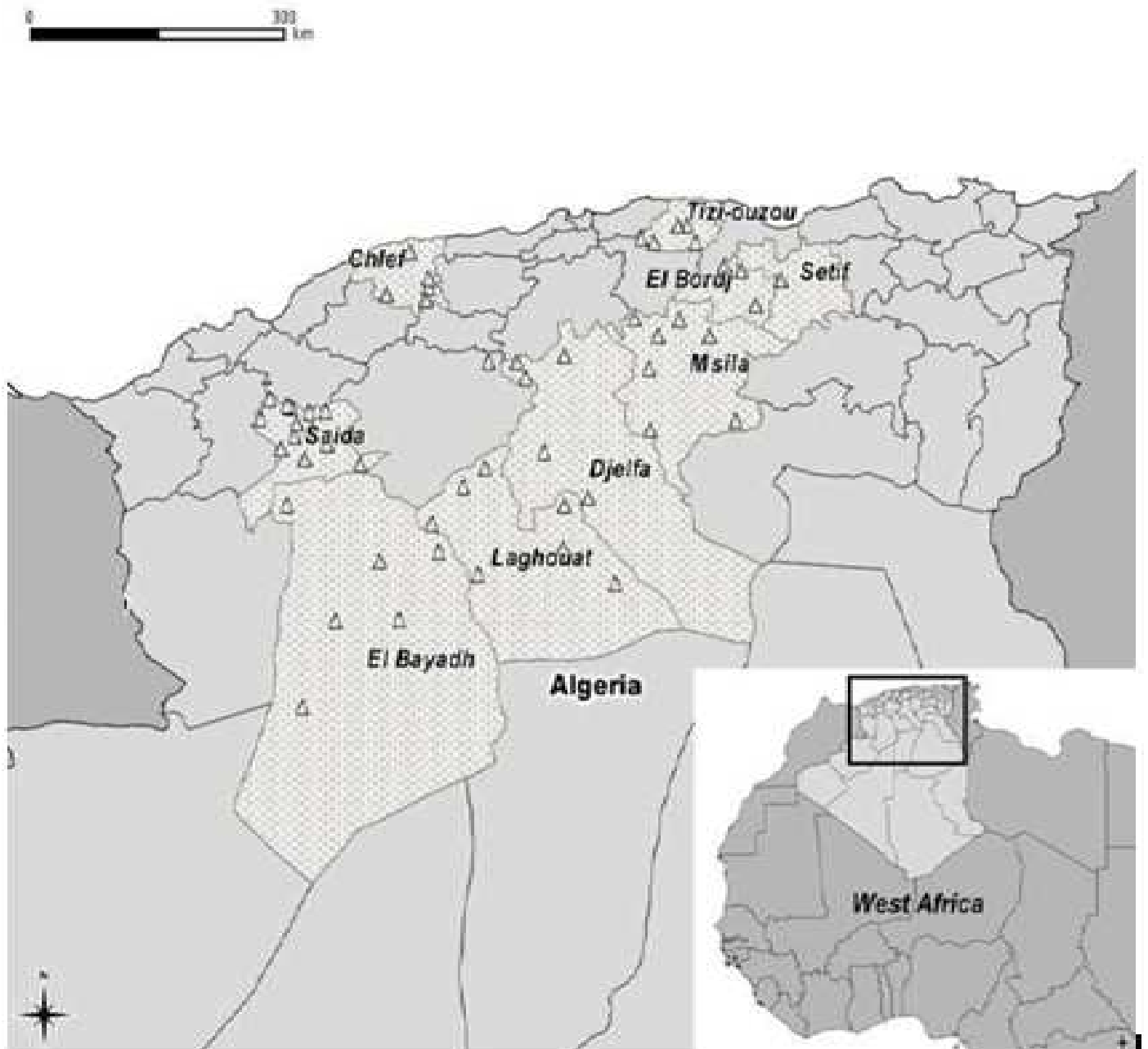


Figure 8.2 : représentation géographique des régions d'études

8.2. Période d'étude

Notre étude s'est déroulée durant la période du mois de décembre 2015 à Mars 2016, considérées comme les saisons de mise-bas et des avortements.

8.3. Enquête sur le terrain

Une enquête a été réalisée auprès de 56 fermes (tableau 8.2) afin de fournir des informations sur la taille, la composition du cheptel, la transhumance, gestion de la reproduction ainsi que les antécédents d'avortements au niveau des troupeaux. Pour chaque animal prélevé, la tranche d'âge a été prise en considération. Il est à noter que la composition des troupeaux est instable car elle peut changer avec le temps et sans qu'il y ait un marquage des animaux. Aucune information concernant les antécédents d'avortements chez les femelles prélevées n'était disponible. En outre, la vaccination contre la BD n'est pas pratiquée en Algérie.

Les éleveurs ont été sollicités pour participer à notre questionnaire (appendice B). Les questions étaient fermées pour la plupart et elles ont été formulées simplement permettant à l'interrogé de développer davantage sa réponse, ce qui était attendu par la suite avec quelques questions ouvertes. Ainsi, ce questionnaire représente un moyen d'obtenir des informations pertinentes pour ce qui concerne certaines conditions d'élevages qui peuvent être considérées comme des facteurs de risque (climat, relief, race, taille des troupeaux, espèces présentes dans les différentes exploitations, mouvement d'animaux, gestion de la reproduction...), le tableau 8.3 englobe les différents paramètres étudiés avec le pourcentage de troupeau pour chaque paramètre.

Tableau 8.2 : le nombre de troupeaux prélevés dans chaque wilaya

wilaya	Nombre de troupeaux	proportion	Nombre de troupeaux prélevé
Borj Bouaririj	9000	0,05	3,0
Setif	4233	0,02	1,0
Msila	23000	0,12	7,0
Djelfa	21000	0,11	6,0
Laghouat	23000	0,12	7,0
El Bayed	25000	0,13	7,0
Tizi Ouzou	18000	0,09	5,0
Chlef	17230	0,09	5,0
Saida	50000	0,26	15,0
Total	190463	1,00	56

Sur la base du nombre de troupeaux/wilaya = nombre utilisé pour le tirage au sort

Tableau 8.3 : distribution des troupeaux intégrés dans l'étude selon leurs principales Caractéristiques

Paramètres	Catégorie	Troupeaux (%)
Climat	Aride	82.1
	Méditerranéen	17.9
Relief	Montagne	12.5
	Plateau	87.5
Race	El Hamra + autre	48.2
	OuledDjellal + autre	39.3
	Race local	3.6
	Rimbi	8.9
Taille	<50	14.28
	51-100	33.92
	101-200	35.71
	>200	16.07
Type d'élevage	Sédentaire	42.9
	Transhumant	57.1
Espèce présente	Mixte (ovine/caprine/bovine)	71.4
	Uniquement ovine	28.6

8.4. Choix des élevages et des animaux

Avec l'aide de vétérinaires sentinelles sur le terrain, les prélèvements ont été réalisés sur des sujets de l'espèce ovine tout sexe confondu. Un plan d'échantillonnage a été établi et adapté aux conditions de terrain :

- Plan d'échantillonnage

Un échantillonnage en grappes en deux étapes a été effectué et un total de 576 animaux ont été prélevés, (âgés de 6 à 24 mois) vu que les anticorps colostraux anti *pestivirus* peuvent persister jusqu'à 6-8 mois chez les agneaux nouveau-nés, ce qui peut réduire la virémie et l'excrétion du virus [50] ; prélevés dans 56 troupeaux d'ovins provenant de 56 communes différentes, réparties dans les 9 wilayas (figure 8.2). La taille de l'échantillon a été calculée avec une précision de 5%, une prévalence animale de BD attendue de 54.2% (résultat d'une enquête préliminaire sur la BD réalisée en Algérie, sur 144 prélèvements il y avait 78 animaux séropositives, en plus dans l'étude de Rekiki et *al.*, (2005) [88], la prévalence animale de BD était estimée à 54%), un nombre d'unités secondaires (m) = 10 (animaux prélevés par élevage) et une valeur maximale de corrélation intra-classe (ICC ou ρ) = 0,05, le nombre d'unités primaires ou grappe (n) = 56 (le nombre total des élevages inclus dans l'étude).

- Nous avons choisi un ICC de 0,05 qui est une valeur intermédiaire pour une plage de valeurs (0,01-0,36) mentionnée pour le BVDV [174].
- Le nombre de troupeaux échantillonnés dans chaque wilaya était proportionnel au nombre de troupeaux d'ovins estimés par wilaya (d'après les données des services agricoles régionaux). Comme il n'y avait pas de liste détaillée des troupeaux de moutons en Algérie, nous avons utilisé la liste de toutes les communes des régions étudiées ($n = 342$) et avons effectué un échantillonnage aléatoire proportionnel de 56 communes avec le logiciel SAS 9.2 (procsurveysselect, strata = région) ; un troupeau, censé représenter la commune, il a ensuite été sélectionné dans chacune des 56 communes par les vétérinaires privés qui y travaillaient. Dans chaque troupeau, au moins 10 animaux adultes cliniquement en bonne santé (sans signes clinique de la BD) et âgés de 6 à 24 mois ont été choisis au hasard par les vétérinaires pour la

collecte de sang afin de détecter les anticorps et le virus de la BD ainsi que certains jeunes animaux (moins de 6 mois), en fonction de la coopération du propriétaire, qui ont été échantillonnés pour la détection du virus uniquement. Au total, 689 animaux ont été échantillonnés, 576 adultes et 113 agneaux. Le tableau 8.4 indique la répartition et le nombre d'échantillons prélevés dans chaque secteur.

Table 8.4: population ovine (nombre de troupeaux) et échantillonnage réalisé

Département	Troupeaux ovin	Nombre de troupeaux prélevés	Nombre de sérum prélevés pour les >6 mois	Nombre de plasma récoltés pour les < 6 mois	Nombre de plasma récoltés pour les >6 mois	Nombre total de prélèvements (sérum+plasma)
Borj Bouaririj	9000	3	30	0	30	60
Sétif	4233	1	10	0	10	20
Msila	23000	7	71	31	71	173
Djelfa	21000	6	60	5	60	125
Laghouat	23000	7	80	24	80	184
Al Bayedh	25000	7	70	0	70	140
Tizi Ouzou	18000	5	50	1	50	101
Chlef	17230	5	50	30	50	130
Saida	50000	15	155	22	155	332
Total	190463	56	576	113	576	1265

8.5. Choix des prélèvements

A l'aide des vétérinaires qualifiés les prélèvements ont été effectués avec le plein consentement des agriculteurs, les animaux choisis pour les prélèvements ont été isolés et ont subi une contention. Nous avons fait les prélèvements suivants :

8.5.1. Nature des prélèvements

a. Prélèvement de sérum

Pour le dosage d'anticorps qui représente un témoin intéressant de la circulation du virus dans les élevages de petits ruminants. L'âge a été déterminé entre 6 et 24 mois.

b. Prélèvement de plasma pour les moins de 6 mois

Pour la recherche des IPI, témoin d'une virémie récente. En revanche en raison de la faible manifestation du virus de la BD chez les agneaux de moins de 2 mois qui ont reçu des anticorps colostraux [175. 84], des sujets âgés entre 3 mois et moins de 6 mois ont été choisis.

c. Prélèvement de plasma pour les sujets âgés entre 6 et 24 mois :

Pour la recherche des antigènes ainsi que la présence des IPI [132].

L'association des deux méthodes est appuyée par les recommandations de l'office International des Epizooties (O.I.E) [84].

Le non recours à des analyses sur des prélèvements d'organe dans notre étude a été justifié par le fait que l'infection aiguë est généralement sub-clinique et la virémie est transitoire et difficile à détecter [175]. Aussi l'isolement du virus à partir d'avortons ou d'agneaux mort-nés est difficile vu la non déclaration ou même des déclarations tardives de la part des éleveurs, sachant que ce type de recherche exige des cadavres en bon état, avant le début de l'autolyse [132].

8.5.2. Types de prélèvements en fonction de l'âge des animaux

Sur l'animal âgé entre 6 et 24 mois

a. Sang :

- **Pour la récolte du sérum** : il a été pris à partir de la veine jugulaire à l'aide d'une aiguille à usage unique. Le sang est directement versé dans des tubes secs (sous vide) en verre de 5 ml. Après centrifugation du sang à 1500 g pendant 15 mn, aliquotes dans des micros tubes stériles de 1 ml, le tout est organisé dans des blocs

à 96 puits. Il est à noter que les prélèvements sanguins de 2 élevages ont été écartés à cause du phénomène d'hémolyse.

- **Pour la récolte du plasma**

L'échantillon de sang (5 ml) a été prélevé à partir de la veine jugulaire de chaque animal en utilisant un tube Vacutainer : EDTA pour la récolte du plasma. Les plasmas ont été séparés du sang total par centrifugation à 1500 g pendant 15 minutes, aliquotes dans des micros tubes stériles de 1 ml, le tout est organisé dans des blocs à 96 puits.

Sur l'animal âgé de moins de 6 mois

a. Sang : plasma

La même technique citée ci-dessus a été utilisée.

- Nous avons acheminé tous les prélèvements vers le laboratoire LBRA de l'Université de BLIDA sous couvert du froid à l'aide de glacières. Ensuite, ils ont subi une congélation à -40°C.

Chaque spécimen a été marqué d'un code comprenant un numéro d'échantillonnage individuel et du troupeau qui lui correspond.

Pour l'envoi des prélèvements, nous avons emballé les boîtes d'échantillons identifiées dans des caisses UN3373 (conditions IATA) destinées spécialement pour ce type de prélèvements biologiques qui satisfait à la sécurité pour le transport international et la manipulation. Ces caisses sont dotées de plusieurs compartiments qui permettent de séparer les prélèvements pour une meilleure qualité de conservation ; on a mis ensuite du gaz carbonique qui a l'avantage de conserver au mieux les basses températures pour un transport de longue durée. Les caisses ainsi préparées ont été fermées à l'aide de ruban adhésif. Sur le côté du carton, nous avons collé les documents officiels de transport avec les autorisations des services de douanes des deux pays.

La société de transport et logistique aérien assure l'arrivée des échantillons au laboratoire du CODA-CERVA dans un délai ne dépassant pas les 24 heures.

On a choisi dans notre étude de faire des prélèvements sanguins (sérum et plasma) qui correspondent parfaitement à notre objectif principal qui est la détermination des taux d'infection de la maladie dans nos cheptels sachant qu'on a choisi des sujets apparemment en bonne santé (les IPI étant la source d'infection la plus importante sont apparemment sains mais infectés in utero) [175].

8.6. Laboratoire d'analyse

Notre partie expérimentale a été réalisée au sein du Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA), à l'Unité des maladies virales enzootiques et ré-émergentes UCCLE, BRUXELLE, BELGIQUE. Il a été récemment fusionné avec l'ISP (institut Scientifique de Santé Publique) en 2018, créant ainsi un nouveau centre de recherche sous la nomination de Sciensano.

Le CERVA voit le jour en 1930 et reçoit le nom d'INRV (Institut National de Recherches Vétérinaires) en 1957. Sa mission était toujours de garantir la santé animale et, ce faisant, la santé publique. C'est un établissement public placé sous les tutelles des ministères de la Santé, de l'Agriculture et de la Consommation. Ce centre est chargé des missions d'évaluation, d'expertise, de recherche et d'appui scientifique et technique.

Le laboratoire met en œuvre un ensemble d'actions qui concourent à une traçabilité et une maîtrise de ses performances, et donc garantir la qualité de ses résultats.

Pour cela, l'organisation des évaluations externes de la qualité (EEQ) met en œuvre une série d'activités visant à s'assurer que les laboratoires reçoivent périodiquement des échantillons de contrôle des témoins positifs. Cela permet de surveiller la reproductibilité des méthodes de diagnostic. Cette démarche est accréditée selon la norme ISO17043. Pour répondre aux exigences d'application de toutes les procédures, des audits internes et externes à intervalles réguliers sont appliqués.



Figure 8.3 : bloc de récolte d'échantillons de 96 puits



Figure 8.4 : échantillons de sang récoltés dans des tubes vacutainer



Figure 8.5 : caisse UN3373 dotée de gaz carbonique



Figure 8.6 : caisse UN3373



Figure 8.7 : sac UN3373 destinés à l'envoi d'échantillons biologiques

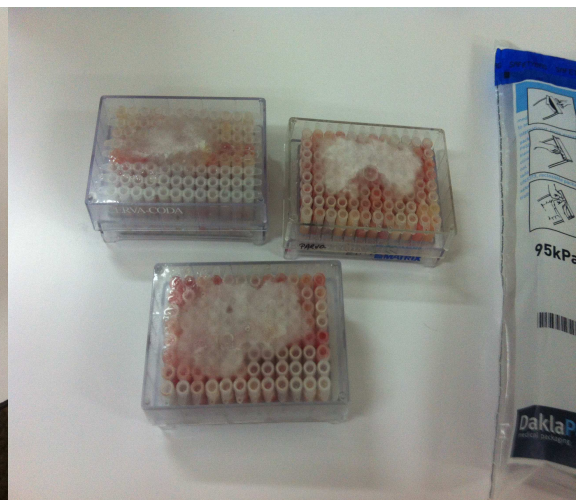



Figure 8.8 : blocs d'échantillons de plasma et de sérum

Tableau 8.5: organisation des prélèvements dans les blocs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	DJ1	S1	S1
B	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S1	ELB1	ELB1	ELB1	ELB1
C	ELB1	ELB1	ELB1	ELB1	ELB1	ELB1	DJ2	DJ2	DJ2	DJ2	DJ2	DJ2
D	DJ2	DJ2	DJ2	DJ2	DJ3	DJ3	DJ3	DJ3	DJ3	DJ3	DJ3	DJ3
E	DJ3	DJ3	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4	DJ4
F	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB2	ELB3	ELB3
G	ELB3	ELB3	ELB3	ELB3	ELB3	ELB3	ELB3	ELB3	ELB4	ELB4	ELB4	ELB4
H	ELB4	ELB4	ELB4	ELB4	ELB4	ELB4	BB1	BB1	BB1	BB1	BB1	BB1



Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire
Administration du Contrôle Import/Export & Notifications
CA-Botanique
Food Safety Center
Bd du Jardin botanique, 55
1000 Bruxelles
Tel: 02 211 82 11
Fax: 02 211 84 70
info@afsca.be
www.afsca.be

CODA-CERVA,
Ann Brigitte Cay
Groeselenberg 99
1180 Bruxelles

Correspondant : Christine Mertens
Téléphone : 02/211 84 64
E-mail : Import.Export@afsca.be

NE 0267.387.230

Votre lettre du Vos références 2016-01 : BDV Algeria (correction)
Nos références CONT/IEC/CHM/1350418
Annexes
Date 03-02-2016

Objet : Importation d'Algérie de sérum, de plasma et de sang de mouton potentiellement contaminés par le BDV

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'ai l'honneur de donner l'accord à votre institut pour l'importation de l'envoi décrit ci-dessous:

Nature : Sérum et sang de mouton potentiellement contaminés par le BDV

Quantité : Sérum de mouton : 650 x 1 ml
Plasma de mouton : 800 x 1 ml
Sang de mouton : 400 x 1 ml

Provenance: Feknous Naœel,
Université Saad Dahlab vétérinaire, Blida 09000 - Algérie

Pays d'origine : Algérie

Destination : CODA-CERVA, Groeselenberg 99, 1180 Bruxelles

Objectif: Analyses sur le border disease virus (BDV)

Poste d'inspection frontalier: Zaventem
(contrôle documentaire)

Conditions:

- L'envoi est uniquement destiné à CODA-CERVA et doit être directement transporté à l'endroit de destination.
- Les échantillons doivent être emballés de façon étanche.
- L'envoi doit être emballé correctement, de telle sorte qu'une ouverture accidentelle de l'emballage ne puisse pas se produire.
- Sur l'emballage doivent figurer le nom et l'adresse d'établissement de l'expéditeur et du destinataire ainsi que la mention: "Produits biologiques, exclusivement destinés à la recherche en laboratoire - ne pas ouvrir pendant le transport".

Notre mission est de veiller à la sécurité de la chaîne alimentaire et à la qualité de nos produits, afin de protéger la santé des hommes, des animaux et des plantes.

Figure 8.9 : autorisation de réception des échantillons

8.7. Méthodes de diagnostic

8.7.1. Technique ELISA-Ac

Pour la détection des anticorps anti-*pestivirus* de ruminants.

Les anticorps spécifiques anti-*pestivirus* ont été mesurés dans 576 sérums de moutons adultes à l'aide d'un kit ELISA du commerce (SERELISA[®] BVD NS2-3 (p80) antibloquant, synbiotiques (Zoetis) selon les instructions du fabricant. Ce kit permet de détecter les anticorps anti-BVDV et anti-BDV chez les ruminants.

La densité optique (DO) a été mesurée en bichromatisme à 450 et 630 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de compétition résultant de la différence de DO entre le contrôle négatif et l'échantillon rapporté à la différence de DO entre le contrôle négatif et le contrôle positif.

Selon les instructions du fabricant :

- Un échantillon était considéré comme positif si le pourcentage de compétition était supérieur ou égal à 40%,
- Négatif lorsqu'il est inférieur à 20% et
- Douteux entre 20% et 40%.

Les détails de la réalisation de la technique sont mentionnés dans Appendice C.

8.7.2. Test de séroneutralisation

Parmi les 576 sérums testés en ELISA-Ac, 197 échantillons (y compris des échantillons positifs, douteux et négatifs en ELISA-Ac) ont été testés en parallèle pour la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre le BDV, BVDV-1, le BVDV-2 à l'aide de deux souches de BVDV : BVDV-1 souche NADL [176], la souche BVDV-2 3534 [177] et la souche BDV AV [71]. Les échantillons ont été inactivés à 56°C pendant 30 minutes avant le test, puis dilués dans le milieu essentiel minimum (MEM) dans une série de deux dilutions à partir d'une dilution de 1: 5 pour le BVDV-1 et le BVDV-2 et de 1: 2 pour le BDV.

Une dose virale fixe contenant 100 TCID₅₀ / 50µl (entre 30 et 300 TCID₅₀) a été incubée pendant 2 h à 37°C avec chaque dilution dans un milieu de croissance

enrichi en antibiotiques (à savoir, pénicilline, gentamicine et amphotéricine B). Des cellules MDBK (ATCC numéro CCL-22) (3×10^7 cellules / 100 μ l) ont été ajoutées et les cultures ont été cultivées pendant 72 heures à 37°C dans un incubateur à CO₂.

Tous les sérums ont été testés en double. Après incubation, les cultures cellulaires ont été évaluées directement pour les effets cytopathogènes par microscopie optique (BVDV-1) ou après immunomarquage avec un sérum polyclonal anti-*pestivirus* (BVDV-2 et BDV). Les titres neutralisant le virus ont été calculés selon la méthode de Reed-Muench [178].

Les titres ont été exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum donnant lieu à une neutralisation virale et considérés comme positifs pour le BVDV et pour BDV lorsqu'ils sont supérieurs ou égaux à 1 :10 ou 1:8, respectivement.

Les détails de la réalisation de la technique sont mentionnés dans Appendice F.

8.7.3. Technique ELISA-Ag

Pour la détection d'antigènes de *pestivirus* de ruminants.

Le plasma recueilli dans les 689 échantillons de sang a été testé pour la présence d'antigène de *pestivirus* à l'aide du Kit SERELISA[®] BVD NS2-3 (p80) Ag mono indirect, Synbiotiques (Zoetis). Ce kit permet la détection des antigènes BDV et BVDV et dans des échantillons individuels d'animaux IPI, en utilisant une technique immuno-enzymatique de détection d'antigène en monocupule (protéine non structurale NS2-3 (p80) / 125) commun à toutes souches, cytopathogènes ou non, des virus de la BVD/MD et de la BD.

La DO a été mesurée en bichromatisme à 450 et 630 nm.

Les résultats sont exprimés en indice échantillon = $0,5 \times DO$ de l'échantillon - DO du Contrôle positif (P). Selon les instructions du fabricant :

- Tout échantillon de plasma ayant un indice $\geq (0,15 \times OD P)$ a été considéré comme positif.
- Tout échantillon de plasma avec un indice $< (0,3 \times OD P)$ était considéré comme négatif.
- Tout échantillon de plasma ayant un indice compris entre $(0,15 \times OD P)$ et $(0,3 \times OD P)$ était considéré comme douteux.

Les détails de la réalisation de la technique sont mentionnés dans Appendice D.

8.7.4. Technique PCR quantitative (en temps réel)

La PCR-RT a été réalisée sur des pools d'échantillons plasmatiques de 10 animaux différents, qui ont été constitués en mélangeant 100 µl de chaque échantillon. L'ARN (acide ribonucléique) a été extrait de chaque pool en utilisant un volume de 100 µl. L'extraction a été réalisée avec le mini-kit QIAamp Viral RNA (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant.

On extrait 4µl de l'ARN total pour les utiliser dans la transcription inverse en présence d'hexa-nucléotides [179].

Pour l'amplification par PCR-RT, 5µl des ADNc résultants ont été inclus dans le mélange réactionnel. Les amorces (F2: CTCGAGATGCCATGTGGAC et PESTR: CTCCATGTGCCATGTACAGCA) et les sondes TaqMan utilisées dans cette étude ciblaient les régions 5'UTR du BD et le BVDV génotype 1 (sonde BVDV-1: 5' FAM-CAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGC-TAMRA 3') et BVDV génotype 2 (sonde BVDV-2: 5' VIC-CACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACCTG-TAMRA 3') [180]. La réaction de PCR a été réalisée dans 25 µl, contenant 2X le Master mix de sonde Taqman DNA FastStart® (LifeScience), 450 µm des deux amorces et 50 µm des deux sondes fluorescentes.

Une incubation de 10 min à 95 °C a été faite.

Les conditions d'amplification de la PCR étaient les suivantes:

45 cycles en : 15 secondes à 95 °C et 45 secondes à 60 °C. Des mesures fluorescentes ont été effectuées au cours de l'étape d'élongation.

Le cooling c'est fait à 40°C pendant 30 secondes.

Les détails de la réalisation de la technique sont mentionnés dans Appendice E.

8.8. Analyses statistiques

8.8.1. Estimation de la séroprévalence

La séroprévalence au sein d'un troupeau a été estimée au niveau global et au niveau de la wilaya avec un modèle d'équation d'estimation généralisée (GEE) à l'aide du logiciel SAS 9.2 «Proc genmod». Dans ce modèle, le troupeau était pris comme sujet répété, la wilaya en tant que variable indépendante et la prévalence a été estimée à la probabilité prédictive de séropositivité; une matrice de corrélation échangeable a été supposée. Les résultats douteux en l'ELISA-Ac, basés sur le seuil recommandé par le fabricant du kit, ont été considérés comme positifs dans notre analyse, car nous avons constaté que la plupart des échantillons douteux dans ELISA-Ac étaient positifs avec le VNT (voir la section des résultats). Ces taux de prévalence étaient la prévalence apparente (P_a), sans tenir compte de la sensibilité (Se) et de la spécificité (Sp) de l'ELISA-Ac. La vraie séroprévalence globale (P_t) a ensuite été calculée en prenant en compte le Se et le Sp que nous avons estimés relativement au VNT (voir la section des résultats). La prévalence totale réelle et l'IC à 95% ont été calculés à l'aide du calculateur épidémiologique en ligne EpiTools [181].

8.8.2. Comparaison entre les résultats ELISA- Ac et VNT

Une étude comparative a été réalisée sur une partie des échantillons de sérum (197/576) afin d'estimer les performances du test ELISA- Ac par rapport au VNT pour les virus BDV, BVDV-1 et BVDV-2. Ces échantillons comprenaient des sérums négatifs, douteux et positifs dans ELISA-Ac provenant de 20 troupeaux différents et de 8 départements différents. La sensibilité et la spécificité relatives de l'ELISA ont été calculées en divisant le nombre d'échantillons positifs ou négatifs dans l'ELISA par le nombre d'échantillons positifs ou négatifs dans le VNT, respectivement. Le test du coefficient kappa de Cohen [182] a été utilisé pour mesurer la concordance entre ELISA-Ac et le VNT et a été calculé à l'aide du calculateur épidémiologique en ligne EpiTools [181].

8.8.3. Statistiques descriptives et facteurs de risque

Des statistiques descriptives ont été réalisées pour établir la proportion de troupeaux en fonction de différentes caractéristiques étudiées au cours de l'enquête et la proportion correspondante d'animaux séropositifs.

Les paramètres suivants, considérés comme des facteurs de risque potentiels, ont été comparés en termes de séroprévalence: climat (zones arides vs / Méditerranée), paysage (montagne vs / plateau) gestion du troupeau (sédentaires vs / transhumants), taille du troupeau (<100 vs > 100), composition du troupeau (ovins / bovins / chèvres), race ovine, achat de femelles reproductrices (oui / non), achat d'agneaux d'engraissement (oui / non), origine des béliers d'élevage (externes / interne), contacts avec d'autres troupeaux au pâturage, contacts avec des animaux sauvages, nombre d'avortements, maladies cliniques, vaccination. Un test du khi deux a été utilisé pour détecter des différences significatives de séroprévalence pour les caractéristiques étudiées; une probabilité inférieure à 5% était considérée comme statistiquement significative. L'odds ratio (OR) et le khi deux ont été calculés à l'aide du logiciel XLSTAT version 2014 [182] afin de quantifier l'association entre ELISA-Ac positif et les facteurs de risque identifiés. Les IC à 95% ont été calculés selon la méthode de Miettinen.

CHAPITRE 9

RESULTATS ET DISCUSSION

9.1. Enquête sur le terrain

L'éleveur est l'acteur principal en production et santé animale parmi les acteurs de la société civile.

Nous avons jugé avantageux d'initier notre travail par une enquête sur le terrain auprès des éleveurs et des vétérinaires pour avoir une idée sur l'état de connaissance de ces derniers vis-à-vis de la BD, rechercher l'élément clé de suspicion de la pathologie qui est l'avortement ainsi que la recherche des facteurs de risques qui pourraient être en relation direct avec son apparition

A travers les régions d'étude, notre enquête menée au niveau de 56 exploitations agricoles a montré que les avortements intéressent 66% des élevages enquêtés, contre 34% d'absence totale ou de rareté d'observation durant toute l'année.

A l'exception de certains éleveurs, la plupart associent ce phénomène aux pertes financières beaucoup plus qu'à l'état sanitaire des animaux ; et le voient ainsi comme un accident et non pas un problème pathologique particulier, par conséquent, ils ne montrent aucune inquiétude quant au reste du troupeau surtout si ces avortements ne sont pas à répétition.

9.2. Résultats

9.2.1. Détermination de la séroprévalence par ELISA-Ac

Un troupeau était considéré positif pour la BD lorsqu'au moins un animal était positif dans le test ELISA-Ac. Tous les troupeaux sauf un étaient séropositifs; on a donc estimé que la séroprévalence troupeau était $55/56 = 98,2\%$ (IC à 95% : 90,5-99,6). La proportion de moutons positifs dans chaque troupeau variait entre 1 et 100%. Sur les 576 sérums testés, 344 échantillons ont été considérés comme séropositifs (304 positifs + 40 douteux en ELISA-Ac) et 232 étaient négatifs. La prévalence individuelle est de 59.7% (IC à 95% : 63,6- 55,8) (tableau 9.1).

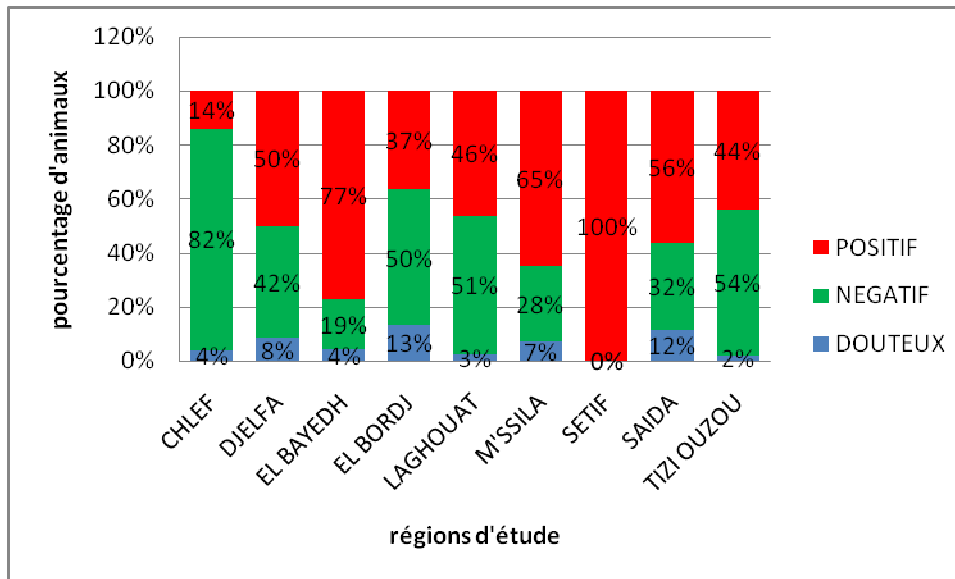


Figure 9.1 : détermination de la séroprévalence par wilaya

La séroprévalence apparente à l'échelle troupeau, sur la base du modèle GEE, a été estimée à 60,17% (IC à 95%: 52,96-66,96) (voir le tableau supplémentaire 10.1) sans prendre en considération la (Se) et la (Sp). La véritable séroprévalence globale, en tenant compte de notre estimation de Se (84,0%) et de Sp (92,4%) de l'ELISA-Ac (voir résultat VNT), a été calculée comme étant égale à 68,20% (IC à 95% : 60.2-76.3).

Tableau 9.1 : population ovine (nombre de troupeaux), échantillonnage effectué et estimation de la séroprévalence (apparente) (avec un IC à 95%) de la BD, par Wilaya, selon le modèle GEE.

Régions	Effectif troupeau	N Tr	N Ag	N Ad	N Pos	Prev % 95	% IC
Borj Bouaririj	9000	3	0	30	15	50.00	[2 7.33 ; 72.67]
setif	4230	1	0	10	10	100.00	n.d.
Msila	23000	7	31	71	51	71.90	[60.36 ; 81.13]
Djelfa	21000	6	5	60	35	58.33	[43.12 ; 72.11]
Laghouat	23000	8	24	80	39	51.07	[36.55 ; 65.41]
El Bayadh	25000	7	0	70	57	81.43	[64.40 ; 91.40]
Tizi Ouzou	18000	5	1	50	23	46.00	[20.87 ; 73.34]
Chlef	17230	5	30	50	9	18.00	[09.90 ; 30.50]
Saida	50000	15	22	155	105	67.68	[55.81 ; 77.64]
Total	190460	57	113	576	344	60.17	[52.96 ; 66.96]

N Tr : Nombre de troupeaux échantillonnés.

N Ag : Nombre d'agneaux échantillonnés (animales < 6 mois, plasma).

N Ad : nombre d'adultes échantillonnés (sérum + plasma).

N Pos : nombre de sérums positifs (adultes).

Prev % : séroprévalence au sein du troupeau.

n.d : non calculé.

9.2.2. Détermination des facteurs de risques

Les différences dans la proportion d'animaux séropositifs n'étaient pas statistiquement significatives pour les variables étudiées suivantes: taille du troupeau, race ovine, présence de bovins à la ferme, achat de femelles reproductrices, achat d'ovins à l'engraissement, antécédents d'avortement, partage de béliers reproducteurs, vaccination contre la clavelée, la brucellose. Au contraire, une différence significative de séroprévalence a été constatée pour les variables suivantes: climat (aride contre méditerranéen; OR = 4,04), relief (montagne contre haut plateau; OR = 0,49), gestion du troupeau (sédentaire versus transhumant; OR = 0,59), présence de chèvre ou non (OR = 0,58), atteinte du cheptel par d'autres maladies cliniques (OR = 0,66). Les résultats détaillés, y compris les rapports de cotes (OR) pour ces facteurs de risque, sont présentés dans le tableau 9.2.

Tableau 9.2 : facteurs de risque de séropositivité de la Border Disease avec le nombre et la proportion d'échantillons positifs correspondants (séroprévalence apparente), nombre d'échantillons négatifs et ratio associé (avec IC de 95%)

Paramètres		Echantillons positifs (%)	Echantillons négatifs (%)	p value	OR	95% CI
Climat	aride	312 (65.5%)	164	0.0001	4.04	2.55-6.39
	méditerranéen	32 (32.0%)	68			
Relief	montagne	31 (44.3%)	39	0.005	0.49	0.29-0.80
	Haut plateau	313 (61.9%)	193			
Type d'élevage	sédentaire	126 (52.5%)	114	0.0001	0.59	0.42-0.83
	transhumant	218 (64.9%)	118			
Composition	mixte (caprin ou bovin)*	243 (59.1%)	168	0.644*	0.92*	0.63-1.33
	uniquement ovin	101 (61.2%)	64			
	ovin avec bovin*	206 (60.6%)	134			
	sans bovin	138 (58.5%)	98			
	ovin avec caprin	143 (52.8%)	128			
Maladies cliniques	oui	126 (59.0%)	108	0.017	0.66	0.47-0.93
	non	218 (63.7%)	124			

* Non significatif

- Climat

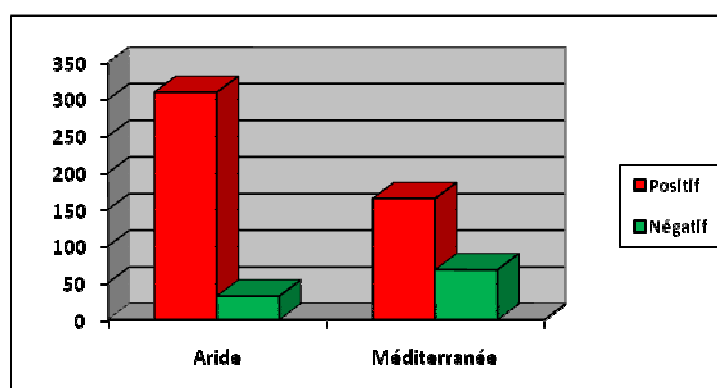


Figure 9.2 : séroprévalence selon le climat

Les animaux séropositifs ont été observés dans 65,5% des troupeaux élevés dans un climat aride vs 32% des troupeaux qui se trouvent dans un climat tempéré, l'étude statistique entre le climat et la séropositivité était hautement significative

($p < 0,0001$)

- Relief

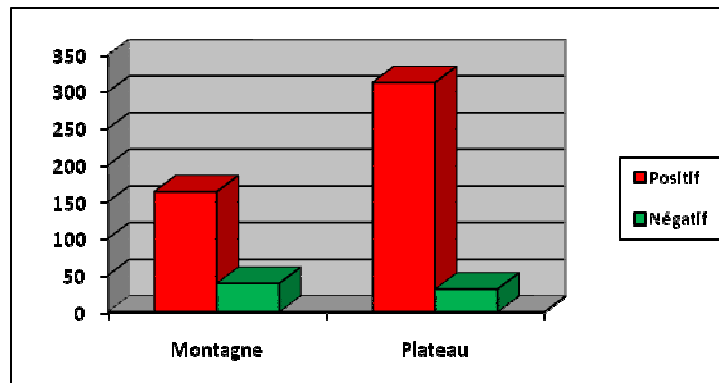


Figure 9.3 : séroprévalence par relief

D'après cette étude, les animaux élevés dans les montagnes avaient moins de risque de contracter la BD (44,3%) par rapport aux autres qui sont dans les haut plateaux (61,9%), cette différence est hautement significative ($p < 0,005$).

- Race ovine

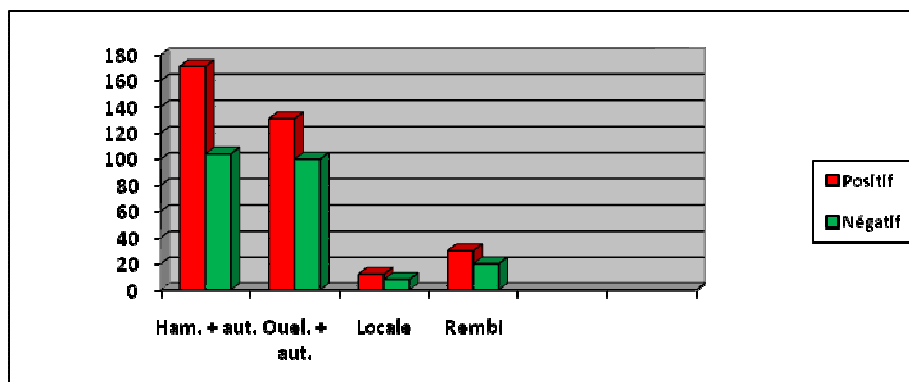


Figure 9.4 : séroprévalence selon la race

Il n'y avait pas de différences significatives entre les taux de prévalence et les races ovines ($p = 0,21$) Si l'on analyse 2 par 2 (en particulier El Hamra vs Ouled Djellal, les chiffres sont trop faibles pour en tirer des conclusions). Le taux de séroprévalence le plus élevé a été observé chez la race El Hamra avec un pourcentage de 62,2%, Ouled Djellal + Rimbi en deuxième position avec 56,7% et ensuite les races locales, Rimbi, avec un pourcentage de 60,0%.

- Symptômes cliniques

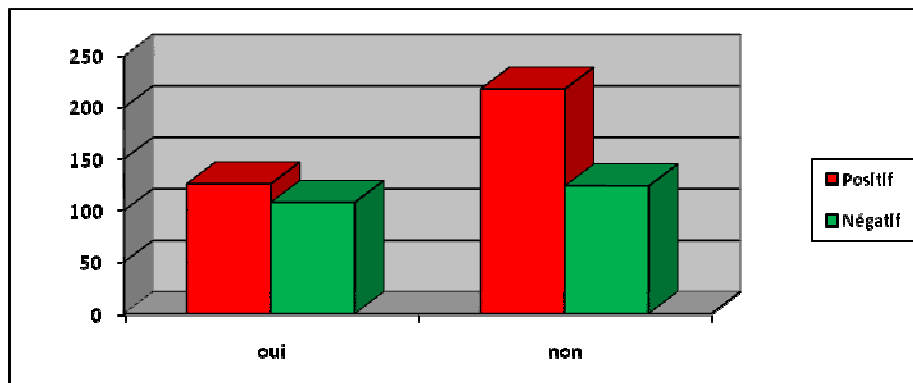


Figure 9.5 : séroprévalence selon la présence de symptômes cliniques

Nous avons remarqué une prévalence faible (59%) dans les troupeaux souffrant d'autres maladies d'élevage par rapport aux troupeaux apparemment sains ; (63.7%) avec une différence significative ($p = 0.01$).

- Taux d'avortements

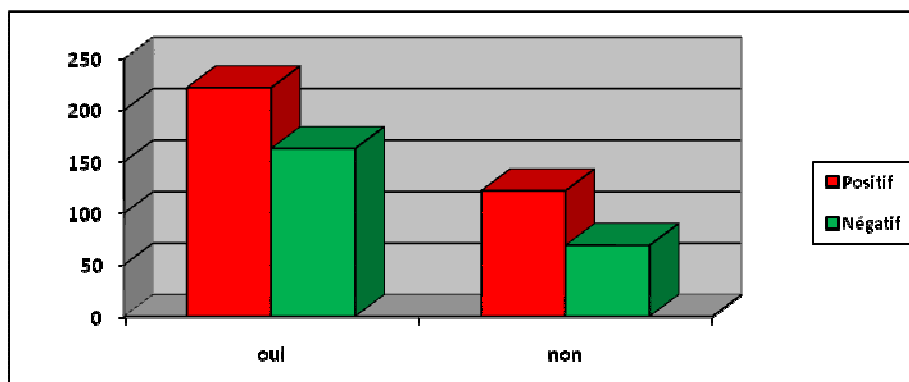


Figure 9.6 : séroprévalence suite aux taux d'avortements

La corrélation entre la survenue des avortements et la séroprévalence de la BD est non significative ($p < 0,152$): la séroprévalence est de (63.9%) dans les troupeaux n'ayant pas ou peu de problèmes d'avortement comparés aux troupeaux avortant, où elle est de l'ordre de (57.7%).

- Type de stabulation :

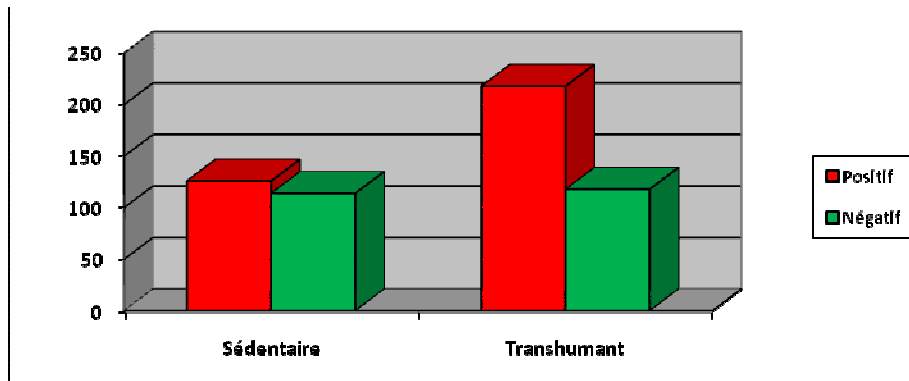


Figure 9.7 : séroprévalence selon le type de stabulation

Un taux de séropositivité élevé a été observé chez les troupeaux transhumants (avec 64.9%) relativement aux troupeaux sédentaires (avec 52.5%) avec une différence significative ($p < 0,003$).

- Taille du troupeau

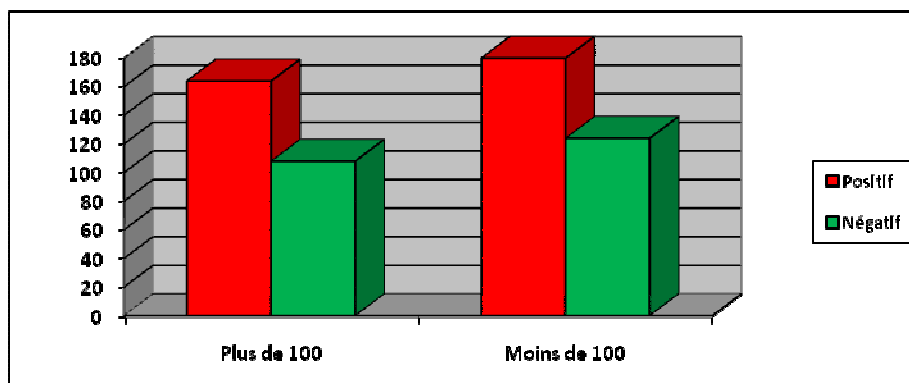


Figure 9.8 : séroprévalence par taille de troupeau

Cependant, il n'y avait pas de relation entre la taille du troupeau et les taux de séroprévalence et les comparaisons de troupeaux comprenant plus de 100 animaux (60,3%) et moins de 100 animaux (59,2%) n'étaient pas significatives ($p < 0,791$).

- Présence de bovin dans les élevages

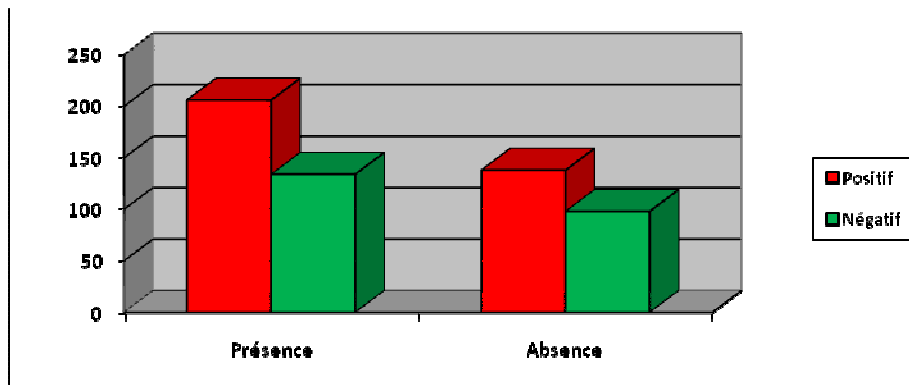


Figure 9.9 : séroprévalence selon la présence de bovins

Le taux de séroprévalence n'a pas été influencé par la présence (un taux de 60.6%) ou l'absence de bovins (un taux de 58.5%) au niveau des cheptels testés et la différence n'était pas significative ($p < 0,611$).

- Présence de caprin dans les élevages

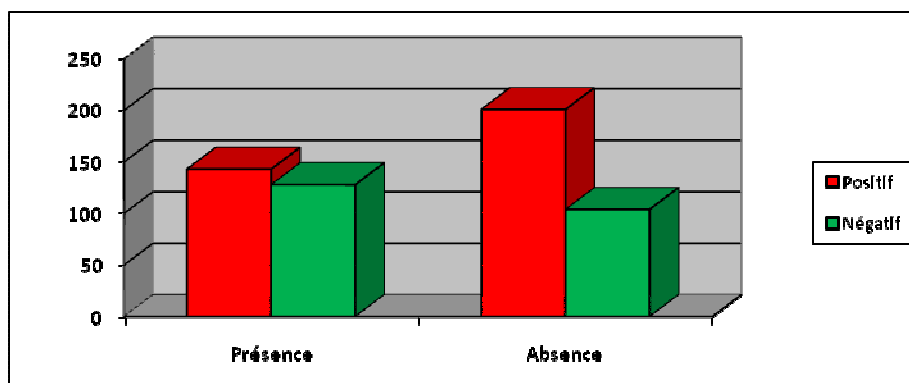


Figure 9.10 : séroprévalence selon la présence de caprins

Le taux de séroprévalence a été influencé par l'absence de caprins (un taux de 65.9%) par rapport aux troupeaux avec présence de caprins (un taux de 52.8%) avec différence statistiquement significative ($p < 0,001$).

- Achat de nouveau animaux

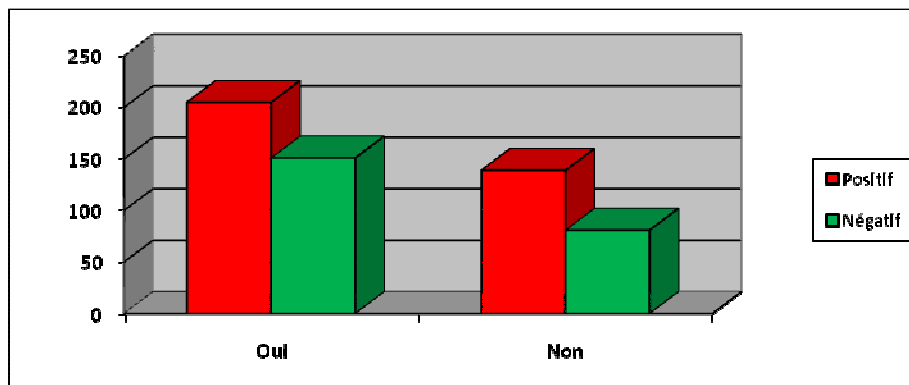


Figure 9.11: séroprévalence selon l'achat de nouveaux animaux

Aucune différence significative ($p < 0,183$) n'a été observée entre les troupeaux avec (57.6%) ou sans achat de nouveaux animaux (63.2%).

- Origine du mâle reproducteur

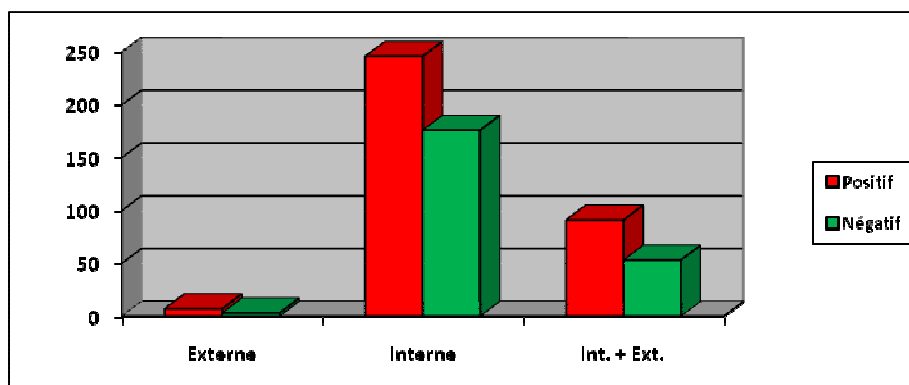


Figure 9.12 : séroprévalence selon l'origine du reproducteur

Les taux de séroprévalence ont donné de légères différences mais sans signification statistique ($p < 0.468$) quant à l'origine du reproducteur dans le troupeau avec 70, 58.3 et 63.2% respectivement pour les troupeaux qui utilisent un reproducteur externe, interne ou mixte.

- Vaccination

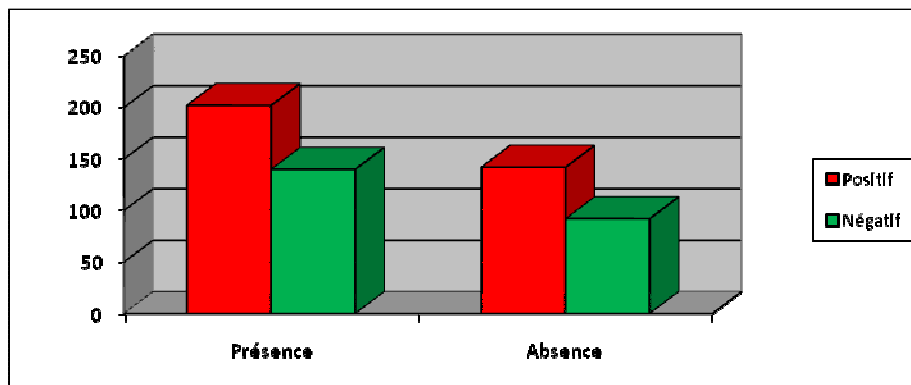


Figure 9.13 : séroprévalence selon la vaccination

Il n'y avait pas de différences significatives entre les animaux vaccinés contre la brucellose et la clavelée en ce qui concerne la séroprévalence (59,1%) par rapport aux animaux non vaccinés (60,7%) incluant des animaux séropositifs ($p < 0,697$).

Tableau 9.3 : caractéristiques descriptives et résultats obtenus par troupeau par la méthode ELISA-Ac.

Troupeaux	Caractéristiques de troupeau					Nb. d'animaux testés	ELISA-Ac Nb. de cas positifs (%)
	Antécédants d'avortements	Taille	Composition		Système de production		
			Bv.	Cp.			
EL BO1	Non	≤100	Oui	Oui	transhumant	10	4 (40)
EL BO2	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	6 (60)
EL BO3	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	1(10)
S1	Oui	>100	Oui	Oui	sédentaire	10	10 (100)
M1	Oui	≤100	Oui	Non	sédentaire	10	9 (90)
M2	Non	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	9 (90)
M3	Oui	>100	Non	Oui	transhumant	10	5 (50)
M4	Oui	>100	/	/	sédentaire	10	5 (50)
M5	No	≤100	/	/	sédentaire	10	5 (50)
M6	Oui	≤100	/	/	sédentaire	10	4 (40)
M7	No	>100	No	Oui	transhumant	11	7 (70)
D1	Oui	>100	Oui	Oui	transhumant	10	8 (80)
D2	Oui	≤100	/	/	transhumant	10	6 (60)
D3	Oui	>100	Oui	No	transhumant	10	5 (50)
D4	Oui	>100	Oui	Oui	transhumant	10	8 (80)
D5	Oui	>100	/	/	sédentaire	10	2 (20)
D6	No	≤100	Oui	No	transhumant	10	1(10)
L1	No	>100	Oui	No	transhumant	10	4 (40)
L2	Oui	>100	Oui	Oui	transhumant	20	5 (25)
L3	Oui	>100	/	/	transhumant	10	3 (30)
L4	No	≤100	Oui	Oui	transhumant	10	7 (70)
L5	Oui	>100	Oui	No	transhumant	10	6 (60)
L6	Oui	>100	/	/	sédentaire	10	5 (50)
L7	Oui	≤100	Oui	No	sédentaire	10	7 (70)
EL BA1	Non	>100	Oui	Non	transhumant	10	4 (40)
EL BA2	Oui	>100	/	/	transhumant	10	10 (100)
EL BA3	Oui	>100	Non	Oui	transhumant	10	7 (70)
EL BA4	Non	>100	Oui	Oui	transhumant	10	9 (90)
ELBA 5	Oui	>100	/	/	sédentaire	10	9 (90)
EL BA6	Oui	≤100	Oui	Non	sédentaire	10	8 (80)
EL BA7	Oui	≤100	Oui	Non	sédentaire	10	7 (70)
T1	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	6 (60)
T2	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	2 (20)
T3	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	2 (20)
T4	Oui	≤100	Non	Oui	sédentaire	10	2 (20)
T5	Non	≤100	Oui	Oui	transhumant	10	10 (100)
C1	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	1 (10)
C2	Oui	≤100	Oui	Oui	sédentaire	10	2 (20)
C3	Oui	≤100	Non	Oui	sédentaire	10	0
C4	Non	>100	Oui	Oui	transhumant	10	3 (30)
C5	Non	>100	Oui	Oui	sédentaire	10	1 (10)
SA1	Non	>100	Oui	Oui	sédentaire	10	2 (20)
SA2	Non	≤100	Oui	Non	sédentaire	10	2 (20)
SA3	Oui	≤100	Non	Oui	transhumant	10	2 (20)
SA4	Oui	>100	Oui	Non	transhumant	11	4 (36.5)
SA5	Non	>100	Oui	Oui	sédentaire	10	5 (50)
SA6	Non	≤100	Oui	Non	transhumant	10	6 (60)
SA7	Oui	≤100	/	/	transhumant	10	5(50)
SA8	Non	≤100	/	/	sédentaire	10	9 (90)
SA9	Oui	≤100	/	/	transhumant	10	8 (80)
SA10	Oui	>100	Oui	Oui	Sédentaire	10	8 (80)

SA11	Non	≤100	/	/	Sédentaire	10	9 (90)
SA12	Oui	>100	/	/	transhumant	10	9 (90)
SA13	Non	≤100	Oui	Oui	transhumant	10	6 (60)
SA14	Non	>100	/	/	transhumant	10	2 (20)
SA15	Oui	≤100	/	/	transhumant	14	9 (64.3)
Total	/	/	/	/	/	576	301(52.25)

B.: bovin avec ovin; Cp.: caprin avec ovin

9.2.3. Détermination des résultats obtenus par VNT et leur comparaison aux résultats de l'ELISA-Ac

Pour estimer les performances (Se et Sp) d'ELISA-Ac anti-pestivirus par rapport au VNT, 197 sérums ont été testés en parallèle par ELISA-Ac et par trois VNT différents (BDV, BVDV-1 et BVDV-2). Le tableau 9.4 indique le nombre d'échantillons positifs, douteux et négatifs testés par ELISA-Ac par rapport au titre BDV obtenu par VNT. Le tableau 9.5 quand à lui donne le nombre d'échantillons positifs, douteux et négatifs dans ELISA-Ac par rapport au ratio [titre VNT pour BDV / titre VNT pour BVDV], ce dernier étant calculé par rapport au titre le plus élevé dans BVDV, qu'il s'agisse de BVDV-1 ou BVDV-2. Ce rapport était divisé en trois catégories: (a) titre BDV = quatre fois le titre BVDV-1 ou BVDV-2, (b) titre BDV = deux à trois fois le titre BVDV-1 ou BVDV-2, (c) BDV titre = moins de deux fois le titre BVDV-1 ou BVDV-2. Les échantillons de la catégorie (a) ont été considérés comme spécifiquement positifs pour le BDV.

Parmi les 197 sérums testés en parallèle par ELISA-Ac et VNT, 144 étaient positifs en VNT pour le BDV (titre 1/8) (Tableau 9.4), dont 103 sérums avec un titre quatre fois plus élevé pour le BDV que pour le BVDV-1 ou le BVDV- 2 (tableau 9.5).

Sur les 36 sérums ayant donné des résultats douteux en ELISA-Ac, 32 étaient positifs en VNT pour le BDV (Tableau 9.4) et la plupart d'entre eux (31/32) présentaient un titre de VNT élevé (1/32 à 1/192) (Tableau 9.4) comprenant 19 échantillons avec un titre de BDV quatre fois supérieur à celui du BVDV-1 ou du BVDV-2 (tableau 9.5). Sur la base de cette observation, nous avons considéré les sérums avec un résultat douteux dans ELISA-Ac comme des échantillons séropositifs pour la suite de notre analyse.

Par conséquent, la sensibilité relative du test ELISA-Ac comparée au traitement BDV-VNT a été estimée à [(89 tests ELISA positifs +32 tests ELISA douteux) / 144

VNT positifs] = 84,0% et la spécificité relative à [49 tests ELISA négatifs / 53 VNT négatif] = 92,4% (tableau 9.4).

Certains sérums positifs avec le BDV-VNT ont réagi de manière croisée avec le VNT du BVDV-1 et du BVDV-2, mais les titres observés pour le BVDV étaient généralement faibles, sauf pour deux échantillons de deux troupeaux différents qui présentaient des titres très élevés pour le BVDV-2 (titre = 1/ 480 et 1/640 respectivement).

Tableau 9.4 : Nombre de cas positifs, négatifs et douteux en ELISA-Ac, conformément au seuil recommandé par le fabricant, par rapport au titre VNT pour le BDV, en considérant un titre sur 1/8 comme seuil pour le VNT

Résultats ELISA	Nég VNT (titre < 1/8)			Pos VNT (titre ≥ 1/8)												Total Pos. (VNT)	Total d'échantillons
	<1/2	1/2	1/4	Total Nég (VNT)	1/8	1/12	1/16	1/24	1/32	1/48	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256		
Dout.	4			4		1			7	1	5	3	10	5		32	36
Pos.				0	1		1	1	9	5	20	3	15	6	28	89	89
Nég.	37	10	2	49	2		2		7	2	5	1	2		2	23	72
Total	41	10	2	53	3	1	3	1	23	8	30	7	27	11	30	144	197

Nég: négatifs.

Pos: positifs

Dout: douteux

Tableau 9.5 : Nombre de cas positifs, négatifs et douteux en ELISA-Ac comparés au ratio du titre VNT-BDV comparé au titre VNT-BVDV-1 et BVDV-2

	VNT Titre BDV/ Titre BVDV			Neg	Total
	>4 x	2-3 x	< 2 x		
Résultats ELISA-Ac					
Douteux.	19	7	6*	4	36
Positif	63	8	18	-	89
Négatif	21	-	2*	49	72
Total	103	9	15	53	197

>4 x / 2-3 x / < 2 x: titre VNT pour BDV plus de trois fois plus élevé / entre deux et trois fois plus élevé / moins de deux fois plus élevé que le titre BVDV

* incluant un échantillon avec un titre BVDV-2.

La concordance (coefficient kappa de Cohen) entre le test ELISA-Ac et le test BDV-VNT était de 0,68 (95% de C.I. 0,58 - 0,79).

9.2.4. Résultats obtenus par ELISA-Ag et PCR-RT

Tous les 689 échantillons individuels ont été testés négatifs par ELISA-Ag et ces résultats négatifs ont été confirmés par le fait que tous les pools d'échantillons de plasma ont été testés négatifs par PCR-RT.

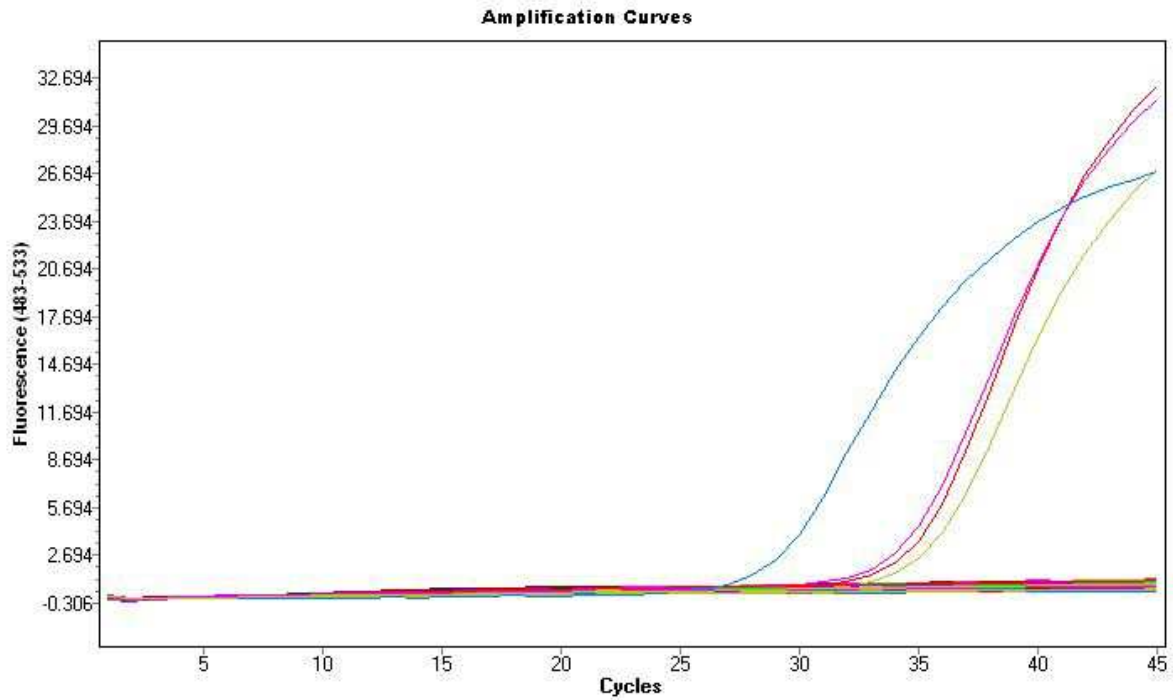


Figure 9.14: Courbes d'amplification sur le lecteur PCR-RT

9.3. Discussion

9.3.1. Séroprévalence

Les études de séroprévalence sont importantes pour détecter l'exposition d'un troupeau aux *pestivirus* et pour vérifier la présence, le contrôle et la surveillance d'une infection active [50]. De ce fait, plusieurs enquêtes ont été menées dans plusieurs pays du monde, soulevant ainsi l'important impact des infections à BDV sur l'industrie des petits ruminants [70.184.88]. En revanche, aucune donnée n'est rapportée sur l'infection de nos cheptels ovins par ce virus à notre connaissance, pour cela nous avons réalisé cette présente étude, en utilisant des tests sérologiques (ELISA-Ac et VNT) et virologiques (ELISA-Ag et PCR-RT).

Chez les ovins, après une infection virale, la détection des anticorps dirigés contre la protéine NS2-3 (p80) (protéine hautement conservée) par la méthode ELISA fournit des résultats fiables pour confirmer une séroconversion. Ces tests ont été largement pratiqués dans plusieurs pays où des programmes de contrôle et d'éradication ont été mis en place, dont le leader est le programme suisse pour le BVDV [185.186]. Dans notre cas, les résultats de cette étude révèlent une prévalence troupeau de 98,2%, alors que la prévalence apparente intra-troupeaux est de 60,17% et la réelle prévalence globale a été estimée à 68,20% en tenant compte de la (Se) et (Sp) du test ELISE-Ac. Des résultats similaires sont rapportés en Europe avec des taux de séroprévalence troupeaux allant de 17.9% à 100% et une séroprévalence individuelle qui varie entre 49,3% et 76% [187.188.70.165.60.89.36], en Asie des taux allant de 20.6% à 23% à l'échelle individuelle et entre 42.89% et 66.3% sont enregistrés [167.186]. Une récente étude au Maroc révèle une séroprévalence troupeaux de l'ordre de 22.7% ainsi que 28.9% à l'échelle individuelle [170]. En Tunisie, Rekiki et al [88] ont rapporté des taux très élevés, avec une séroprévalence troupeaux estimée à 95% et une séroprévalence individuelle de 54%.

Selon Nettelton et al [19], la séroprévalence de la maladie frontalière varie d'un pays à un autre et elle peut s'étendre de 5 à 50% selon les pays et entre les différentes régions d'un même pays.

Les taux un peu plus faibles observés dans quelques pays européens comme la Norvège, Allemagne, Danemark, Irlande ainsi que la Suisse, où des taux de prévalence individuelle de 14% ou moins et des taux de prévalence troupeaux entre 18 et 46% ont été signalés [189.190.191.192.193.194.185] pourraient être attribués à

l'adoption des différents programmes d'éradication dans ces pays, les mesures d'hygiène strictes appliquées contre la BVD/MD, la vaccination ; ce qui réduit indirectement le risque des infections à *Pestivirus* chez les ovins. Cela dit, ces programmes d'éradication ont concerné le BVD et non pas le BDV [185].

Par ailleurs, plusieurs facteurs peuvent expliquer la séroprévalence élevée observée dans nos troupeaux qui peuvent donc participer à la dissémination du virus : le maintien des animaux dans de mauvaises conditions d'élevage, le manque de connaissances des règles d'élevage et de biosécurité, la transhumance et le mélange des troupeaux de différentes origines, le manque de contrôle sérologique périodique et enfin, les échanges clandestins des animaux de pays limitrophes.

Cela dit les résultats d'études de séroprévalence ne sont pas forcément comparables entre elles en raison des différents protocoles d'échantillonnage utilisés, ainsi que l'utilisation du vaccin contre le *Pestivirus* dans certains pays.

9.3.2. Différences régionales de la séroprévalence

Dans cette enquête, nous avons observé des différences régionales marquées en matière de séroprévalence intra-troupeau avec des taux estimés entre 18 et 100% selon les wilayas. Cependant, notre plan d'échantillonnage a été établi pour estimer avec une précision raisonnable la séroprévalence globale au sein du troupeau, mais ne peut pas fournir une estimation précise au niveau des wilayas (cela aurait nécessité un plus grand nombre de troupeaux dans chaque wilaya). Les différences observées entre les wilayas n'étaient pas statistiquement significatives, à l'exception de Chlef (18%, IC à 95% = 9,90-30,50) où nous avons noté une prévalence inférieure à celle notée dans les autres Wilayas. Un tel résultat peut être expliqué par la faible densité des ovins dans cette wilaya, la sédentarité des troupeaux, avec une disponibilité des pâturages tout au long de l'année, lié à de meilleures conditions climatiques. Ces conditions pourraient bien limiter le contact avec les troupeaux potentiellement infectés.

Par ailleurs, il a été montré que la transmission du virus dépend du degré de contact entre les animaux, et elle serait plus élevée dans les bâtiments d'élevage où les animaux sont gardés nez à nez que lorsqu'ils sont à l'aire libre [40]. De même, Loken et al et Graham et al [60.195] ont observé aussi d'importantes variations régionales

de la séroprévalence au sein des troupeaux, et ils ont attribué ces différences aux taux de mouvement, aux différences entre les régions dans les pratiques de gestion et à la densité des moutons dans les troupeaux

9.3.3. Circulation du virus

Les taux de séroprévalence élevés observés dans cette étude peuvent être considérés comme révélateurs d'une infection récente et probablement d'infection active dans certains troupeaux, étant donné que seuls les animaux âgés de 6 à 24 mois ont été échantillonnés. A cet âge, les anticorps maternels ont diminué et leur présence est due à une exposition récente à un *Pestivirus* [57]. Les animaux âgés de plus de 2 ans n'ont pas été échantillonnés pour exclure un biais dû à la séropositivité chez les animaux plus âgés et qui restent positifs durant toute leur vie, une fois la séroconversion.

9.3.4. Etude des facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque importants en relation avec la séroprévalence élevée du BDV ont été identifiés dans notre étude, mais en raison du nombre limité de troupeaux et d'animaux testés ainsi que la zone d'étude limitée, ces facteurs de risque doivent être considérés comme spécifiques au contexte algérien et généralisés avec prudence aux autres pays endémique.

- La séroprévalence (P) était significativement élevée dans les régions intérieures caractérisées par un climat froid et aride (P=65,5%, OR =4,04 ; IC à 95% = 2,55-6,39) que dans les régions côtières caractérisées par un climat tempéré (P=32%). Dans une étude faite en Turquie, une observation similaire a été notée [196]. Bien que les *pestivirus* soient endémiques dans de nombreux pays caractérisés par des conditions climatiques très différentes, on ne peut exclure que des facteurs climatiques tels que la température extérieure ou l'hygrométrie puissent influencer la survie et la dissémination du virus dans l'environnement par le biais des (matières fécales, ustensiles d'élevage...) et avoir donc un impact sur la transmission du virus, et dans des conditions climatiques chaudes la transmission pourraient être réduite et cela par modification de l'intégrité de la membrane virale ainsi que la résistance naturelle à l'environnement [196.197].

- Une séroprévalence nettement plus faible a été observée chez des troupeaux élevés en région montagneuse (P=44,3% ; OR=0,49 ; IC à 95%= 0,29-0,80) par rapport aux troupeaux élevés dans les hauts plateaux (P=61,9%). Le même résultat a été signalé en Espagne où un troupeau qui pâturait dans les montagnes comparé à d'autres troupeaux, présentait une faible prévalence en anticorps [70]. Nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que les troupeaux de la zone côtière sont principalement sédentaires et sont donc rarement en contact avec d'autres troupeaux alors que dans les régions intérieures, les mouvements des troupeaux sont plus intenses, entraînant des taux d'infection plus intenses, ce qui entraîne des taux d'infection plus élevés sans pour autant négliger la densité animale importante dans ces régions.
- Une séroprévalence significativement plus faible a été notée dans les troupeaux sédentaires (P=52,5% ; OR=0,59 ; IC à 95%=0,43-0,84) par rapport aux troupeaux transhumants (P=64,9%). La transhumance est un système largement pratiqué en Algérie, elle concerne les troupeaux des steppes, où les éleveurs se déplacent vers le nord du pays pendant la saison estivale (du début mai à la fin septembre) pour d'avantages de pâturages et retournent en automne (octobre) à leurs fermes. Un autre mouvement de transhumance est observé en début d'hiver (2^{ème} quinzaine de décembre) vers le sud en raison de l'énorme baisse de la température dans les régions steppiques. Cette pratique a déjà été identifiée comme facteur de risque dans des études antérieures. La migration saisonnière des troupeaux et l'utilisation des pâturages en commun permettent l'exposition directe et indirecte à d'autres espèces, y compris les ruminants en liberté [70.9]. Une autre étude réalisée en Syrie appuie notre résultat où il a été rapporté que les troupeaux transhumants, en particulier ceux parcourant de longues distances, ont une augmentation de 14% par rapport aux troupeaux sédentaires qui se déplacent sur de courtes distances [58].
- Nous avons analysé aussi l'impact de la cohabitation des moutons avec d'autres espèces de ruminants (bovin et/ou caprin) dans nos élevages, vu que dans la littérature beaucoup de cas naturels de transmission de *pestivirus* du bétail au mouton et vice versa ont été signalés [87.198] et même la présence

de moutons est reconnue comme un facteur de risque pour l'introduction du BVDV dans les troupeaux bovins [156, 185] et vice-versa [9]. Cependant, une séroprévalence élevée dans des troupeaux bovins séropositifs en Irlande du Nord (> 85%) suggère que la pression d'infection est plus importante des bovins aux ovins que des ovins aux bovins [199]. Une étude sérologique suisse confirme le fait que l'hébergement séparé des ovins et des bovins réduit significativement la séroprévalence de l'infection par le BVDV chez les ovins mais pas celle du BDV [44]. Par contre nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation entre le statut sérologique au niveau individuel et la présence ou l'absence de bovins dans les fermes ($p=0,611$). Mais, nous avons noté une séroprévalence significativement plus faible dans les troupeaux où les ovins étaient mélangés avec des caprins ($P=52,8\%$; $OR=0,58$; $IC \text{ à } 95\% = 0,41-0,81$) par rapport aux troupeaux sans élevage caprins ($P=65,9\%$). Un tel résultat nous laisse penser que la présence de caprins dans le troupeau ralentie la dissémination du virus vu que cette espèce ne semble pas être un hôte efficace pour la survie du *Pestivirus* des ruminants (rare sont les cas détectés chez les caprins ainsi que les animaux IPI) [195.200].

- De manière surprenante, une séroprévalence plus faible a été observée dans les troupeaux où d'autres maladies cliniques ont été signalées par les éleveurs (diarrhée, problèmes respiratoires, agneaux faibles) ($p=0,017$) ($P=63,7\%$; $OR= 0,66$; $IC \text{ à } 95\% = 0,47-0,93$) par rapport aux troupeaux apparemment sains. Il faut dire que la présence d'une autres maladie reposait sur les déclarations des éleveurs et pourraient être biaisées ou subjectives. De plus, dans les troupeaux avec une séroprévalence élevée au virus BDV, la maladie peut être considérée comme endémique et non pas en phase aiguë, et le statut immunitaire des animaux le fera circuler à faible bruit par rapport aux troupeaux ayant plus d'animaux naïfs.
- Par ailleurs, nous n'avons trouvé aucune relation entre la survenue des cas d'avortement et la séroprévalence BDV, mais encore une fois, celle-ci repose sur les déclarations des éleveurs qui pourraient être biaisées. Dans une étude

faite en Irlande du Nord, il est rapporté que parmi 186 fœtus testés sérologiquement; un seul était positif pour le BDV, concluant ainsi que les *pestivirus* ne sont pas une cause primordiale d'avortement ovin dans ce pays [60]. Un résultat similaire est rapporté en Tunisie qui conclut que malgré une forte prévalence de la BD, elle n'a pu être impliquée que dans un syndrome d'avortement que dans un seul troupeau (soit 6 %), sur 20 testés [88].

- Dans le but d'éviter toute infection trans-placentaire, un vaccin de la BD doit protéger les brebis avant leur entrée en période de reproduction [84]. En revanche, il n'existe pas de vaccin standard contre le BDV par contre des vaccins expérimentaux et commerciaux utilisant du BDV complet et inactivé ont été produits en Europe [145.160], sinon ce sont les vaccins contre BVDV qui sont utilisés, mais ces vaccins n'ont pas d'AMM pour une utilisation ovine. Ces vaccins sont utilisés sur le terrain chez les ovins, sans qu'il n'y ait de démonstration expérimentale de leurs efficacités, de leurs durées de protection vaccinales, même le protocole vaccinal n'est pas bien déterminé. Les doses utilisées sont systématiquement divisées par deux, parfois par quatre, pour des raisons économiques, sans qu'aucune étude n'ait prouvé leurs efficacités à ces dosages [158].

Néanmoins ces vaccins peuvent également induire une séroconversion. Malheureusement cette vaccination n'est pas pratiquée en Algérie, mais plutôt nos cheptels de petits ruminants sont vaccinés contre la clavelée (avec un vaccin fabriqué localement à partir d'une lignée cellulaire issue de souche d'embryon ovin) et la brucellose. Par contre, certaines études incriminent l'utilisation, durant les campagnes de vaccination des troupeaux ovins, de vaccins contaminés dans les infections à *pestivirus*, comme celles rapportées en Tunisie où des souches de *Pestivirus* ont été isolées à partir de plusieurs lots de vaccin anti-clavelé du mouton, ce qui pourrait être à l'origine d'une large propagation du virus [48].

- Selon l'OIE (2008), la contamination des vaccins à virus vivants modifié par le *Pestivirus* a été incriminée comme une cause de maladies graves après leur utilisation chez les ovins et d'autres animaux d'élevage. La liste comprend les vaccins utilisés pour lutter contre la maladie d'Aujeszky, la peste porcine

classique, les rotaviroses, les coronaviroses, la peste bovine, la clavelée et l'ecthyma contagieux.

- Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la séroprévalence de BD chez les troupeaux vaccinés par rapport aux troupeaux non vaccinés, cela peut témoigner de la bonne qualité de nos vaccins (lots utilisés non contaminés).

9.3.5. Etude comparative entre VTN et ELISA-Ac

Le VNT est le test de référence pour la détermination et la mesure des anticorps anti-*Pestivirus* [84] ; il a été également utilisé comme test de référence dans plusieurs études de validation d'ELISA en matière de (Sp) et (Se) [201]. Des études antérieures comparant un ELISA indirect disponible dans le commerce (SVANOVIR ELISA-Ac-BD; Svanova Biotech) au VNT ont montré une sensibilité de 94,3% et 100%, et une spécificité de 93,7 et 100% chez les moutons et les caprins respectivement pour la BDV [165.202]. A notre tour pour étudier l'effet de neutralisation croisée ainsi que la (Se) et la (Sp) de notre ELISA-Ac nous avons utilisé un isolat de bovins BVDV-1 et BVDV-2 et un isolat de BDV. Pour cela, 197 échantillons de différents troupeaux ont été testés en parallèle avec ELISA-Ac et VTN pour le BVDV-1, le BVDV-2 et le BVD. Nous avons observé une sensibilité relativement faible de la performance de l'ELISA-Ac, qui est estimée à 84%. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le Kit que nous avons utilisé est plus adapté aux souches européennes de *Pestivirus* et pourrait ne pas détecter correctement les souches de BDV circulant en Algérie. En effet, il est bien connu qu'il existe une grande variabilité dans les souches de BDV en général.

Sur les 197 testés en parallèle, 144 étaient positifs au BDV (titre VTN>1/8) et la plupart d'entre eux (118) présentaient un titre VNT pour le BDV de deux à trois fois supérieur au titre pour le BVDV-1 ou le BVDV-2. Nous pouvons donc en conclure que le virus qui circule en Algérie est le virus de la maladie frontalière plutôt que celui du BVDV.

De manière surprenante, deux des sérums testés présentaient un titre élevé pour le BVDV-2. Ces échantillons provenaient de deux fermes différentes situées dans deux wilayas distinctes (Chlef et Saida), ces troupeaux sont généralement sédentaires mais partagent des pâturages avec les bovins. Le BVDV-2 est un *Pestivirus* spécifique aux Bovins et rarement identifié chez les ovins. Il a d'abord été détecté

chez les bovins d'Amérique du nord [74] États-Unis [8], en Italie [121] puis dans d'autres pays comme l'Allemagne et Royaume-Uni et récemment en Espagne [141]. En Inde, une étude de neutralisation croisée sur des échantillons de chèvres et de moutons a révélé un titre plus de quatre fois supérieur au BVDV-2 pour un mouton et une chèvre [57]. Une étude réalisée récemment en Espagne a révélé que 6 sur 8 foetus d'agneaux testés étaient positifs au BVDV-2 [141]. Ce virus peut provoquer des avortements et probablement une grande virulence chez les moutons naturellement infectés. Cependant, dans la plupart des cas, la principale source de BVDV chez les espèces non bovidés est inconnue, bien que le contact direct avec les bovins semble être la source de contamination initiale [204].

9.3.6. Détection des IPI par ELISA-Ag et PCR-RT

Des analyses d'ELISA-Ag et PCR-RT sont réalisées dans notre étude afin de détecter les animaux IPI, mais aucun antigène viral n'a pu être détecté sur les 689 échantillons, malgré les résultats sérologiques montrant une circulation récente de l'infection dans les troupeaux. Pour expliquer de tels résultats, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

- Premièrement, seul un nombre limité d'animaux de moins de 6 mois a été testé dans chaque troupeau qui est la catégorie d'âge dans laquelle il y a plus de chances de détecter un IPI.
- Deuxième raison, on remet en cause notre faible nombre d'échantillons comparé à différentes recherches réalisées dans le monde [89.60.57]. Par contre notre résultat peut joindre celui de Fassi au Maroc [169] où aucun IPI n'a pu être détecté ainsi que d'autres résultats rapportés dans la littérature où une faible prévalence des animaux IPI est communément observée, qui varient entre 0.3% et 0.24%, et la probabilité de les détecter dans un petit effectif est encore plus faible [64. 70.184].
- Le passage unique dans les stations d'élevage pourrait aussi être mis en cause, car normalement après l'étude de séroprévalence un deuxième passage s'impose dans les mêmes stations où tous les sujets de moins de six mois devraient être prélevés ainsi qu'un effectif plus important devrait être inclus dans l'étude concernant les moutons âgés entre 6 et 24 mois. mais cela est impossible pour deux raisons majeurs : le non marquage des animaux et le manque de coopération des éleveurs, sans oublier la non déclaration ou la

déclaration tardive des avortements, malgré que l'isolement du virus à partir d'avortons ou d'agneaux mort-nés reste difficile mais possible, tandis que les tissus d'ovins IPI contiennent une grande quantité de virus qui peuvent être facilement isolés ou mis en évidence par des méthodes directes [84].

- Notre résultat peut être discuté du point de vue clinique où l'infection aiguë reste généralement sub-clinique et la virémie est transitoire et difficile à détecter.
- En Algérie de nombreux agneaux sont abattus ou vendus à un âge très jeune pour des raisons économiques, ce qui peut réduire les chances de détecter des jeunes animaux IPI. D'autant plus qu'en période de prélèvements, nous n'avons pas observé de signes cliniques typiques de la maladie des frontalières, tels que des signes nerveux, des paralysies et des tremblements musculaires sur les animaux de l'étude. Les sujets prélevés étaient des sujets apparemment sains.
- Généralement, l'ELISA n'est pas assez sensible pour détecter des infections aiguës par le BDV dans des prélèvements de sang [84].

CHAPITRE 10

DISCUSSION GENERALE

Séroprévalence

De nombreuses enquêtes de séroprévalence ont été menées dans le monde, soulevant l'important impact des infections à BDV sur l'industrie des petits ruminants. [70.184], en revanche aucune donnée n'est rapportée sur l'infection de nos cheptels ovins, d'où l'objectif principal de ce travail. Plusieurs tests ont été réalisés, à savoir : sérologiques (ELISA-Ac et VNT) et virologiques (ELISA-Ag et PCR-RT). Un taux de 98,2% est obtenu, alors que la prévalence apparente intra-troupeaux était de 60,17% par contre la réelle prévalence globale a été estimée à 68,20%. Résultats similaires rapportés dans plusieurs études [88.187.188.70.165.60.89.36]. Cela pourrait être expliqué par le fait que ces animaux étaient maintenus dans de mauvaises conditions d'élevage, associé au manque de connaissances sur les règles d'élevage et de biosécurité, l'utilisation courante de la transhumance et donc le mélange de troupeaux de différentes origines, un manque de contrôle sérologique périodique et enfin, les échanges clandestins des animaux de pays limitrophes.

Par contre les taux un peu plus faibles observés dans certains pays pourraient être attribués à l'adoption des différents programmes d'éradication dans ces pays, sachant que ces programmes d'éradication ont concerné le BVDV plus que le BDV [185].

Des différences régionales marquées en matière de séroprévalence intra-troupeau avec des taux estimés entre 18 et 100% selon les wilayas, mais elles n'étaient pas statistiquement significatives, à l'exception de Chlef (18%, IC à 95% = 9,90-30,50). La faible densité des ovins dans cette wilaya, la sédentarité des troupeaux, avec une disponibilité des pâturages tout au long de l'année pourrait bien limiter le contact avec les troupeaux potentiellement infectés, ce constat est soutenu par plusieurs auteurs qui ont observé aussi d'importantes variations régionales de la séroprévalence au sein des troupeaux, due aux taux de mouvement, aux différences entre les régions dans les pratiques de gestion et à la densité des moutons dans les troupeaux [60.195].

Cependant cette séroprévalence élevée peut être révélatrice d'une infection récente et active dans certains troupeaux, étant donné que seuls les animaux âgés de 6 à 24 mois ont été échantillonnés. A cet âge, les anticorps maternels ont diminué et leur présence est due à une exposition récente à un *Pestivirus* [57].

Etude des facteurs de risque

La séroprévalence était significativement élevée dans les régions intérieures caractérisées par un climat froid et aride (65,5%, OR =4,04 ; IC à 95% = 2,55-6,39) que dans les régions côtières caractérisées par un climat tempéré (32%). Les facteurs climatiques tels que la température et l'hygrométrie peuvent influencer la survie et la dissémination du virus dans l'environnement et avoir un impact sur sa transmission [196.197]. Une séroprévalence nettement plus faible a été observée chez des troupeaux élevés en région montagneuse (44,3%) comparés à ceux élevés dans les hauts plateaux (61,9%). Cela peut être expliqué par la sédentarité des troupeaux dans les régions côtières qui ne sont pas forcément en contact avec d'autres troupeaux ; alors que dans les régions intérieures, les mouvements sont plus intenses et le contact est plus fréquent [70].

Une séroprévalence significativement plus faible a été notée dans les troupeaux sédentaires (52,5%) par rapport aux troupeaux transhumants (64,9%), alors que la transhumance est un système largement pratiqué en Algérie sachant que cette pratique a déjà été identifiée comme facteur de risque dans des études antérieures, car elle permet une exposition directe et indirecte à d'autres espèces [70.9.58].

La mixture des élevages (bovin, ovin, caprin) pouvait être un facteur de dissémination du virus BVDV et BDV [87.198.156.185] par contre nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation entre le statut sérologique au niveau individuel et la présence ou l'absence de bovins dans les fermes; mais, nous avons noté une séroprévalence significativement plus faible dans les troupeaux où les ovins étaient mélangés avec des caprins (52,8%).

De manière surprenante, une séroprévalence plus faible a été observée dans les troupeaux où d'autres maladies cliniques ont été signalées par les éleveurs (63,7%) par rapport aux troupeaux apparemment sains. Il faut dire que la présence d'une autre maladie reposait sur les déclarations des éleveurs et pourraient être biaisées ou subjectives. Même constat concernant la relation entre la survenue des cas d'avortement et la séroprévalence BDV ; cela dit l'étude tunisienne a enregistré

l'implication du BDV que dans 6% des élevages comparés aux autres maladies abortives étudiées [88].

Enfin il est à rappeler qu'il n'existe pas de vaccin standard contre le BDV par contre des vaccins expérimentaux utilisant du BDV complet et inactivé ont été produits en Europe [145.160], sinon ce sont les vaccins contre BVDV qui sont utilisés, sans AMM. Ces vaccins peuvent permettre une séroconversion. Par contre la vaccination, durant les campagnes de vaccination des troupeaux ovins, peut être une source d'infections à *pestivirus* [48], Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la séoprévalence de BD chez les troupeaux vaccinés par rapport aux troupeaux non vaccinés.

Etude comparative entre VTN et ELISA-Ac

Dans notre étude, 197 échantillons de différents troupeaux ont été testés en parallèle avec ELISA-Ac et VTN pour le BVDV-1, le BVDV-2 et le BVD. Une faible performance de l'ELISA-Ac est observée, en particulier pour la sensibilité qui est estimée à 84%. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le Kit utilisé est plus adapté aux souches européennes de *Pestivirus*.

Sur les 197 testés en parallèle, 144 étaient positifs au BDV de deux à trois fois supérieur au titre pour le BVDV-1 ou le BVDV-2 ce qui voudrait dire que le virus qui circule en Algérie est le virus de la maladie des frontières plutôt que celui du BVDV. Deux sérums testés présentaient un titre élevé pour le BVDV-2 qui provenaient de deux fermes différentes situées dans deux wilayas distinctes (Chlef et Saida), il est à noter que le BVDV-2 est un *Pestivirus* spécifique aux Bovins et rarement identifié chez les ovins [74.8.121.141].

Détection des IPI par ELISA-Ag et PCR-RT

Aucun antigène viral n'a pu être détecté sur les 689 échantillons. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'un nombre limité d'animaux de moins de 6 mois a été testé dans chaque troupeau qui est la catégorie d'âge dans laquelle il y a plus de chances de détecter un IPI. Notre faible nombre d'échantillons pourrait aussi être mis en cause comparé à différentes recherches réalisées dans le monde [89.60.57], et donc la probabilité de détecter des IPI dans un troupeau de faible effectif est très faible [70.184].

CONCLUSION GENERALE

Les études de séroprévalence (qui sont une approche largement répandue dans le monde) sont d'une grande importance pour détecter l'exposition d'un troupeau aux *pestivirus*, permettant ainsi la vérification de la présence, la circulation et le contrôle d'une infection active dans nos cheptels.

Selon notre recherche bibliographique, cette étude serait la première en Algérie. Elle a permis d'évaluer la séroprévalence du virus BDV chez les ovins, fournissant des preuves d'une infection répandue dans la population ovine à l'échelle individuel et à l'échelle troupeaux ; avec des différences régionales marquées avec des taux allant jusqu'à 100% selon les wilayas.

Plusieurs facteurs de risque importants qui semblent être en étroite relation avec la dissémination de la maladie ont été identifiés dans notre étude à savoir le climat, les reliefs, les mouvements des troupeaux, la présence de caprins dans les élevages ainsi que le développement d'une éventuelle immunité croisée dans ces cheptels. En revanche, en raison du nombre limité de troupeaux et d'animaux testés, ainsi que la zone d'étude limitée, ces facteurs de risque doivent être considérés comme spécifiques au contexte algérien et généralisés avec prudence aux autres pays endémiques. Par ailleurs, cette enquête n'a révélé aucun effet significatif concernant la taille du troupeau, présence de bovins, introduction de nouveaux animaux dans les troupeaux et survenue des avortements.

Dans le but de contrôler la sensibilité et la spécificité de notre kit ELISA-Ac ainsi que la détermination de l'effet de la neutralisation croisée un test VNT de référence a été utilisé. Cependant, dans notre étude, cette technique a révélé une faible performance de l'ELISA-Ac, en particulier en matière de sensibilité. Par contre, nous avons conclu que le virus circulant en Algérie est le virus de la maladie des frontières plutôt que celui du BVDV vu que les sérums testés en parallèle en VNT avaient des titres très élevés en BDV, et deux des sérums testés présentaient un titre élevé pour le BVDV-2 qui est rarement détecté chez les moutons, provenant de deux fermes différentes situées dans deux wilayas distinctes.

Cependant aucun antigène viral n'a pu être détecté sur la totalité des échantillons et ce, malgré les résultats sérologiques montrant une circulation récente de l'infection dans les troupeaux, étant donné que seuls les animaux âgés de 6 à 24 étaient échantillonnés.

Enfin, on peut conclure que la mise en place d'autres études épidémiologiques complémentaires à travers d'autres régions du pays, ainsi que l'isolement des souches virales à l'origine de la maladie des frontières qui circule en Algérie peuvent aider à mieux comprendre l'origine et la dynamique des infections à *pestivirus*, permettant d'élaborer un programme de contrôle et de lutte contre ces infections chez les ovins ainsi que chez d'autres espèces de ruminants.

CONSEILS ET RECOMMANDATIONS

Les propositions citées ci-dessous sont destinées aux différents acteurs de la filière dans le but de bénéficier de conseils appropriés, surtout pour minimiser les risques liés à l'apparition et la dissémination des *pestivirus* au sein des troupeaux ovins. De nombreux acteurs peuvent intervenir à des niveaux différents :

a. Services vétérinaires :

- Organiser des journées de formation et de sensibilisation aux vétérinaires publiques et privés (hygiénistes, praticiens, inspecteurs) dans le but d'enrichir leurs connaissances vis-à-vis du BDV et BVDV et les sensibiliser ainsi sur l'existence du virus dans nos cheptels et les risques liés à cette maladie.
- Intégrer la BD dans le plan national de lutte contre les maladies infectieuses. Un vaccin de la BD recommandé par OIE peut être utilisé chez les brebis avant leur entrée en période de reproduction dans le but d'éviter toute infection trans-placentaire, parce que l'élimination des IPI et l'immunisation des reproductrices avant gestation en vue d'une « protection foétale » sont des facteurs clés de l'assainissement.
- Réaliser un suivi sérologique BD pour permettre la gestion sanitaire des mouvements d'animaux et pour assurer une prophylaxie annuelle (6 sérologies de contrôle peuvent être réalisées chacune sur un mélange de 5 sérums d'agnelles ; en utilisant un kit ELISA détectant les anticorps dirigés contre la protéine structurale P80) prenant comme exemple le modèle du bassin aveyronnais.
- Irradier la maladie, par l'élimination des IPI. En dépistant par PCR des mélanges de 20 échantillons (tubes secs ou EDTA). Afin de réduire les coûts, en cas de résultat positif, on fait une PCR sur des petits mélanges de 5 et sur les mélanges positifs on les reprend individuellement. Une 2ème PCR, 1 à 2 mois après, peut être réalisée afin de savoir si c'est un IPI ou un Infecté transitoire.

- Protéger les troupeaux sains en ne réalisant les achats d'animaux que dans des troupeaux sains.
- protéger les troupeaux indemnes de BD par un système de gestion sanitaire des mouvements d'animaux en prenant comme exemple les différents programmes de lutte adoptés dans plusieurs pays d'Europe et qui ont connu un grand succès.
- Renforcer la collaboration entre les différents secteurs concernés (services vétérinaires, chercheurs universitaires, laboratoire de diagnostic et la santé publique, praticiens privés, étudiant en médecine vétérinaire) en faisant connaître la pathologie par le biais d'ateliers de formation.
- Soulever l'importance des déclarations des avortements par les vétérinaires praticiens et éleveurs.

b. Eleveurs

- Organiser des journées de sensibilisation et de vulgarisation sur la pathologie d'une manière simplifiée afin qu'ils prennent conscience sur l'importance des pertes causées par la BD/BVDV sur les cheptels ovins ainsi que bovins.
- Mettre l'accent sur l'importance de la déclaration des avortements, ainsi que les risques biologiques liés et la conduite à tenir après.
- Encourager les éleveurs à collaborer en matière de lutte contre les avortements (en facilitant : l'accès aux élevages et la réalisation des prélèvements tous types confondus).

c. Laboratoires de diagnostic

- Renforcer les laboratoires de recherche par des outils de diagnostic d'actualité qui correspondent aux besoins du terrain.
- Des tests de diagnostic permettant de différencier BVDV-1, BVDV-2 et BDV doivent être disponibles car cela peut avoir un impact sur les mesures de contrôle de la maladie.

PERSPECTIVES

On considère que ce travail est une introduction à l'étude de la maladie des frontières chez les ovins ; pour cela, il est très intéressant de dégager quelques pistes de recherche pour des études ultérieures, à savoir :

- créer un réseau de travail professionnel regroupant tous les acteurs de la filière afin d'élaborer une bonne stratégie de recherche de la Border Disease.
- approfondir les recherches des *pestivirus* chez les ovins dans le but de mieux comprendre leur rôle comme réservoir biologique des *pestivirus* en Algérie.
- cibler d'autres espèces d'animaux d'élevage (bovins, caprins) et sauvages pour la détection du virus.
- effectuer des enquêtes sérologiques périodiques à grande échelle pour contrôler la circulation du virus.
- rechercher les souches de *pestivirus* circulantes en Algérie à travers des enquêtes ciblées visant des cheptels souffrant de problèmes d'avortements, avec ou non des agneaux présentant un tableau clinique caractéristique.

APPENDICE A

Liste des abréviations

BD: Border Disease
BDV: Border Disease Virus
BVDV: Bovine Viral Diarrhea virus
MD: Maladies des Muqueuses
CSFV: Classical Swine Fever virus
ELISA-Ac: Antibody enzyme-linked immunosorbent assay- Anticorps
ELISA-Ag: Antigen enzyme-linked immunosorbent assay-Antigenes
VNT: virus neutralization test
PCR-RT: polymerase chain reaction- Real Time
ICTV : Comité International de la Taxonomie des Virus
ARN : Acide RiboNucléique
IPI : Infecté Permanent Immunotolérant
IC: intervalle de confiance
ICC: intra-class correlation
DO: Densité Optique
GEE: generalized estimating equation model
P: séroprévalence
Se: Sensibilité
Sp: Spécificité
OR: odds ratio
TCID₅₀: Tissue culture infectious dose 50%
MDBK cells: Lignée cellulaire Madin-Darby Bovine Kidney
OIE: Organisation mondiale de la santé animale
Cp: Cytopathogène
Ncp : Non Cytopathogène
HCV : Hog Cholera Virus
IPMA : Indirect Peroxidase Mono Assay
IRES : Internal Ribosome Entry Site
SPM : système phagocytaire mononuclée

AcM : Anticorps Monoclonaux
Nm : Nanomètre
ORF : Open Reading Frame
UTR : UnTranslated Region
IgM : immunoglobulines M
IgG : immunoglobulines G
A : Antibiotique
Ac : Anticorps
ADV : Aujeszky Disease Virus = virus de la maladie d'Aujeszky
C+ : Contrôle viral
C- : Contrôle cellulaire
CPE : Effet cytopathogène
EHV-1 : Equine Herpes Virus type 1 = Herpes virus équin de type 1
EVA : virus de l'artérite virale équine
FCS : Foetal calf serum = serum de foetus de veau
HPS : sérum fortement positif
IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis = Rhinotrachéite infectieuse bovine
LPS : Sérum faiblement positif
ND50 : Neutralising dose 50% = titre neutralisant 50%
MEM: Milieu minimum essentiel
MEM+A : MEM+antibiotiques
MEM+A+S: MEM+antibiotiques+FCS
PK-15 :Lignée cellulaire Pig Kidney-15
PBS : Phosphate buffered saline
RK-13 : Lignée cellulaire Rabbit Kidney-13

APPENDICE B

Questionnaire des Participants de l'Etude BD

Date réponse au questionnaire : / / 2015

Code Eleveur :

N° troupeau :

Wilaya :

Localité :

Taille du troupeau :

- Structure du Troupeau

1. Races :

2. Inventaire :

(Données à compléter avec l'éleveur pour le détail du cheptel) :

Catégorie	Mâle	Femelle
Jeunes ovins < 24 mois		
< 6 mois		
6 – 12 mois		
12 – 24 mois		
ovins Adultes > 24 mois		
Dont brebis en lactation		()
Brebis gestante		()
Brebis de réforme (engraissement)		()
TOTAL		

- L'exploitation

- 1/ Les ateliers de l'exploitation :

Ovins		Bovins		Caprins		Mixtes	
-------	--	--------	--	---------	--	--------	--

- 2/ l'atelier bovin se situe-t-il sur le même site que l'atelier ovin O/N?.....
- 3/ Les mouvements d'animaux (achats, pensions, estives, ...) dans l'atelier bovin sont-ils :

Rares		Fréquents		Très fréquents	
-------	--	-----------	--	----------------	--

- 4/ Présence d'un atelier caprin O/N :...
- 5/ L'atelier caprin se situe-il sur le même site que l'atelier ovins O/N?...
- 6/ Les mouvements d'animaux (achats, pensions, estives) dans l'atelier caprin sont-ils :

Rares		Fréquents		Très fréquents	
-------	--	-----------	--	----------------	--

- Les mouvements d'animaux

- 1/ Le renouvellement :
 - Auto-renouvellement O/N :.....
 - Achat d'agnelles de renouvellement O/N :.....

- 2/ L'engraissement :

- Engraissement : de leurs agneaux seuls O/N :.....
- D'agneaux de différents élevages (collecte dans le voisinage, marchés,...) O/N :.....
- Connaissance du statut des agneaux à l'engraissement provenant d'autres élevages O/N?....

- Risques d'introduction du BD dans l'exploitation

- 1/Au cours de 12 derniers mois, avez- vous acheté des d'animaux (O/N) ? :

Catégorie	Nombre
agneaux < 6 mois	
agneaux d'élevage >6 mois	
brebis en gestation	
Béliers reproducteurs	
TOTAL	

- 2/Si vous avez acheté des animaux ont-ils été testés pour le BD (O/N) ?
- 3/Au cours des 12 derniers mois, vous vous êtes déplacés avec votre cheptel (O/N) ? :
- 4/En pâture, les ovins de votre troupeau sont-ils en contact avec des animaux d'autres troupeaux (O/N) ?
- Est-ce- que votre cheptel est entré en contact avec des animaux sauvages O/N ?.....

- Gestion de la reproduction

- 1/ Mode de reproduction :

- Saillie naturelle O/N :.....
- IA O/N:.....
- Nombre de mise bas par an :.....
- Ya-t-il des cas d'avortements enregistrés O/N ?..., Si oui combien depuis 1 an ?.....

- 2/ Les reproducteurs :

- Origine des béliers :
-
- Existence de béliers communs à plusieurs exploitations (location de béliers...) O/N?.....

- Antécédents de l'élevage

- 1/ Y a-t-il déjà eu des épisodes cliniques de Border Disease dans l'élevage O/N?...
 - Autres problèmes sanitaires rencontrés :
.....
.....
.....
 - Quel est le statut vaccinal du cheptel ?.....

APPENDICE C

Principaux résultats de l'étude

Tableau 9.6 : caractéristiques d'élevage

Paramètres	Type	% élevage
Climat	Aride	82.1
	tempéré	17.9
Relief	montagne	12.5
	Plateau	87.5
Races ovines	El Hamra + autres	48.2
	OuledDjellal + autres	39.3
	Race locale	3.6
	Rimbi	8.9
Taille des troupeaux	<50	14.28
	51-100	33.92
	101-200	35.71
	>200	16.07
Mouvements des troupeaux	sédentaire	42.9
	Transhumant	57.1
Mixture des espèces	mixe	71.4
	ovin	28.6
Maladies associées	oui	59.0
	non	63.7
Auto-renouvellement	non	100
	oui	59.0
Achat de femelles	non	62.2
	oui	56.7
Engraissement des agneaux seuls	non	66.0
	oui	59.1
Paturage en commun	non	63.3
	oui	59.7
Antécédent d'avortement	non	63.9
	oui	57.7
Achat de béliers	oui	63.2
	non	57.6

Tableau 9.7 : analyse statistique des facteurs de risqué et séroprévalence

Variables		ELISA- Ac				
		Cas positifs (%)	Cas négatifs	P value	OR	IC 95%
Région	Bordj Bouaririj	15 (50,0)	15	0,0001		
	Setif	10 (100,0)	0			
	Msila	51 (71,8)	20			
	Djelfa	35 (58,3)	25			
	Laghouat	39 (48,8)	41			
	Al Bayedh	57 (81,4)	13			
	Tizi Ouzou	23 (46,0)	27			
	Chlef	9 (18,0)	41			
	Saida	105(67,7)	50			
Climat	aride	312(65,5)	164	0,0001	4,04	2.55-6.39
	tempéré	32 (32,0)	68			
Relief	montagne	31(44,3)	39	0,005	0,49	0,29-0,80
	Haut plateau	313(61,9)	193			
Breed	El Hamra	162 (72,0)	63	0,0001		
	El Hamra+ race locale	9 (18,0)	41			
	Ouled djellal	15 (37,5)	25			
	Ouled Djellal+ autres	112(56.7)	15			
	race locale	12 (60,0)	8			
	Rimbi	30 (60,0)	20			
Taille du troupeau	>100	164 (60,3)	108	0,791	1,04	0,75-1,45
	≤100	180 (59,2)	124			
Mouvement de troupeau	sedentary	126 (52,5)	114	0,0001	0,59	0,42-0,83
	transhumant	218 (64,9)	118			
Composition du troupeau	sheep	339(49.20)		0,611	0,91	0,65-1,28
	Sheep mixed with cattle	206 (60,6)	134			

	Sheep mixed with goat	143 (52,8)	128	0,001	1,73	1,23-2,41
Avortement	No	122 (63,9)	69	0,152	1,29	0,90-1,85
	Yes	222 (57,7)	163			
Animaux achetés dans les 12 derniers mois	No	139 (63,2)	81	0,183	1,26	0,89-1,78
	Yes	205 (58)	151			
location de béliers	No	294 (59,3)	202	0,585	0,87	0,53-1,41
	Yes	50 (62,5)	30			
Origine du mâle reproducteur	intern	246 (58,3)	176	0,468		
	extern	7 (10)	3			
	Extern+intern	91 (63,2)	53			
Maladies associées	Yes	126 (59)	108	0,017	0,66	0,47-0,93
	No	218 (63,7)	124			
Vaccination	Yes (clavelée, brucellosis)	202(59,1)	134	0,697	0,93	0,66-1,31
	No	142 (60,7)	92			

Tableau 9.8 : tableau récapitulatif des résultats de la séroprévalence par troupeaux

	Code élevage	POSITIF	DOUTEUX	POS+DOUT	NEGATIF	Grand Total	Prévalence troupeaux
1	CH1	1		1	9	10	10%
2	CH2	2	1	3	7	10	30%
3	CH3			0	10	10	0%
4	CH4	3		3	7	10	30%
5	CH5	1	1	2	8	10	20%
6	DJ1	8		8	2	10	80%
7	DJ2	6		6	4	10	60%
8	DJ3	5	1	6	4	10	60%
9	DJ4	8		8	2	10	80%
10	DJ5	2	2	4	6	10	40%
11	DJ6	1	2	3	7	10	30%
12	ELB1	4		4	6	10	40%
13	ELB2	10		10		10	100%
14	ELB3	7	1	8	2	10	80%
15	ELB4	9		9	1	10	90%
16	ELB5	9		9	1	10	90%
17	ELB6	8		8	2	10	80%
18	ELB7	7	2	9	1	10	90%
19	BB1	4	2	6	4	10	60%
20	BB2	6	1	7	3	10	70%
21	BB3	1	1	2	8	10	20%
22	LAG1	4		4	6	10	40%
23	LAG2	5		5	15	20	25%
24	LAG3	3		3	7	10	30%
25	LAG4	7		7	3	10	70%

26	LAG5	6		6	4	10	60%
27	LAG6	5	1	6	4	10	60%
28	LAG7	7	1	8	2	10	80%
29	M1	9		9	1	10	90%
30	M2	9		9	1	10	90%
31	M3	7	1	8	2	10	80%
32	M4	5	2	7	3	10	70%
33	M5	5	1	6	4	10	60%
34	M6	4	1	5	5	10	50%
35	M7	7		7	4	11	64%
36	S1	10		10		10	100%
37	SAIDA01	2	3	5	5	10	50%
38	SAIDA02	2	1	3	7	10	30%
39	SAIDA03	2	3	5	5	10	50%
40	SAIDA04	4		4	7	11	36%
41	SAIDA05	5	1	6	4	10	60%
42	SAIDA06	6	1	7	3	10	70%
43	SAIDA07	5		5	5	10	50%
44	SAIDA08	9		9	1	10	90%
45	SAIDA09	8	2	10		10	100%
46	SAIDA10	8		8	2	10	80%
47	SAIDA11	9	1	10		10	100%
48	SAIDA12	9		9	1	10	90%
49	SAIDA13	6	2	8	2	10	80%
50	SAIDA14	2	3	5	5	10	50%
51	SAIDA15	10	1	11	3	14	79%
52	TIZI1	6	1	7	3	10	70%

53	TIZI2	2		2	8	10	20%
54	TIZI3	2		2	8	10	20%
55	TIZI4	2		2	8	10	20%
56	TIZI5	10		10		10	100%

APPENDICE C

Test ELISA-Ac

- **Kit utilisé**

- SERELISA® BVD p80 Ab Mono Blocking, Référence : SBVD1.NF version n°19 – 11/03/2013, (ISO 9001).
- Kit de détection des anticorps anti BVD-BD chez les ruminants qui peut faire 384 réactions monocupules,
 - Individuels (Bovins et caprins),
 - Individuels et mélanges (ovins).

- **Contrôles utilisés**

- Un control du Kit positif mis dans les cupules (B1-B2).
- Un control du kit négatif mis dans les cupules (A1-A2).
- 2 contrôles :
 - high pos BVD1, son titre en SN est de 1/320, mis dans les cupules (D1.D2). réf MAC.5156.
 - high pos BVD2, son titre en SN est de 1/30, mis dans les cupules (E1.E2).
- Un control BD, son titre en SN est de 1/10, qui a donné un résultat positif, mis dans les cupules (F1.F2).
- Un contrôle BVDV1 et 2 négatif son titre en SN est de 1/30, réf : MAC. 3003. Mis dans les cupules (G1.G2).
- Un Week positif BVDV1 qui est sortie douteux. Son titre en SN est 1/10 mis dans les cupules (H1.H2).

Ci-dessous le plan de plaque utilisé pour ELISA Ac :

Tableau 9.9 : plan de plaque pour ELISA-Ac

Plan de plaque

Plaque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC										
B	NC	NC										
C												
D	BVDV1 HP	BVDV1 HP										
E	BVDV2 HP	BVDV2 HP										
F	BDV HP	BDV HP										
G	NEG	NEG										
H	BVDV1 WP	BVDV1 WP										

Tableau 9.10 : Composition et conservation du kit ELISA-Ac

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
4 plaques de 6 barrettes de 2 x 8 cupules sensibilisées par la protéine BVD/BD [p80/125]	A utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Solution de lavage (W) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48h après dilution.
Diluant des échantillons (SD)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif (P)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué (CD)	Prêt à l'emploi.
Conjugué (concentré) (CJ) AcM anti-BVD/BD p80/125 / peroxydase	A diluer dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h.
Tampon substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi.
Solution d'arrêt (S)	Prêt à l'emploi.
Films adhésifs	12 films

Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à + 5°C ± 3°C.

- **Echantillons testés**

576 sérums de moutons adultes.

- **Matériels utilisés**

- Haute de sécurité,
- Micropipette multi sortie,
- Tips,
- Gants,
- Kit Elisa
- Eau distillée,
- Marqueur,
- Fiole,
- Becher.
- Laveur de plaque,
- Lecteur Elisa,
- Papier absorbant.
- Incubateurs : à 5°C +/- 3°C. à 20°C +/- 5°C.

- **Technique**

- 1. Dépôt des échantillons et témoins**

- a. Distribution des témoins**

Les témoins sont prêts à l'emploi. Après agitation des flacons, déposer 100 µl de témoin négatif (**N**) dans les cupules A1 et A2 et 100 µl de témoin positif (**P**) dans les cupules B1 et B2.

- b. Distribution des échantillons**

- Les échantillons d'ovins à tester pré-dilués au 1/5 sont distribués à raison de 100 µl par cupule.
- Une dilution directe dans la cupule a été faite en distribuant 80 µl de diluant puis 20 µl de sérum d'ovins.
- Les échantillons sont testés en simple et la distribution est effectuée en colonne.
- Les barrettes sont disposées sur un cadre. Celui-ci était nécessaire pour utiliser le laveur et le lecteur.

- Les cupules ont été couvertes avec la longueur nécessaire de film adhésif.
- Une homogénéisation a été faite à l'aide d'un agitateur de plaque.

c. Incubation des échantillons et des témoins

Incubés pendant 1 nuit (14-18 heures) à $+ 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

2. Lavage

Le film adhésif a été ôté délicatement.

Tampon de lavage :

Une quantité suffisante de tampon de lavage par dilution de la solution de lavage au 1/10 dans de l'eau distillée qui a été préparée.

Le lavage est répété 4 fois.

3. Ajout du conjugué

a. Préparation du conjugué

La solution de conjugué est préparée par dilution du conjugué CJ au 1/10 dans le diluant du conjugué CD (2 ml sont nécessaires pour une barrette, à savoir 200 μl de CJ dilué dans 1,8 ml de CD).

On a utilisé 79.2 ml de diluant + 8.8 ml de solution conjugué pour obtenir 88ml de solution ainsi diluée.

b. Distribution du conjugué

Distribuer 100 μl de conjugué dilué qui est distribué dans toutes les cupules. Les plaques sont recouvertes d'un film adhésif neuf.

c. Incubation du conjugué :

Le temps d'incubation était de 1 heure ± 5 min à $+ 20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

d. LAVAGE

Le film adhésif est ôté délicatement et les plaques sont lavées 4 fois.

4. Révélation

- Ajout du substrat

100 μl de tampon substrat (PS) est distribué par cupule.

Les plaques sont homogénéisées à l'aide d'un agitateur de plaque.

- **Incubation du substrat :**

Une incubation de 30 minutes \pm 5 min. à température du laboratoire ($+ 20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) et à l'obscurité, a été nécessaire.

- **Ajout de la solution stop :**

50 μl de solution d'arrêt (**S**) est distribué par cupule.

Les plaques sont homogénéisées à l'aide d'un agitateur de plaque.

Il faut s'assurer qu'il n'y a pas eu de formation de bulles dans les cupules.

Les fonds des cupules sont essuyés soigneusement.

5. Validation du test

Les résultats de chaque série seront validés :

- si la DO du sérum témoin négatif (N) est $\geq 0,500$, et,

- si le pourcentage de compétition du sérum témoin positif est (P) $\geq 70\%$.

Ce pourcentage se calcule de la façon suivante :

$$\% P = \frac{DO N - DO F}{DO N} \times 100$$

DO = moyenne des densités optiques.

6. Mesure des densités optiques

Les densités optiques (DO) sont mesurées en bichromatisme à 450 et 630 nm (La lecture en bichromatisme est fortement recommandée).

7. Analyse de la densité optique

Les DO seuils correspondants à 20 % et 40 % de compétition sont calculées et comparées à chacune des DO des échantillons aux DO seuils DO S 20 et DO S 40 pour les échantillons individuels

$$\overline{DO S 20} = 0,80 \overline{DO N} + 0,20 \overline{DO P}$$

$$\overline{DO S 40} = 0,60 \overline{DO N} + 0,40 \overline{DO P}$$

8. Interpretation des résultats

		DO S 40	DO S 20
Echantillon individuel	+	+/-	-

Echantillons :

- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (%E) ≥ 40 % est considéré comme **positif**.
- Tout sérum ou plasma présentant un pourcentage de compétition (% E) ≤ 20 % est considéré comme **négatif**.

- Zone d'incertitude :

Tout sérum ou plasma individuel présentant un pourcentage de compétition situé dans une zone d'incertitude comprise entre 20 et 40 % doit être considéré comme douteux.

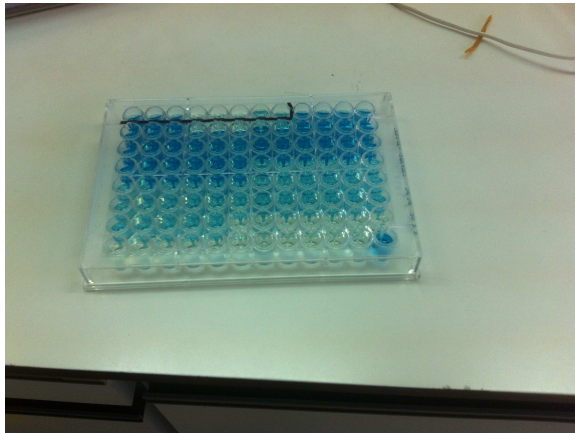


Figure C.1 : plaque ELISA-Ac



Figure C.2 : polymicropipette



Figure C.3 : kit SERELISA[®] BVD p80 Ab Mono Blocking



Figure C.4 : etuve pour incubation des plaques



Figure C.5 : agitateur de plaque



Figure C.6 : laveur de plaque



Figure C.7 : agitateur de sérum



Figure C.8 : lecteur de plaque ELISA

APPENDICE D

Test ELISA-Ag

Principe du test

Le kit SERELISA® BVD p80 Ag Mono Indirect utilise une technique immuno enzymatique indirecte monocupule pour la détection d'un antigène (protéine non structurale p80/125) commun à toutes les souches, cytopathogènes ou non, des virus de la BVD/MD et de la BD. Ce test, réalisé directement sur un échantillon de sérum, plasma ou sang total, permet notamment l'identification des ruminants IPI. Ce test peut également être utilisé sur des échantillons de leucocytes ou d'extraits d'organes.

La réaction comporte quatre étapes :

1. Les témoins et les échantillons à tester sont distribués dans les cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux anti- BVD/MD/BD [p80/125]. La protéine virale éventuellement présente dans l'échantillon se fixe sur les sites spécifiques.
2. Après lavage pour éliminer les fractions non liées, un anti-sérum de lapin anti-BVD/MD/BD [p80/125] est ajouté. Il se fixe sur l'antigène précédemment lié à la phase solide.
3. Après lavage, un conjugué anti-Ig de lapin couplé à la Peroxydase permet de révéler la fixation des Ig de lapin anti-BVD/MD/BD [p80/125] formant un complexe (Ac-Mn) - (Ag BVD/MD/BD [p80/125]) - (Ig lapin anti BVD/MD/BD [p80/125]) - (Ac chèvre anti-Ig lapin/Peroxydase)
4. Après lavage, l'enzyme liée au complexe est révélée par adjonction d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Les densités optiques sont alors enregistrées. La présence ou l'absence de l'antigène est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues à partir du témoin positif.

- Kit utilisé

- SERELISA® BVD p80 Ag Mono indirect, Référence : SBVD6.NF version n°24 12/03/2013 (ISO9000).

- Kit de détection d'un antigène du virus BVD-BD- MD dans les échantillons individuels de ruminants infectés permanents immunotolérants (IPI).
- Technique immuno-enzymatique indirecte.
- 192 réactions monocupules.

- **Les contrôles utilisés**
- Un control du Kit positif (contrôle du Kit) mis dans les cupules (B1-B2).
- Un control du kit négatif (contrôle du Kit) mis dans les cupules (A1-A2).
- Un High positif BVD mis dans les cupules (C1-C2).
- Un week positif BVD mis dans les cupules (D1-D2).
- Un négatif BVD mis dans les cupules (E1-E2).
- Un sérum BD dilué à 10^{-2} mis dans les cupules (F1-F2).
- un sérum BD dilué à 10^{-3} mis dans les cupules (G1-G2).
- un sérum BD dilué à 10^{-4} mis dans les cupules (H1-H2).

Ci-dessous le plan de plaque utilisé pour ELISA-Ag :

Tableau 9.11 : plan de plaque pour ELISA-Ag

Plan de plaque

Plaque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	NC										
B	PC	PC										
C	HP BVD	HP BVD										
D	LP BVD 0,5	LP BVD 1										
E	neg	neg										
F	BD 10-2	BD 10-2										
G	BD 10-3	BD 10-3										
H	BD 10-4	BD 10-4										

Tableau 9.12 : composition et conservation du kit

NATURE DES REACTIFS	RECONSTITUTION ET CONSERVATION
2 plaques de 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées par des Ac-Mn anti-BVD/MD/BD [p80/125]	A utiliser dans les 3 mois après ouverture du sachet. Refermer le sachet après utilisation.
Solution de lavage (W) (concentrée 10 fois)	Diluer 10 fois en eau distillée ou déminéralisée. Utiliser dans les 48h après dilution.
Anti-sérum de lapin anti-BVD/MD/BD [p80/125] (concentré 10 fois) (AS)	A diluer 10 fois dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h après dilution.
Conjugué anti-sérum de chèvre anti-Ig de lapin marqué à la peroxydase (CJ). (concentré 10 fois)	A diluer 10 fois dans le diluant CD. Utiliser dans les 24h après dilution.
Diluant pour échantillon (SD)	Prêt à l'emploi.
Témoin négatif (N)	Prêt à l'emploi.
Témoin positif (P)	Prêt à l'emploi.
Diluant du conjugué (SD)	Prêt à l'emploi.
Tompan substrat de la peroxydase (PS)	Prêt à l'emploi.
Solution d'arrêt	Prêt à l'emploi.
Films adhésifs	6 films

Le kit et les réactifs dilués doivent être conservés à + 5°C ± 3°C.

- Echantillons testés

- 576 plasmas de moutons âgés entre 6 et 24 mois
- 144 plasmas de moutons de moins de 6 mois.

- Matériels utilisés_

- Haute de sécurité,
- Micropipette multi sortie,
- Tips,
- Gants,
- Kit Elisa,
- Eau déminéralisée,

- Marqueur,
- Fiole,
- Becher,
- Laveur pour plaque,
- Lecteur Elisa de lecture pour microplaques équipées de filtres pour lecture bichromatique à 450 et 630 nm.
- Papier absorbant.
- incubateur à $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- **Technique utilisé**

Préparer les échantillons de plasma à analyser :

- Dilutions :
 - Pour l'antisérum : on a préparé 110 ml de solution: 11ml d'antisérum + 99ml de diluant avec une dilution de 1/10.
 - Pour le conjugué : on a préparé 110 ml de solution: 11ml d'antisérum + 99ml de diluant avec une dilution de 1/10.

1. Dépôt des échantillons et témoins

1.1. Distribution des témoins

Les témoins négatif et positif sont distribués en double pour chaque série de déterminations et pour chaque plaque. Ils sont prêts à l'emploi.

Après agitation des flacons, 100 μl de témoin négatif (N) est déposé dans les cupules A1 et A2 et 100 μl de témoin positif (P) dans les cupules B1 et B2.

1.2. Distribution des échantillons

- Les échantillons de plasma sont testés dilués au 1/2 directement dans les cupules, à raison de 100 μl par cupule (on a distribué 50 μl de tampon diluant (SD) et 50 μl d'échantillon à tester).
- Les cupules sont recouvertes avec le film adhésif.
- Les plaques sont homogénéisées par agitation douce à l'aide d'un agitateur de plaque.

- Un plan de distribution et d'identification des témoins et des échantillons sur les plaques a été établi.

1.3. Incubation des échantillons et des témoins

On a utilisé le protocole long : 1 nuit (14-18 heures) à $+ 20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

1.4. LAVAGE

- Le film adhésif a été ôté délicatement.

- Tampon de lavage :

Une quantité suffisante de tampon de lavage par dilution de la solution de lavage W au 1/10 dans de l'eau distillée, a été préparée.

Le lavage est répété 4 fois.

1.5. Ajout de l'antisérum

- **Préparation de l'antisérum :**

L'antisérum (AS) est dilué au 1/10 avec le diluant (CD). On a prévu 1 ml d'antisérum dilué par barrette, soit 100 μl de sérum concentré (AS) plus 0,9 ml de diluant (CD) (susciter ci-dessus).

- **Distribution de l'antisérum :**

100 μl d'antisérum dilué est distribué dans toutes les cupules. Les plaques sont recouvertes avec un film adhésif neuf.

- **Incubation de l'antisérum**

Les plaques sont Incubées 1 heure \pm 5 min. à $+37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- **LAVAGE**

Le film adhésif est ôté délicatement et les plaques sont lavées 4 fois.

1.6. Ajout du conjugué

- Préparation du conjugué

Le conjugué (CJ) est dilué au 1/10 avec son diluant (CD). On a prévu 1 ml de conjugué dilué par barrette, soit 100 µl de conjugué concentré (CJ) plus 0,9 ml de diluant (CD) (susciter ci-dessus).

- Distribution du conjugué

100 µl de conjugué dilué est distribué dans toutes les cupules. Les plaques sont recouvertes avec un film adhésif neuf.

- Incubation du conjugué

Les plaques sont incubées 1 heure \pm 5 min. à $+37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- LAVAGE

Le film adhésif est ôté délicatement et les plaques sont lavées 4 fois.

1.7. Révélation

- Ajout du substrat

100 µl de tampon substrat (**PS**) est distribué par cupule. Les plaques sont tapotées à l'aide d'un agitateur de plaque.

- Incubation du substrat

Les 10 plaques sont incubées 30 minutes \pm 5 min. à température du laboratoire ($+20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) et à l'obscurité.

- Ajout de la solution stop

50 µl de solution d'arrêt (S) est distribuée par cupule. Ces dernières sont tapotées à l'aide d'un agitateur de plaque. On s'est assuré qu'il n'y a pas eu de formation de bulles dans les cupules et qu'elles étaient bien propres.

- Mesure des densités optiques

Mesurer les densités optiques (DO) en bichromatisme à 450 et 630.

1.8. Validation du test

Les résultats de chaque série sont validés si :

- la DO obtenue avec le témoin positif est $\geq 0,300$,
- la DO du témoin négatif est $< 50\%$ du DO P.

1.9. Expression et interprétation des résultats_

Pour caractériser, dans un échantillon, la présence ou l'absence du marqueur de virémie BD, on a utilisé la méthode suivante :

- Calcul des indices

Pour chaque échantillon de plasma :

- **Indice échantillon = $0,5 \times (\text{DO échantillon} - \text{DO P})$**

—

- DO = Moyenne des densités optiques de l'échantillon.

—

- DO P = Moyenne des densités optiques du témoin positif

- Tout échantillon de PLASMA présentant un indice $\geq - 0,15 \times \text{DO P}$ est considéré comme positif.

- Tout échantillon de PLASMA présentant un indice $< - 0,3 \times \text{DO P}$ est considéré comme négatif.

- Tout échantillon de plasma présentant un indice situé dans une zone d'incertitude entre $-0,15 \times \text{DO P}$ et $-0,3 \times \text{DO P}$ doit être considéré comme douteux.



Figure D.1 : kit ELISA-Ag

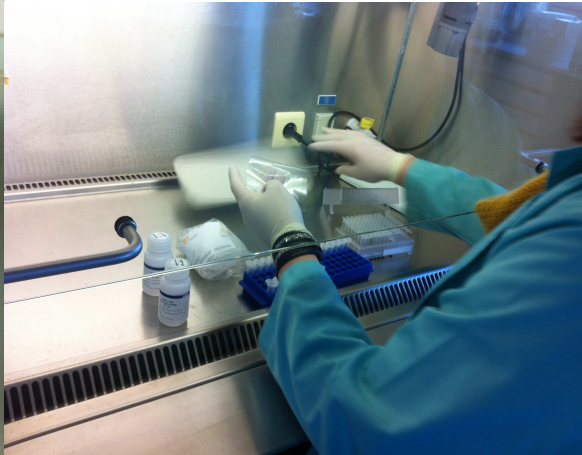


Figure D.2 : réalisation de l'ELISA-Ag

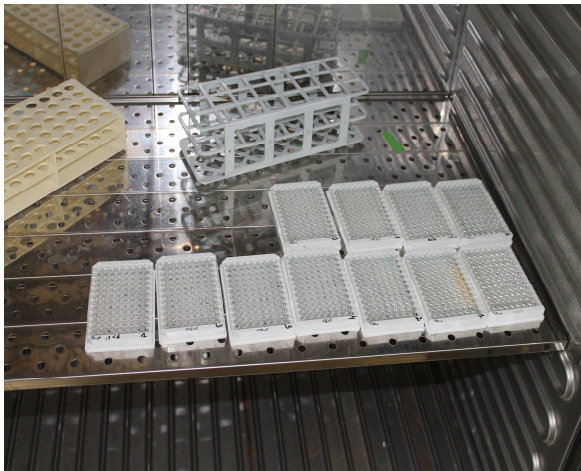


Figure D.3 : incubation des plaques ELISA-Ag

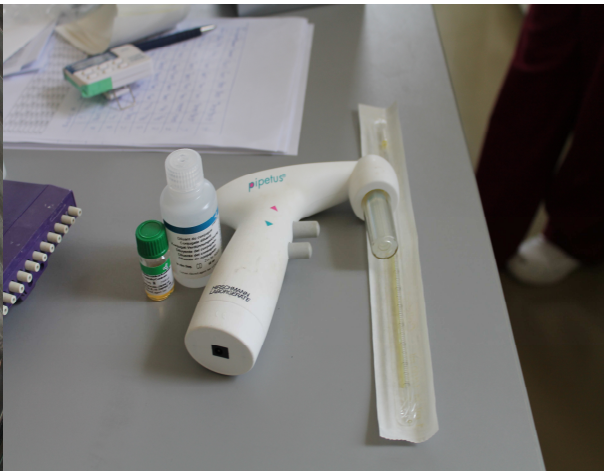


Figure D.4 : micropipette électronique

APPENDICE E

Technique PCR-RT

La PCR en temps réel (PCR-RT) classique est divisée en deux étapes :

1. Extraction de L'ARN

a. Préparation des pools

- Pour chaque bloc, les échantillons ont été regroupés en pool de 10, en raison de 08 pools par bloc.
- Un volume de 100 µl est pipeté de chaque échantillon.

b. Extraction d'ARN

- Le contenu de chaque pool est mis dans un éppendorf,
- Dans chaque eppendorf, on met 560 µl du mélange AVL-carrier RNA,
- On ajoute 140 µl d'échantillon et on vortex,
- On incube à température ambiante 10mn,
- On centrifuge brièvement,
- On ajoute 560 µl d'éthanol 100%,
- On vortex,
- On centrifuge brièvement,
- On transfère 630 µl du mélange sur une colonne avec un tube collecteur,
- On centrifuge 1mn/8000 tours,
- On re-transfère 630 µl du mélange sur la même colonne avec un nouveau tube collecteur,
- On centrifuge 1mn/8000 tours et on change de tube collecteur,
- On ajoute 500 µl de tampon AW1 (solution de lavage),
- On centrifuge 1mn/8000 tours et on change de tube collecteur,
- On ajoute 500 µl de tampon AW2 (solution de lavage),
- L'élution :
- On centrifuge à 14000 rpm pendant 3 min pour éliminer toute trace d'éthanol qui risquera d'inhiber la PCR et on met la colonne dans un nouveau eppendorf initialement encodé avec les codes qui correspondent aux codes des échantillons dans les blocs,

- On ajoute 60 µl de tampon AVE,
- On incube 2 minutes à température ambiante,
- On centrifuge 1mn/8000 tours,
- L'élution permet de capter l'ARN qui se trouve dans les colonnes,
- L'ARN est ainsi conservé à – 80°C.

Remarque

Le carrier est sous forme lyophilisée d'où l'importance de le reconstituer en lui ajoutant 310 µl de solution AVE (l'eau + conservateur).

2. Technique PCR-RT est réalisée en deux temps

Réalisée en deux temps :

- a. Transcription réverse pour synthétiser l'ADNc à partir de l'ARN viral ;
- b. Amplification par PCR de l'ADNc pour produire des quantités facilement détectables d'ADN double-brin.

Elle consiste à suivre, au cours du temps, le processus d'amplification à l'aide de la fluorescence. Les données de cette fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. L'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés ; plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (cycle seuil) et apparaît en début de phase exponentielle. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique [204.205].

Si l'on suit la fluorescence, donc le nombre de fragments PCR amplifiés, on distingue 3 phases :

- **Phase de bruit de fond** : la quantité de fragments amplifiée est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- **Phase exponentielle** : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil ; ensuite, le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. Cette phase est représentée par une droite en coordonnées logarithmiques.

- **Phase de saturation (de plateau)** : certains composants de la réaction (en particulier le nombre de molécules de *Taq* polymérase disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

Les valeurs de C_t obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, sont représentées par une droite standard issue de séries de dilutions d'un échantillon connu. La valeur de C_t est inversement proportionnelle au log 10 de la concentration initiale en molécules cibles. A partir d'un échantillon de concentration inconnue, le C_t obtenu sera traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.

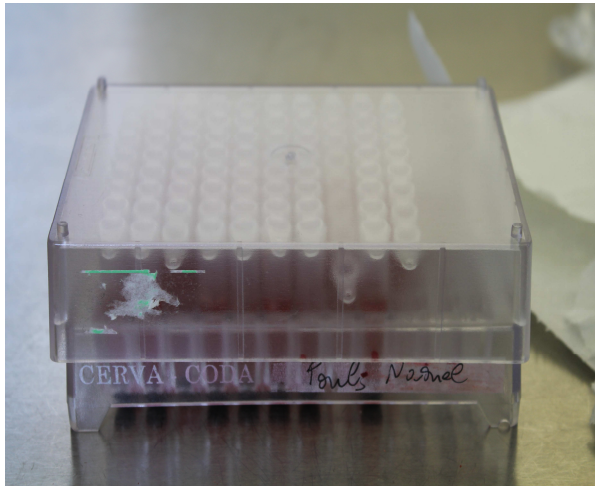


Figure E.1 : bloc de pouls de 10



Figure E.2 : préparation des pouls

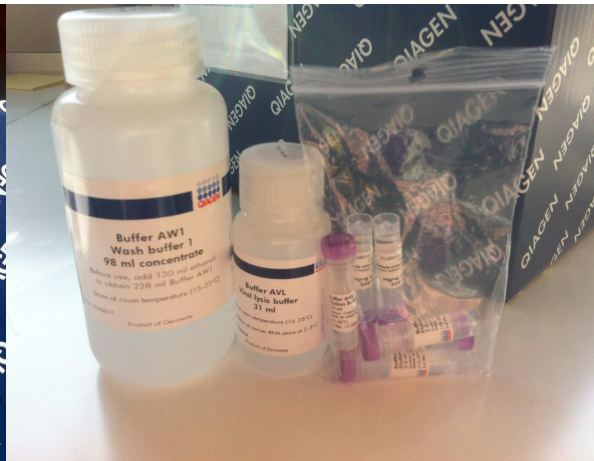


Figure E.3 : kit ELISA A-Ag

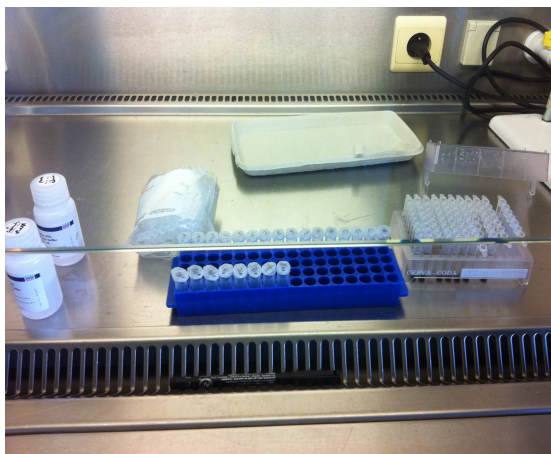


Figure E.4 : extraction de l'ARN



Figure E.5 : préparation des Mixes

APPENDICE F

Test de séroneutralisation

1. **Définitions** La neutralisation virale ou séroneutralisation est un test qui permet de mettre en évidence dans le sérum des anticorps capables de neutraliser des particules virales infectieuses.

-Titre TCID₅₀: une dose de virus qui infecte 50% des cultures cellulaires.

-Titre (ND₅₀): valeur réciproque de la plus haute dilution d'échantillon pour laquelle le virus est neutralisé dans 50 % des cultures cellulaires.

1. Principe [206]

Ce test est effectué sur des microplaques à 96 puits.

Suite à une infection ou à une vaccination, il se forme des anticorps neutralisants capables de neutraliser spécifiquement le virus dans un système de test in vitro. Le virus devient alors incapable d'infecter des cellules sensibles. Si le virus n'est pas neutralisé, il infectera des cellules sensibles.

Différentes dilutions des sérums à tester sont incubées en présence d'une quantité définie de virus. Dépendant du virus pour lequel le test est réalisé, on ajoute ensuite une suspension cellulaire au mélange virus-sérum ou on transfère ce mélange sur des cellules préparées la veille dans des microplaques 96 puits. Après incubation, le test est lu au microscope par observation directe des effets cytopathogènes ou après révélation des cellules infectées au moyen d'une coloration spécifique.

Dans les cupules où la totalité du virus est neutralisée, aucun effet cytopathogène ou coloration n'apparaît. Dans les cupules où le virus n'est pas neutralisé, ou est partiellement neutralisé, un effet cytopathogène ou une coloration apparaît.

Présence d'Ac neutralisants : absence d'effet cytopathogène ou de coloration

Absence d'Ac neutralisants : effet cytopathogène ou coloration.

2. Fournitures

- **Petit matériel de laboratoire :**

- Papier absorbant
- Chronomètre
- Gants
- Ballon en verre 1L
- Plaque agitante
- barreaux magnétiques
- Boîtes de Pétri
- Support pour tube
- Spatule
- Seringues et aiguilles
- Microplaques à 96 puits stériles (fond plat) avec couvercles
- Pipettes stériles de 1, 2, 5, 10 et 25 ml
- Tubes à essai stériles 15 ml, 50 ml.
- Embouts stériles
- Bloc de dilution stérile

- **Réactifs :**

- Milieu de culture :

Milieu Essentiel Minimum (MEM) + L-glutamine 2 mM : conservé à 5°C +/- 3°C.

- Sérum :

Foetal Calf Serum (FCS) : le sérum est conservé à <-16°C. Après décongélation, stockage limité à 5°C +/- 3°C.

- Antibiotiques :

Pénicilline (Benzympenicilline sodique à 1.000.000 U) : la pénicilline lyophilisée est conservée à 20° C +/- 5°C. En solution, elle est conservée à 5°C +/- 3°C.

Fungizone (250 µg/ml d'amphotéricine B) : conservée à <-16°C.

Gentamycine 50 mg/ml: conservée à 20° C +/-5°C.

- **Matériel biologique :**

Par maladie, les spécificités sont reprises dans le tableau ci-dessous.

Cellules : Elles sont incubées à 37° C +/- 3°C.

Stock viral (=Virus de référence) : conservé à une température <- 72 °C.

Tableau 9.13 : récapitulatif des cellules et stocks viraux utilisées

	ADV (AUJ)	CSF	BVD	EHV- 1	IBR	EVA
Cellules	PK-15	PK-15	MDBK	RK- 13	MDBK	RK-13
Virus stock	ADV	CSF Alfort/187	BVD NADL	EHV- 1	IBR 3760	EVA Bucyrus

- **Matériel de référence pour le contrôle de première ligne :**

Par maladie, trois sérums sont utilisés comme contrôle de première ligne. La valeur médiane de leur titre a été établie sur la base de 10 tests en séroneutralisation.

-un sérum négatif (NS) : conservé à <-16°C

-un sérum fortement positif (HPS) : conservé à <-16°C

-un sérum faiblement positif (à la limite de positivité) (LPS) : conservé à <-16°C Spécification par maladie :

3. Préparation des solutions

Fungizone

Décongeler un flacon de fungizone dans un bain marie à 37° C +/- 3°C. Aliquoter le contenu par volume de 1 ml dans des tubes. Conserver les tubes au congélateur à <-16°C.

MEM+A: (1 litre)

Prélever 5 ml de milieu d'une bouteille de 500 ml avec une seringue et une aiguille et les injecter au flacon de pénicilline. Lorsque la poudre est complètement dissoute prélever les 5 ml à l'aide de la seringue et de l'aiguille et ajouter 2,5 ml à chaque bouteille de 500 ml de milieu.

Ajouter 0,5 ml de fungizone par bouteille.

Prélever 1 ml de gentamycine et distribuer 0,5 ml par bouteille. Le milieu est conservé à 5°C et 3°C.

MEM+A+S

Ajouter 5% de FCS au milieu MEM+A. Le milieu est conservé à 5°C et 3°C.

4. Equipements

- Balance
- Hotte à flux laminaire
- Etuve à CO₂ à 37°C +/- 3°C
- Bain marie à 37° C +/- 3°C et à 56°C +/- 3°C
- Pipeteur mobile
- Microscope Congélateur < - 72°C
- Congélateur <-16°C
- Chambre froide à 5°C +/- 3°C
- pipettes multicanaux (5 à 50 µl)
- Pipettes multicanaux (50 à 1500 µl)
- pipettes multicanaux (50 à 300 µl)
- Pipettes (200 et 20 µl)

5. Préparation des cellules

Les cellules sont ajoutées directement aux mélanges virus-sérum et aux dilutions virales préparées pour l'exécution du test de neutralisation virale et la titration du virus de référence et de la dilution virale de travail.

6. Mise en place du milieu de culture

- Préparer le nombre de microplaques à 96 puits stériles pour la réalisation du test. Notez leur référence d'identification sur les microplaques.
- Verser du milieu dans une boîte de Pétri.

- La colonne 1 de chaque microplaque est réservée au contrôle cellulaire (C-); la colonne 12 est réservée au contrôle viral (C+).
- Prélever 50 µl de milieu et déposer dans les cupules des colonnes 1 (A1-H1) et 12 (A12-H12).
- Prélever 80 µl de MEM+A nécessaire à la dilution initiale des échantillons (voir tableau ci-dessous) et déposer dans les cupules qui contiendront la dilution initiale des échantillons. Déposer 50 µl de milieu dans les autres cupules.

Tableau 9.14 : récapitulatif du milieu et les volumes utilisés pour le VNT

	ADV (AUJ)	CSF	BVD	EHV-1	IBR (protocol1)	IBR (protocol 2)	EVA
Milieu	MEM+A	MEM+A+S	MEM+A	MEM+A	MEM+A+S	MEM+A+S	MEM+A+S
Volume de milieu pour la dilution initiale de l'échantillon	50 µl	80 µl	80 µl	50 µl	50 µl	0 µl	50 µl

7. Décomplémentation thermique et dilution des échantillons de sérum

Incuber les échantillons de sérums pendant 30 minutes dans un bain-marie à 56°C+/- 3°C.

Chaque échantillon est déposé en double (2 cupules).

Les sérums de contrôle de première ligne sont ajoutés à chaque série d'échantillons et sont traités de la même façon que les échantillons à analyser.

Après la dilution initiale, les sérums sont dilués en série (facteur de dilution ½). A l'aide d'une pipette multicanaux, mélanger 3 fois la dilution précédente. Prélever 50 µl de cette dilution et l'ajouter aux 50 µl de milieu dans les cupules suivantes. Changer d'embouts entre chaque dilution. Procéder ainsi de suite jusqu'à la dernière dilution, où les 50 derniers µl sont éliminés

8. Préparation et distribution des dilutions virales

a. Titration du virus de référence

Déposer 8 tubes de 15 ml dans un support pour tube. Noter sur chacun d'eux la dilution qu'il contiendra. A l'aide d'un pipeteur mobile et d'une pipette de 10 ml, distribuer 9 ml de milieu par tube.

Prendre un tube de virus de référence dans le congélateur $<-72^{\circ}\text{C}$. Lorsqu'il est décongelé, prélever 1 ml de la suspension virale, l'ajouter au premier tube qui correspond à la dilution 10^{-1} . Fermer le tube et mélanger 3 fois la solution. Changer de pipette (ou d'embout). Prélevez ensuite 1 ml du premier tube et l'ajouter au deuxième tube, on obtient une dilution 10^{-2} . Fermer et mélanger. Procéder de la même manière jusqu'à la dilution 10^{-8} .

Distribuer 8 fois 100 μl de la dilution virale 10^{-8} dans les puits de la colonne A8 - H8, 8 fois 100 μl de la dilution 10^{-7} dans la colonne A7 - H7 et ce jusqu'à la dilution 10^{-2} que l'on distribue dans la colonne A2 - H2.

Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dans l'étuve à CO_2 pendant la durée décrite dans le tableau ci-dessous. La durée d'incubation est identique pour la séroneutralisation et la titration de la dilution de travail.

b. Préparation et distribution de la dilution virale de travail

La dilution du virus qui doit être employée est déterminée par la valeur de TCID₅₀. Idéalement, le titre de la dilution virale doit approcher 100 TCID₅₀/50 μl selon les recommandations des normes. Pour que le test soit validé, le TCID₅₀/50 μl doit être compris entre 30 et 300.

Pour atteindre cette valeur de TCID₅₀/50 μl , une dilution du virus doit être effectuée.

Ajouter aux microplaques 50 μl de la dilution virale de travail dans tous les puits sauf dans la rangée 1 (A1-H1) de toutes les plaques qui contient le contrôle cellulaire (C-).

Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dans l'étuve à CO_2 pendant 2heures (+10mn), pour laisser la neutralisation s'effectuer.

c. Titration de la dilution virale de travail

Effectuer une titration de la dilution virale de travail dans du milieu. Procéder de la même manière que pour la titration du stock viral de référence, jusqu'à la dilution 10^{-3} (trois dilutions en base 10).

Distribuer 8 fois 100 μl des dilutions virales 10^{-3} , 10^{-2} et 10^{-1} dans une microplaque.

Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dans l'étuve à CO_2 pendant 2heures (+10mn)

9. Incubation des mélanges virus-sérum et dilutions virales avec les cellules

Préparer une suspension cellulaire. Prévoir 10 ml de suspension cellulaire par plaque.

Verser la quantité nécessaire de cellules dans une boîte de Pétri.

Ajouter 100 µl de suspension cellulaire dans chacune des cupules des microplaques, y compris les plaques de titrations virales (stock viral de référence et dilution de travail).

Incuber à 37°C +/- 3°C dans l'étuve à CO₂ 72heures (+24h).

10. Coloration et lecture

La présence d'effets cytopathogènes (CPE) ou d'une coloration des cellules est indicative de la présence de virus non neutralisé.

Les plaques sont observées au microscope permettant d'observer les cupules présentant des effets cytopathogènes ou une coloration.

Interprétation

a. Validation des contrôles cellulaires et viraux :

La colonne 1 (A1-H1) qui contient le contrôle cellulaire doit être négative (pas de virus).

La colonne 12 (A12-H12) qui contient le contrôle viral doit être positive (présence du virus).

b. Détermination du titre viral

La détermination du titre viral s'effectue à partir des résultats de lecture de la plaque. Il faut introduire le nombre de cupules positives pour chaque facteur de dilution afin de calculer le titre selon la méthode de Reed-Muench.

La détermination de la valeur théorique du TCID₅₀ se fait sur la base du titre viral et du facteur de dilution utilisé lors de la préparation de la dilution virale de travail.

c. Lecture des titres neutralisants (ND₅₀) des échantillons à analyser :

Si le TCID₅₀/50µl répond aux critères d'acceptation (30-300 TCID₅₀/50µl), la lecture des microplaques contenant les sérums à analyser peut être effectuée. S'il ne répond pas aux critères d'acceptation, l'analyse doit être recommencée.

La dilution la plus élevée du sérum dans laquelle le virus est neutralisé à 50% (une cupule neutralisée et une cupule non neutralisée) correspond au titre en anticorps neutralisants (ND50). Si aucune neutralisation ne se produit pour la dilution initiale du sérum (deux cupules non neutralisées à la dilution initiale), l'échantillon est considéré comme négatif (titre < à la dilution initiale).

Si la dernière dilution neutralisante de l'échantillon produit une neutralisation dans les deux cupules (100%), la ND50 doit être extrapolée comme étant la demi-dilution suivante.

d. Seuil de positivité

Le seuil de positivité pour le BVD est fixé à 1/10

11. Mesures Spécifiques (sécurité, biosécurité et environnement)

Les manipulations sont effectuées en respectant les mesures générales de sécurité en vigueur pour les laboratoires. Les manipulations doivent être effectuées en condition d'asepsie, dans une hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérile. Le manipulateur portera toujours des gants lorsqu'il manipule le virus. Il n'effectuera que des prélèvements mécaniques avec des pipettes. Après utilisation, la hotte à flux laminaire sera désinfectée avec un produit à base d'alcool. Pour la nuit, brancher le rayonnement UV de la hotte.

Les déchets liquides associés à la manipulation (reste de titrations et de dilutions virales) sont inactivés en présence d'acide citrique ou avec un produit à base d'activateur d'oxygène avant élimination.

12. Contrôle interne

Pour chaque test de séroneutralisation, les conditions suivantes doivent être remplies pour que le test puisse être validé. Si une de ces conditions n'est pas remplie, le test doit être répété.

a. Contrôles cellulaire et viral :

Le contrôle cellulaire (C-) doit être négatif (pas d'effet cytopathogène ou pas de coloration). Le contrôle viral (C+) doit être positif (effet cytopathogène ou coloration).

13. Concentration de virus

Le titre viral (TCID₅₀/ml) et de la dilution de travail (TCID₅₀/50µl) sont contrôlés lors de chaque essai. La valeur de TCID₅₀/50µl doit répondre aux critères d'acceptation (30-300 TCID₅₀/50 µl).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Khaled H., « Etude sérologique et moléculaire de *Coxiella Brunetii* agent de la fièvre Q chez les petits ruminants dans certaines régions d'Algérie ». Thèse de doctorat es-sciences en Sciences Vétérinaires, spécialité : Microbiologie Médicale, p15. Blida 2015.
2. Ministère d'Agriculture et de Développement Rural. « Statistiques du Ministère d'Agriculture et du Développement Rural pour l'année» (2015).
3. Scott, P.R., Sargison, N.D. and Wilson, D.J., « The potential for improving welfare standards and productivity in United Kingdom sheep flocks using veterinary flock health plans». *Veterinary Journal*, V. 173, (2007), 522-531.
4. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A., « Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses». Elsevier, Academic Press, London, (2005).
5. Simmonds P , Becher P, Bukh J, Ernest A, Gould, Meyers G, Monath T, Muerhoff S, Pletnev A, Rico-Hesse R, Donald B, Smith, Jack T, Stapleton, and ICTV Report Consortium. "ICTV virus taxonomy profiles", *Journal of General Virology*. V. 98, (2017), 2–3.
6. Terpstra, C., G. Wensvoort, G., « Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever». *Res. Vet. Sci*, V. 45, (1988), 137–142.
7. Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., Thiel, M.J., « Genetic diversity of 544 pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, V.545, (1999), 262: 64–71.
8. Sullivan, D.G., Akkina, R.K., « A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses». *Virus Res*, V.38, (1995), 231–39.
9. Krametter-Froetscher, R., Loitsch, A., Kohler, H., Schleiner, A., Schiefer, P., Mostl, K., *et al*, « Serological survey for antibodies against *pestiviruses* in sheep in Austria». *Vet Rec*, V. 160, (2007), 726-730.
10. Becher, P., Ramirez, R.A., Orlich, M., Rosales, S.C., König, M., Schweizer, M., *et al*, «Genetic And Antigenic Characterization Of Novel Pestivirus Genotypes : Implication For Classification». *Virology*, V. 96, (2003), 96-104.
11. Vilcek, S., ET Nettleton, P.F., «*Pestivirus* in wild animals». *Veterinary Microbiology*. (2006), 116: 1-12.

12. Nettelton, P.F., Entrican, G., «Ruminant pestiviruses». *Br Vet J.* V.151, (1995), 615-642.
13. Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S., Alenius, S., «Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep». *Vet Microbiol.* V, 43, (1995), 283– 94.
14. Braun U, Reichle SF, Reichert C, Hässig M, Stalder HP, Bachofen C, et al. «Sheep persistently infected with Border disease readily transmit virus to calves seronegative to BVD virus». *Vet Microbiol.* V, 168(1), (2014), 98-104.
15. Braun, U., Hilbe, M., Janett, F., Hässig, M., Zanoni, R., Frei, S., *et al*, «Transmission of border disease virus from a persistently infected calf to seronegative heifers in early pregnancy». *BMC Vet Res.* (2015), 11:43.
16. Bell, M., "The problem of fuzzy lambs". *National Wool Grower*, V. 57, (1967), 6.
17. Hartley, W. J., Kater, J. C., « Observations on diseases of the central nervous system of sheep in New Zealand». *N.Z. Vet. J.*, V. 10, (1962), 128-142.
18. Markson, L. M., Terlecki, S., Shand, A., Sellers, K. C and Woods, J. A., « Hypomyelinogenesis congenita in sheep». *Vet. Rec*, V. 71, (1959), 269-271.
19. Nettleton, P. F., Gilray, J. A., Russo, P. & Dlissi, E. « Border disease of sheep and goats». *Veterinary Research*, V. 29, (1998), 327-240.
20. Masounave, L. M., « les *pestivirus* chez les animaux sauvages, étude bibliographique ». Thèse pour obtenir le grade de Docteur vétérinaire Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (2008).
21. Olafson, P., Mac Callu, A.D., et Bitsh, V., « An apparently new transmissible disease of cattle». *Cornell Vet*, V. 36, (1946), 205-213.
22. Ramsey, F.K., Et Chivers, W.H., « Mucosal Disease of cattle». *North American Veterinary*, V. 34, (1953) , 629-634.
23. Jubb, K.V.P., Kennedy, P.C., « Pathology of domestic animals». (1963), 2: 12-21.
24. Hugues, L.E., Kershaw, G.F., Shaw, I.G., « "B" or Border Disease. An undescribed disease of sheep». *Veterinary Record*, V. 71, (1959) , 313-317.
25. Barr, M. «Hypomyelinogenesis congenita in lambs». *Vet. Rec*, V. 76, (1964), 815-817.

26. Sands, J.J., Harkness, J. W, «The distribution of antibodies to Border Disease virus among sheep in England and Wales». *Res. Vet. Sei*, V. 25, (1978), 241-242.
27. Cravero, G.C., Fatzer, R., Frankhauser, R., "hypomyelinogenesis congenital" bei Lammern in der Schweiz. *Schweiz Arch. Tierheilkd*, V. 117,(1975), 119-121.
28. Bogel, K., "über die Verbreitung eines Virus der Mucosal-Disease Gruppe" in Shafherden Süddeutschlands». *Zentbl. Vet. Med*, V. II B, (1964), 681-692.
29. Blood, D.C., Raoostitis, O. M. et Hebderson, J.A., - *Veterinary Medicine*, pp. 835-837, éd. Baillière Tindall, Londres, (1983).
30. Spais, A.G., Padopoulos, O. et Vantsis J.T. «An extensive outbreak of Border disease in Greece (a preliminary report) ». *Proceedings: 20th World Veterinary Congress*, (1975), Thessaloniki 622.
31. Brugère- -Picoux, Jeanne., H. MAES, H., Moussa, A., Russo, P., et A. L. PARODI, A.L., « Identification de la « Border disease » ou « maladie de la frontière » chez le mouton en France. *Bull. Acad. Vét. de France*, V. 57, (1984), 555-562.
32. Darbyshire, J.H., «Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. A serological relationship between mucosal disease and swine fever». *Research in veterinary science*, V. 3 (1962), 125-128.
33. Plant, J.W., Little Johns, I.E., Gardiner, A.C., Vantis, J.T., and Huck, R.A., «Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever». *Veterinary record*, V.92, (1973) 455-461.
34. Dickinson, A.G., Barlow, R.M., « The demonstration of transmissibility of Border disease of sheep». *Vet. Rec*, V. 81, (1967), 114.
35. Ward, G.M., «Experimental infection of pregnant sheep with bovidiarrhoea-mucosal disease virus». *Cornell Vet*, V. 61, (1971), 179-191.
36. Claire Martin, A., Veronique Duquesne, A., Gilbert Adam, A., Eric Belleau, B., Dominique Gauthier, C., Jean-Luc Champion, D., Claude Saegerman, E., Richard Thie´ Ry, A., Eric Dubois, A., « Pestiviruses Infections At The Wild And Domestic Ruminants Interface In The French Southern Alps" *Vet. Mic*, V. 175 (2015) 341–348.

37. Eloïse, Georgina., Gabrielle, Bernard., «Les Pestivirus Bovine Et Ovine : Différences Cliniques, Épidémiologiques Et Barrière D'espèce». Thèse Pour Le Doctorat Vétérinaire École Nationale Vétérinaire D'alfort. (2011).
38. Barlow, R. M., Vantsis J. T., Gardiner A. C., Rennie J. C., Herring J. A. and Scott O. «Natural transmission of border disease». *J. comp. Pathol.*, V. 90, (1980), 574-55.
39. Kirkland, P.D., McGowan, M.R., Kafi, M., et al. «Early reproductive loss due to bovine viral diarrhoea virus infection. In: Program and Abstracts of the International Symposium Bovine Viral Diarrhoea Virus: A 50-Year Review». Ithaca: Cornell University Press (1996), 98-107.
40. Nettleton, P.F., Gilmour, J.S., Herring, J.A., Sinclair, J.A., «The production and survival of lambs persistently infected with border disease virus». *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, V, 15 (1992), 179-188.
41. Arcangioli, Marie-Anne., Renaud Maillard « BVD Clinique, Epidémiologie, Gestion sanitaire » Unité de Pathologie du Bétail - ENVL, ENVA, G.D.S 69 - 15/11/2006.
42. Collins, M.E., Heaney, J., Thomas, C.J., Brownlie, J., «Infectivity of pestivirus following persistence of acute infection». *Vet Microbiol*, V. 138, (2009), 289-296.
43. Givens, M.D., Heath, A.M., Brock, K.V., «Detection of bovine viral diarrhoea virus in semen obtained after inoculation of seronegative post pubertal bulls». *Am J Vet Res*. V, 64, (2003), 428-434.
44. Francois, C., «Les maladies de la reproduction des petits ruminants». *Thèse MédVét* Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, (2008).
45. Lang-Ree, J.R., Vatn, T., Kommisrud, E., Loken T., «Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination». *Vet Rec*, V. 135, (1994), 412-413.
46. Niskanen, R., Et Lindberg, A., «Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air and from contaminated pens». *Vet J*, V. 165, (2003), 125-130.
47. Wellemans, G., Van Opdenbosch, E., «Mise en évidence du virus BVD (Bovine Viral Diarrhoea Virus) dans plusieurs lignées cellulaires». *Ann Rech Vet*, V. 18, (1987), 199-102.
48. Thabti, F., Fronzaroli, L., Dlissi, E., Guibert, J.M., Hammami, S., Pepin, M., Russo, P., «Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs:

- comparative pathogenicity of Pestiviruses isolated in France and Tunisia». *Vet. Res*, V. 33, (2002), 35-45.
49. Brugère-picoux, J., «Pestivirus ovine dans Maladies des moutons». Editions France Agricole. (2002), pp: 23-25.
 50. Houe, H., Epidemiologic features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet Microbiol*, V. 64, (1999), 89-107.
 51. Bonniwell, M.A., Nettleton, P.F., Gardiner, A.C., Barlow, R.M., Gilmour, J.S., «Border disease without nervous signs or fleece changes». *Vet Rec*, V.120, (1997), 246-249.
 52. Traven, M., Alenius, S., Fossum, C., Larsson, B., «Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with persistently viraemic calf». *J Vet Med B*, V.38, (1991), 453-462.
 53. Nettleton, P.F., «Pestivirus infections in ruminants other than cattle». *Rev Sci Tech*, V. 9(1), (1990), 131-50.
 54. Braun, U., Schonmann, M., Ehrensperger, F., Hilbe, M., Brunner, D., Stark, K.D.C., et al., «Epidemiology of Bovine Virus Diarrhoea in Cattle on Communal Alpine Pastures in Switzerland. *J Vet Med A*, V. 45, (1998), 445-452.
 55. Siegwart, N., Hilbe M., Hässig, M., Braun, U., «Increased of BVDV infection of calves from pregnant dams on communal alpine pastures in Switzerland». *Vet J*, V.172, (2006), 386-388.
 56. Bachofen, C., Stalder, H., Braun, U., Hilbe M., Ehrensperger F., Peterhans, E., «Co-existence of genetically and antigenically diverse Bovine Viral diarrhoea viruses in an endemic situation». *Vet Microbiol*, V. 131, (2008), 131:93-102.
 57. Mishraa, N., Rajukumar, K., Vilcek, S., Tiwari, A., Satav, J.S., Dubey, S.C., «Molecular characterization of bovine viral diarrhea virus types 2 isolate originating from a native indian sheep». *Vet Microbiol*, V. 130, (2008), 88-98.
 58. Tabbaa, D., Giangaspero, M., Nishikawa, H., «Seroepidemiological survey of Border Disease (BD) in Syrian Awassi sheep». *Small Ruminant Research*, V. 15, (1995), 273-277.
 59. Wellemans, G., Van Opdenbosch, E., «Mise en évidence du virus BVD (Bovine Viral Diarrhoea Virus) dans plusieurs lignées cellulaires». *Ann RechVet*, V. 18, (1987), 199-102.
 60. Graham, D.A., Calvert, V., German, A., Mccullough, S.J., «Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland». *Vet Rec*, V. 148, (2001), 69-72.

61. Paton, D.J., Christiansen, K.H., Alenius, S., Cranwell, M.P., Pritchard, G.C., Drew, T.W., «Prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales». *Vet Rec*, V.142, (1998), 385-391.
62. Orsel, K., Antonis, A.E.G., Oosterloo, J.C., Vellema, P., Van Der Meer, F.J.U.M., «Seroprevalence of antibodies against pestiviruses in small ruminants in the netherlands». *Tijdschr Diergeneesk*, V. 134, (2009), 380-384.
63. Rüfenacht, J., Schaller, P., Audigé, L., Strasser, M., Peterhans, E., «Prevalence of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus in Switzerland». *Vet Rec*, V. 147, (2000), 413-417.
64. Berriatua, E., Barandika, J., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Garrido, J., Garcia-Perez, A.L., «Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks». *Vet J*, V.168, (2004), 336-342.
65. Houe, H., «Epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus». *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, V.11, (1995), 521-547.
66. Presi, P., Strunchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., Heim, D., «Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland—Experiences of the first two years». *Prev Vet Med*, V. 99, (2011), 112-121.
67. Alvarez, M., Prieto M., Munoz, M., Carmenes, P., «Pestivirus Infection Prevalence (Border Disease) In Ovine in Castilla-Leon And Asturias Regions». *Med Vet*, V. 6 (6), (1989), 353-355.
68. Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rufenacht, J., Schaller, P., *et al*, «Genetic Heterogeneity Of Pestiviruses Of Ruminants In Switzerland». *Prev Vet Med*, V. 72, (2005), 37-41.
69. Arnal, M., Fernández-De-Luco, D., Riba, L., Maley, M., Gilray, J., Willoughby, K., Vilcek, S., Nettleton, P.F., «A Novel Pestivirus Associated With Deaths In Pyrenean Chamois (*Rupicapra Pyrenaica Pyrenaica*)». *J Gen Virol*, V.85 (12), (2004), 3653-3657.
70. Valdazo-Gonzalez B., Alvarez-Martinez M., Greiser-Wilke I. «Genetic Typing and Prevalence of Border Disease Virus (Bdv) In Small Ruminant Flocks in Spain». *Vet Microbiol*, V. 117, (2006), 141-153.

71. Dubois, E., Russo, P., Prigent, M., Thiery, R., «Genetic Characterization of Ovine Pestivirus Isolated In France between 1985 and 2006». *Vet Microbiol*, (2008), 130: 69-79.
72. Giammarioli, M., La Rocca, S.A., Steinbach, F., Casciari, C., De Mia, G.M., «Genetic And Antigenic Typing Of Border Disease Virus (Bdv) Isolates From Italy Reveals Existence Of A Novel Bdv Group». *Vet Microbiol*, V.147, (2011), 231-236.
73. Oguzoglu, T.C., Tan, M.T., Toplu N., Bilge-Dagalp, S., Karaoglu, T., Ozkul, A., et al., «Border Disease Virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup» *Vet Microbiol*, V. 135, (2009), 374-379.
74. Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J., Tijssen, P., «Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Associated With Severe Outbreaks and High Mortalities». *Virology*, V. 203, (1994), 260-268.
75. Ridpath, J.F., Bolin, S.R., Dubovi, E.J. «Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes». *Virology*, V. 205, (1994), 66-74.
76. Couvreur, B., Letelliera, C., Collard, A., Quenona, P., Dehanc, P., Hamers, C. et al. «Genetic and Antigenic Variability in Bovine Viral Diarrhea Virus (Bvdv) Isolates from Belgium». *Virus Res*, V. 85 (1), (2002), 17-28.
77. Tajima, M., Frey, H.R., Yamato, O., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I. «Prevalence of Genotype 1 and 2 of Bovine Viral Diarrhea Virus in Lower Saxony», Germany. *Virus Res*, V. 76, (2001), 31-42.
78. Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibatat, G., Moussa, A., et al. «Bovine Viral Diarrhea Virus Genotype 1 Can Be Separated Into At Least Eleven Genetic Groups». *Arch Virol*, V. 146, (2001), 99-115.
79. Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Greiser Wilke, I., Paton, D.J. «Genetic Diversity of International Bovine Viral Diarrhea Virus (Bvdv) Isolates: Identification Of A New Bvdv 1 Genetic Group». *Vet Res*, V. 35, (2004), 609-615.
80. Nagai, M., Hayashi, M., Sugita, S., Sakoda, Y., Mori, M., Murakami, T., et al. «Phylogenetic Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses Using Five Different Genetic Regions». *Virus Res*, V. 99 (2), (2004), 103-13.
81. Zhu, L.Q., Ren, M., Lin, Y.Q., Ding, X.Y., Zhang, G.P., Zhao, X. et al. «Identification of A Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Isolated From Cattle in China». *Acta Virol*, V. 53, (2009), 131-134.

82. Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., «Phylogenetic Analysis Of Brazilian Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 (Bvdv-2) Isolates: Evidence For A Subgenotype Within Bvdv-2». *Virus Res*, V. 87(2002), 51-60.
83. Nettleton, P.F., Martin, W.B., Aitken, I.D., "Border disease". In *Diseases of Sheep*, Eds. 3ed.Blackwell Sciences, London, (2000), 95-102.
84. Office International des Epizooties (OIE). Section 2. 7. Ovidae et Capridae Chapitre 2.7.1. Maladie De La Frontière « Border Disease ».611 Oie Terrestrial Manuel. (2008).
85. Barandika J.F., Aduriz G., Moreno B., Oporto B., Hurtado A., Garcifaperez A.L. et al., «Avances En La Etiologia De Los Abortos Infecciosos Ovinos En La Comunidad Autonoma Del Pais Vasco ». *Produccion Ovina Y Caprina Xxvii Jordanas Cientificas Seoc*, (2002), 509-514.
86. Lamontagne L., Roy R. «Presence of Antibodies to Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Virus (Border Disease) In Sheep and Goat Flocks In Quebec», *Can J Comp Med*, V. 48, (1984), 225-227.
87. Carlsson U., «Border Disease in Sheep Caused By Transmission of Virus from Cattle Persistently Infected With Bovine Virus Diarrhoea Virus». *Vet Rec*, V.128, (1991), 145-147.
88. Rekiki, A., Thabt,i F., Dlissi, I., Russo, P., Sanchis, R., Pepin, M., Rodolakis, A., Hammami, S., «Enquête Sérologique Sur Les Principales Causes D'avortements Infectieux Chez Les Petits Ruminants En Tunisie», *Revue Méd. Vét.* V, 156 :7, (2005); 395-401.
89. Krametter-Froetscher, R., Duenser, M., Preyler, B., Theiner, A., Benetka, V., Moestl, K. *et al.*, «*Pestivirus* infection in sheep and goats in West Austria». *Vet J*, V. 186, (2010a), 342-346.
90. Berriatua E., Barandika J.F. «Flock Prevalence of Border Disease Virus Infection in Basque Dairy-Sheep Estimated By Tank-Milk Analysis». *Vet Microbiol*, V. 118, (2006), 118: 37-46.
91. Julia S., Craig M.I., Jimenez L.S., Pinto G.B., Weber E.L. «First Report of Bvdv Circulation in Sheep in Argentina». *Prev Vet Med*, V. 90, (2009), 274-277.
92. Zouagui, Z., Alali, S., Aiyar, A., El Ouazzani, M.N., «Etude Séro-Epidémiologique De Quelques Virus Bovines D'intérêt Economique Au Maroc ». Communication Présentée Au Xxiv^e Congrès Vétérinaire Maghrébin, Rabat (Maroc), Les 4 Et 5 Mai 2007.

93. Lee, D.H., Park, S.W., Choie.W., Lee, C.W.," Investigation of the prevalence of bovine viral diarrhoea virus in dairy in South Korea". *Vet Rec* 162, (2008), 211-213.
94. Park, J.S., Moon, H.J., Lee, B.C., Hwang, W.S., Yoo, H.S., Kim, D.Y., et al. «Comparative Analysis on the 5'-Untranslated Region of Bovine Viral Diarrhea Virus Isolated In Korea». *Res Vet Sci*, V. 76, (2004), 157-163.
95. Mishraa, N., Rajukumar K., Kalaiyarasu S., Dubey S.C. «*Pestivirus* Infection, An Emerging Threat To Ruminants In India: A Review». *Ind J Anim. Sci*, V. 81 (6), (2011), 545-551.
96. Ciulli S., Galletti E., Battilani M., Scagliarini A., Gentile A.,Morganti L. *et al.* «Genetic Typing Of Bovine Viral Diarrhoea Virus Evidence of Increasing Number of Variants in Italy». *New Microbiol*, V. 31, (2008), 263-271.
97. Baker, J.C. «Bovine Viral Diarrhea Virus: A Review». *J Am Vet Med Assoc*, V. 190 (11), (1987), 1449-58.
98. Loneragan, G.H., Thomson D.U., Montgomery D.L., Mason G.L., Larson R.L. «Prevalence, Outcome, and Health Consequences Associated With Persistent 107 Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus in Feedlot Cattle». *J Am Vet Med Assoc*, V. 226 (4), (2005), 595- 601.
99. Goyal, S., Ridpath, J.F. «Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management and control». Ames, Blackwell Publishing, (2005), 261 pages.
100. Bachofen C., Stalder H., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Peterhans E. «Co-Existence Of Genetically And Antigenically Diverse Bovine Viral Diarrhoea Viruses In An Endemic Situation». *Vet. Mic*, V, 131, (2008), 93-102.
101. Van Campen, H., "Epidemiology and control of BVD in the U.S". *Vet Microbiol*, V.142, (2010), 94-98.
102. Zaghawa, A., "Prevalence of antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus and/or Border Disease Virus in Domestic Ruminants". *J Vet Med*, V. 45, (1998), 345-351.
103. Grooms, D.L., Baker, J.C., Ames, T.R., «Diseases caused by Bovine Virus Diarrhea Virus». *In: SMITH B.P.* Large animal internal medicine, 4th edition, Mosby, (2009), 791-798.
104. Kahrs, R.F., «Viral diseases of cattle». 2nd edition, Iowa State University Press, (2001), 324 Pages.

105. Giangaspero, M., ET Harasawa, R., «Species characterization in the genus *Pestivirus* according to palindromic nucleotide substitution in the 5'-untranslated region». *J Virol Methods*, V. 66 (3), (2011), 323-326.
106. Moennig, V., ET Plagemann, P.G.W., «The *pestivirus*». *Adv Virus Res*, V. 41, (1992), 53-83.
107. Viral Zone. Suisse Institut of Bioinformatics. (2010). <https://viralzone.expasy.org/39>.
108. Renard, A., Guiot, C., Schmetz, D., «Molecular cloning bovine viral diarrhea viral sequences». *DNA*, V. 4, (1985), 429-438.
109. Collet, M.S., Carson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K., Purchio, A.F. «Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus». *Virology*, V. 165, (1988), 191-199.
110. Vilcek, S., Nettleton, P.F., Paton, D.J., Belák, S., «Molecular Characterization Of Ovine Pestiviruses». *J Gen Virol*, V. 78, (1997), 725-735.
111. Giangaspero, M., ET Harasawa, R., «Genetic Variety of Bovine viral diarrhea virus 2 Strains Isolated from sheep». *J Vet Med Sci*, V. 66 (3), (2004), 323-326.
112. Weiland, F., «Localization of pestiviral envelope proteins E (ns) and E2 at the cell surface and on isolated particles». *J. Gen. Virol*, V. 80 (5), (1999), 1157-65.
113. Focquenoy, Léonilde., « La pestivirose de l'isard, modélisation épidémiologique et analyse de mesures de gestion». Thèse de Docteur vétérinaire n°45, Université de Lyon, (2013).
114. Le Drean, E., Pelletier, C., Daly, S., Moine, S., Chevalier, C., Magnee, D., et al. «Génotypage à grande échelle de souches de virus BVD circulant en France métropolitaine». In : Compte-rendu du Congrès des GTV, Lille (2010), 305-310.
115. Drake, J.W., Holland, J.J., "Mutations rates among RNA viruses". *Proc Nat Acad Sci USA*, V. 96, (1999), 13910-13913.
116. Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., «Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections». *Med Res Rev*, V. 23 (4), (2003), 488-518.
117. Strong, R., La Rocca, S.A., Ibata, G., Sandvik, T., «Antigenic and genetic characterization of Border disease viruses isolated from UK cattle». *Vet Microbiol*, V. 141, (2010), 208-215.

118. Donis, R.O., Dubovi, E.J., «Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells». *J Gen Virol*, V. 68, (1987) 1597-605.
119. Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., «Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses». *Virology*, V. 191, (1992), 368-386.
120. Brownlie, J., «The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of the diseases». *Arch Virol Suppl*, V. 3, (1991), 79-96.
121. Pratelli A., Martella V., Cirone F., Buonavoglia D., Elia G., Tempesta M. *et al.* «Genomic Characterization Of Pestiviruses Isolated From Lambs And Kids In Southern Italy». *J Gen Virol Meth*, V. 94, (2001), 81-85.
122. Hulst, M.M., Moormann, R.J., «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 (11), (1997), 2779-2787.
123. Lindenbach, Brett D., Thiel, Heinz-Jurgen., Rice, Charles M., «Flaviviridae: The viruses and their replication» *Fields Virology*, 5th Edition. D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (2007).
124. David, M., Peter, M., Howley « *Fields Virology*», Fifth edition, V. 1, (2007).
125. Jefferey, M., et Wells, G.A.H., «Immunohistochemical topography and cellular localization of BDV in the central nervous system in experimental Border Disease of sheep». *Neuropathol Applied Neurobiol*, V. 15 (1989), 590-591.
126. Jefferey, M., Wells, G.A.H., Bridges, A.W., Sands, J.J., «Immunocytochemical localization of Border disease virus in the spinal chord of foetal and newborn lambs». *Neuropathol Applied Neurobiol*, V. 16, (1990), 501-510.
127. Loken, T., «Experimental pestivirus infections in newborn goats' kids». *J Comp Pathol*, V. 103, (1990), 277-288.
128. Topliff, C. L., et Kelling. C.L., «Virulence markers in the 5'-untranslated region of genotype 2 Bovine Viral Diarrhea Virus isolates». *Virology*, V. 250 (1), (1998), 164-172.
129. Plant, J.A., Acland, H.M., Gard, G.P., Walker, K.H. «Clinical variations of Border Disease in sheep according to the source of the inoculum». *Vet Rec* 113, (1983), 58-60.

130. Jeffery, M., Roeder, P.L. «Variable nature of Border disease on a single farm: Clinical and pathological description of affected sheep». *Res Vet Sci*, V. 43, (1987), 22-27.
131. Chappuis, G., Brun, A., Kato, F., Dauvergne, M., Reynaud, G., Duret, C., «Serological and immunological studies following the isolation of a *pestivirus* during an outbreak of petega ovina on sheeps (Aveyron, France) ». *In* : Pestiroses of sheep and cattle: new knowledge, use for a control strategy, Paris, (1986) 6-7, Maisons-Alfort
132. Mondoly, Paul., Pouget, Céline., « La Border Disease». Société nationale des groupements techniques vétérinaires. Fiche n° 18. Novembre (1998).
133. Loubière, A. «La border disease en Aveyron : analyse de la situation épidémiologique entre 2006 et 2010». Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2012, 176 p.
134. Orr, M.B., Barlow, R.M., «Experiments in Border Disease: X. The postnatal skin lesion in sheep and goats». *Journal of Comparative Pathology*, vol. 88, (1978), 295 – 302.
135. Sweasey, D., Patterson, S.P., Richardson, C., Harkness, J.W., Shaw, I.G., Williams W.W, «Border disease: a sequential study of surviving lambs and an assessment of its effects on profitability», *The Veterinary Record*, vol. 104, (1979), 447 – 450.
136. Gardiner, A.C., Nettleton, P.F., Barlow, R.M. «Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical Border Disease», *Journal of Comparative Pathology*, vol. 93, (1983), 463 – 469.
137. Garcia-Perez, A.L., Minguíjon, E., Estével, L., Barandika, J.F., Aduriz, G., Juste, R.A. *et al.*, «Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype)». *Res Vet Sci*, V. 86,(2009), 345-352.
138. Border Disease. Oakhill Veterinary Center. www.oakhill-vets.com.
139. www.optimalag.com
140. Ferrer, Garcia de Jalon., De las Heras., « Pestiroses Ovine ou Border Disease». <http://theses.vet-alfort.fr>. 1987.
141. Elvira Partida, L., Fernandez, M., Gutiérrez, J., Esnal, A., Benavides, J., Pérez, V., de la Torre, A., Alvarez, M., Esperon, F., «Detection of Bovine Viral

- Diarrhoea Virus as the Cause of Abortion Outbreaks on commercial Sheep Flocks». *Transbound Emerg Dis*, V. 64, (2017), 19-26.
142. Pouget, C., Blain, S., Novella, C., Duquesne, V., Corbière, F., De Cremoux, R., Jay, M «La Border Disease chez les petits ruminants », Institut de L'élevage. UMT: Santé des petits ruminants, 2013.
 143. Rodolakis, A., «Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis», *Small Ruminant Research*, V. 62, (2006), 121-124.
 144. Office International des Epizooties (OIE), «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009. Chapter 2.1.12», Edition de l'OIE, Paris, (2010), 13 p.
 145. Brun, A., Lacoste, F., Reynaud, G., Kato, F., Saint-Marc, B. (1993). «Evaluation of the potency of an inactivated vaccine against border disease pestivirus infection in sheep». In: *Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, Edwards S., ed. Fondation Marcel Merieux, Annecy, France, 1.3 October, (1992), 257-259.
 146. Thur B., Hilbe M., Strasser M. & Ehrensperger F., "Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death". *Am. J. Vet. Res*, V. 58, (1997), 1371-1375.
 147. Entirican, G., Dand, A., et Nettleton, P.F., «A double monoclonal-antibody ELISA for detecting *pestivirus* antigen in the blood of viraemic cattle and sheep». *Vet. Microbiol*, V. 43, (1994), 65-74.
 148. Becher, P., Orlich, M. et Thiel, H.J. «Complete genomic sequence of border disease virus a pestivirus from sheep». *J. Virol*, V. 72, (1998), 5165-5173.
 149. Ridpath, J.F et Bolin, S.R., «Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses». *Virus Res*, V. 50, (1997), 237-243.
 150. Sandvick, T., Paton, D.J et Lowings, P.J.L «Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of the 5' untranslated cDNA region». *J. Virol. Methods*, V. 64, (1997), 43-56.
 151. Vilceck, S., Herring, A.J., Nettleton, P.F., Lowings, J.P.L. et Paton, D.J «Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis». *Arch. Virol*, V. 136, (1994), 309-323.

152. Fulton, R.W., Doffay, J.M., Saliki, J.T., Burge, L.J., Helman, R.G., Confer, A.W., Bolin, S.R. et Ridpath, J.F. «Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhoea virus and border disease virus». *Can. J. Vet. Res*, V, 63, (1999), 276-281.
153. Vilcek, S., Paton, D.J., «A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus». *Vet. Res*, V. 31, (2000), 437-445.
154. Willoughby, K., Valdazo-Gonzalez, B., Maley, M., Gilray, J. et Nettleton, P.F. «Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses». *J. Virol. Methods*, V. 132, (2006), 187-194.
155. Houe, H., Lindeberg, A., Moennig, V., «Test strategies in bovine viral diarrhoea virus control and eradication campaigns in Europe». *J Vet Diagn Invest*, V. 18, (2006), 427-436.
156. Lindberga, Ann. L.E., Alenius b, S., «Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations», *Veterinary Microbiology*, V. 64, (1999), 197-222.
157. BURGÈRE-PICOUX, J., «Maladies des moutons, manuel pratique», édition France agricole, (2016), 23-25.
158. Stephanie, A., «Vaccination contre la maladie des frontières (Border Disease) chez le mouton: Premiers essais d'efficacité du vaccin inactivé BOVILIS-BVD». Thèse : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. (2012), 46-47.
159. Mondoly, Paul ; Pouget, Céline ., « La Border Disease » ; Société Nationale Des Groupements Techniques Vétérinaires (Sngtv) ; (1998), Fiche N° 18.
160. Vantsis J.T., Rennie J.C., Gardanier A.C., Wells P.W., Baolow R.M. & Martin W.B. «Immunisation against Border disease». *J. Comp. Path*, V. 90, (1980), 349-354.
161. Duffel, S.J., Harkness.J.W. «The bovine virus diarrhoea-mucosal disease complex». *Vet Annual*, V. 27, (1987), 91-97.
162. Brugère-Picoux, J., « Maladie Des Moutons ». Manuel Pratique. Edition France Agricole, 2^{ème} Edition (2004), 22-26.
163. Sawyer, M.M., Schore C'E., Osbrun B.I., «Border Disease Of Sheep, Aspects For Diagnostic And Epidemiologic Consideration». *Arch. Virol. Supp.*, V. 3, (1991), 97-100.

164. Alba, A., Allepuz, A., Serrano, E., Casal, J., " Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain)", *Small Ruminant Research*, V. 78, (2008), 80-86.
165. Mohhamedi, Ali., Ghane, M., Ebrahimi K., Ansari-Lary, M., "Seroepidemiology of Border Disease and Risk Factors in Small Ruminants of Shiraz Suburb, Fars Province, Southe of Iran", *Global Veterinaria*, V.6, (2011), 383-388.
166. Yazici, Zafer., Murat, S., Serdar., Semra, O., Gumusova., Harun, Albayrak., "Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep", *Veterinarski Arhiv*, V. 82, (2012), 35-45.
167. Mishraa, Niranjana, Katherukamem, Rajukumara., Stefan, Vilcek., Semmannan, Kalaiyarasua., Sthita, Pragnya., Beheraa, Pooja, Dubeya., et al., « Identification and molecular characterization of border disease virus(BDV) from sheep in IndiaNiranjan », *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, V. 44, (2016), 1–7.
168. Alali S, Zouagui, Z.E.H. « La Border Disease »: Fiche technique. *L'esp Vétérinaire*, N°78, Janvier-Février, (2008).
169. Fassi, Ouafaa., Noâma, Fihri., Nadia, Jammara., Amrani, Ikhlass., El Berbri, and Alali, Said., «Sheep pestivirus in Morocco: sero-epidemiological and molecular study» [Vet Rec Open](#), 6 (1), 2019.
170. Carlsson, U., Belák, K., « Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control", *Acta Veterinaria Scandinavica*, V. 35 (1), (1994), 79-88.
171. Monies, R.J., Paton, D.J., Vilcek, S., «Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border Disease virus». *Vet rec*, V. 155, (2004), 765–69.
172. FAO., Faostat Database Collections. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Rome. Access. 2014. Date: (2017)-03-07. Url: [Http://Faostat.Fao.Org](http://Faostat.Fao.Org).
173. Allal, M., «Le cheptel national dépasse 34 millions têtes ». *l'ECO News* 31 Mai (2015).
174. Mcdermott J J, SchukkenYh., « A Review Of Methods Used To Adjust For Cluster Effects In Explanatory Epidemiological Studies Of Animal Populations». *Preventive Veterinary Medicine*, V. 18, (1994), 155-173.

175. Nettleton, P. F., Gilray, J. A., Russo, P. et Dliissi, E., «Border Disease of Sheep and Goats». *Veterinary Research*, V. 29, (1998), 327-240.
176. Gutekunst, D.E., Malmquist, W.A., "Separation of a Soluble Antigen 572 and Infectious Particles of Bovine Viral Diarrhea Viruses and their Relationship to Hog Cholera". *Can J Comp Med Vet Sci*, V. 27, (5), (1963), 121-23.
177. Letellier, C., Pardon, B., Van der Heyden, S., Deprez, P., "Circulation in Belgium of a bovine viral diarrhoea virus type 2 closely related to North American hypervirulent viruses". *Vet Rec*, V. 166, (2010), 625-26.
178. Reed, L et Muench, H., «A simple method of estimating fifty per cent endpoints». *Am J Hyg*, V. 27, (1938), 493–497.
179. Letellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G., Vanopdenbosch, E., "Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region". *Vet Microbiol*, V. 64, (1999), 155-67.
180. Letellier, C., Kerkhofs, P., "Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus". *J Virol Methods*, V. 114, (2003), 21–27.
181. Sergeant ESG. Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. (2017). Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.
182. Santos Frédérique, « Le Kappa de Cohen : un outil de mesure de l'accord inter-juges sur des caractères qualitatifs », CNRS, UMR 5199 PACEA, 12 Mars (2015).
183. Logiciel XLSTAT version 2014 : <https://www.xlstat.com/fr/articles/xlstat-2014-5>.
184. Valdazo-Gonzales B., Alvarez M., Sandvik T., «Prevalence Of Border Disease Virus In Spanish Lambs». *Vet Microbiol*, V. 128, (2008), 269-278.
185. Kaiser, V., Nebel, L., Schüpbach-Regula, G., Zanoni, R. G. and M. Schweizer, M., «Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhea (BVD) eradication program in Switzerland». *BMC Veterinary Research*. (2017).
186. Mishra N, Rajukumar K, Tiwari A, Nema RK, Behera SP, Satav JS, et al. «Prevalence of Bovine 590 viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies among sheep and goats in India». *Trop Anim Health 591 Prod*, V. 41, (2009), 1231–39.

187. Mainar-Jaime, Raúl C., Vázquez-Boland, José A., “Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain”, *Medicine*. 40, (1999), 193-205.
188. Adair, B.M., McFerran, J.B., McKILLOP, E.R., McCullough, S.J. «Survey for antibodies to respiratory viruses in two groups of sheep in Northern Ireland». *Veterinary Record*, V. 115, (1984), 403-406.
189. Loken, T., «Pestivirus infections in ruminants in Norway». *Revue Scientifique Technique De l'Office International Des Epizooties*, V. 11, (1992). 895–899.
190. Bechmann, G., «Serological investigations in the diagnosis of viral infections derived from cattle in sheep». *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, V. 104, (1997), 321–324.
191. Tegtmeier, C., Stryhn, H., Uttentha, I., Kjeldsen, A.M., Nielsen, T.K., «Seroprevalence of Border Disease in Danish sheep and goat herds». *Acta Veterinaria Scandinavica*, V. 41, (2000), 339–344.
192. O' Neill, R.G., O' Connor, M., O' Reilly, P.J., «A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland». *Irish Veterinary Journal*, V. 57, (2004), 525–530.
193. Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Moennig, V., «Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe». *Biologicals*, V. 31, (2003), 113–8.
194. Ståhl, K., Alenius, S., «BVDV control and eradication in Europe - an update». *Jpn, J Vet Res*, V. 60,(2012), 31–9.
195. Loken, T., Krogsrud, J., Larsen, I.L., “Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs”. *Acta Veterinaria Scandinavica*, V. 32, (1991), 27-34
196. Okur-Gumusova, S., Yazici, Z., Albayarak, H., “Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey”, *Revue Méd. Vét*, V. 157, (2006), 595-598.
197. Tutuncu, M., Duz, E., Karaca, M., Altan Akkan, H., Keles, I., Tasal, I., “A serological investigation of pestiviruses in sheep in eastern border of Turkey”, *Tropical Animal Health and Production*, V. 43, (2011), 1467–1469.
198. Paton, D. J., Carlsson, U., Lownings, J. P., Sands, J. J., Vilcek, S., Alenius, S., “Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus”, *Veterinary Microbiology*, V. 43, (1995a), 283-294.

199. Mccullough, S. J., Adair, B. M., Mckillop , E. R., "A survey of serum antibodies to respiratory viruses in cattle in Northern Ireland. *Irish Veterinary Journal*, V. 41, (1987), 342-344.
200. Rosamilia, A., Grattarola, C., Caruso, C., Peletto, S., Gobbi, E., Tarello, V., et al. «Detection of border disease virus (BDV) genotype 3 in Italian goat herds». *Vet J*, V.199, (2014), 446-50.
201. Fenton, A., Sinclair, J.A., Entrican, G., Herring, J.A., Nettleton, P.F., "A monoclonal antibody captures ELISA to detect antibody to border disease virus in sheep sera". *Vet. Microbiol.*, 28, (1991), 327-333.
202. Krametter-Froetscher, R., Loitsch, A., Moestl, K., Sommerfeldstur, I., Baumgartner, W., "Seroprävalenz von Border Disease und Boviner Virus diarrhö bei Schafen und Ziegen in ausgewählten Regionen Österreich. " *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, V. 92, (2005), 238-244.
203. Nelson, D. D., Duprau, J.L., Wolff, P.L., Evermann, J.F., "Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the mountain goat (*Oreamnosamericanus*)". *Front. Microbiol.* V. 6, (2016), 1415.
204. Belàk, S. et Thorén, P., "Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, V. 1, n°4, (2001), 434-443.
205. Viljoen G.J. et Luckins, A.G., "The role of nuclear technologies in the diagnosis and control of livestock diseases -a review", V. 44, (2012), 1341-1366.
206. Tignon M. « Dosage des anticorps dirigés contre les virus de suidae, bovidae et équidae au moyen du test de neutralisation virale ». CODA-CREVA. SOP/SER/ANA/46, (2014), 1-19.

