

### III. DIAGNOSTIC CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

#### A. Manifestations cliniques

Lors d'infection par le virus de la FCO, seuls le mouton et quelques ruminants sont traditionnellement connus pour présenter des manifestations cliniques. Les bovins et caprins ne présentent quant à eux que rarement des symptômes, exception faite du récent épisode européen pendant lequel les bovins ont été anormalement affectés par les sérotypes 1 et 8 du virus [BELBIS *et al.*, 2010].

##### 1. Chez les ovins

Les ovins sont l'espèce la plus sensible, quel que soit le sérotype impliqué. L'infection par le virus de la FCO se traduit par une maladie grave et généralisée avec un taux de mortalité élevé. La clinique est alors dominée par [BELBIS *et al.*, 2010 ; ZANELLA *et al.*, 2010]:

- Une hyperthermie très franche ne régressant pas après d'administration d'anti-inflammatoires,
- Un abattement et un amaigrissement rapide,
- Des lésions d'œdème (de la face notamment),
- Du jetage (muqueux, mucopurulent, parfois mucohémorragique),
- Des lésions buccales (ptyalisme, ulcères,...),
- Un muflle croûteux,
- Des écoulements oculaires,
- Des boiteries (œdème du bourrelet coronaire),
- Une perte de laine.

Le taux de morbidité est de 80 à 100% chez les ovins et le taux de mortalité est variable, entre 0 et 50%.

## 2. Chez les bovins

Si l'infection par le virus de la FCO a de graves conséquences chez les ovins, la majorité des infections sont habituellement inapparentes chez les bovins, ces derniers étant plutôt considérés comme des réservoirs pour le virus permettant à la maladie de continuer à circuler. Ainsi, lors d'épisodes d'infection de ruminants par les sérotypes 2 et 4 en Corse, les bovins n'ont présenté aucun symptôme lié à l'infection par le virus de la FCO mais ont uniquement été suivis comme sentinelles dans le cadre de l'épidémiologie afin d'attester de la circulation virale [MEROCC *et al.*, 2009 ; BELBIS *et al.*, 2010 ; MILLEMANN *et al.*, 2009].

Quand la maladie a lieu dans sa forme classique, les principaux signes cliniques sont la fièvre, l'inflammation et l'érosion des muqueuses, notamment buccales, un ptyalisme, un œdème facial, de la rigidité et de la réticence à bouger et des œdèmes pulmonaires consécutifs à une défaillance cardiaque. Des anomalies de la reproduction, que nous développerons dans une seconde partie, sont aussi rapportées (infertilité, anomalies congénitales, avortement...). Le taux de mortalité est faible [OSBURN, 1994 ; MEROCC *et al.*, 2009].

Toutefois, une des particularités de l'épisode de FCO survenu en 2006 a été, en plus de son occurrence bien au Nord de la limite classique de la maladie, sa virulence au sein de l'espèce bovine. Ainsi, les bovins ont présenté des signes cliniques non exceptionnels pour les sérotypes 1, 6 et 8 circulant alors en Europe à cette période. Dans le cas particulier du sérotype 8, son apparition au sein d'une population totalement naïve a entraîné des manifestations cliniques très différentes de ce qui était couramment décrit pour ce même sérotype sous d'autres latitudes. Les animaux les plus touchés ont essentiellement été les adultes et les veaux tandis que les taurillons semblaient les moins touchés [MEROCC *et al.*, 2009 ; BELBIS *et al.*, 2010].

➤ Sérotype 8 [LE GAL *et al.*, 2008 ; BELBIS *et al.*, 2010 ; ZANELLA *et al.*, 2010]

La maladie est extrêmement protéiforme. Classiquement, les premiers signes d'appel rapportés sont :

- un abattement (25,9% des cas dans une étude Ardennaise de LE GAL *et al.* (2008) au cours de l'épidémie 2007),
- une hyperthermie (23,1%) (fugace donc rarement observée lors de l'examen clinique),
- une anorexie,
- une baisse brutale et persistante de la production laitière (signe d'alerte classique dans les troupeaux laitiers).

Les signes cliniques les plus fréquemment détectés sur le terrain sont :

- un amaigrissement (24%),
- des manifestations nasales (jetage séreux (19,8%), congestion du mufle et de la muqueuse, érosions, croûtes et ulcères du mufle et des cavités nasales (22,1%)),
- une raideur des membres (16,3%) voire une boiterie grave (plus fréquemment chez le bovin laitier),
- des troubles oculaires (18,1%) (conjonctivite, larmoiement, exophtalmie, œdème périoculaire),
- des symptômes buccaux (congestion de la muqueuse (7,8%), ptyalisme (16,9%)) ;
- des lésions de la mamelle (pétéchies, ulcères et croûtes sur les trayons),
- un œdème des pâturons.

D'autres signes cliniques peuvent être observés (lésions cutanées, cyanose de la langue, érosions et ulcère linguaux) mais ils sont moins fréquents.

On peut également noter que l'état sanitaire de l'élevage est un facteur important pour l'expression clinique tout comme le stade physiologique au moment du passage viral, le stade le plus à risque étant la gestation. Si l'infection a lieu à cette période, il peut s'ensuivre des avortements, des vêlages prématurés, une mauvaise préparation au vêlage, la naissance de veaux mort-nés, des malformations du nouveau-né ou des avortons, un anœstrus et une infertilité des mâles.

En 2006 (Pays-Bas) et 2007 (Ardennes), la morbidité moyenne calculée était d'environ 2,5% avec des situations variées selon les élevages (jusqu'à 80% d'animaux atteints). La létalité est estimée à 7% [BELBIS *et al.*, 2010].

➤ Sérotype 1 [BELBIS *et al.*, 2010]

Les signes cliniques chez les bovins infectés par le sérotype 1 lors du récent épisode ont été rapportés par les vétérinaires du Sud-Ouest de la France. Ces derniers évoquent une symptomatologie souvent frustrée, un seul trouble étant souvent identifié. Les symptômes locomoteurs et oculaires semblent prédominer. Les boiteries sont causées par des œdèmes des membres, des ulcères de l'espace interdigité, une inflammation du bourrelet coronaire et elles induisent souvent une difficulté au relever. Les symptômes oculaires sont un épiphora discret, des conjonctivites de faible intensité et un chémosis.

Les signes de jetage nasal semblent plus discrets que lors d'infection par le sérotype 8 même si les descriptions classiques du sérotype 8 (sialorrhée, congestion du muflé et des gencives) ont été retrouvées avec le sérotype 1.

La morbidité est en moyenne de 3 à 5 % (variant de 1 à 40% en fonction des élevages) et la mortalité est de 1 à 3%.

➤ Sérotype 6 [BELBIS *et al.*, 2010]

Ce sérotype a émergé en 2008 aux Pays-Bas et en Allemagne et provoque uniquement une inflammation des bourrelets coronaires. La morbidité est extrêmement faible et aucune mortalité n'a été constatée.

## B. Diagnostic de laboratoire

La FCO est une infection qui est souvent asymptomatique chez les bovins. Afin de confirmer une suspicion d'infection, diverses méthodes sont à disposition du praticien (isolement viral, détection d'antigènes, d'anticorps ou d'acides nucléiques). De plus, si la FCO fait partie du diagnostic différentiel d'un praticien, la détection rapide et précise des foyers est cruciale, de par l'inscription de la maladie à la liste de l'OIE et à la liste précédente des Maladies Réputées Contagieuses. Enfin, une fois le diagnostic clinique confirmé, les techniques à disposition permettront également d'identifier le sérotype incriminé.

## 1. Virologie

Le diagnostic virologique consiste à mettre en évidence le virus (diagnostic conventionnel) ou son génome (diagnostic moléculaire). Il est donc fondé sur deux techniques utilisables : l'isolement viral et l'amplification du matériel génétique par RT-PCR (amplification en chaîne par la polymérase après transcriptase inverse). Le laboratoire de référence en France pour la virologie est l'ANSES-LERPAZ de Maisons-Alfort (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologies Animales et Zoonoses) [ZIENTARA, 2007].

### a. Prélèvements

Les prélèvements à réaliser varient selon la situation [AFSHAR, 1994 ; OSBURN, 1994 ; ZIENTARA, 2007].

Sur un animal vivant, il convient de prélever 5 mL de sang sur anticoagulant (EDTA) pendant la phase d'hyperthermie qui correspond à la phase de virémie. On peut également, en cas de doute sur le caractère infectant d'un taureau reproducteur, effectuer des analyses sur son sperme. Cependant afin d'éviter toute cytotoxicité, la semence sera diluée dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) avant de procéder aux analyses.

Sur un cadavre frais, on pourra prélever le plus rapidement possible post-mortem la rate, le cœur et/ou les ganglions. Sur un avorton, le cerveau est un prélèvement de choix

Tous ces prélèvements devront être acheminés au laboratoire sous régime du froid positif (+4°C).

### b. Isolement viral

Seule la technique d'isolement viral peut attester la présence du virus infectieux dans le sang de l'animal (un test RT-PCR positif ne signifiant pas que le virus présent dans l'échantillon est toujours infectieux) [BELBIS *et al.*, 2010] et permettre ainsi un diagnostic de certitude. Toutefois, la grande limite de ces méthodes « conventionnelles » est leur délai de

réponse : de 15 jours à un mois (dépendant du nombre de passages réalisés pour isoler le virus) [ZIENTARA, 2007].

➤ Inoculation sur animal vivant : une méthode historique [AFSHAR, 1994]

Il s'agit de la première méthode développée dès 1902 pour isoler le virus. Elle est encore à ce jour la méthode la plus sensible et la plus spécifique. Elle est réalisée sur des moutons qui peuvent facilement tolérer l'injection intraveineuse d'un grand volume d'inoculum (200 à 300 mL). L'inoculum peut être du sang hémolysé, des suspensions de tissu et des broyats d'insecte. A l'injection intraveineuse était aussi combinée une intradermique et une sous-cutanée. Le test est considéré positif si les moutons montrent des signes cliniques ou séroconvertissent. Toutefois, cette méthode est aujourd'hui largement délaissée au profit des techniques cellulaires moins contraignantes.

➤ Techniques cellulaires [AFSHAR, 1994 ; ZIENTARA, 2007]

○ Inoculation sur œufs de poules embryonnés

On inocule le prélèvement par voie intraveineuse à des œufs de poule embryonnés pendant 9 à 11 jours. Si le virus est présent, les embryons infectés commencent à mourir 24h après l'inoculation à la suite d'importantes hémorragies leur donnant l'aspect d'une cerise rouge.

○ Inoculation sur culture cellulaire

Les lignées cellulaires les plus utilisées pour la recherche du virus de la FCO sont les lignées BHK-21, Vero et C6-36. Généralement, l'utilisation de ces cultures cellulaires pour l'isolement viral en première intention n'est pas recommandée car une amplification virale est d'abord nécessaire. Elle est de ce fait couplée à l'inoculation sur œufs de poule embryonnés, cette étape servant d'amplification virale. Les embryons morts entre le 2ème et le 7ème jour sont récupérés, broyés, puis inoculés à des cultures cellulaires. L'inoculation sur culture cellulaire apporte une information complémentaire à savoir la recherche d'effets cytopathogènes dus au virus. Sur des cultures cellulaires (cellules BHK-21), l'observation

d'un effet cytopathique 2 à 5 jours après inoculation met en évidence le potentiel infectieux du virus. Une PCR sur ces cultures cellulaires permet de détecter la présence du virus.

Le typage du virus peut être effectué par neutralisation virale sur culture de cellules à l'aide de sérums hyper immuns spécifiques (correspondants aux sérotypes connus) produits sur mouton ou sur lapin.

### c. Amplification du matériel génétique (PCR)

L'amplification du matériel génétique par la technique de PCR est plus rapide que les méthodes conventionnelles d'isolement viral. L'amplification de gènes hautement conservés chez les 24 sérotypes permet le diagnostic du virus de la FCO en 24h seulement. Cette technique présente une haute spécificité et une grande sensibilité [ZIENTARA, 2007].

Une amélioration technologique, la PCR en temps réel (abrégée rt-PCR pour real time RT-PCR) permet désormais également la quantification du génome dans les prélèvements. De ce fait, la rt-PCR est relativement plus utilisée sur le terrain. L'interprétation d'une valeur de rt-PCR ne se fait alors plus uniquement en « positif » ou « négatif » comme la RT-PCR classique. Elle fait en plus intervenir une valeur de « cycle seuil » (Ct). Il s'agit du nombre de cycles d'amplification nécessaires pour l'atteinte d'un seuil significatif du matériel amplifié. Le Ct est donc une valeur inversement proportionnelle à la quantité du génome viral présente initialement dans le prélèvement. On peut donc interpréter un Ct faible comme le signe de la présence d'une grande quantité de matériel génétique viral dans l'échantillon et un Ct élevé comme celui d'une faible quantité de génome viral. D'un point de vue pratique, un Ct très faible (18 par exemple) est le plus souvent associé à une virémie infectieuse alors que lorsqu'un Ct est élevé est retrouvé, le virus est rarement infectieux. [BELBIS *et al.*, 2009].

Cependant aucune étude n'a proposé jusqu'à présent de corrélation entre une valeur de Ct et le statut infectieux ou non du virus. Les résultats positifs obtenus doivent donc être interprétés avec précaution, la détection de l'ARN viral n'étant pas suffisante pour déterminer le statut infectieux de l'animal. Seules des méthodes d'isolement viral permettent actuellement de statuer sur le caractère infectieux ou non du virus. De plus, dans le cas de la FCO chez les bovins, si la virémie infectieuse peut durer en moyenne 60 jours chez le bovin,

la détection de la virémie par RT-PCR est fonction de la durée de vie des érythrocytes auxquels les virus sont associés. Elle demeure ainsi possible pendant 140 à 150 jours chez les bovins, bien que le virus infectieux ne soit plus présent [BELBIS *et al.*, 2009].

L'identification du sérotype est également possible en réalisant par RT-PCR une amplification partielle du segment génomique 2 (codant la protéine VP2 siège de la spécificité de type) [BELBIS *et al.*, 2010]. Cet outil a été développé dans le laboratoire de l'ANSES-LERPAZ d'Alfort et est actuellement utilisé pour le diagnostic des 5 sérotypes (1, 2, 4, 9 et 16) présents dans le bassin méditerranéen et pour le sérotype 8 présent dans le Nord de l'Europe [ZIENTARA (2007)].

Le développement de kits commerciaux a permis de faciliter l'établissement du diagnostic et de procéder à une décentralisation du diagnostic virologique vers 64 laboratoires départementaux d'analyse, facilitant la réalisation du diagnostic au pic de l'épizootie en France fin 2008 [BELBIS *et al.*, 2010].

La RT-PCR est donc une technique de diagnostic virologique privilégiée sur le terrain et dans l'urgence mais elle ne remplace pas les techniques d'isolement viral qui restent seules à permettre un diagnostic de certitude.

## 2. Sérologie

De nombreuses techniques ont été mises au point mais aucune ne permet de distinguer la présence d'anticorps liés à la vaccination de ceux consécutifs à une infection [BELBIS (2010)]. En France, le laboratoire de référence pour la sérologie est le département EMVT (Elevage et Médecine Vétérinaire Tropicale) du CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) à Montpellier.

Seules deux de ces techniques sont recommandées par l'OIE et servent de référence : l'immunodiffusion en gélose et l'ELISA de compétition. Ces deux techniques permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles reposent sur la reconnaissance d'antigènes communs aux différents sérotypes. Les prélèvements à effectuer sont des prises de sang sur tube sec. La

séroneutralisation sur culture de cellules est utilisée pour identifier l'identité du/des sérotypes contre le/lesquels sont dirigés les anticorps.

La sérologie est un test sensible et spécifique. En zone infectée, très peu d'animaux positifs à la PCR sont trouvés négatifs à la sérologie, notamment parce que l'infection est fréquemment installée depuis longtemps lorsqu'on la découvre. En outre, les anticorps sériques apparaissent en moyenne dans les 8-10 jours suivant l'infection (90 à 95% des animaux présentent une séroconversion dans les 15 jours qui suivent l'inoculation) et ils peuvent persister plusieurs années [ZIENTARA, 2007].

#### a. Immunodiffusion en gélose

L'immunodiffusion en gélose repose sur la mise en évidence des anticorps présents dans le sérum testé par la précipitation de ceux-ci au contact d'un antigène (le plus couramment un antigène purifié soluble préparé à partir de cultures cellulaires infectées) après migration dans un gel d'agarose. L'antigène est contenu dans la cupule centrale d'une boîte de Pétri remplie de gel d'agarose à 0,9% et les sérums à tester sont déposés dans 6 cupules situées en périphérie de la cupule centrale. On oppose toujours les sérums à tester à un sérum témoin préparé à partir du sang d'un animal hyperimmunisé. Les éléments contenus dans les différentes cupules migrent et se rencontrent faisant apparaître en face des cupules dont le sérum contient des anticorps des lignes de dépôt d'immuns complexes. La réaction nécessite 24h d'incubation seulement [AFSHAR, 1994].

Cette technique permet une détection des anticorps dès 8-15 jours après l'inoculation intraveineuse et jusqu'à deux ans après. Cependant, lors d'inoculation sous-cutanée ou intradermique, la séroconversion peut être retardée voire même absente chez certains individus [AFSHAR, 1994].

Si ce test apparaît simple à mettre en œuvre et d'interprétation rapide, l'immunodiffusion en gélose a été quasiment abandonnée par manque de sensibilité, de spécificité (notamment par le biais de réaction croisée avec d'autres Orbivirus comme celui de

la maladie hémorragique épizootique des cervidés [OSBURN, 1994] et parce qu'elle est non quantitative [GIBBS et GREINER, 1994].

#### b. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

La technique ELISA de compétition est actuellement la sérologie la plus utilisée et plusieurs kits sont d'ailleurs commercialisés en France. Ce test utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine VP7. Le test est sensible et spécifique de la FCO, sans réaction croisée avec la maladie hémorragique des cervidés, comme c'est le cas avec l'immunodiffusion en gélose [OSBURN, 1994]. Elle permet de détecter les anticorps dès le 9<sup>ème</sup> jour post-infection chez le bovin [BELBIS *et al.*, 2010].

##### ➤ ELISA classique [AFSHAR, 1994]

Cette technique commence par l'incubation du sérum prélevé avec de l'antigène du virus de la FCO prélevé sur culture cellulaire. Si des anticorps sont présents, ils vont se fixer sur l'antigène. On va alors marquer les anticorps fixés par ajout d'anticorps anti-bovins liés à une enzyme. On rince ensuite le tout et on rajoute un dernier substrat à l'origine d'une réaction colorée si le sérum testé a réagi avec l'antigène.

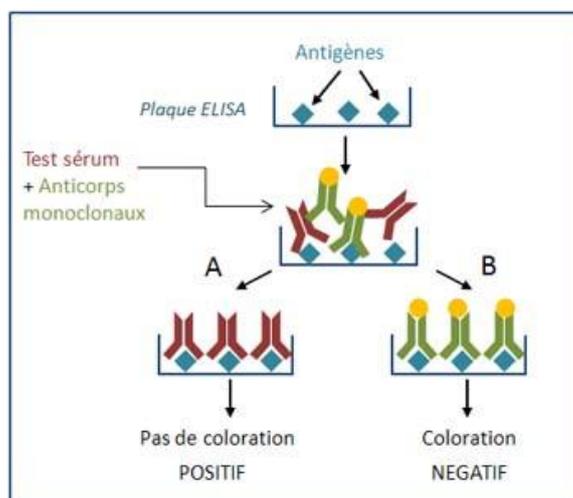
##### ➤ ELISA de compétition [AFSHAR, 1994]

Si le principe de base reste le même, cette méthode diffère de l'ELISA classique car l'anticorps lié à l'enzyme marqueur ne se fixe plus sur le même site : c'est dorénavant sur les molécules d'antigène du virus de la FCO laissées libres par le sérum testé qu'il se rattache (*cf.* figure 8). Ces molécules seront libres si le sérum ne contient pas d'anticorps anti virus de la FCO. L'ajout du sérum testé et des enzymes marqueurs aux antigènes fixés est simultané d'où la dénomination d'ELISA de compétition.

Cette méthode est plus sensible que la précédente et peut permettre le testage du sérum de tous types d'animaux puisqu'elle s'affranchit du développement d'anticorps marqueurs spécifiques de l'espèce testée.

Figure 8 : Représentation schématique du test Elisa de compétition.

Source : FCOINFO (2010)



➤ ELISA indirecte

Un test ELISA indirect existe : il met en évidence les anticorps spécifiques contre la protéine VP7, il n'est donc pas spécifique du sérotype viral. Son intérêt réside dans la facilité et le faible coût de la collecte des échantillons de lait. De plus, une étude menée en 2008 a permis de démontrer une très grande sensibilité (98,9%) et une grande spécificité (96,5%) du test [KRAMPS *et al.*, 2008]. Il paraît donc utile pour déterminer si un troupeau est séropositif ou non en première intention. L'usage d'autres tests complémentaires pourra être utile ensuite pour déterminer la présence de faux positifs.

c. Séroneutralisation sur culture de cellules

La séroneutralisation permet de déterminer le sérotype vis-à-vis duquel sont dirigés les anticorps [BELBIS *et al.*, 2010]. En raison de nombreuses réactions croisées entre les sérotypes, l'interprétation est délicate, surtout lorsque les animaux sont exposés à plusieurs sérotypes [ZIENTARA, 2007].

Les sérums dilués sont mis en présence d'une quantité définie de chaque sérotype de virus pendant une heure. Des cellules BHK-21 ou Vero y sont ajoutées et laissées en contact pendant plusieurs jours. Le mélange sérum/virus d'un certain sérotype pour lequel aucun effet

cytopathogène du tapis cellulaire ne sera constaté permettra de déduire que les anticorps présents sont dirigés contre ce sérotype [ZIENTARA *et al.*, 2009].

L'isolement du virus et l'identification du sérotype sont essentiels car les impacts du virus ne sont pas les mêmes en fonction de la souche mise en cause. Si certains signes sont fréquemment remarqués quels que soient les sérotypes, d'autres seront plus ou moins marqués en fonction du sérotype impliqué. Parfois on peut même avoir quelques surprises comme ce fut le cas en Europe en 2006 avec le sérotype 8 qui, s'il avait déjà sévi dans d'autres régions du globe, se révéla particulièrement virulent chez les bovins et eut notamment des impacts importants sur la reproduction. Nous allons donc évoquer les différents impacts du virus de la FCO sur la reproduction des bovins rapportés jusqu'à aujourd'hui.