

## CONTRIBUTION A L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DES PESTIVIROSES CHEZ DES ONGULES SAUVAGES DANS LES ALPES DU SUD FRANÇAISES \*

Claire Martin <sup>1,2</sup>, Carine Letellier <sup>3</sup>, Dominique Gauthier <sup>4</sup>, Nicolas Jean <sup>5</sup>,  
Anahita Shaffii <sup>6</sup> et Claude Saegerman <sup>1</sup>

### RÉSUMÉ

La transmission interspécifique est régulièrement incriminée dans l'épidémiologie des pestivirus ; notamment dans les alpages où des ongulés sauvages et domestiques cohabitent. L'objectif de cette étude séro-épidémiologique longitudinale menée de 2003 à 2007 dans le département français des Hautes-Alpes a été de mettre en évidence une circulation de *Pestivirus* chez des ongulés sauvages pour évaluer leur implication dans la transmission de *Pestivirus*. Des taux de séroconversion atteignant 45,9% (intervalle de confiance à 95% : IC95% : [40,5-51,3%]) chez des chamois (*Rupicapra rupicapra*) et 61,1% (IC95% : [38,6-83,6]) chez des mouflons (*Ovis amon musimon*) ont été révélés et étaient associés à des densités optiques significativement supérieures chez les mouflons. Des séroneutralisations comparatives de 15 sérums positifs de chamois envers 7 souches de *Pestivirus* distinctes ont permis de montrer que deux souches de Border Disease Virus (Av et 33s) étaient les plus neutralisées. Des titres significativement inférieurs ont été obtenus envers la souche 3534 (Bovine Viral Diarrhea Virus 2). Les résultats de séroconversion et de séroneutralisation indiquent une circulation d'un Border Disease Virus au sein de la zone d'étude. Aucun *Pestivirus* n'a été mis en évidence par réaction d'amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse, ni par isolement viral. Une amélioration du protocole de prélèvement et de transport des échantillons a été envisagée afin de pouvoir isoler et caractériser la souche circulante.

**Mots-clés :** Ruminants sauvages, *Pestivirus*, épidémiologie, Alpes (France), transmission interspécifique.

### SUMMARY

Mountains are a specific site where frequent contacts occur between livestock and wild animals during pasturing seasons. Interspecies transmission is often incriminated in the epidemiology of Pestivirus diseases. The goal of this study was to investigate the prevalence of Pestivirus in some wild ungulates and to determine their role in Pestivirus interspecies transmission.

.../..

\* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA-AESA, 4-5 juin 2009  
<sup>1</sup> Unité de recherche en épidémiologie et analyse de risques appliqués aux sciences vétérinaires (UREAR), Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Boulevard de Colonster, 20, B42, B-4000 Liège, Belgique  
<sup>2</sup> Unité de pathologie des petits ruminants, Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), 06902 Sophia-Antipolis, France (adresse actuelle)  
<sup>3</sup> Département de virologie, Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA-CODA), Bruxelles, Belgique  
<sup>4</sup> Laboratoire départemental vétérinaire et d'hygiène alimentaire des Hautes-Alpes, rue des Silos 5, BP 63, F-05002 GAP cedex, France  
<sup>5</sup> Fédération départementale des chasseurs des Hautes-Alpes, route Sainte Marguerite 62, F-05000 Gap, France  
<sup>6</sup> Centre de recherche du Cyclotron, Sart-Tilman, B30, B-4000, Liège, Belgique

.../..

Between 2003 and 2007, a longitudinal epidemiological study was carried out on hunted ungulates in the French department of Hautes-Alpes. Antibodies were found in 45.9 % (95% confidence interval: [40.5-51.3%]) of 343 chamois (*Rupicapra rupicapra*) and in 61.1% (95% CI: [38.6-83.6%]) of 18 mouflons (*Ovis aemon musimon*) analysed. The optical density obtained in the ELISA antibody test was significantly higher in mouflons. Comparative virus neutralization tests performed on 7 Pestivirus strains with 15 seropositive samples from chamois showed highest titers to 2 Border Disease Virus strains, named Av and 33s strains. Titers to 3534, a Bovine Viral Diarrhea Virus-2 strain, were significantly lower. Virus neutralization tests confirm the circulation of a Border Disease Virus in wild ungulates in the study area. No Pestivirus was detected by reverse - transcriptase polymerase chain reaction or by viral isolation. Further efforts have to be made to improve the protocol in order to isolate and characterize the local strain.

**Keywords:** Wild ruminants, *Pestivirus*, Epidemiology, Alps (France), Inter-specie transmission.




---

## I - INTRODUCTION

---

Les genres *Pestivirus*, *Flavivirus* et *Hepacivirus* forment la famille des *Flaviviridae* [Pastoret, 2003]. Quatre espèces de *Pestivirus* sont officiellement acceptées par le comité international de taxonomie des virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV) : le virus de la diarrhée virale bovine-1 (*Bovine Viral Diarrhea Virus* 1, BVDV-1), le virus de la diarrhée virale bovine-2 (*Bovine Viral Diarrhea Virus* 2, BVDV-2), le virus de la maladie des frontières (*Border Disease Virus*, BDV) et le virus de la peste porcine classique (*Classic Swine Fever Virus*, CSFV) [Becher *et al.*, 1999]. Une souche isolée d'une girafe [Becher *et al.*, 1999] est classée comme une pseudo-espèce (« *tentative species* ») dans le genre *Pestivirus* (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2004). Bien qu'étant la classification la plus communément acceptée, cette dichotomie est, entre autres, fondée sur l'espèce hôte dans laquelle les souches virales ont été découvertes. Cependant, de nombreuses infections croisées ont été décrites [Nettleton et Entrican, 1995]. Le génome des *Pestivirus* est constitué par une molécule d'ARN (Acide Ribo Nucléique) monocaténaire de polarité positive non polyadénylée de 12,3 kb (kilobases) [Meyers et Thiel, 1996]. Une faible réactivité sérologique croisée existe entre les différentes espèces de *Pestivirus* [Avalos-Ramirez *et al.*, 2001].

Chez les ruminants domestiques, une infection par un *Pestivirus* se traduit par un tableau clinique très variable, pouvant aller d'une simple virémie transitoire subclinique à une sévère atteinte multi-systémique [Evermann et Ridpath, 2002]. Les signes cliniques généralement rencontrés incluent des anomalies de la reproduction (infécondité, avortement, mortalité fœtale), une immunodépression (leucopénie et neutropénie associées à une infection aiguë), des diarrhées, un dépérissement et, lors de surinfection d'un animal IPI par une souche cytopathogène, un syndrome hémorragique sévère. Lors d'infection d'une femelle gestante pendant le deuxième tiers de gestation, les fœtus ne développent pas de réaction immunitaire envers le virus, et sont alors dénommés infectés persistants immunotolérants (IPI).

Plusieurs études menées sur des espèces d'ongulés sauvages ont montré que de nombreuses espèces étaient réceptives aux *Pestivirus*. Dans les pays scandinaves, des études réalisées sur des cervidés montrent que des souches de *Pestivirus* circulent au sein de ces populations. En effet, en Norvège, les *Pestivirus* sont enzootiques chez les rennes (*Rangifer tarendus*) et chez les chevreuils (*Capreolus capreolus*) [Lillehaug *et al.*, 2003]. En revanche, au Danemark, les

chevreuils semblent être faiblement infectés [Nielsen *et al.*, 2000]. En Allemagne, deux souches cytopathogènes ont été isolées sur des chevreuils [Frölich et Hofmann, 1995] et ont été classées dans l'espèce BVDV-1 [Fischer *et al.*, 1998]. En Autriche, une séroprévalence très faible a été mise en évidence sur des cerfs élaphe alors que la séroprévalence du BDV et du BVDV était de 1,1% chez les moutons et de 70-80% chez les bovins [Krametter *et al.*, 2004]. Or, il a pu être montré qu'un fort taux de contact existait entre les espèces sauvages testées et les ruminants domestiques, notamment autour des dépôts de sel en alpages. Le sens de transmission semble alors s'être fait d'un bovin IPI vers le cerf [Krametter *et al.*, 2004].

Un cas particulier semble être celui des populations d'isards (*Rupicapra pyrenaica*) dans les Pyrénées. Depuis 2001, de nombreux épisodes de fortes mortalités ont été constatés dans plusieurs populations d'isards dans la principauté d'Andorre et quatre réserves de chasse en Aragon, en Espagne (réserve de Benasque, Los Circos, Viñamala, et Los Valles) [Arnal *et al.*, 2004], dans la réserve Alt Pallars, en Catalogne, nord de l'Espagne [Hurtado *et al.*, 2004 ; Marco *et al.*, 2007], ainsi que dans la réserve d'Orlu, dans le département de l'Ariège, en France [Frölich *et al.*, 2005]. Ces mortalités étaient associées à des signes cliniques non spécifiques, tels qu'une diminution de la mobilité et une absence de fuite lors de présence humaine, différents degrés d'alopécie du tronc et de la nuque, une rétention du duvet hivernal sur les membres et la face, et une hyperpigmentation de la peau. A l'examen clinique, ces isards étaient cachectiques et anémiés [Arnal *et al.*, 2004 ; Hurtado *et al.*, 2004 ; Frölich *et al.*, 2005 ; Marco *et al.*, 2007]. Des lésions histologiques ont pu être observées dans la peau (alopécie sévère avec atrophie folliculaire

et regroupement des follicules pileux, accompagnée d'hyperplasie et de mélanose de l'épiderme) et le cerveau (œdème cérébral, spongieuse de la substance blanche et dégénérescence neuronale) [Marco *et al.*, 2007]. Le virus responsable de ces affections a été séquencé par plusieurs équipes [Hurtado *et al.*, 2004 ; Frölich *et al.*, 2005] et a été classé parmi les BDV, sous-type BDV-4 [Arnal *et al.*, 2004].

En France, dans le département des Hautes-Alpes, une chute des effectifs a été observée sur plusieurs populations de chamois, allant jusqu'à 17% (réserve naturelle du Combeynot). Plusieurs suivis sanitaires<sup>7</sup> ont été successivement mis en place en partenariat avec le Laboratoire départemental vétérinaire et d'hygiène alimentaire des Hautes-Alpes et les différentes sociétés de chasse concernées.

En application des récentes recommandations de l'Organisation mondiale de la santé animale [King, 2004] et à l'aide d'une étude épidémiologique longitudinale, ce travail permettra d'estimer la prévalence des *Pestivirus* au sein de certaines espèces d'ongulés sauvages, dans le but d'évaluer leur rôle dans les transmissions interspécifiques entre ongulés sauvages et domestiques. En effet, à l'heure de l'essor de nouveaux plans de lutte collective contre le BVD en Europe [Lindberg *et al.*, 2006], il est capital de pouvoir évaluer si les ongulés sauvages étudiés jouent un rôle dans le maintien (réservoir) ou non de l'infection [Haydon *et al.*, 2002]. Par la suite, la mise en place de séroneutralisations comparatives aura pour but de situer les *Pestivirus* circulant dans les populations d'ongulés sauvages dans les Alpes du Sud françaises par rapport aux groupes phylogénétiques déjà connus dans les régions et pays avoisinants.

<sup>7</sup> Suivi sanitaire ou surveillance sanitaire ou épidémiosurveillance : méthode d'observation fondée sur des enregistrements en continu permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte [Toma *et al.*, 1991]

## II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. MATÉRIELS

#### 1.1. ZONE D'ÉTUDE

Le territoire d'étude se situe dans les Alpes françaises, dans le département des Hautes-Alpes (05) (figure 1). Deux zones situées au Nord du département ont été incluses dans le protocole de prélèvements. Il s'agit tout d'abord du territoire de chasse de la société Ségure-Viso, situé sur la commune de Ristolas (44°46'26" N, 06°57'24" E). Cette zone est présente dans le Parc naturel régional du Queyras, et est en partie située au niveau d'une Réserve Naturelle de Chasse et de Faune Sauvage (RNCFS Ségure-Viso). Le

deuxième territoire d'étude est le Briançonnais (44°58' N, 6°30' E), il s'étend de la limite du Parc national des Ecrins jusqu'à la Alta Valle du Suza (Italie) à l'Ouest. Il comprend le Val de la Clarée, la Vallée étroite, et la rive gauche du val de la Guisane. Le climat est de type montagnard avec une faible pluviométrie et nébulosité (la moyenne annuelle est de 650 à 850 mm). Les chamois se rencontrent essentiellement à des altitudes comprises entre 800 et 3 000 m dans deux biotopes particuliers, à savoir les pelouses alpines (>2 400 m d'altitude) et les forêts de mélèzes et de pins cembro.

Figure 1

Localisation de la zone d'étude : les deux zones sont situées au Nord de la ville de Gap, dans le département des Hautes-Alpes, en France



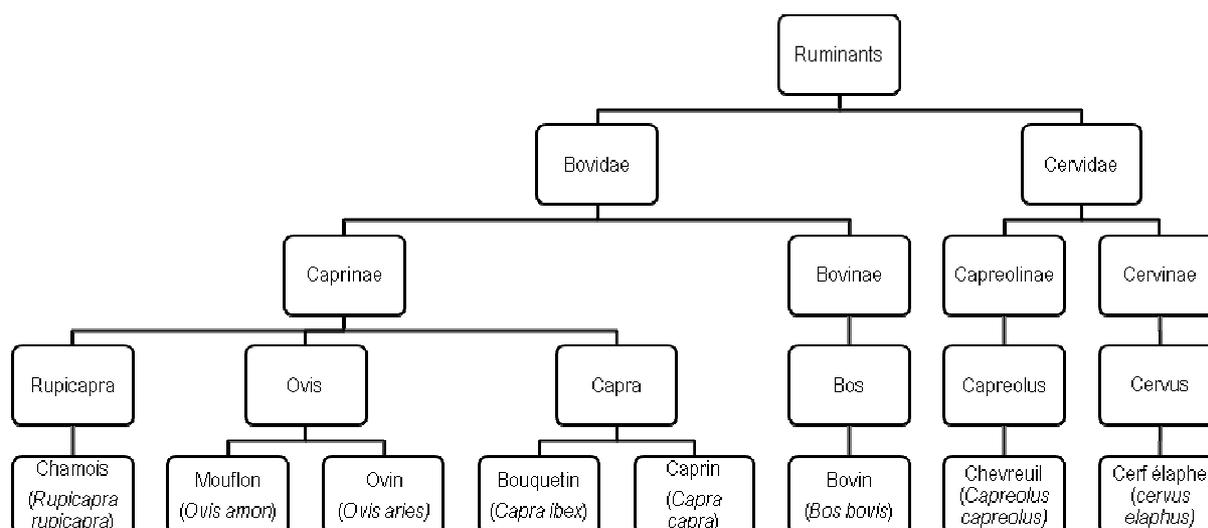
### 1.2. POPULATION ET PÉRIODE

Les analyses ont été effectuées sur les ongulés sauvages tués à la chasse, soit le chamois (*Rupicapra rupicapra*), le mouflon (*Ovis ammon musimon*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*). La figure 2 représente les affiliations phylogénétiques des espèces de

ruminants susceptibles d'interagir dans les deux zones d'étude. Les effectifs des animaux ont été évalués grâce à des comptages effectués au minimum tous les six ans par les organismes responsables (parc ou fédération de chasseurs).

Figure 2

Arbre phylogénétique des ruminants cohabitant dans la zone d'étude



### 1.3. PRÉLÈVEMENTS

La prise en charge des prélèvements a été réalisée par les sociétés de chasse volontaires, en partenariat avec le Laboratoire départemental vétérinaire et d'hygiène alimentaire (LDVHA) de Gap. Une première inspection externe a été réalisée au retour de chasse par une personne compétente. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide de tubes secs, et, à partir de 2006, à l'aide de tubes vacutainers SST avec gel séparateur et activateur de coagulation. Ils ont été centrifugés puis congelés à -18°C dans les 24h après le tir. Les rates, placées dans un « gant de fouille » à usage vétérinaire, ont été congelées (-18°C) endéans les 24h *post mortem*. Le broyage des rates s'est effectué en injectant 5 mL de milieu de culture mélangé à

250 µg/L d'amphotéricine B, 50 mg/L de gentamycine et 1 000 000 U/L de benzylpénicilline dans 2 cm<sup>3</sup> de parenchyme splénique.

## 2. ANALYSES DE LABORATOIRE

### 2.1. SOUCHES VIRALES UTILISÉES

La souche BVDV-1 NADL a été reçue du Dr J.M. Aynaud (INRA, Thiverval, France), la souche BDV Av du Dr. Chappuis (Mérial). Les souches Frijters, 137/4 et 3534 ont été fournies par G. Wellemans (CERVA, Uccle, Belgique). Les virus ont été multipliés dans des cellules MDBK (Madine Darby Bovine Kidney) dans un milieu de culture additionné d'antibiotiques (mélange identique à celui utilisé lors du broyage des rates).

## 2.2. TESTS DIRECTS

La recherche d'antigènes spécifiques des *Pestivirus* a été réalisée de 2004 à 2006 grâce au kit commercial SERELISA<sup>®</sup> Synbiotics BVD p80 Mono Indirect, fondé sur la recherche de la protéine NS3 par une méthode immuno-enzymatique par blocage. Les échantillons prélevés en 2007 ont été analysés via le kit HERDCHEK\* BVDV Ag/Serum Plus commercialisé par le laboratoire IDEXX.

Tous les sérums déclarés positifs au test ELISA Ag (Synbiotics ou Idexx) ont été analysés pour confirmation par PCR (Polymerase Chain Reaction), selon un protocole en temps réel et selon un protocole conventionnel. Tous les broyats de rate ont, de plus, été analysés par PCR en temps réel. L'extraction du RNA a été effectuée à l'aide du kit QIAamp RNeasy<sup>®</sup> Mini (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. Les RNA ont été mis en solution dans 40 µL d'eau RNase-free et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. La réaction de transcription inverse a été réalisée dans un mélange contenant 10µL de RNA et 10µL de mix contenant 4µL de tampon (pH=7,3), 0,1 M de DTT, 10 mM de dNTP (déoxynucléotide triphosphate), 0,2µL d'hexanucléotides mix 10 fois concentré, et 200 unités d'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Murine Maloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase - Invitrogen<sup>®</sup>). Pour la réaction de PCR en temps réel, la région génomique codant pour la région 5'UTR (hautement conservée) a été amplifiée en utilisant les amorces F2 :

5' CTCGAGATGCCATGTGGAC 3'  
(position 224-242 de la séquence de la souche NADL)

et PESTR :

5' CTCCATGTGCCATGTACAGCA 3' (position 391-371 de la séquence de la souche NADL).

Deux sondes - différant de 3 nucléotides - ont été utilisées : la sonde :

5' FAM CAGCCTGATAGGGTGTCTGCAGAGG C TAMRA 3' spécifique du BVDV-1 et la sonde 5' VIC CACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAG ACCTG TAMRA 3' spécifique du BVDV-2 [Letellier *et al.*, 2003].

Le système de détection Light Cycler<sup>®</sup> 480 (Roche) a été utilisé. Les conditions de PCR étaient constituées de 10 minutes de pré-incubation à 95°C suivies de 45 cycles d'amplification (15 sec à 95°C et 1 min à 60°C). Les mesures de fluorescence

ont été réalisées pendant la phase d'élongation. Chaque réaction de PCR a été réalisée dans 20 µL de mix contenant 10µL de FastStart Taqman Probe Master, 200nM de chaque sonde et 300 nM de chaque amorce, 8 µL d'eau DEPC et 1 µL d'ADNc.

Un témoin négatif (eau) ainsi que deux témoins positifs (BVDV-1 et BVDV-2) ont été inclus dans chaque réaction d'amplification. Un contrôle interne  $\beta$ actine a de plus été utilisé pour valider les résultats négatifs. Lors de la réaction de PCR conventionnelle, les amorces B<sub>E</sub> 5' CATGCCCTTAGTAGGACTAGC 3' et B<sub>2</sub> 5' TCAACTCCATGTGCCATGTAC 3' ont été utilisées pour amplifier un fragment de 287 paires de bases. L'amplification des ADNc par PCR a été réalisée dans un volume de 50 µL contenant 5 µL de tampon 10x concentré, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de dNTP, 75 pmol de chaque amorce, 2 µL d'ADNc et 2.5 u.i. de Taq DNA polymérase (Invitrogen<sup>®</sup>). Le mélange réactif a été chauffé dans un thermocycle à 94°C pendant 10 minutes puis a été soumis à 35 cycles d'amplification (conditions : 1 min à 94°C, 1 min à 57°C, et 1 min à 72°C). La lecture des produits d'amplification a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% [Letellier *et al.*, 1999].

De plus, les prélèvements répondant positivement au test ELISA pour la recherche d'antigènes ont été mis en culture sur cellules MDBK, dans le but d'isoler la souche virale circulante.

## 2.3. TESTS INDIRECTS

La recherche d'anticorps dirigés contre des *Pestivirus* de ruminants sur les sérums déclarés non hémolysés au test rose Bengale (recherche Brucellose) a été réalisée grâce à un kit commercial ELISA (Synbiotics SERELISA<sup>®</sup> BVD p80 Mono Blocking) selon les recommandations du fabricant. Ce test a permis la mise en évidence des anticorps réagissant contre la protéine NS3, via une méthode ELISA sandwich. De plus, parmi les 168 prélèvements testés positifs avec ce test ELISA, 30 sérums ont été prélevés de façon aléatoire selon un échantillonnage stratifié (six sérums par année de prélèvements, de 2003 à 2007) afin de subir un test de séroneutralisation sur une souche non cytopathogène de BDV (souche Av). Par la suite, un deuxième échantillonnage a été réalisé à partir des valeurs de densité optique (DO) obtenues lors du test ELISA : 19 sérums ayant les valeurs de DO les plus élevées parmi

ceux n'ayant pas encore été testés lors du 1<sup>o</sup> échantillonnage ont également été testés sur la souche Av.

Enfin, un pool de 15 sérums choisis aléatoirement parmi les sérums ayant un titre en anticorps dirigé contre la souche Av supérieur à 1/128 a fait l'objet de séroneutralisations comparatives sur les souches NADL (BVDV-1) [Collett *et al.*, 1988], 3534 (BVDV-2) [Letellier et Kerkhofs, soumission directe à GenBank ; numéro d'accès : AM181232] et sur 4 souches de BDV : 137/4 (BDV-1) [Vilcek *et al.*, 1997], Frijters (BDV-1) [Vilcek et Belak, 1996], 33s (BDV tunisiens) [Thabti *et al.*, 2005]. La dernière souche, 02/1517, est une souche classée parmi le génotype BDV-4. Elle a été isolée en France en 2002 sur des isards (Alzieu *et al.*, 2004) et est génétiquement identique à la souche chamois-01 (Arnal *et al.*, 2004) (pourcentage de similarité antigénique pour les séquences UTR et Npro supérieur à 99%, Letellier, communication personnelle).

Une dose constante de virus (comprise entre 30 à 200 CCID<sub>50</sub>) a été incubée pendant 2 heures à 37°C sous atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub> (5%) avec les sérums dilués de 2 en 2. Des cellules MDBK en suspension ont été ajoutées au mélange, et l'ensemble a été incubé pendant 72h ±5h à 37°C sous atmosphère contrôlée. Tous les sérums ont été testés en double, en utilisant une dilution de départ de 1:2 ou 1:10. La valeur retenue correspond au titre de la dernière cupule montrant une neutralisation virale. Les suspensions virales utilisées ont été titrées systématiquement.

Après séchage puis congélation, une coloration IPMA (Immuno Peroxydase Monolayer Assay) a permis la lecture des plaques : les cellules ont été successivement mises en contact avec des anticorps anti-BVD (dilution 200<sup>-1</sup>, 1h30 d'incubation à 37°C sous atmosphère sèche), puis avec des anticorps anti-bovins liés à la peroxydase (dilution 500<sup>-1</sup>, 1h d'incubation à 37°C sous atmosphère sèche). Enfin, le substrat de l'enzyme peroxydase a été ajouté, permettant une coloration rouge des cellules infectées par un virus proche du BVDV.

### 3. ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été saisies puis traitées grâce au logiciel Excel<sup>®</sup>. Il a été fait usage du test du

Chi carré de Pearson (Chi 2) qui est un test statistique de relation entre deux variables qualitatives [Toma *et al.*, 1991]. Les facteurs de risque et facteurs d'interaction ont été évalués grâce au calcul d'odds ratio, avec un seuil de signification statistique fixé à 5% ( $P < 0,05$ ). Les calculs des odds ratio ont été réalisés avec le logiciel WinEpiscop<sup>®</sup> [Thrusfield *et al.*, 2001]. Lorsqu'il y avait des valeurs nulles, les odds ratio ont été calculés grâce à un odds ratio ajusté [Grenier, 1990]. L'interaction éventuelle entre le facteur d'exposition et le facteur de confusion a été investiguée à l'aide du test de Breslow-Day.

Lorsque des sérums présentaient une toxicité pour les cellules, et que la première dilution interprétable était négative (absence de neutralisation virale), les valeurs des titres ont été choisies en fixant une valeur aléatoire comprise entre 0 et la limite de détection supérieure.

Les valeurs des titres en séroneutralisation obtenues envers sept souches virales (Av, NADL, 3534, 02/1517, 33s, Frijters et 137/4) ont été comparées à l'aide d'une variante du test de Wilcoxon (*Wilcoxon signed rank test* ; méthode non paramétrique alternative au test de *t* pairé) [Dagnelie, 1998]. Ce test a été appliqué du fait que les données sont quantitatives et paires, les variances n'étaient pas les mêmes entre les séroneutralisations effectuées envers les différentes souches virales utilisées et les valeurs de titre en séroneutralisation ne se distribuaient pas selon une loi normale. Après application de la correction de Bonferroni, les différences entre comparaisons ont été considérées significatives au seuil de signification de 5% divisé par le nombre de répétitions du test :  $P < 0,002$ .

La standardisation directe de la prévalence apparente sur l'âge consiste « à calculer les taux spécifiques des sous-populations définies en fonction du facteur responsable de la différence de composition démographique, puis à appliquer ces taux à la population de référence [Toma *et al.*, 2001]. Dans le cas d'espèce, la structure démographique résultant de la somme des deux populations comparées a été prise comme population de référence. On obtient ainsi des résultats qui neutralisent l'effet des différences de composition démographique.

### III - RÉSULTATS

#### 1. RÉPARTITION DES PRÉLÈVEMENTS

Le nombre de prélèvements réalisé par année ainsi que la proportion de sérums utilisables sont consignés dans le tableau 1. La couleur des sérums (hémolyse) et le test rose Bengale utilisé pour la recherche de la brucellose ont permis de distinguer des prélèvements dits « utilisables » des sérums altérés.

La forte diminution du taux de sérums exploitables en 2007 peut être expliquée par le fait qu'aucune personne coordinatrice n'a pu être sur place pour soutenir les sociétés de chasse volontaires. Des rates (n=81) n'ont été récoltées que sur des chamois.

**Tableau 1**  
**Répartition du nombre de sérums prélevés et utilisables**

| Année | Nombre de sérums prélevés | Sérums utilisables |     |
|-------|---------------------------|--------------------|-----|
|       |                           | nombre             | %   |
| 2003  | 49                        | 33                 | 67% |
| 2004  | 95                        | 60                 | 63% |
| 2005  | 46                        | 42                 | 91% |
| 2006  | 143                       | 131                | 91% |
| 2007  | 121                       | 77                 | 63% |

#### 2. EPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE

##### 2.1. SIGNES CLINIQUES

Tous les animaux inspectés étaient en bon état physiologique (état d'embonpoint correct, pas de lésion externe, pas de parasitisme externe massif). En 2005, huit chamois inspectés sur 30 présentaient des lésions de kérato-conjonctivite non évolutives, dont un présentait une cécité unilatérale et un autre une cécité bilatérale [Gauthier, données non publiées]. En 2006, quatre chamois sur 105 examinés présentaient des écoulements oculaires purulents peu abondants. En 2007, seul un chamois présentait des traces d'écoulements oculaires.

##### 2.2. MOUFLONS ET CHEVREUILS

En 2003, les trois mouflons testés étaient séronégatifs, alors qu'en 2006, onze étaient séropositifs parmi 12 animaux testés. En 2007, seuls trois mouflons ont pu être testés et étaient séronégatifs. Les valeurs de densité optique obtenues pour les mouflons étaient très significativement supérieures à celles obtenues chez les chamois et les chevreuils (*Wilcoxon signed rank test*,  $P < 0,0001$ ). Une épreuve de séroneutralisation sur la souche Av a été mise en place sur quatre sérums positifs

en anticorps. Les résultats ont confirmés une circulation virale (titres allant de 1:128 à 1:512).

Deux chevreuils parmi 20 animaux testés étaient positifs en anticorps p80. Tenant compte du fait que les effectifs pour ces deux espèces étaient réduits, les résultats mentionnés par la suite ne concernent que l'espèce chamois.

##### 2.3. ÉVOLUTION ANNUELLE DES RÉPONSES SÉROLOGIQUES

Lors d'une étude antérieure, Pioz et collaborateurs [2007] ont montré que, au sein d'une population d'ongulés sauvages (*Rupicapra pyrenaica*), la transmission d'un *Pestivirus* était dépendante de la distribution des âges des animaux. L'évaluation de la prévalence apparente nécessite dès lors une correction vis-à-vis de l'âge, ce qui a été réalisé via une standardisation directe de la prévalence apparente sur l'âge : cette méthode permet de « pouvoir comparer la situation épidémiologique de plusieurs populations en tenant compte des différences de composition démographique » [Toma *et al.*, 2001]. Cinq tranches d'âges ont été déterminées, de 0 à 2 ans, 2-4 ans, 4-6 ans, 6-8 ans et supérieure à 8 ans. La prévalence apparente en anticorps

standardisée globale (calculée en groupant les 343 prélèvements réalisés de 2003 à 2007) est égale à 45,96% (intervalle de confiance à 95% : IC 95% : [40,5-51,3%]). Les valeurs restent, pour les cinq années étudiées, dans un intervalle compris entre 36,1% (IC 95% : [21-38,2%]; valeur obtenue en 2007) et 61,4% (IC 95% : [43,3-74,4%]; valeur obtenue en 2004). Une tendance générale peut être dégagée, à savoir une diminution globale de la prévalence annuelle standardisée depuis 2003.

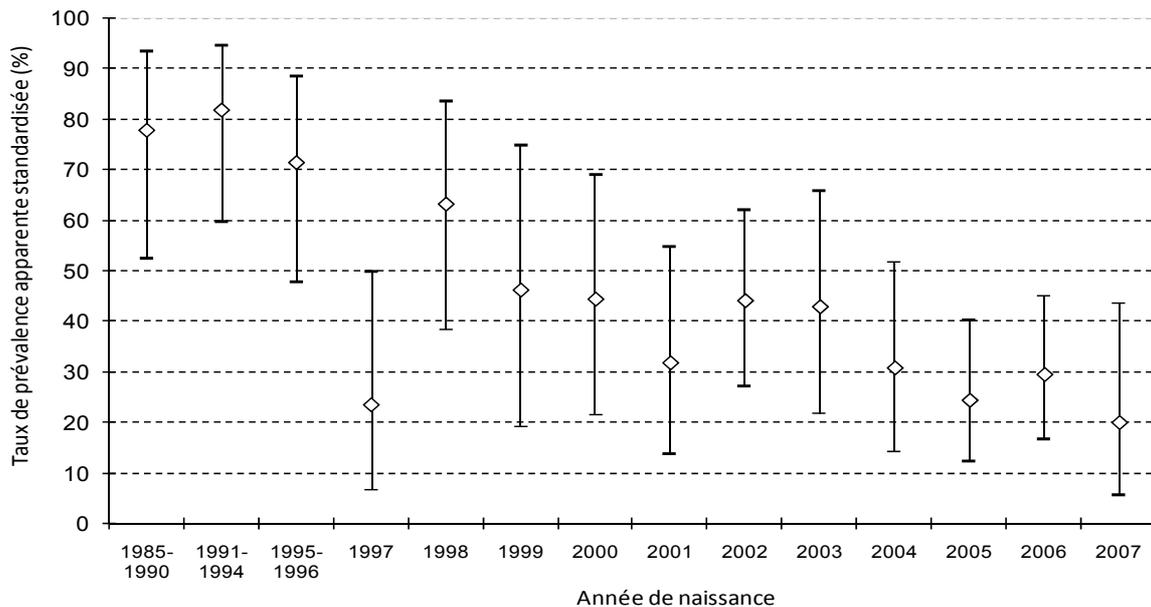
Par ailleurs, lorsque la prévalence apparente est évaluée en fonction de l'année de

naissance des animaux, il est possible de remarquer que, de façon générale, celle-ci diminue au cours du temps. Plus de 80% des animaux nés entre 1991 et 1994 étaient séropositifs (P.A.=81,8%, IC 95% : [59,7-94,8%]), alors que cette prévalence n'atteint que 29,5% (IC 95% : [16,8-45,2%]) pour les animaux nés en 2006 et 20% (IC 95% : [5,7-43,7%]) pour ceux nés en 2007 (figure 3). Il a été également observé l'existence d'un cycle au cours duquel la prévalence apparente chute tous les quatre ans (en 1997, 2001 et 2005).

Figure 3

**Evolution annuelle de la prévalence apparente en anticorps dirigés contre un *Pestivirus* (◇) chez des chamois en fonction de l'année de naissance des animaux.**

Les limites inférieures et supérieures des intervalles de confiance à 95% ont été calculées à partir d'une distribution binomiale exacte.



#### 2.4. RECHERCHE ANTIGÉNIQUE

Seuls les prélèvements séronégatifs ont été testés à l'aide d'un test ELISA pour la recherche d'antigène. En 2004, tous les prélèvements testés étaient positifs pour la présence d'antigène (PA = 100% ; IC 95% : [85 – 100%]) alors qu'aucun n'était positif en 2005 (PA = 0% ; IC 95% : [0 – 8%]). En 2006 et en 2007, respectivement 2,6% (IC 95% : [0,3 – 9%]) et 7,69% (IC 95% : [3,51 –

11,87%]) étaient positifs en antigène. Les résultats obtenus lors des dernières années d'étude semblent montrer une circulation virale active.

Par contre, que ce soit par PCR en temps réel ou conventionnelle, aucun résultat positif obtenu avec un test ELISA n'a pu être reconfirmé. Les résultats obtenus sur les rates étaient également négatifs.

Aucun *Pestivirus* n'a pu être mis en évidence par isolement viral sur culture cellulaire.

### 3. EPIDÉMIOLOGIE ANALYTIQUE

#### 3.1. ETUDE DES FACTEURS DE RISQUE ASSOCIÉS À LA PRÉVALENCE APPARENTE STANDARDISÉE

Bien qu'il y ait une diminution générale de la prévalence apparente dans les deux zones d'étude (données non montrées) pour les années comparables (soit 2004, 2006 et 2007), celle-ci reste plus élevée dans le Briançonnais. Cette zone est significativement plus à risque que le Queyras ( $OR_{\text{Briançonnais}} = 1,65$  ; IC 95% : [1,09-2,50] et  $OR_{\text{Queyras}} = 0,61$  ; IC 95% : [0,40-0,92]).

Les jeunes chamois (moins de deux ans) sont significativement moins séropositifs que les autres animaux ( $OR_{<2\text{ans}} = 0,40$  ; IC 95% : [0,25-0,63]). Le risque de développer une réaction immunitaire contre un *Pestivirus* augmente significativement chez les animaux âgés :  $OR_{>8\text{ ans}} = 2,90$  ; IC 95% : [1,74-4,82].

Le sexe femelle semble plus à risque ( $OR_{\text{♀}} = 2,31$  ; IC 95% : [1,48-3,59]) que le sexe

mâle qui serait un facteur protecteur ( $OR_{\text{♂}} = 0,43$  ; IC 95% : [0,28-0,67]).

Toutefois, l'âge est un facteur de confusion. En effet, lorsque les populations sont stratifiées en 5 classes (<2 ans, 2-4 ans, 4-6 ans, 6-8 ans et ≥8 ans), les OR de chaque classe ( $OR_{<2\text{ans}} = 0,84$  ; IC95% : [0,79-0,88] ;  $OR_{2-4\text{ans}} = 2,50$  ; IC95% : [1,80-3,47] ;  $OR_{4-6\text{ans}} = 3,94$  ; IC95% : [2,41-6,44] ;  $OR_{6-8\text{ans}} = 2,86$  ; IC95% : [2,08-3,91] et  $OR_{>8\text{ans}} = 7,12$  ; IC95% : [5,70-8,90]) sont différents de l'odds ratio brut ( $OR_{\text{brut}} = 2,29$  ; IC95% : [2,09-2,51]). En outre, il y a une interaction entre l'âge et le sexe (test de Breslow-Day,  $P < 0,05$ ).

Toutefois, lorsque les données sont traitées à l'aide d'une régression logistique il apparaît que seuls l'âge et le sexe femelle augmentent le risque de séroconversion chez le chamois.

#### 3.2. SÉRONEUTRALISATIONS COMPARATIVES

L'ensemble des résultats obtenus par sérum et par souche est repris dans le tableau 2.

Tableau 2

#### Titres obtenus lors des épreuves de séroneutralisations comparatives

L'identification des sérums porte l'année de prélèvement (1<sup>er</sup> chiffre), la commune de prélèvement (la lettre centrale) puis le numéro individuel de chaque sérum. L'âge est donné en années révolues (le jour de naissance est fixé au 1<sup>er</sup> mai de chaque année) avec F=femelle, M=mâle et n.d. = données non disponibles. Les valeurs correspondent à la réciproque des titres de la dernière dilution montrant une neutralisation virale. Tous les échantillons testés proviennent de chamois.

| Sérum  | Age  | Sexe | Réciproque du titre dirigé contre la souche |        |         |          |       |        |      |
|--------|------|------|---|--------|---------|----------|-------|--------|------|
|        |      |      | Av  | 33s    | 02/1517 | Frijters | 137/4 | NADL   | 3534 |
| 3.N.5  | 2    | F    | 128   | 13     | 20      | 0        | 40    | 1 024  | 0    |
| 3.N.25 | 14   | M    | 1 024                                       | 5 120  | 640     | 2 560    | 2 560 | 2 048  | 160  |
| 5.R.13 | 2    | M    | 20 480                                      | 10 240 | 1 280   | 2 560    | 640   | 4 096  | 320  |
| 5.R.27 | 10   | M    | 512   | 320    | 80      | 160      | 320   | 512    | 80   |
| 5.R.30 | 6    | M    | 256   | 320    | 160     | 1 280    | 640   | 32     | 16   |
| 6.N.1  | 8    | F    | 512   | 160    | 40      | 80       | 160   | 8      | 4    |
| 6.N.2  | 13   | F    | 256   | 640    | 320     | 640      | 640   | 128    | 0    |
| 6.R.10 | 3    | M    | 1 024                                       | 1 280  | 640     | 640      | 640   | 256    | 80   |
| 6.B.7  | 0    | M    | 256   | 320    | 40      | 160      | 80    | 3      | 6    |
| 7.V.40 | n.d. | n.d. | 20 480                                      | 10 240 | 10 240  | 5 120    | 1 280 | 5 120  | 160  |
| 7.V.42 | 10   | F    | 20 480                                      | 20 480 | 10 240  | 10 240   | 5 120 | 20 480 | 320  |
| 7.V.46 | 0    | M    | 20 480                                      | 5 120  | 10 240  | 2 560    | 1 280 | 5 120  | 320  |
| 7.N.4  | n.d. | n.d. | 4 096                                       | 5 120  | 640     | 640      | 1 280 | 320    | 80   |
| 7.N.13 | n.d. | n.d. | 20 480                                      | 10 240 | 1 280   | 5 120    | 320   | 2 560  | 80   |
| 7.N.59 | 18   | F    | 1 024                                       | 640    | 320     | 320      | 320   | 80     | 0    |

La moyenne des titres obtenus pour chaque souche virale est reprise dans la figure 4.

Des titres plus élevés ont été obtenus envers les souches Av et 33s. La souche Av est la souche qui nécessite des dilutions en anticorps les plus élevées pour être neutralisée, mais n'est pas significativement différente de 33S.

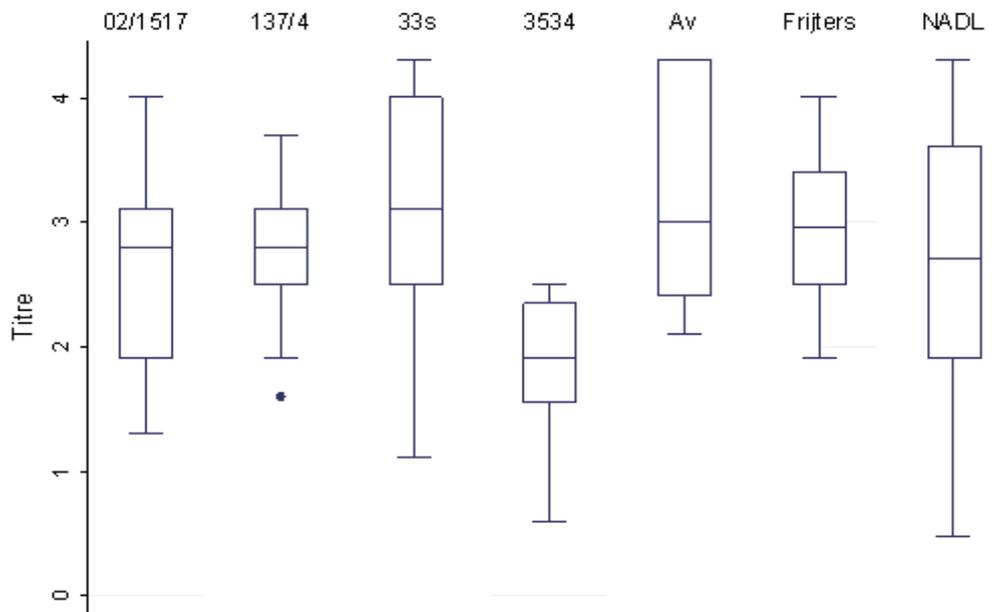
Le *Wilcoxon signed rank test* avec correction de Bonferroni réalisé pour chaque combinaison de souches possible entre les sept souches (c'est-à-dire 21 combinaisons

possibles) montre que les titres dirigés contre la souche 3534 sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour toutes les autres souches (tableau 2). Dès lors, il est très peu probable que la souche circulante appartienne au BVDV-2. Il est en revanche impossible de déterminer une réelle différence entre les souches NADL, Frijers, 137/4 et 02/11517 en utilisant le test paramétrique choisi.

**Figure 4**

**Répartition sous forme de « boîtes à moustaches » (boxplots) du logarithme des titres (axe des Y) obtenus envers chaque souche virale (axe des X).**

La ligne horizontale dans le rectangle représente la médiane ; les limites inférieure et supérieure du rectangle représentent respectivement le premier et le troisième quartile ; les limites inférieure et supérieure des moustaches représentent les limites minimale et maximale estimées et le point représente une valeur aberrante.



## IV - DISCUSSION

Les prélèvements déclarés « positifs » lors de la recherche d'antigènes p80 par un test ELISA ont été réévalués par PCR et isolement viral. Aucun de ces deux derniers tests n'a permis de mettre en évidence une quelconque présence virale. L'inconstance de ces résultats met en exergue plusieurs problématiques.

Tout d'abord, il pourrait s'agir d'un problème de conservation des prélèvements. En effet, avant 2007, les prélèvements ont été conservés à -20°C pendant un intervalle de temps au moins égal à 12 mois (temps écoulé entre le test ELISA et les méthodes de virologie moléculaire). En 2007, les deux tests

ont été réalisés dans un intervalle de temps d'un mois, avec conservation des prélèvements à -80°C. Néanmoins, le transfert dans un congélateur approprié à -80°C n'a pu se faire que trois mois après le début de la mise en place du protocole de prélèvements. La nature labile du RNA, même lorsque stocké dans les meilleures conditions, est bien documentée [Tsui *et al.*, 2002 ; Blacksell *et al.*, 2004]. La dégradation du matériel génétique pourrait expliquer l'absence de détection de RNA au sein des prélèvements. Il faudrait, pour les campagnes de prélèvements futures, pouvoir réaliser les analyses de laboratoire instantanément ou adopter des procédures visant à préserver les RNA. Certaines méthodes de conservation proposées mériteraient d'être approfondies telles que l'utilisation de composés de la guanidine [Dubois *et al.*, 2008] ou du RNAlater™ (notamment lors du transport) [Blacksell *et al.*, 2004].

Par ailleurs, est également soulevée ici la problématique de l'utilisation de certains kits sur d'autres espèces que celles prévues à l'origine par le fabricant. En effet, les valeurs de sensibilité et de spécificité des tests commerciaux utilisés ne sont connues que pour les ruminants domestiques ; l'interprétation des résultats donnés par ces kits pour d'autres espèces doit par conséquent être entourée de la plus grande prudence. En particulier, dans cette étude, les sérums analysés sont non seulement issus d'ongulés sauvages, mais proviennent en plus d'animaux morts. La sensibilité et la spécificité sont dès lors *a priori* plus faibles que pour des sérums de ruminants domestiques vivants [Olde Riekerink *et al.*, 2005]. Lors d'une étude réalisée sur des isards par l'équipe de Marco et collaborateurs [2008], quatre prélèvements ont été testés « positifs » par le test ELISA antigène employé (coffret commercialisé par le laboratoire Synbiotics) mais n'ont pas pu être confirmés par RT-PCR. Ainsi, dans leur étude, le manque de spécificité de ce test apparaît important puisque quatre prélèvements sont des faux positifs [Marco *et al.*, 2008].

Les méthodes de PCR utilisées ont, quant à elles, fait l'objet d'une validation sur une multitude de souches. La méthode d'amplification en temps réel utilisée a été validée sur 60 échantillons. Tous les résultats obtenus par cette technique concordent avec ceux obtenus par une méthode de PCR conventionnelle : toutes les souches de *Pestivirus* testées (qu'elles soient classées parmi les BVDV-1, BVDV-2, BDV ou CSFV)

ont été détectées. D'après les auteurs, ce test peut être utilisé pour la détection de souches encore inconnues, issues notamment de la faune sauvage [Letellier et Kerkhofs, 2003].

Les épreuves de séroneutralisations comparatives ont été mises en place dans le but de réaliser une caractérisation antigénique de la souche virale circulant. Toutefois, un biais peut être présent dans ces résultats, de par le protocole d'échantillonnage. En effet, le choix des 15 sérums a porté sur des sérums initialement testés sur la souche Av et dont le titre était supérieur à 1/128. Le choix de la souche Av comme souche de référence lors des épreuves de séroneutralisations initiales résulte de plusieurs hypothèses préliminaires. Dans un premier temps, le choix s'est porté sur une souche de BDV plutôt que de BVDV. En effet, phylogénétiquement, les chamois sont classés parmi les *caprinae* (figure 2) : ils sont donc plus proches des ovins ou caprins que des bovins. Même si des contaminations croisées ont déjà été décrites, les souches infectant le plus couramment les petits ruminants sont des souches de BDV. Par ailleurs, dans les Pyrénées, des isards ont été infectés par des BDV [Pioz *et al.*, 2007]. Il est par conséquent possible de penser que des souches du même génotype peuvent infecter des chamois. La souche Av a alors été choisie en fonction du lieu géographique dans lequel ont été isolées chacune des souches de BDV disponibles. La souche Av a été isolée lors d'un épisode de Border Disease aiguë en Aveyron en 1985 (Sud Ouest de la France) [Chappuis *et al.*, 1986], la souche 137/4 a été isolée de moutons au Royaume-Uni [Vilcek *et al.*, 1997], la souche Frijters provient de porcins en Allemagne [Vilcek et Belak, 1996] et la souche 33s a été isolée de vaccins tunisiens [Thabti *et al.*, 2005]. La souche 02/1517 est une quasi-espèce des souches circulant dans les Pyrénées [Letellier, communication personnelle]. Il est dès lors plus probable d'avoir un déplacement de cheptels d'ovins domestiques à l'intérieur du territoire français que des transports internationaux, ou encore des transports d'animaux sauvages. Cette stratégie s'est révélée être correcte grâce à l'isolement d'une souche dans les Alpes en 1993, proche de Av [Dubois *et al.*, 2008].

La correction de Bonferroni appliquée au test de Wilcoxon permet de diminuer le risque d'erreur de type I en prenant en compte le nombre de répétitions du test (21 répétitions ici). Par contre, le risque d'erreur de type II augmente. Ainsi, bien que les titres les plus élevés dirigés contre les souches Av et 33s ne

soient pas significativement supérieurs à ceux des autres souches, il est possible de penser que de tels résultats sont importants et méritent d'être discutés ou approfondis (les tests non paramétriques ayant une puissance limitée).

Par manque de la souche homologue, la construction d'un dendrogramme des réactions antigéniques [Archetti et Horsfall, 1950] est, pour l'instant, irréalisable. Toutefois, il est possible d'apporter un certain nombre d'éléments de réponse face à la problématique de la détermination de la souche circulant dans les deux zones étudiées. Tout d'abord, la souche 3534 est significativement moins neutralisée que les autres, ce qui laisse penser que la souche circulante n'est pas classée parmi le génotype BVDV-2. Les titres les plus élevés obtenus lors des séroneutralisations comparatives sont dirigés vers la souche Av. Or, en juillet 2007, l'équipe de Dubois et collaborateurs [2008] a publié une étude phylogénétique de 32 souches de *Pestivirus* ovins circulant dans le Sud de la France de 1985 à 2006, et plus particulièrement dans la région PACA (Provence-Alpes-Côte d'Azur, extrême Sud-est de la France). L'analyse phylogénétique de la souche 93-F-7289, isolée dans les Alpes en 1993, montre que celle-ci se situe dans le même sous-groupe que la souche Av ; une souche française isolée en 1984 sur des moutons dans l'Aveyron [Dubois *et al.*, 2008]. Par ailleurs, les résultats des séroneutralisations comparatives montrent que la deuxième souche provoquant des titres les plus importants est la souche 33s, soit une souche isolée dans des vaccins tunisiens en 1995 [Thabti *et al.*, 2005]. L'analyse phylogénétique de souches isolées en 1991 dans le Vaucluse (département de la région PACA) montre que celles-ci sont proches des souches 33s et BM01, deux souches « tunisiennes » [Dubois *et al.*, 2008]. Ces deux résultats pris simultanément peuvent laisser supposer une circulation de souches apparentées au génogroupe « *Pestivirus* tunisien » dans le Sud-Est de la France. Enfin, les souches circulant au sein des populations d'isards dans les Pyrénées ont été classées dans un groupe particulier (BDV-4). Il aurait été possible que la souche circulant parmi l'espèce chamois soit relativement proche de ce groupe. Toutefois, les résultats obtenus lors des épreuves de séroneutralisation ne

confirment pas cette hypothèse, et laissent plutôt penser à une distribution géographique des souches circulantes plutôt qu'une distribution spécifique par espèce. Ainsi, s'il reste impossible de conclure avec certitude quant à la classification de la souche circulant actuellement au sein des ongulés sauvages dans les Alpes du Sud françaises avec de seuls résultats de séroneutralisation, il est toutefois tout à fait plausible que cette souche soit apparentée au BDV. De plus, de fréquentes interactions entre ongulés sauvages et domestiques sont constatées autour des points d'eau et des pierres à sel (salines) lors de la mise en alpage de ruminants domestiques (essentiellement bovins - *Bos bovis* et ovins - *Ovis aries*), du mois de juin au mois d'octobre [Richomme *et al.*, 2006]. Il est dès lors fortement probable que des troupeaux de moutons aient joué un rôle important dans la transmission des pathogènes [Olde Riekerink *et al.*, 2005 ; Marco *et al.*, 2008], pouvant expliquer la proximité antigénique plus importante avec les souches AV et 33S plutôt qu'avec des souches BDV de type 1 ou de BVDV. Pour être confirmés, ces résultats nécessitent l'isolement du virus et sa caractérisation génétique.

La variation de la prévalence apparente en anticorps suit la même tendance dans les deux zones géographiques étudiées. Les valeurs de séroprévalence apparente sont significativement plus élevées dans le Briançonnais. Or, dans le Queyras, la zone de chasse est en partie comprise dans une réserve naturelle de chasse (RNCFS Ségure-Viso), dans laquelle des règles strictes de gestion de la faune et du pastoralisme sont établies [Anonyme, 2008]. Il est possible que la densité spatio-temporelle des ruminants domestiques (densité de population) et la durée de mise en alpage soient plus élevées dans le Briançonnais que dans le Queyras. La vérification d'une telle hypothèse sera rendue possible lorsque les comptes rendus des diagnostics pastoraux<sup>8</sup> actuellement en cours de réalisation dans la RNCFS Ségure-Viso seront disponibles [Gauthier, communication personnelle]. De plus, dans la Alta Valle di Susa, zone frontalière au Briançonnais, une séroprévalence apparente d'un *Pestivirus* atteignant 25,5% chez les chamois a été mise en évidence.

<sup>8</sup> Diagnostic pastoral : relever l'ensemble des enjeux qui s'appliquent sur un alpage et qui ont un lien avec l'activité pastorale. Un des moyens importants mis en œuvre est l'étude de la capacité fourragère de chaque alpage, permettant de préconiser des effectifs de bétail appropriés [Anonyme, 2007]

Les titres les plus importants ont été obtenus contre la souche Frijters (moyenne géométrique des titres :  $\bar{x}_g = 106$  [étendue : 0-960]), puis contre la souche NADL ( $\bar{x}_g = 38$  [étendue : 0-320]) [Olde Riekerink *et al.*, 2005].

Pour chaque souche comparable, les titres obtenus dans notre étude sont plus élevés : Frijters :  $\bar{x}_g = 999,3$  [étendue 0-10 240] et NADL :  $\bar{x}_g = 435,87$  [3-20 480]. De plus, la moyenne géométrique maximale obtenue ici est nettement supérieure et l'a été sur la souche Av ( $\bar{x}_g = 1 833,83$  [128-20 480]) (données non exposées). Ces résultats corroborent l'hypothèse de circulation virale active dans la zone des Alpes du Sud dont l'origine semblerait être alors du côté français de la frontière.

En moyenne, les titres des séroneutralisations obtenus sont nettement supérieurs à ceux d'autres études similaires réalisées sur les mêmes espèces [Olde Riekerink *et al.*, 2005 ; Pioz *et al.*, 2007]. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les prélèvements sont effectués systématiquement à l'automne, lors de la période de chasse (du premier week-end de septembre aux premières neiges, soit généralement fin novembre). Deux phénomènes sont présents simultanément. Tout d'abord, cette période correspond à la reproduction chez les chamois qui se manifeste par des déplacements importants d'animaux, des remaniements de groupes, augmentant ainsi le taux de contacts entre individus [Pioz *et al.*, 2007]. De plus, des contacts importants avec des ruminants domestiques ont eu lieu pendant la période précédant la prise de prélèvements, et ont possiblement réactivé les réponses immunitaires. Il faudrait pouvoir inclure au protocole de prélèvement un échantillonnage d'ongulés sauvages juste avant la mise en alpage des ruminants domestiques. L'importance de la saisonnalité dans la transmission des *Pestivirus* a été mise en évidence lors d'une étude réalisée dans la RNCFS d'Orlu (Pyrénées, France) [Pioz *et al.*, 2007] : la prévalence apparente en anticorps était significativement plus élevée au printemps qu'en automne alors que la prévalence apparente en antigènes est significativement supérieure en automne. Nos données ne permettent pas de vérifier cette tendance, il faudrait pour cela pouvoir faire des prélèvements dans les deux périodes juxtaposant la mise en alpage des ruminants domestiques.

La connaissance de l'âge des animaux lors du tir permet d'apprécier la dynamique d'infection depuis 1991. L'augmentation de la prévalence apparente en anticorps simultanément à l'augmentation de l'âge des animaux peut simplement s'expliquer par le fait que des animaux âgés ont plus de chances d'être en contact du virus. Dans les Pyrénées, Pioz et collaborateurs [2007] ont montré que l'augmentation de la prévalence apparente d'un BDV était associée à une diminution des effectifs des animaux de moins de deux ans. Le faible pourcentage de jeunes animaux séropositifs pourrait être en partie expliqué par une forte mortalité dans cette classe d'âge, et en partie par une probabilité de contact avec le virus inférieure à celle des animaux plus âgés. Deux études réalisées sur des isards concluent en l'existence d'un BDV enzootique au sein des populations [Pioz *et al.*, 2007 ; Marco *et al.*, 2008]. La première, réalisée dans la RNCFS d'Orlu (France), démontre qu'un *Pestivirus* est présent à l'état enzootique depuis au moins 1995 et affecte durablement la reproduction et la survie des jeunes sans toutefois engendrer des mortalités massives. Dans les Pyrénées espagnoles, un foyer de Border Disease mis en évidence en 2001-2002 a provoqué une forte mortalité et une chute importante des effectifs [Marco *et al.*, 2007]. Une étude longitudinale de ce phénomène, menée de 2002 à 2006, conclue que ces souches virales semblent être devenues enzootiques, avec un impact encore important sur la dynamique des populations [Marco *et al.*, 2008]. Dans notre étude, malgré la diminution de la prévalence apparente, la présence de titres fortement élevés chaque année, et notamment en 2007, renforce l'hypothèse d'endémicité virale, avec une circulation virale régulière, réactivant les réponses immunitaires. Peu d'études épidémiologiques longitudinales ont été réalisées sur des populations « sauvages » (populations dans lesquelles l'infection n'est pas régulée par des moyens humains). Aussi, l'observation d'un cycle d'infection au cours duquel la prévalence apparente en anticorps chute tous les quatre ans revêt tout son intérêt. De façon intéressante, une même dynamique a été enregistrée sur des isards dans la RNCFS d'Orlu (France). Les auteurs concluent en la présence d'un *Pestivirus* enzootique, dont la virulence aurait augmenté dernièrement [Pioz *et al.*, 2007].

Les *Pestivirus* sont des virus à ARN chez lesquels les mutations sont extrêmement fréquentes. Il est dès lors possible que chaque augmentation de la prévalence apparente soit associée à une précédente diminution de l'immunité naturelle des animaux couplée à une mutation virale. La régularité du cycle pourrait être expliquée par le fait qu'un intervalle de quatre ans soit nécessaire pour que l'immunité acquise par les populations lors d'un passage viral décroisse.

Il est toutefois impossible d'admettre qu'un *Pestivirus* circule de façon enzootique parmi toutes les populations d'ongulés sauvages. En effet, une étude réalisée entre 1999 et 2001 dans la province de Lecco (Nord des Alpes Italiennes) montre que sur 145 chamois testés par séroneutralisation sur la souche Singer (BVDV-1), aucun n'était séropositif [Citterio *et al.*, 2003]. Ainsi, la circulation d'un *Pestivirus* au sein des populations d'ongulés sauvages ne semble pas affecter toutes les Alpes.

Cette étude a montré pour la première fois que des mouflons pouvaient être infectés par une souche de *Pestivirus*. La prévalence apparente est très élevée, et est associée à des valeurs de densité optique significativement supérieures à celles obtenues pour les chamois et les chevreuils. Or, cette espèce est phylogénétiquement très proche des ovins. Il semblerait dès lors que leur rôle dans la

transmission des *Pestivirus* soit prépondérant. Prélever des rates et sérums sur un effectif plus important d'animaux est un point clé à améliorer pour les années futures.

Selon Haydon et collaborateurs [2002], la notion de réservoir ne prend de sens que lorsqu'elle est définie par rapport à une population cible. Ainsi, ils définissent ce terme par « *une ou plusieurs population(s) ou environnement(s) épidémiologiquement relié(e)s dans la(les)quelles un pathogène est maintenu de façon permanente et de la (des)quelles l'infection peut être transmise à la population d'étude* ».

De récentes analyses conduites sur des troupeaux domestiques dans la péninsule ibérique ont montré que les souches circulant au sein des troupeaux d'ovins sont phylogénétiquement proches des souches isolées des isards [Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2007]. Cependant, le sens de transmission et le rôle de chaque espèce par rapport à l'autre ne sont pas encore totalement déterminés. L'analyse sérologique et virologique des troupeaux domestiques pâturant en alpage dans la zone d'étude revêt alors toute son importance afin de déterminer dans quelle mesure les contacts périodiques entre ongulés domestiques et ongulés sauvages interviennent dans la dynamique d'infection.

---

## V - CONCLUSION

---

En conclusion, cette étude a permis de montrer qu'au moins un *Pestivirus* circule au sein des ruminants sauvages dans les Alpes du Sud françaises. La souche prépondérante circulante semble être fortement apparentée à un BDV, et être enzootique dans les populations étudiées. Les résultats obtenus sur des mouflons laissent suspecter un rôle prépondérant de cette espèce dans la transmission des *Pestivirus*, au sein des zones étudiées. Le prélèvement de rates et de

sérums dans cette espèce est dès lors primordial pour les futures campagnes de prélèvements. Des études supplémentaires sont indispensables pour évaluer dans un premier temps la présence de l'agent pathogène au sein des troupeaux domestiques, présents sur place ou mis en alpage, puis dans un deuxième temps le taux réel de contact entre les animaux sauvages et domestiques dans les zones étudiées.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alzieu J.P., Deplanche M., Moulignie M., Letellier C., Lacroux C., Duquesnel R., Baranowski E., Meyers G., Kerkhofs P., Schelcher F. - Première description d'une pestivirus de l'isard (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *Bull. Acad. Vét. France*, 2004, **157**, 49-54.
- Anonyme - Etude de la végétation dans le cadre d'un diagnostic pastoral. [En ligne] (2007) Adresse URL : [http://www.echoalp.com/alpes/download/Vegetat\\_Diag\\_pastoral.pdf](http://www.echoalp.com/alpes/download/Vegetat_Diag_pastoral.pdf). Consulté le 22/07/2008.
- Anonyme - Code de l'environnement Article L332-1. [En ligne] (2008) Adresse URL : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?idArticle=LEGIARTI000006833583&idSectionTA=LEGISCTA000006188388&cidTexte=LEGITEXT000006074220&dateTexte=20080627>. Consulté le 22/07/2008.
- Archetti I., Horsfall F.L. - Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.*, 1950, **92**, 441-462.
- Arnal M.C., Fernandez-de-Luaco 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.*, 2004, **85**, 3653-3657.
- Avalos-Ramirez R., Orlich M., Thiel H.J., Becher P. - Evidence for the presence of two novel *Pestivirus* species. *Virology*, 2001, **286**, 456-465.
- Becher P., Orlich M., Kosmidou A., König M., Baroth M., Thiel H.J. - Genetic diversity of *Pestiviruses*: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, 1999, **262**, 64-71.
- Blacksell S.D., Khounsy S., Westbury H.A. - The effect of sample degradation and RNA stabilization on classical swine fever virus RT-PCR and ELISA methods. *J. Virol. Methods*, 2004, **118**, 33-37.
- Chappuis G., Brun A., Kato F., Dauvergne M., Reynaud G., Duret C. - Etudes sérologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un *Pestivirus* dans un foyer ovina chez des moutons. In: *Pestivirus des ovins et des bovins*. J. Espinasse, M. Savey, Société française de buiatrie, 1986, pp. 55-66.
- Citterio C.V., Luzzago C., Sala M., Sironi G., Gatti P., Gaffuri A., Lanfranchi P. - Serological study of a population of alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) affected by an outbreak of respiratory disease. *Vet. Rec.*, 2003, **153**, 592-596.
- Collett M.S., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D.K., Purchio A.F. - Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Pestivirus* bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 1988, **165**, 191-199.
- Dagnelie P. - Interférence statistique à une et à deux dimensions. In *Statistique théorique et appliquée*. Volume 2. De Boeck & Larcier, Brussels: 1998, 659 p.
- Dubois E., Russo P., Prigent M., Thierry R. - Genetic characterization of ovine *Pestiviruses* isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet. Microbiol.*, 2008, **130**, 69-79.
- Evermann J.F., Ridpath J.F. - Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.*, 2002, **89**, 129-139.
- Fischer S., Weiland E., Frolich K. - Characterization of a bovine viral diarrhoea virus isolated from roe deer in Germany. *J. Wildl. Dis.*, 1998, **34**, 47-55.
- Frolich K., Hofmann M. - Isolation of bovine viral diarrhoea virus-like *Pestiviruses* from roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Wildl. Dis.*, 1995, **31**, 243-246.
- Frolich K., Jung S., Ludwig A., Lieckfeldt D., Gibert P., Gauthier D., Hars J. - Detection of a newly described *Pestivirus* of Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. *J. Wildl. Dis.*, 2005, **41**, 606-610.
- Grenier B. - *Analyse et stratégie de la décision médicale*. Editions Masson, Paris, 1990, 246 p.
- Haydon D.T., Cleaveland S., Taylor L.H., Laurenson M.K. - Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infect. Dis.*, 2002, **8**, 1468-1473.
- Hurtado A., Aduriz G., Gomez N., Oporto B., Juste R.A., Lavin S., Lopez-Olvera J.R., Marco I. - Molecular identification of a new

- Pestivirus* associated with increased mortality in the pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J. Wildl. Dis.*, 2004, **40**, 796-800.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Flaviviridae : Taxonomic Structure of the Family. [En ligne] (2004) Adresse URL : [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_flavi.htm#Genus2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_flavi.htm#Genus2), Consulté le 8/07/2008.
- King L.J. - Maladies zoonotiques émergentes et ré-émergentes : défis et opportunités. In : Compte rendu de la 72<sup>e</sup> session générale de l'Organisation mondiale de la santé animale, 2004, Paris, 9 p.
- Krametter R., Nielsen S.S., Loitsch A., Froetscher W., Benetka V., Moestl K., Baumgartner W. - *Pestivirus* exposure in free-living and captive deer in Austria. *J. Wildl. Dis.*, 2004, **40**, 791-795.
- Letellier C., Kerkhofs P. - Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*, 2003, **114**, 21-27.
- Letellier C., Kerkhofs P., Wellemans G., Vanopdenbosch E. - Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.*, 1999, **64**, 155-167.
- Lillehaug A., Vikoren T., Larsen I.L.A., Kerstedt J., Tharaldsen J., Handeland K. - Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.*, 2003, **39**, 779-786.
- Lindberg A., Brownlie J., Gunn G.J., Houe H., Moennig V., Saatkamp H.W., Sandvik T., Valle P.S. - The control of bovine Aral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 2006, **25**, 961-979.
- Marco I., Lopez-Olvera J.R., Rosell R., Vidal E., Hurtado A., Juste R., Pumarola M., Lavin S. - Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. *Vet. Microbiol.*, 2007, **120**, 33-41.
- Marco I., Rosell R., Cabezon O., Mentaberre G., Casas E., Velarde R., Lopez-Olvera J.R., Hurtado A., Lavin S. - Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Vet. Microbiol.*, 2008, **127**, 29-38.
- Meyers G., Thiel H.J. - Molecular characterization of *Pestiviruses*. *Adv. Virus Res.*, 1996, **47**, 53-118.
- Nettleton P.F., Entrican G. - Ruminant *Pestiviruses*. *Br. Vet. J.*, 1995, **151**, 615-642.
- Nielsen, S.S., Roensholt, L., Bitsch V. - Bovine virus diarrhoea virus in free-living deer from Denmark. *J. Wildl. Dis.*, 2000, **36**, 584-587.
- Olde Riekerink R.G.M., Dominici A., Barkema H.W., Smit A.J.D. - Seroprevalence of *Pestivirus* in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Vet. Microbiol.*, 2005, **108**, 297-303.
- Pastoret P.P. - Maladie de la frontière ou Border Disease. In : Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes – Volume 1 : généralités, maladies virales. Technique et documentation, Editions médicales internationales, Paris, 2003, p 559-564.
- Pioz M., Loison A., Gibert P., Dubray D., Menaut P., Le Tallec B., Artois M., Gilot-Fromont E. - Transmission of a *Pestivirus* infection in a population of Pyrenean chamois. *Vet. Microbiol.*, 2007, **119**, 19-30.
- Richomme C., Gauthier D., Fromont E. - Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. *Epidemiol. Infect.*, 2006, **134**, 21-30.
- Thabti F., Letellier C., Hammami S., Pepin M., Ribiere M., Mesplede A., Kerkhofs P., Russo P. - Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch. Virol.*, 2005, **150**, 215-229.
- Thrusfield M., Ortega C., De Blas I., Noordhuizen J.P., Frankena, K. - WINEPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 567-572.
- Toma B., Bénet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F., Sanaa M. - Glossaire d'épidémiologie animale. Editions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, 1991, 365p.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Benet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. - Notions de base en épidémiologie, In: Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les

- maladies transmissibles majeures. AEEMA, Maisons-Alfort, 2001, 29-35 p.
- Tsui N.B.N.G.E.K., Lo Y.M. - Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.*, 2002, **48**, 1647-1653.
- Valdazo-Gonzalez B., Alvarez-Martinez M., Sandvik T. - Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet. J.*, 2007, **174**, 316-324.
- Vilcek S., Belak S. - Genetic identification of *pestivirus* strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J. Virol. Methods*, 1996, **60**, 103-108.
- Vilcek S., Nettleton P.F., Paton D.J., Belak S. - Molecular characterization of ovine *pestiviruses*. *J. Gen. Virol.*, 1997, **78**, 725-735.

