



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 3061

To cite this document:

Soulestin, Marion (2009) [Evaluation de l'efficacité d'un candidat vaccine sous-unitaire contre le virus respiratoire syncytial bovin.](#) **Thesis**

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EVALUATION EXPERIMENTALE DE L'EFFICACITE D'UN CANDIDAT VACCIN SOUS-UNITAIRE CONTRE LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marion SOULESTIN

Née, le 14 mai 1982 à Roubaix (59)

Directeur de thèse : M. le Professeur Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Gilles MEYER
M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^o CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Dentrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie et Thérapeutique*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
- M. **SEGUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
- Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Professeurs des Universités
Praticien hospitalier
Virologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse.
Hommages respectueux.*

A Monsieur le Docteur Gilles MEYER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des ruminants

*Qui nous a confié ce sujet, grandement aidé à l'analyse des données et supporté nos caprices
de calendrier
Sincères remerciements.*

A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie infectieuse

*Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.
Sincères remerciements.*

A toute l'équipe des animaliers de la PII de Nouzilly

Joël, Jérémy, Olivier, Sylvain et Damien

Merci de m'avoir si spontanément intégré et d'avoir fait de mon séjour en Touraine un vrai plaisir.

A mes parents

Merci d'avoir su me guider sans jamais rien imposer à mon caractère frondeur : je crois que ça n'a pas trop mal réussi.

A ma famille

Pour toute la ménagerie que vous avez toujours élevée. Petites et grosses bêtes si souvent côtoyées ne sont sûrement pas étrangères à ma vocation.

A Jérémie, Marion et Emma

Votre belle petite famille m'encourage à ne pas réussir « que » professionnellement !

A mon « Tonton Gilles »

Qui le premier m'a fait confiance en tant que véto. Je te dois beaucoup et c'est toujours avec très grand plaisir que je repasserai par Montemboeuf.

A toute la « gang » du Québec

Merci de ce que vous êtes et de tout ce qu'on a partagé. Je n'oublierai jamais cette année formidable où j'ai tant appris sur le plan professionnel que personnel. Vous me manquez « en criss » !

A mes camarades d'école

Emilie, Audrey, Florence

Merci pour ces belles années passées à Toulouse et plus encore pour les futures où nous tâcherons de ne pas nous perdre de vue.

Carole

De la prépa jusqu'à aujourd'hui, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi...!

Laure

Merci d'avoir été là en T1 pour « faire face » !

A tous les autres

On a passé de bons moments dans « notre » école et ce sera sans aucun doute un plaisir de recroiser à l'occasion un membre de la « famille » toulousaine.

A tous ceux

Qui m'ont encouragé et découragé de faire de « la rurale » au féminin. Je m'en trouve plus aguerrie aujourd'hui que je fais mes débuts.

A toute l'équipe de la Pommeraye

Merci de votre sympathie, de votre entraide, de votre humour et de votre indulgence envers mes catastrophes en série. C'est un plaisir de débiter à vos côtés.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	15
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. VIRUS RESPIRATOIRES SYNCYTIAUX : VIROLOGIE.....	17
<i>I.1. Première mise en évidence.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2. Taxonomie.....</i>	<i>17</i>
<i>I.3. Structure virale.....</i>	<i>18</i>
<i>I.4. Protéines et polypeptides viraux.....</i>	<i>20</i>
I.4.1. Protéines non-structurales NS1 et NS2.....	20
I.4.2. Protéine hydrophobe (SH).....	20
I.4.3. Glycoprotéine G.....	20
I.4.4. Protéine de fusion F.....	20
I.4.5. Protéines de la nucléocapside.....	20
I.4.6. Protéines de matrice.....	21
<i>I.5. Mécanisme d'infection de la cellule hôte et caractéristiques biologiques.....</i>	<i>21</i>
<i>I.6. Espèces sensibles.....</i>	<i>22</i>
<i>I.7. Parenté VRSB/VRSH.....</i>	<i>22</i>
II. LA MALADIE.....	23
<i>II.1. Epidémiologie.....</i>	<i>23</i>
II.1.1. Prévalence de l'infection et de la maladie.....	23
II.1.2. Morbidité et mortalité.....	24
II.1.3. Age des malades.....	24
II.1.4. Saisonnalité de la maladie.....	25
II.1.5. Modalités de transmission.....	25
II.1.6. Persistance de l'infection.....	25
<i>II.2. Signes cliniques.....</i>	<i>26</i>
<i>II.3. Lésions.....</i>	<i>26</i>
II.3.1. Lésions macroscopiques.....	26
II.3.2. Histopathologie.....	27
<i>II.4. VRSH et VRSB : deux virus à l'origine de maladies très semblables.....</i>	<i>27</i>
III. POUVOIR PATHOGENE ET REponse DE L'HOTE.....	29
<i>III.1. Infections expérimentales.....</i>	<i>29</i>
<i>III.2. Pouvoir pathogène.....</i>	<i>30</i>
<i>III.3. Réponse de l'hôte.....</i>	<i>32</i>
<i>III.4. Rôle immunogène des protéines virales.....</i>	<i>34</i>
<i>III.5. Rôle de l'immunité passivement acquise.....</i>	<i>35</i>
<i>III.6. Causes de variation de la gravité des signes cliniques.....</i>	<i>36</i>
<i>III.7. Immunopathologie vaccino-induite.....</i>	<i>36</i>
IV. PROPHYLAXIE.....	39
<i>IV.1. Enjeux et difficultés de la vaccination contre les virus respiratoires syncytiaux.....</i>	<i>39</i>
IV.1.1. Trouver un modèle animal pertinent.....	39
IV.1.2. Vacciner des individus en bas âge.....	39
IV.1.3. Variabilité du virus.....	40
IV.1.4. Maladies vaccinales.....	40
<i>IV.2. Les vaccins disponibles à l'heure actuelle.....</i>	<i>40</i>
IV.2.1. Vaccins inactivés.....	41

IV.2.2. Vaccins sous-unités.....	41
IV.2.3. Vaccins vivants atténués	42
IV.2.4. Virus mutants.....	43
IV.2.5. Vaccins recombinants	44
IV.2.6. Vaccins ADN.....	44
DEUXIEME PARTIE : EVALUATION EXPERIMENTALE D'UN CANDIDAT VACCIN	
CONTRE LE VRSB.....	46
I. OBJECTIF DE L'ETUDE	46
II. METHODOLOGIE	46
II.1. Cellules et culture cellulaire	39
II.2. Virus et préparation de l'inoculum viral	46
II.3. Préparation des anneaux de nucléoprotéines	47
II.4. Expérimentation animale	47
II.4.1. Bâtiment confiné	48
II.4.2. Animaux	48
II.4.3. Vaccination.....	49
II.4.4. Inoculation d'épreuve	49
II.4.5. Prélèvements sur animaux vivants.....	50
II.4.6. Suivi clinique.....	50
II.4.7. Prélèvements nécropsiques et score lésionnel	51
II.5. Suivi sérologique	52
II.6. Suivi virologique	52
II.6.1. RT-PCR VRSB en temps réel.....	52
II.6.2. Test ELISA.....	53
II.7. Analyse statistique	53
III. RESULTATS	53
III.1. Tests de contrôles de l'étude.....	53
III.1.1. Répartition aléatoire des animaux	53
III.1.2. Statut sanitaire des veaux	53
III.1.3. Conditions de logement.....	53
III.1.4. Contrôle de l'inoculum	54
III.1.5. Déroulement du protocole expérimental	54
III.2. Suivi clinique	54
III.2.1. Signes cliniques induits par l'infection expérimentale	54
III.2.2. Comparaison des fréquences respiratoires et températures rectales en fonction des groupes.....	54
III.2.3. Comparaison des scores cliniques des différents groupes	56
III.3. Suivi sérologique : réponse en IgM.....	57
III.4. Suivi virologique.....	59
III.4.1. Méthode immuno-chromatographique	59
III.4.2. RT-PCR en temps réel	60
IV. DISCUSSION	63
V. CONCLUSION	66
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	67
ANNEXES	71

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Tableau 1 : Caractéristiques principales des protéines du VRSB</i>	21
<i>Tableau 2 : Degrés d'homologie entre séquences nucléotidiques et aminoacides des protéines constitutives des virus respiratoires syncytiaux humain et bovin</i>	23
<i>Tableau 3 : Caractéristiques épidémiologiques des virus respiratoires syncytiaux humain et bovin</i>	29
<i>Tableau 4 : Stratégies vaccinales : avantages et inconvénients</i>	45
<i>Figure 1 : Représentation schématique du VRSB</i>	19
<i>Figure 2 : Séquence des événements de la réponse immunitaire</i>	32
<i>Figure 3 : Températures rectales des animaux en fonction du jour post-inoculation.</i>	55
<i>Figure 4 : Températures rectales en fonction du jour post-inoculation.</i>	55
<i>Figure 5 : Fréquences respiratoires en fonction du jour.</i>	56
<i>Figure 6 : Scores cliniques en fonction du jour.</i>	57
<i>Figure 7 : Pourcentage des animaux séropositifs dans chacun des trois groupes en fonction du jour.</i>	58
<i>Figure 8 : Pourcentage de fixation des conjugués anti-Ig M du test Pourquoiier® par groupe, en fonction du jour.</i>	59
<i>Figure 9 : Pourcentage des animaux positifs pour le test Speed®-ReSpiVBND dans chacun des groupes en fonction du jour.</i>	60
<i>Figure 10 : Charges virales des écouvillonnages nasaux en fonction du jour.</i>	61
<i>Figure 11a et b : Charge virale des LBA (13a) et échantillons de poumons (13b) prélevés sur les animaux euthanasiés six jours post-infection en fonction du groupe.</i>	62
<i>Figure 12 : a) Score clinique des animaux du groupe 1 selon leur unité de logement et en fonction du jour). b) Score clinique des animaux du groupe 2 selon leur unité de logement et en fonction du jour.</i>	64

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Virus respiratoires syncytiaux : virologie

I.1. Première mise en évidence

Au cours de l'automne 1955 à Washington, un épisode de maladie respiratoire survint dans un groupe de chimpanzés de laboratoire ainsi que chez un employé en contact avec ces animaux. Un virus jusqu'alors inconnu fut isolé en 1958 par le Dr J. A. Morris chez l'un des singes malades, et nommé dans un premier temps : « agent du coryza du chimpanzé ». Ce virus sera ensuite renommé « virus respiratoire syncytial » (VRS), en raison des effets cytopathiques observés en cultures cellulaires (Baker et al., 1997a, Chanock et al., 1961, Larsen, 2000a).

Par la suite (début des années soixante), une série d'enquêtes établit l'importance du VRSH dans les maladies respiratoires des enfants du monde entier. Chanock & al. en 1961 mettent en évidence un virus respiratoire syncytial chez 39% de jeunes enfants hospitalisés pour bronchiolite. Une enquête sérologique menée en parallèle révèle que 91% des enfants de moins de 4 ans testés ont été exposés au virus syncytial (Chanock et al., 1961).

A la même époque, la découverte d'anticorps sériques bovins capables d'inhiber la croissance du VRSH en culture cellulaire, permit d'émettre l'hypothèse de l'existence d'un virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) (Baker et al., 1997a). Le premier VRSB isolé provenait de bovins suisses victimes d'une sévère épidémie de maladie respiratoire, en 1970.

I.2. Taxonomie

Ordre	<i>Mononegavirales</i>	ARN monocaténaire, négatif, non segmenté
Famille	<i>Paramyxoviridae</i>	
Sous famille	<i>Pneumovirinae</i>	Absence de neuraminidases mais activité de fusion Agents de maladies respiratoires
Genre	<i>Pneumovirus</i>	Présence de protéines non structurales (NS1 et NS2)

Les membres du genre *Pneumovirus* sont :

- le virus respiratoire syncytial humain (VRSH)
- le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB)
- le virus respiratoire syncytial ovin (VRSO)
- le virus respiratoire syncytial caprin (VRSC)
- le pneumovirus murin
- le virus de la rhinotrachéite de la dinde

VRSH, VRSB, VRSO et VRSC sont d'un point de vue structurel et antigénique très similaires. Contrairement aux VRSH, VRSB, VRSO dont la séquence est connue, le séquençage du génome du VRSC n'a pas été réalisé. Cependant, Smith et al. en 1979, on démontré l'existence d'un virus distinct chez les caprins par l'étude des niveaux de réactions croisées avec des anticorps spécifiques anti-VRSB au cours d'épreuves de séroneutralisation.

Récemment un nouveau genre appelé *Métapneumovirus* a été rajouté à la nomenclature. En effet, en 2001 a été découvert aux Pays-Bas, un virus responsable d'infections respiratoires aiguës chez les enfants. Ce virus possède les caractéristiques des *Pneumovirinae* sans avoir de protéines non-structurales NS1 et NS2, d'où la création d'un nouveau genre (auquel a été ultérieurement attaché le virus de la rhinotrachéite de la dinde, aussi appelé Métapneumovirus aviaire.) Ce virus est donc appelé Métapneumovirus humain.

I.3. Structure virale

Les *Pneumovirinae* ont une structure virale homogène, similaire à celles des autres virus de la famille des *Paramyxoviridae*. La *Figure 1* schématise leur organisation. Bien que pléiomorphes, ils se présentent généralement sous forme sphérique (diamètre de 150 à 200 nm). On peut également les trouver sous forme de filaments de 400 à 500 nm de long et de 60 à 100 nm de diamètre. Aucune différence fonctionnelle n'a été mise en évidence entre ces différentes formes de virion. Elles pourraient dépendre du type de cellule infectée (Easton et al., 2004, Valarcher and Taylor, 2007b).

Les virions du genre *Pneumovirus* sont entourés d'une enveloppe, bicouche lipidique issue de la membrane plasmique de la cellule infectée, dans laquelle sont enchâssées trois glycoprotéines virales : la glycoprotéine G d'attachement, la protéine F de fusion et la protéine SH (dont le rôle est mal connu).

Cette enveloppe entoure une nucléocapside hélicoïdale formée du monobrin non segmenté d'ARN négatif (une seule copie du génome, environ 15000 nucléotides), associé à la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase ARN-dépendante L. Enfin, la protéine M forme une couche sur la face interne de l'enveloppe lipidique. Le génome code également pour deux protéines non structurales NS1 et NS2, ainsi que pour des facteurs de régulation de la transcription M2-1 et M2-2 (Easton et al., 2004, Valarcher and Taylor, 2007a).

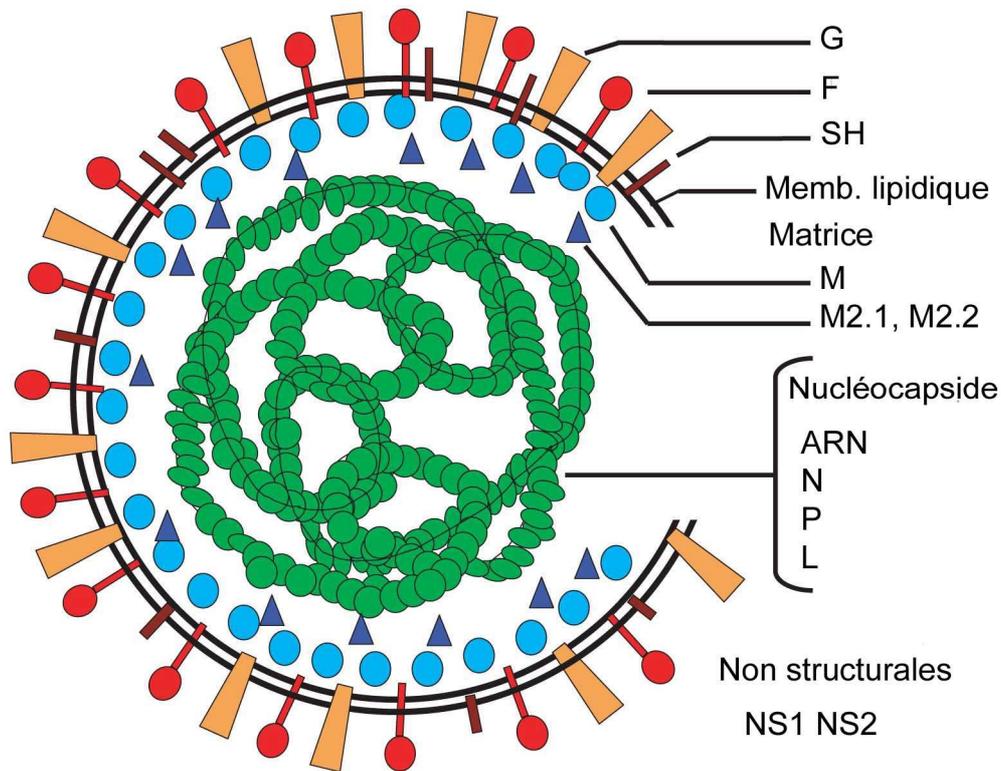


Figure 1 : Représentation schématique du VRSB (d'après Meyer et al., 2008)

I.4. Protéines et polypeptides viraux (Valarcher and Taylor, 2007b)

I.4.1. Protéines non-structurales NS1 et NS2

La présence de ces 2 protéines distingue les pneumovirus des autres *Paramyxoviridae*. Les gènes de ces deux protéines sont abondamment transcrits dans les cellules infectées bien qu'elles ne soient détectées qu'en faible quantité dans les virions purifiés.

I.4.2. Protéine hydrophobe (SH)

Sa fonction est encore mal définie à l'heure actuelle. Elle n'est pas indispensable à la multiplication virale *in vitro* ni *in vivo*. Elle pourrait interagir avec la protéine F pour la fusion cellulaire.

I.4.3. Glycoprotéine G

Elle joue un rôle majeur dans l'attachement du virus à la cellule hôte, par l'interaction de ces domaines héparan-sulfates avec les glycosaminoglycanes de la membrane cellulaire. Cependant, elle n'est pas indispensable à la réplication *in vitro* du virus, sur certaines lignées cellulaires. Elle est synthétisée sous deux formes : une forme ancrée dans l'enveloppe virale et une forme sécrétée. Cette dernière jouerait le rôle de leurre pour le système immunitaire en se liant aux anticorps neutralisants.

I.4.4. Protéine de fusion F

Cette protéine est responsable de l'entrée du virion dans la cellule hôte par fusion de sa membrane cellulaire avec l'enveloppe virale. Elle entraîne également la fusion des membranes cytoplasmiques des cellules infectées avec les cellules saines avoisinantes, entraînant ainsi la formation de cellules multinuclées géantes ou syncytia. La protéine F induit la formation d'anticorps neutralisants. Elle est fortement conservée entre les différentes souches virales. Elle est indispensable à la réplication du virus.

I.4.5. Protéines de la nucléocapside

Il s'agit de la nucléoprotéine N, de la phosphoprotéine P et de la polymérase L. La protéine N est présente en grande quantité dans les virions et les cellules infectées. Elle a plusieurs fonctions : en association avec les protéines P, L et possiblement M2-2, elle protège le génome viral des ARNases. De plus, la protéine N joue un rôle pour la transition de la phase de transcription à la phase de réplication virale. La protéine P intervient comme une protéine chaperonne pour la protéine N soluble et intervient dans la régulation de la transcription et de la réplication virales. La protéine L est une polymérase ARN dépendante qui responsable de la transcription et de la réplication virales.

I.4.6. Protéines de matrice

La protéine M se trouve sur la surface interne de l'enveloppe virale et joue un rôle majeur dans l'assemblage des particules virales. La protéine M2-1 régule la transcription virale (c'est un facteur anti-terminaison). La protéine M2-2 intervient dans le passage de la phase de transcription à la phase de réplication.

Le *Tableau 1* résume les caractéristiques des protéines virales.

Tableau 1: Caractéristiques principales des protéines du VRSB (d'après (Valarcher and Taylor, 2007b))

Protéine	Nom	Fonction
NS1	Protéine non structurale 1	Inhibition et résistance aux interférons de type α/β
NS2	Protéine non structurale 2	Inhibition et résistance aux interférons de type α/β
F	Protéine de fusion	Fusion avec la membrane de la cellule hôte
G	Glycoprotéine	Attachement à la cellule hôte
SH	Petite protéine hydrophobe	Inconnue
M	Protéine de matrice	Assemblage du virion
M2-1	Protéine de matrice 2-1	Terminaison de la transcription virale
M2-2	Protéine de matrice 2-2	Régulation de la transcription virale
N	Nucléoprotéine	Formation de la nucléocapside Résistance aux ARNases
P	Phosphoprotéine	Co-facteur de la polymérase
L	Polymérase	Transcription et réplication virale

I.5. Mécanisme d'infection de la cellule hôte et caractéristiques biologiques

Dans un premier temps, le virion s'attache à la cellule cible. La glycoprotéine G joue un rôle majeur dans cette étape. On a en effet démontré que des anticorps spécifiques anti-protéine G sont capables d'empêcher la liaison du virus à la cellule cible. Elle interagit avec une ou plusieurs molécules situées à la surface de la cellule. Ces molécules n'ont pas encore été précisément identifiées, mais des glycosaminoglycanes ou des molécules « héparin-like » seraient impliquées (Easton et al., 2004). Ensuite, la protéine F induit une fusion de la membrane plasmique de la cellule hôte avec l'enveloppe virale. Les composants du virion se retrouvent alors dans le cytoplasme de la cellule. Notons cependant que certaines études remettent en question ce modèle classique « d'attachement-fusion » (Valarcher 2004). Le nom des virus syncytiaux provient des effets cytopathiques qu'ils entraînent aussi bien in vivo qu'en culture cellulaire : ils conduisent à la formation de syncytium, qui sont de grosses cellules polynucléaires, issues de la fusion de plusieurs cellules, sous l'action du virus (Baker et al., 1997a, Larsen, 2000b). L'infection par les

virus respiratoires syncytiaux conduit également à la formation de corps d'inclusion intracytoplasmiques caractéristiques (Baker et al., 1997b).

I.6. Espèces sensibles

Contrairement au VRSH qui est capable de se répliquer dans de nombreux types cellulaires, le VRSB se développe préférentiellement sur des cellules de bovins (Baker et al., 1997b). Il est capable de se répliquer *in vitro* sur un large panel de cellules primaires bovines: cellules testiculaires, cellules de cornets nasaux, cellules trachéales, cellules aortiques, cellules spléniques, et cellules pulmonaires (Larsen, 2000b). Certains auteurs affirment pouvoir adapter un VRSB à la croissance sur des cellules humaines (Matumoto et al. 1974) alors que d'autres (Paccaud et Jacquire 1970) n'obtiennent pas de croissance sur culture de cellules humaines.

Si en infection expérimentale, le VRSH est capable d'induire sur des veaux des signes cliniques légers ainsi que quelques lésions pulmonaires macroscopiques, (Stott et al., 1984, Thomas et al., 1984) il n'y a cependant aucune preuve à l'heure actuelle que le VRSB puisse infecter les humains de façon naturelle (Larsen, 2000b). En revanche, la sensibilité et la réceptivité des ovins au VRSB est avérée. En outre des anticorps anti-VRS ont été isolés à partir de sérum de chevreuils, de chats et de porcs, mais le virus n'a jamais pu être isolé à partir de ces espèces (Larsen, 2000b).

I.7. Parenté VRSB/VRSH

Nous avons déjà évoqué la parenté taxonomique et biologique des virus respiratoires syncytiaux bovin et humain. S'il s'agit de deux virus bien distincts, ils ont un haut degré d'homologie génétique comme le montrent les études de réactions croisées. Le VRSB est actuellement le virus connu le plus proche du VRSH d'un point de vue phylogénétique (Easton et al., 2004, Kalina et al., 2004). Des équipes de microbiologistes ont étudié les pourcentages d'homologies entre les séquences nucléotidiques et aminoacides des virus VRSB et VRSH, il s'avère que certaines protéines, en particulier les protéines P, F et N ont une séquence aminoacide particulièrement proche dans les deux virus (voir *Tableau 2*). Ceci permet d'envisager des protocoles vaccinaux pour les veaux et les enfants en bas âge s'appuyant sur le principe de protection croisée. Ainsi une équipe américaine a-t-elle réussi à protéger des cobayes contre une infection expérimentale avec une souche de VRSH par exposition préalable au VRSB (Piazza et al., 1993).

Tableau 2: Degrés d'homologie entre séquences nucléotidiques et aminoacides des protéines constitutives des virus respiratoires syncytiaux humain et bovin (d'après (Mallipeddi and Samal, 1992, Samal and Zamora, 1991))

Protéine virale	Séquence nucléotidique	Séquence aminoacide
P	72 à 74%	81%
SH		16 à 22%
M		
G		30%
F		80%
N		93%

II. La maladie

II.1. Epidémiologie

II.1.1. Prévalence de l'infection et de la maladie

Selon un rapport d'études conduites auprès d'enfants hospitalisés pour pneumonie, le VRSH est impliqués dans 9 à 39% des cas. Chez les enfants atteints de bronchiolite, le VRSH est impliqué dans 27 à 70% des cas. Une étude rapporte que 95 à 98% des enfants serait séropositifs pour le VRSH à la fin de leur troisième année de vie (Van der Poel et al., 1994).

Suite à la découverte du virus chez les bovins, plusieurs enquêtes menées au début des années 1980 ont confirmé que le VRSB était endémique dans la population des jeunes bovins, dans le monde entier (Larsen, 2000a). Des études menées dans les années 80-90 montrent en outre que la séroprévalence augmente avec l'âge des animaux : 50% des bovins de moins de 2 ans seraient séropositifs, tandis que plus de 70% des bovins de plus de 2 ans le seraient (Van der Poel et al., 1994). Une récente étude conduite aux Etats-Unis sur 1 102 bovins estime à 56,6% la séroprévalence du VRSB (Grubbs et al., 2001). Cependant le rôle de ce virus dans le complexe des maladies respiratoires des bovins est resté un temps inconnu à cause des difficultés rencontrées pour l'isolement viral. Aujourd'hui, les progrès réalisés dans les techniques diagnostiques permettent d'évaluer l'impact de ce virus sur l'élevage bovin : on sait aujourd'hui qu'il représente une cause majeure de maladie respiratoire chez les veaux laitiers en élevage industriel mais aussi chez les jeunes bovins d'engraissement voire même les vaches adultes (Baker et al., 1997a). Cependant, l'incidence des épisodes cliniques imputables au VRSB seul semble inférieure, notamment dans les pays d'Amérique. En revanche, une étude séro-épidémiologique rétrospective a montré que dans une population donnée, les veaux ayant le plus faible taux

d'anticorps anti-VRSB à leur arrivée au centre d'élevage, recevaient plus de traitement pour maladies respiratoires que les autres animaux (Baker et al., 1997a). Ceci laisse donc supposer que le VRSB tient une place importante au sein du complexe des maladies respiratoires, et pourrait favoriser les pneumonies bactériennes secondaires. Différentes études réalisées sur le terrain en Grande-Bretagne, en Irlande du Nord, en Belgique et dans le Minnesota montrent que le virus est impliqué dans 14 (Grande Bretagne) à 71% (Minnesota) des épidémies de pneumonies des veaux (Baker et al., 1997a).

II.1.2. Morbidité et mortalité

L'apparition de la maladie est brutale, et le temps d'incubation serait de l'ordre de 3 à 5 jours en cas d'infection naturelle. Le virus se répand rapidement au sein d'une population sensible, ainsi la morbidité peut atteindre 60 à 80%. La mortalité est très variable et peut tout aussi bien être nulle qu'avoisiner les 20% (Baker et al., 1997a). De plus, certaines pneumonies qui s'avèrent bactériennes à l'examen nécropsique peuvent avoir été initiées par une infection virale, à VRSB notamment (Larsen, 2000a).

II.1.3. Age des malades

Dans la plupart des régions du monde, les virus respiratoires syncytiaux sont endémiques: les cas cliniques apparaissent de façon sporadique, atteignant le plus souvent uniquement les individus les plus sensibles. Ainsi, 90% des infections à VRSH touchent des enfants de moins de 2 ans et les formes cliniques sévères se manifestent chez les enfants de moins de un an (Van der Poel et al., 1994).

Cependant, si les patients atteints de VRSH sont le plus souvent de jeunes enfants, on peut également rencontrer des cas chez les individus âgés et/ou débilisés. Les épidémies de VRSH sont d'ailleurs une préoccupation importante en maisons de retraite et établissements concentrant en un même lieu de nombreuses personnes âgées.

De nombreuses études ont montré qu'une hospitalisation pour bronchiolite infectieuse en bas âge augmentait fortement le risque pour l'enfant de développer une pathologie asthmatiforme par la suite. Une récente étude rétrospective danoise confirme que le risque d'hospitalisation pour cause d'asthme est multiplié par 6 à 8 dans les 2 mois suivants une hospitalisation pour infection par le VRSH. En revanche, cette enquête montre que ce risque accru n'existe plus un an après l'infection par le VRSH. Réciproquement, l'asthme augmente de 3 fois le risque d'hospitalisation pour bronchiolite infectieuse. Les auteurs évoquent l'hypothèse de l'existence d'un facteur prédisposant génétique ou environnemental commun au développement de l'asthme et d'une expression clinique sévère suite à l'infection par le VRSH (Stensballe et al., 2009).

De même, les bovins atteints sont généralement les veaux au cours de leurs 6 à 9 premiers mois de vie (Taylor et al., 2005). Le pic d'incidence des cas cliniques sévères se situe, selon les auteurs, entre 2 et 7 mois d'âge (Grell et al., 2005a) ou entre 1 et 3 mois (Kimman et al., 1988). Cependant on rencontre parfois des adultes sévèrement atteints. Les formes sévères rencontrées sur des bovins adultes correspondent très probablement à une première exposition tardive au virus (Baker et al., 1997b, Larsen, 2000a), bien que la primo-infection chez l'adulte se traduise le plus souvent par une affection respiratoire bénigne (Van der Poel et al., 1994).

II.1.4. Saisonnalité de la maladie

Les épidémies de maladies respiratoires à VRS suivent une saisonnalité marquée : les épisodes cliniques surviennent, dans les zones au climat tempéré, en automne et au début de l'hiver (Baker et al., 1997a, Larsen, 2000b, Van der Poel et al., 1994). Pendant les autres saisons, les infections primaires sont rares, mais on peut assister à des épisodes cliniques suite à une réinfection. Les facteurs de stress comme les mouvements d'animaux, le surpeuplement, les fluctuations de températures seraient déterminants dans l'apparition des épidémies. A l'heure actuelle, on ne sait pas précisément comment le virus persiste entre les épidémies (Baker et al., 1997b).

II.1.5. Modalités de transmission

Le mode de transmission de l'infection naturelle, n'est pas encore clairement défini, mais un contact étroit est probablement nécessaire. L'infection se transmettrait par voie aérienne à partir des sécrétions respiratoires des animaux infectés. Cependant, certaines études montrent qu'une transmission par des aérosols infectieux serait possible sur de courtes distances (Baker et al., 1997b, Larsen, 2000b, Mars et al., 1999). Les animaux atteints sont donc les principaux vecteurs de la maladie. En infection expérimentale, la période d'excrétion de virus durerait de 4 à 12 jours post inoculation. Le nombre de particules virales nécessaire à l'infection en conditions expérimentales est de 10^3 à 10^7 TCID₅₀ mais dépend très probablement de la virulence de la souche virale (Van der Poel et al., 1994).

II.1.6. Persistance de l'infection

Certains élevages sont victimes d'épidémies récurrentes sans que le virus semble être présent entre les épisodes cliniques. Ces observations ont conduit à mener des études sérologiques au sein d'élevages fermés, lesquelles s'avéraient en faveur d'une persistance virale chez certains individus, plutôt que d'une circulation virale à bas bruit au sein du troupeau. En 2001, une équipe française (Valarcher et al., 2001) a mis en évidence la présence du VRSB (ARN viral et ARNm) dans les nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux de veaux 71 jours après infection expérimentale. De plus, du virus, ayant conservé son pouvoir infectieux pour des cellules cibles, a été isolé dans les lymphocytes B des animaux. On ne peut cependant

pas à l'heure actuelle exclure définitivement l'hypothèse d'une circulation virale à bas bruit au sein des élevages bovins.

II.2. Signes cliniques

Les symptômes d'une infection par le VRSB sont dominés par une affection du système respiratoire. Les premiers signes sont généralement une baisse d'appétit, un abattement modéré, une fréquence respiratoire augmentée, une fièvre qui peut être sévère (40°C-42,5°C). Ces symptômes sont parfois associés à un jetage nasal séreux et un larmoiement. La maladie peut se manifester uniquement par cette atteinte du système respiratoire supérieur, mais dans certains cas elle évolue vers une affection beaucoup plus sévère. L'évolution de la maladie est alors rapide, et les premiers signes ne sont pas toujours observés. A mesure que progresse la maladie, peut apparaître un syndrome de détresse respiratoire : l'animal se tient alors debout, les membres écartés, la tête basse, respire très péniblement avec la bouche ouverte, et souvent une composante abdominale à l'expiration. L'animal est alors incapable de boire et de se coucher, rechigne à se déplacer et un bruit de cornage peut être audible. On peut noter à ce stade la formation de mousse parfois teintée de sang dans la bouche de l'animal, et la formation progressive d'emphysème sous-cutané. A l'auscultation respiratoire on entend une forte augmentation des bruits bronchiques, ainsi que des bruits de crépitation. Une évolution biphasique a été décrite chez des veaux de race à viande. La phase initiale se manifeste par une atteinte respiratoire modérée à laquelle fait suite une phase de rémission clinique. Puis, après quelques jours à 2 semaines, une rechute est observée et les animaux manifestent alors une sévère détresse respiratoire (Baker et al., 1997b, Belknap, 1993, Elvander, 1996). Les différentes formes cliniques peuvent être observables dans un même élevage au cours de la même épidémie.

II.3. Lésions

II.3.1. Lésions macroscopiques

Les muqueuses nasale, trachéale et bronchique sont hyperhémiques dans les premiers stades de la maladie. Chez les veaux morts d'infection par le VRSB, on constate généralement un non affaissement du poumon à l'ouverture de la cage thoracique, qui s'explique par l'emphysème pulmonaire. L'emphysème pulmonaire interstitiel, qui peut être accompagné d'emphysème sous-pleural, est généralement plus marqué en portion dorso-caudale du poumon. Des pétéchies et microhémorragies sous-pleurales sont fréquemment associées à l'emphysème. Il s'accompagne généralement d'un œdème interlobulaire marqué. On peut également remarquer la présence d'emphysème sous-cutané, péri-rénal et péricardique. Les lésions de pneumonie interstitielle sont le plus souvent localisées cranio-ventralement. Elles se caractérisent macroscopiquement par la présence de zones modérément indurées, atelectasiées, de couleur rouge sombre. A la coupe on constate la présence de mucopus dans les bronches et bronchioles. Les nœuds lymphatiques bronchiques et médiastinaux sont le plus souvent hyperplasiques et œdémateux.

II.3.2. Histopathologie

Les lésions microscopiques varient beaucoup en fonction du stade de l'infection, et peuvent être en outre masquées par une infection bactérienne secondaire.

En région crânio-ventrale du parenchyme pulmonaire, les lésions de VRSB se caractérisent par une pneumonie broncho-interstitielle et une bronchiolite sévère, généralement associées à la présence de cellules syncytiales dans les muqueuses nasale et trachéale ainsi que dans l'épithélium bronchique et alvéolaire. Cette dernière lésion donne son nom au virus car elle en est caractéristique, cependant d'autres virus, comme le parainfluenza de type 3, peuvent conduire à la formation de syncytia. Des corps d'inclusion éosinophiles peuvent être présents dans les cellules multinuclées. L'épithélium bronchique peut être hyperplasique ou nécrosé selon le stade d'infection. La lumière des bronches et bronchioles se remplit d'exsudat composé majoritairement de cellules épithéliales, de neutrophiles, de macrophages et occasionnellement d'éosinophiles, souvent accompagné de liquide d'œdème et de la formation de membranes hyalines (bronchiolite nécrosante oblitérante). On peut noter une infiltration péribronchique de cellules mononucléaires, accompagnée d'œdème sous-muqueux (Openshaw and Tregoning, 2005). Les parois alvéolaires sont épaissies par une infiltration cellulaire (Larsen, 2000b). On note aussi de l'emphysème et de l'œdème alvéolaire, qui peut être présent diffusément dans l'ensemble du poumon, mais qui est souvent plus marqué en portion dorso-caudale. On trouve fréquemment des signes de réparation au niveau des bronchioles, concomitants avec des lésions plus aiguës. Dans les cas sévères, on peut observer une congestion généralisée des vaisseaux sanguins de faible diamètre, associée à un œdème périvasculaire et des parois vasculaires, ainsi qu'à des infiltrations lymphoïdes péri-vasculaire. Une étude rapporte une diminution du nombre de mastocytes, interprétée comme consécutive à l'activation et à la dégranulation de ces cellules, ce qui aurait pour effet de provoquer un bronchospasme et d'augmenter la perméabilité vasculaire (Bryson, 1993). Certains auteurs (Kimman et al., 1989) affirment que les lésions caractéristiques de bronchiolite et de syncytia ne se trouvent pas en région dorso-caudale du poumon, au même titre qu'aucun antigène viral n'est mis en évidence dans cette région. Des études plus récentes contestent cependant cet argument (Baker et al., 1997a). Retenons que le choix de la zone à prélever pour un diagnostic histopathologique ou antigénique est probablement déterminant.

II.4. VRSH et VRSB : deux virus à l'origine de maladies très semblables

Les similitudes épidémiologiques entre les deux maladies sont marquées : les deux virus atteignent préférentiellement les nouveau-nés. Les manifestations cliniques les plus sévères sont observées chez les jeunes patients aussi bien humains qu'animaux, tandis que ces deux virus n'induisent généralement que de faibles atteintes chez les individus adultes. Dans un cas comme l'autre, l'immunité acquise passivement (anticorps maternels) ne semble pas empêcher l'infection mais pourrait modifier la gravité de la maladie. Les infections répétées sont observées aussi bien chez les veaux que chez les nourrissons et conduisent dans les deux espèces à des atteintes moins

sévères que lors de la première infection. Le *tableau 3* résume les caractéristiques épidémiologiques des deux virus.

Enfin, les modifications pathologiques induites par les 2 virus sont identiques : bronchiolite avec afflux massif de lymphocytes, nécrose de l'épithélium bronchique, inflammation du parenchyme pulmonaire et comblement des alvéoles (Baker et al., 1997b).

Tableau 3: Caractéristiques épidémiologiques des virus respiratoires syncytiaux humain et bovin (d'après (Van der Poel et al., 1994)

	VRSH	VRSB
Hôte naturel	Humain	Bovin
Sous-groupes	2 : A et B	Aucun
Âges des individus sévèrement atteints	Moins d'un an	Moins de neuf mois
Sources d'infection	Enfants en infection primaire	Veaux en infection primaire
Réinfection	Oui, avec portage viral	Oui, pas de portage viral mis en évidence
Persistance de l'infection	?	?
Transmission	Contact	Contact ou aérosols
Distribution géographique	Monde entier	Monde entier
Pics d'incidence	Automne et hiver	Automne et hiver
Prévalence de l'infection chez les individus de moins d'un an	< 50%	≥ 50%
Séroprévalence chez les individus de plus de trois ans	> 95%	>95%
Durée du portage viral	2 à 10 jours	1 à 12 jours

III. Pouvoir pathogène et réponse de l'hôte

III.1. Infections expérimentales

Le virus respiratoire syncytial humain est un pathogène respiratoire majeur en néonatalogie et pédiatrie, à l'origine d'un syndrome de détresse respiratoire conduisant à l'hospitalisation de nombreux nourrissons et enfants en bas âge. Sa prévalence élevée ainsi que la

gravité des signes cliniques qu'il peut provoquer, ont fait du VRSH une préoccupation majeure des chercheurs en médecine humaine, et ce, dès les années 1970. Aussi, de nombreuses études expérimentales ont été menées afin de trouver un modèle animal pour étudier cette maladie. Différentes espèces ont été infectées : bovins, ovins, singes, rongeurs... La proximité antigénique du VRSB et du VRSH ainsi que le fait que le bovin soit une espèce naturellement infectée, fait du veau le modèle animal le plus pertinent (Belknap et al., 1995), bien que peu utilisé dans les phases précoces d'élaboration d'un vaccin pour des raisons de coût et de logistique.

Les études menées dans les années 1970-80 chez le veau peinent à reproduire la forme clinique sévère de la maladie. Le tableau en *Annexe 1* récapitule les résultats des études rapportés dans la revue de littérature de E. Belknap. (Belknap et al., 1995) Une étude irlandaise (Bryson et al., 1983) montre qu'une double voie d'inoculation (intranasale et intratrachéale) provoque des signes cliniques et des lésions plus sévères (par rapport à une inoculation nasale seule). Le fait d'inoculer pendant plusieurs jours de suite semble également améliorer les résultats et provoquer des symptômes plus sévères. Plus récemment, plusieurs équipes (Tjornehoj et al., 2003, West et al., 1999a) ont réussi à reproduire des signes cliniques sévères. Leur modèle d'infection expérimentale utilise une souche virale ayant subi un nombre réduit de passages en culture cellulaire, multipliée ensuite par passage sur veau nouveau-né. Cette méthode permet de s'affranchir de la perte de virulence généralement observée au cours des passages successifs en culture cellulaire. D'autre part, l'infection intranasale est faite à l'aide d'un nébulisateur sur plusieurs minutes, ce qui permet peut être de mimer plus fidèlement ce qui se passe en cas d'infection naturelle.

Cependant, en l'absence de score clinique commun à toutes ces études, il est difficile de comparer les résultats cliniques observés dans les différents protocoles. Afin de contrôler l'efficacité du protocole d'infection et de comparer au cours du temps, les réponses d'animaux vaccinés par rapport à des animaux témoins par exemple, les études expérimentales s'appuient sur différents critères objectifs. Compte tenu du fait qu'il n'existe pas de phase virémique dans cette maladie, l'isolement viral à partir d'écouvillons nasaux ou de lavages broncho-alvéolaires sont les seuls moyens d'établir une cinétique virale du vivant de l'animal. Des analyses virologiques peuvent être réalisées sur des prélèvements nécropsiques, en particulier pulmonaires, permettant ainsi de faire le lien entre les lésions observées et la présence virale. Les analyses sérologiques permettent de suivre et de caractériser une réponse systémique consécutive à l'infection ou au vaccin. Les méthodes d'analyses immunologiques sont d'autant plus pertinentes que la pathogénie de la maladie fait intervenir des phénomènes immunopathologiques. Aussi différentes études s'intéressent à la prolifération lymphocytaire, et aux différentes interleukines sécrétées... afin de caractériser la réponse à l'infection naturelle et la réponse vaccinale.

III.2. Pouvoir pathogène

Le temps d'incubation serait de 3 à 5 jours en infection naturelle. Le virus se réplique dans un premier temps dans les cellules épithéliales du nasopharynx. Le mécanisme exact par

lequel l'infection gagne l'appareil respiratoire inférieur reste inconnu. Il pourrait s'agir d'une propagation de cellule à cellule, ou de l'inhalation de sécrétions nasopharyngées. Les signes d'atteinte du bas appareil respiratoire peuvent apparaître 1 à 3 jours après l'apparition des premiers signes, soit environ 6 jours post-infection. Ensuite (7 à 8 jours post infection), la quantité de virus vivant ou d'antigène détectables commencent à diminuer. Généralement, on ne retrouve plus de virus ni d'antigène 15 jours après l'infection (Grell et al., 2005a). Les effets cytopathiques directs du virus se manifestent au niveau de l'épithélium pulmonaire par la perte de fonctions spécialisées telles que la motilité ciliaire, voire parfois par sa destruction (Openshaw and Tregoning, 2005). Le virus se cantonne au tractus respiratoire : il ne semble pas exister de phase de virémie, même si certains auteurs (Rohwedder & al., 1998 ; Domurat & al., 1985) ont mis en évidence de l'ARN viral dans le sang (Brandenburg et al., 2001). Les virus syncytiaux n'induisent pas ou peu d'effet cytopathiques lorsqu'on infecte *in vitro* des cellules différenciées de l'épithélium respiratoire aussi bien humain que bovin. Ceci porte de nombreux auteurs à croire que la réponse de l'hôte est prédominante dans le développement de la maladie (Larsen, 2000b, Valarcher and Taylor, 2007b). Il semblerait que les effets cytopathiques du virus s'avèrent délétères et à l'origine de signes cliniques uniquement chez les patients immunodéficients (Openshaw and Tregoning, 2005). De nombreuses hypothèses ont été élaborées pour expliquer une exacerbation de la réponse immunitaire lors d'infection par le VRS. Le fait que la maladie survienne préférentiellement chez de jeunes individus, ayant donc un taux d'anticorps maternels maximal, a conduit à penser qu'un phénomène d'hypersensibilité de type III était impliqué. Cependant aucune étude n'a pu mettre en évidence de complexes immuns dans les poumons des individus atteints. Une étude a montré une corrélation positive entre la gravité des symptômes des enfants malades et le titre d'IgE anti-VRS et d'histamine dans leurs sécrétions nasales. Aussi, on a envisagé l'implication d'une hypersensibilité de type I, ce qui était avancé comme une explication de l'existence des formes biphasiques parfois observées en infection naturelle. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée, voire a été infirmée par des études épidémiologiques et expérimentales (Baker, 1991). Le fait est qu'encore à l'heure actuelle, on connaît mal la pathogénie du virus dans la plupart des cas, qui ne se manifestent que par des signes respiratoires modérés.

Le rôle de chacune des protéines virales dans le pouvoir pathogène du virus a été étudié par l'élaboration de virus mutés ou délétés par génie génétique. Les protéines NS agissent en synergie pour limiter la production d'IFN α/β par l'hôte et par ce biais diminuent la réponse antivirale (Easton et al., 2004). La protéine F aurait un rôle multiple. D'une part, le clivage de la protéine primaire F0 du VRSB pour l'acquisition de sa forme fonctionnelle libère un polypeptide capable d'induire *in vitro* la contraction de muscles lisses, et qui pourrait intervenir dans le mécanisme de bronchoconstriction (ceci n'est pas le cas pour le VRS). Ce même polypeptide pourrait intervenir dans le recrutement des éosinophiles, et limiter la prolifération des lymphocytes. La protéine G semble essentielle à la réplication virale *in vivo*, et particulièrement à la colonisation de l'appareil respiratoire inférieur (Valarcher and Taylor, 2007b). D'autre part, certains auteurs ((Srikiatkhachorn and Braciale, 1997); Jackson & al., 1996) affirment que cette

protéine joue un rôle majeur dans l'orientation de la réponse humorale vers une réponse de type Th-2 et favoriserait par ce biais, l'afflux massif et délétère d'éosinophiles dans le poumon.

III.3. Réponse de l'hôte

La multiplication virale est plus intense et le virus reste détectable plus longtemps en cas d'infection primaire, par rapport à une infection consécutive à une première sensibilisation naturelle ou vaccinale, ce qui révèle la mise en place d'une certaine immunité acquise. La *Figure 2* illustre les différences et points communs entre une infection primaire et secondaire. Lors d'une infection primaire, le virus se multiplie à des niveaux importants, et les signes cliniques apparaissent de façon décalés par rapport au pic de réplication virale. Ce décalage dans le temps correspond à la mise en place de la réaction immunitaire à médiation cellulaire, responsable de la clairance virale. Chez les individus préalablement sensibilisés, la réplication virale est moins importante, et l'élimination du virus intervient plus rapidement. (Openshaw and Tregoning, 2005).

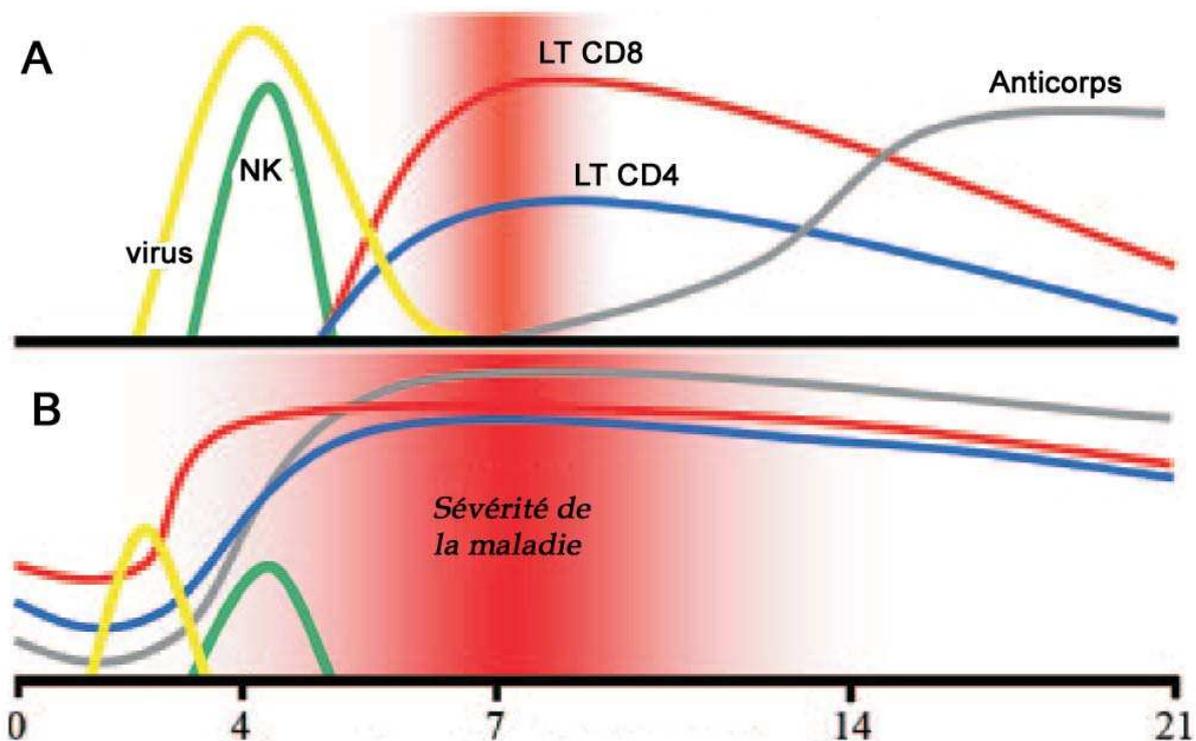


Figure 2: Séquence des événements de la réponse immunitaire (d'après (Openshaw and Tregoning, 2005)). Lors d'infection primaire chez un individu non vacciné (A), l'excrétion virale est maximale autour du 4^{ème} jour p.i. et s'accompagne du recrutement de cellules *Natural Killer* (NK) qui secrètent de l'interféron γ . Le virus est éliminé entre les jours 5 et 8 p.i., temps pendant lequel sont activés les lymphocytes LT CD4 et LT CD8 qui produisent des cytokines locales. Le maximum d'expression des signes cliniques correspond

à cette période. Les anticorps sériques dirigés contre le VRS n'apparaissent que tardivement. Chez les individus vaccinés ou préalablement infectés (B), le titre viral maximal intervient plus tôt (2 jours p.i.) et atteint des niveaux 100 à 1 000 fois inférieurs à ceux observés lors de primo-infection.

Cette clairance virale accélérée peut être attribuée, du moins en partie à la réponse humorale. Lors d'infection expérimentale, les anticorps neutralisants apparaissent dans le sérum entre 3 et 9 jours après inoculation (Elazhary et al., 1981 ; Thomas et al., 1984a-b). Le titre maximal d'anticorps sériques neutralisants apparaît entre 21 et 30 jours après inoculation (Elazhary et al., 1981). Les anticorps neutralisants sont principalement dirigés contre les protéines virales F et G. En se fixant sur celles-ci, ils inhibent le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte. Dans les conditions naturelles, le titre d'anticorps diminue rapidement et atteint un niveau faible à très faible en 3 à 7 mois (Baker et al., 1986a-b). Les immunoglobulines impliquées dans cette réaction immunitaire sont : Les IgM, les IgG (1 et 2), ainsi que les IgA sécrétoires. Les IgM sont les premières détectées dans le sérum et les sécrétions respiratoires, 6 à 7 jours post-inoculation (Thomas et al., 1984). Les IgG1 sont détectées une semaine plus tard, alors que les IgG2 le sont uniquement à partir de 1 à 3 mois post-inoculation. Les IgA apparaissent en même temps que les IgM, mais peuvent rester indétectables chez certains animaux après infection expérimentale (Kimman et al., 1987 ; Thomas, 1984)(Kimman et al., 1987). Les Ig G1 et les Ig M activent le complément et provoquent ainsi la cytolysse des cellules infectées. Les Ig A quant à elles sembleraient bloquer le virus dans les mucosités pour favoriser son élimination (Kimman et al., 1989). Les anticorps sériques assurent principalement la protection de l'appareil respiratoire inférieur, c'est d'ailleurs à cette fin qu'actuellement les nourrissons considérés comme à haut risque reçoivent des traitements prophylactiques à base de préparations d'immunoglobulines riches en anticorps anti-VRSH, ou de préparations d'anticorps monoclonaux anti-protéine F VRSH (Easton et al., 2004). Cependant, des réinfections sont possibles, car l'hôte est généralement incapable de mettre en place une mémoire immunitaire à long terme.

La présence d'anticorps au niveau de la muqueuse nasale est probablement essentielle pour limiter l'infection des voies aériennes supérieures. Cette protection repose également sur la présence locale d'IgA, d'IgM et d'IgG (Meyer et al., 2008). Les anticorps locaux auraient un rôle majeur lors de réinfection. La disparition du VRSH dans les sécrétions nasales est corrélée à l'apparition des Ig A au niveau local. Les Ig A sont peu ou pas neutralisantes *in vitro*, mais leur rôle supposé est de piéger le VRSB dans les mucosités et de favoriser son élimination en synergie avec les cellules « Natural Killer » et les LTC.

Les modèles expérimentaux, en particulier le modèle murin, ont permis d'étudier précisément le rôle et les interactions des différentes cellules de la réaction immunitaire dans la pathologie des VRS. Les cellules dendritiques sont capables d'initier une réponse spécifique par des cellules T naïves. Chez la souris, on a montré que le nombre des cellules dendritiques augmentait fortement suite à une infection par le RSV (Beyer, 2004) et que cette augmentation était accompagnée d'une diminution de la production d'INF γ et d'une augmentation de la production de prostaglandine E2, IL-10 et IL-11 par ces cellules, ce qui signe une orientation de

la réponse immunitaire vers un système de type Th-2. De nombreuses études soulignent le rôle majeur des cellules LT-CD4 dans la mise en place de la réponse cellulaire, par la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- γ . L'IFN- γ en particulier jouerait un rôle majeur dans l'orientation de la réponse immunitaire vers un type Th1 ou Th2. En son absence, la réponse s'oriente vers un type Th2 et s'exprime par une forme sévère de la maladie. Chez la souris, on a montré qu'une déplétion en cellules LT-CD4 ou un transfert de cellules LT-CD8 pouvait modérer l'éosinophilie pulmonaire induite par un virus recombinant exprimant la protéine G. Ceci suggère qu'une suractivation des cellules LT-CD4 Th-2 provoque l'éosinophilie, alors que les cellules LT-CD8 l'inhibe. Or chez le nouveau-né, la réponse immunitaire tend généralement vers un type Th-2, en raison notamment d'une faible expression des cytokines IFN- γ et IL-12. Cependant, les mécanismes immunopathogènes ne sont probablement pas imputables uniquement aux mécanismes de type Th-2. Des études ont montré qu'un virus recombinant exprimant la protéine M-2 entraîne une forme grave de la maladie due à l'afflux massif de cellules LT-CD8 cytotoxiques dans le poumon (Openshaw and Tregoning, 2005).

De récentes études se sont intéressées au dosage des protéines de la phase inflammatoire aiguë, et en particulier de l'haptoglobuline, chez des animaux atteints de VRSB. Bien qu'elle soit habituellement considérée comme un marqueur d'infection bactérienne, plusieurs études ont montré une augmentation du taux d'haptoglobuline sérique chez des veaux expérimentalement infectés par le VRSB. La réponse maximale en haptoglobuline survient 6 à 8 jours post-infection, et atteint 8 à 10 mg/ml (généralement inférieur à 18 μ g/ml chez un bovin sain) (Grell et al., 2005b, Heegaard et al., 2000). Ce pic correspond chez la plupart des animaux à la phase d'hyperthermie. Une étude a de plus montré une corrélation entre le titre d'haptoglobuline et la sévérité des lésions pulmonaires observées (Heegaard et al., 2000). En revanche, l'augmentation du taux d'haptoglobuline n'est pas observée en cas de deuxième infection expérimentale (Grell et al., 2005b)

III.4. Rôle immunogène des protéines virales

Préalablement à l'élaboration de vaccins sous-unités, le rôle de chacune des protéines virales dans la réaction immunitaire a été étudié. Lors de primo infection naturelle par le VRSB, chez des veaux séronégatifs de 6 à 7 mois, les animaux qui guérissent de la maladie développent une forte réponse en anticorps dirigée essentiellement contre les protéines F et N. Il a d'ailleurs été démontré *in vitro* l'activité neutralisante des anticorps anti-F qui empêchent le passage viral de cellule à cellule. Cependant un taux élevé d'anticorps maternels dirigés contre les protéines N et F ne suffit pas à protéger le veau nouveau-né d'une infection (Westenbrink et al., 1989). On a montré en outre, qu'un virus recombinant de la vaccine exprimant les protéines F, G ou N du VRSH était capable de protéger des souris, des rats et des singes contre la réplication du virus dans le poumon après épreuve expérimentale avec une souche de VRSH. Cependant le même protocole testé chez le chimpanzé (espèce dont les signes cliniques de l'infection par le VRSH sont très proches de ceux observés chez l'Homme) a donné des résultats nettement moins concluants. Ce type de vaccins recombinant a également été testé chez le veau, espèce cible. Il

s'avère là encore que des virus exprimant les protéines F, G et N (mais pas ceux exprimant la protéine M2) du VRSB sont capables d'induire une résistance au challenge viral et de limiter l'apparition de lésions pulmonaires. Cependant la nature de la réponse induite par les différents virus recombinants diffère. La protéine F induit la formation d'anticorps neutralisants, la protéine G également mais en quantité nettement inférieure et dont l'activité de séroneutralisation ne se manifeste qu'après ajout au milieu de complément, enfin la protéine N n'induit pas d'anticorps neutralisants. De plus, la protéine F induit une réponse pulmonaire post challenge constituée majoritairement d'IgG1 et d'IgA, tandis que la protéine G n'induit qu'une très faible réponse en anticorps au niveau pulmonaire (Taylor et al., 1997). Une étude sérologique suggère l'importance des anticorps anti-protéine G pour la protection des bovins contre le VRSB. En effet, celle-ci a montré que chez les bovins victimes d'une réinfection par le VRSB, les titres en anticorps anti-protéine G était plus de dix fois inférieurs à ceux des animaux issus des mêmes élevages et n'ayant pas subi de nouvelle infection (Schrijver et al., 1996). Cette protéine exprimée par un virus recombinant de la vaccine, est à l'origine d'une protection qui se limite à l'appareil respiratoire inférieur. Aussi, une équipe a eu l'idée de la faire exprimer par un virus vecteur ayant un bon tropisme pour l'appareil respiratoire supérieur : l'herpes virus bovin de type 1 (BHV-1). De cette façon, la protection de l'appareil respiratoire supérieur induite par la protéine G a été améliorée (mais reste cependant inférieure à celle induite au niveau pulmonaire)(Taylor et al., 1998).

D'autre part, on sait que l'activité des lymphocytes et notamment des $LT\ CD_8$ est importante pour la clairance virale, aussi est-il important d'identifier le rôle de chacune des protéines virales dans l'activation de ces cellules. L'antigène majeur du VRSH reconnu par les cellules cytotoxiques chez l'Homme est situé sur la nucléoprotéine. Les protéines SH, F, M et NS1 sont également capables dans une moindre mesure d'activer ces cellules. Chez le veau en revanche, ce sont les protéines F, N et M2 qui sont reconnues chez la plupart des animaux vaccinés et/ou infectés par le VRSB (Roux et al., 2008). Cependant, il semble que la vaccination puisse orienter la réponse cellulaire préférentiellement vers un antigène. Ainsi chez des veaux vaccinés avec un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine G du VRSB, la protéine G est fortement reconnue par les lymphocytes cytotoxiques lors d'une épreuve virale ultérieure. Il semblerait aussi qu'il existe des différences quant à la durée de la mémoire immunitaire induite par les différentes protéines, mais cet aspect reste à étudier (Gaddum et al., 2003).

III.5. Rôle de l'immunité passivement acquise

Le rôle protecteur des anticorps maternels est questionnable dans la mesure où le virus est capable d'infecter des individus sous couvert de l'immunité passive. Les formes sévères de la maladie s'expriment même chez les très jeunes animaux, c'est-à-dire au moment où la protection par les anticorps maternels spécifiques devrait être maximale. On a même pensé que la présence d'anticorps maternels pouvait exacerber la maladie. Cependant les études épidémiologiques ont permis de réfuter cette hypothèse et d'affirmer que l'immunité passive apportait une certaine protection et pouvait probablement prévenir des conséquences sévères d'une primo-infection.

Une étude hollandaise montre que le nombre d'animaux malades et la sévérité des signes cliniques est inversement corrélée au taux d'IgG chez des veaux de 1 à 3 mois présents dans des élevages ayant subi une épidémie de VRSB (Kimman et al., 1988). Plusieurs études ont été menées sur des animaux de laboratoire. On a montré que des furets nés de mères infectées expérimentalement avec du VRSH pendant la gestation étaient protégés contre une épreuve infectieuse néonatale. Chez le cobaye, l'administration de sérum issu d'autres animaux préalablement infectés protège presque intégralement les animaux receveurs de la réplication du virus dans le poumon, en revanche, le portage viral au niveau de la muqueuse nasale n'est quasiment pas affecté par la présence des anticorps transférés passivement. Des résultats similaires sont obtenus avec l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines G et F du virus. De même, chez le veau, l'ingestion de colostrum provenant de mères séropositives pour le VRSB et également vaccinées contre le VRSB, diminue la gravité des signes cliniques suite à l'inoculation expérimentale (Belknap et al., 1991). Cependant la durée de la protection apportée par les anticorps maternels reste inconnue, de même que le titre d'anticorps nécessaire à un effet clinique.

III.6. Causes de variation de la gravité des signes cliniques

Il n'existe pas à l'heure actuelle de données concernant d'éventuelles différences de virulence entre les souches naturelles de VRSB. Cependant, il semble que des facteurs intrinsèques à l'hôte existent puisque formes bénignes et sévères peuvent s'exprimer conjointement au cours d'une même épidémie. Il existerait une différence de sensibilité au VRSB entre les races. Les races rouges aux Etats-Unis et les Blancs-Bleus belges seraient plus sévèrement atteintes par exemple. Une étude rapporte que des veaux croisés Angus-Holstein se seraient montrés plus sensibles que des veaux Holstein du même élevage. Aucune différence n'est par contre rapportée entre les mâles et les femelles (Baker et al., 1997b)

En médecine humaine, les chercheurs travaillent sur une hypothèse génétique pour expliquer les différences de gravité des signes cliniques d'un individu à l'autre. Les différents haplotypes des gènes IL-8 et IL-4 auraient une influence majeure (Openshaw and Tregoning, 2005).

III.7. Immunopathologie vaccino-induite

L'étude des formes cliniques aggravées par la vaccination renseigne sur les mécanismes immunopathogènes associés aux VRS. Cependant, il ne faut pas confondre une forme de la maladie aggravée par une immunisation vaccinale préalable et une forme clinique sévère suite à une primo-infection, car les mécanismes en sont probablement différents.

Dans les années 1960, un vaccin inactivé au formol (formalin inactivated, FI-RSV) a été testé sur des enfants et des nourrissons. Il s'est avéré peu protecteur, mais surtout dangereux puisqu'associé à une plus grande prévalence et une plus grande sévérité de la maladie. Suite à ce

problème, les premières études menées chez le cobaye ont révélé que ce vaccin induisait des titres élevés en anticorps anti-VRS (titres évalués par méthode ELISA), mais que, en revanche, il induisait une très faible activité séroneutralisante. On en a conclu alors que le traitement au formol altérait les épitopes situés sur les protéines F et G. En outre, ce modèle a permis de montrer que malgré une diminution de 90% des titres viraux dans les poumons des animaux vaccinés avec le vaccin FI-RSV, ceux-ci souffraient de péribronchiolite et d'alvéolite plus sévères, et de dissocier ainsi les effets immunopathologiques des effets directs du virus (Openshaw and Tregoning, 2005). Ce phénomène de maladie vaccinale imputable aux vaccins FI-RSV a été largement étudié, et n'est malgré tout pas entièrement élucidé. Des études menées sur le modèle murin, ont montré que ce vaccin orienterait la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2, par l'expression massive de cytokines IL-5, IL-10 et IL-13, et la diminution des IL-12, ce qui aurait pour conséquence de libérer massivement des composés pro-inflammatoires et d'aggraver la bronchiolite et la bronchoconstriction. La sécrétion d'IL-5 serait en outre corrélée à l'infiltration éosinophilique (Openshaw and Tregoning, 2005). Ce même modèle révèle également une diminution de l'activité des cellules LT CD₄ et LT CD₈, et donc de l'activité des cellules cytotoxiques à l'origine de la clairance du virus. Des phénomènes immunopathologiques ont également été décrits chez le veau, chez qui le vaccin FI-RSV induit un taux d'anticorps neutralisants suffisant mais provoque une réaction inflammatoire importante et l'afflux massif d'éosinophiles dans les poumons, associé à un niveau élevé d'IgE sériques (Openshaw and Tregoning, 2005). De plus, le vaccin n'est pas capable d'activer les cellules T mémoire, et ne prévaut donc pas d'une protection à long terme. Chez le veau, la réponse immunitaire à la vaccination FI-RSV semble être de type mixte Th1-Th2. Certains auteurs affirment que les phénomènes immunopathologiques pourraient être dû au dépôt de complexes immuns, à l'activation du complément et/ou à l'induction d'une forte réponse de type Th2.

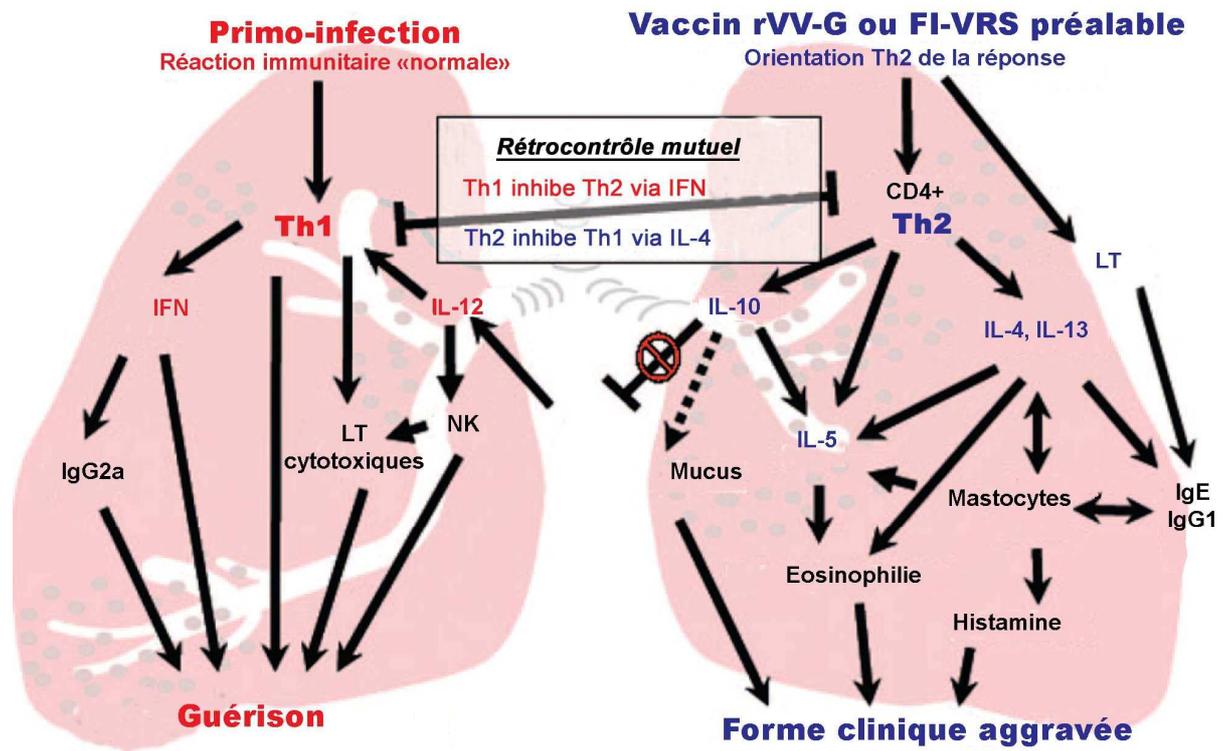


Figure 3 (d'après (Openshaw and Tregoning, 2005)). En cas d'infections asymptomatique ou d'expression clinique modérée, les cellules « Natural Killers » (NK) et les lymphocytes T CD₄⁺ et CD₈⁺ sécrètent de l'interféron γ (IFN). Celui-ci oriente la réponse immunitaire vers un type Th1, ce qui conduit à la guérison (à gauche de la figure). En revanche chez les individus qui développent une forme sévère de la maladie, on a une réaction immunitaire rapide et massive orientée vers un type Th2. Cette orientation de la réponse immunitaire peut être due à un défaut de cytokines majeures (IL 12 en particulier) au moment de l'infection, ou être consécutive à une vaccination (vaccin FI-RSV). Ceci conduit à la production de cytokines (IL 5, IL 13) à l'origine de l'éosinophilie et de la bronchiolite oblitérante.

Par la suite, le développement de vecteurs recombinants a permis de préciser le rôle des antigènes viraux dans les phénomènes immunopathologiques. Il a été montré chez la souris que les vaccins exprimant la protéine G entraînaient une réponse de type Th2 et l'expression de la maladie en cas d'infection post-vaccinale, tandis que les vaccins exprimant la protéine F provoquaient une réponse de type Th1 et la stimulation de cellules cytotoxiques dirigées contre le virus. En outre, une étude a montré qu'un vaccin formulé à base de protéine M2, provoquait une aggravation de la maladie par un excès d'activité des cellules cytotoxiques. Cependant, les maladies vaccinales induites par des vaccins recombinants sont moins sévères que celles induites par les vaccins FI-RSV. D'autre part il faut garder à l'esprit que les phénomènes immunopathologiques observés sur un modèle animal n'existent pas obligatoirement chez l'espèce cible. Ainsi, un virus recombinant de la vaccine exprimant la protéine F du VRSH entraîne chez la souris une aggravation des lésions pulmonaires histologiques lors d'une infection

ultérieure par le VRSH, alors que ce phénomène n'est pas observé chez le veau ou l'enfant (Taylor et al., 1997).

IV. Prophylaxie

IV.1. Enjeux et difficultés de la vaccination contre les virus respiratoires syncytiaux

IV.1.1. Trouver un modèle animal pertinent

Lorsqu'il s'agit de mettre au point un vaccin pour l'Homme, il est évident que les premières expérimentations vont s'effectuer en modélisation animale. Un modèle animal idéal devrait permettre de déterminer quels antigènes utiliser pour l'élaboration d'un vaccin, d'améliorer les voies et modalités d'administration pour de meilleurs résultats, de prévoir les effets de variables telles que l'environnement ou les facteurs génétiques, d'anticiper les effets néfastes et les défauts du candidat vaccin. En réalité, les modèles animaux permettent d'étudier les réponses de systèmes biologiques complexes à une stimulation, d'imaginer des protocoles expérimentaux dans des conditions standardisées, d'évaluer l'effet de facteurs génétiques prédéterminés, de mimer des phénomènes naturels et finalement d'élaborer des hypothèses. En revanche, l'expérimentation animale ne permet pas de prévoir exactement les effets protecteurs ou pathogènes du vaccin chez l'Homme ni d'envisager les conséquences des facteurs génétiques individuels ou de prévoir les effets adverses du vaccin (Openshaw and Tregoning, 2005). Pour le VRSH, la souris, le cobaye sont les modèles couramment employés. Ils ont l'avantage d'être permissif pour la réplication virale, mais ne développe pas réellement la maladie. Les chimpanzés sont les seuls animaux de laboratoire proches de l'Homme à ce point de vue, mais leur emploi est difficile et limité. Compte tenu de la proximité du VRSB et du VRSH, le bovin est un excellent modèle comparatif pour l'étude du VRSH. Pour le VRSB, les veaux étant les hôtes naturels, ils sont bien entendus employés pour l'évaluation des vaccins. Cependant, la plupart des modèles d'infection expérimentale échouent dans la reproduction de signes cliniques et lésions sévères comme nous avons pu le voir dans le paragraphe III.1. Aussi, l'efficacité d'un vaccin doit être évaluée par la diminution des titres viraux plus que par les effets cliniques (Meyer et al., 2008).

IV.1.2. Vacciner des individus en bas âge

Un vaccin performant devrait être capable d'induire une protection efficace pendant les premiers mois de vie, puisque c'est à ce moment que s'exprime le pic d'incidence de la maladie. Il s'agit donc de vacciner des individus immunologiquement immatures (pool de cellules B limité, mécanismes de présentation des antigènes inefficaces) et ayant des anticorps maternels circulants susceptibles d'inhiber la réponse vaccinale. Le problème de l'inhibition de la réponse vaccinale

par la présence d'anticorps maternels est surtout présent au niveau pulmonaire, et peut être contourné par une immunisation par voie intranasale. () Une autre alternative pourrait être de vacciner les mères en cours de gestation, puisqu'il semblerait que les anticorps maternels puissent être protecteurs pour l'individu en bas âge à condition qu'ils soient présents en grande quantité. ()

IV.1.3. Variabilité du virus

La variabilité des virus syncytiaux est un obstacle majeur pour le développement des vaccins, et en particuliers pour les vaccins sous-unité. Deux groupes principaux ont été distingués parmi les souches de VRSH (A et B, parfois subdivisé en B1 et B2). Il a été montré que pendant les épidémies les groupes circulaient conjointement, cependant une séparation géographique et temporelle est possible. Le sous-groupe A serait responsable d'atteintes plus sévères. D'un groupe à l'autre, c'est la glycoprotéine G qui est la plus variable avec 45% de variation dans la séquence de ses acides aminés. Ainsi, un vaccin sous-unité basé sur la protéine G devrait contenir les protéines des deux groupes antigéniques pour apporter une protection complète. En revanche, la protéine de fusion F est capable d'induire une protection croisée. Notons que la variabilité antigénique du VRSB est bien moindre que celle du VRSH (Baker et al., 1997b, Meyer et al., 2008).

IV.1.4. Maladies vaccinales

L'élaboration de vaccin contre les VRS a indiscutablement été fortement ralentie par les accidents survenus dans les années 1960 avec le vaccin anti VRSH inactivé au formol. Ce vaccin prédisposait les enfants qui l'avaient reçu à des formes bien plus sévères voire mortelles de la maladie (comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.7). Dans les années 1970, on a découvert que le même type de vaccin entraînait les mêmes effets immunopathogènes chez les bovins. La mise au point de nouvelles stratégies vaccinales a dès lors supposé la compréhension des phénomènes immunopathologiques vaccino-induits, qui ont largement été étudiés sur de nombreux modèles biologiques.

IV.2. Les vaccins disponibles à l'heure actuelle

Bien qu'un certain nombre d'informations sur l'efficacité, et les modalités d'action des vaccins soient disponibles à l'issue des études *in vitro* et des essais sur des animaux de laboratoire, leur efficacité et leur innocuité doivent impérativement être testés *in vivo*, sur l'espèce cible s'il s'agit d'un vaccin à visée animale. Aussi sont conduits des essais d'épreuves virales afin d'évaluer les caractéristiques du candidat vaccin, avant toute mise sur le marché. Ces études expérimentales sont soumises bien évidemment aux impératifs des bonnes pratiques de laboratoire et au respect du bien être animal. Le fait de travailler avec un virus vivant impose en outre de travailler dans des conditions expérimentales répondant aux règles de biosécurité. Tout ceci rend très coûteuses

les évaluations de candidats vaccins. Par la suite, les essais menés sur le terrain viennent compléter les données expérimentales. Enfin, après mise en place du vaccin sur le marché, le réseau de pharmacovigilance fait état de la survenue d'éventuels problèmes en rapport avec le vaccin (effets indésirables, échec vaccinal...). Les vaccins sont des produits biologiques très sophistiqués et dont l'élaboration est longue et complexe et s'appuie sur les biotechnologies, elles même en constante évolution.

IV.2.1. Vaccins inactivés

La mise en place d'un vaccin de première génération contre le HRSV a été retardée à cause des cas de maladies vaccinales chez des patients pédiatriques suite à l'administration de vaccins FI-VRS dans les années 1960. La situation socio-économique est différente en médecine vétérinaire des animaux de production, ainsi plusieurs vaccins inactivés sont sur le marché depuis plusieurs décennies, et très peu de cas de maladie vaccinale sont référencés par les instances de pharmacovigilance, y compris avec les vaccins FI-RSV. En 1999 West & al. ont montré qu'un vaccin FI-RSV élaboré selon les conditions appliquées pour la préparation du « lot 100 » (c'est-à-dire le vaccin FI-RSV administré à des enfants ayant déclaré de graves formes de maladie vaccinale dans les années 1960) donnait sur des veaux de meilleurs résultats expérimentaux d'un point de vue lésionnel qu'un vaccin vivant modifié (West et al., 1999a). D'autre part les vaccins inactivés couramment employés aujourd'hui chez les bovins emploient d'autres adjuvants connus pour orienter la réponse immunitaire vers un type Th-1. C'est le cas notamment de la saponine *Quillaja* (Meyer et al., 2008). Aussi les vaccins inactivés ne peuvent en aucun cas être considérés globalement, et ne sauraient être rejetés définitivement des protocoles de vaccination en élevage bovin.

IV.2.2. Vaccins sous-unités

Deux approches ont été envisagées dans l'élaboration de vaccins sous-unités contre les virus respiratoire syncytiaux. La première consiste en l'utilisation des protéines virales F ou de protéines chimériques F/G, ces protéines étant les épitopes majeurs pour la production d'anticorps neutralisants. Il s'agit des candidats vaccins, PFP-1, PFP-2, PFP-3 et FG. Administrés par voie parentérale à des rongeurs, ils induisent une protection de l'appareil respiratoire inférieur, mais pas de l'appareil respiratoire superficiel. Administrés par voie intra-nasale, ils induisent une protection de l'appareil respiratoire supérieur mais pas de l'appareil respiratoire inférieur. La combinaison des deux voies d'administration s'avère pleinement protectrice et d'une innocuité satisfaisante (Brandenburg et al., 2001, Meyer et al., 2008). Cependant, chez le singe vert d'Afrique, le vaccin FG intramusculaire n'induit qu'un faible titre d'anticorps neutralisants et n'apporte qu'une protection minimale au niveau pulmonaire. Des essais ont finalement été conduits sur des patients volontaires : le vaccin PFP s'avère d'une bonne innocuité mais modérément immunogène chez les femmes enceintes, les enfants atteints de maladies respiratoires chroniques et les personnes âgées (Meyer et al., 2008).

La seconde approche est basée sur l'élaboration d'une protéine recombinante comprenant l'épitope majeur de la région centrale de la protéine G du VRSH sous-groupe A couplée à la protéine G de streptocoque, dénommée BBG2Na. Les essais chez la souris montrent une bonne innocuité mais un potentiel immunogène modéré aussi bien chez l'adulte que chez le nouveau-né avec ou sans anticorps maternels. La réponse immunitaire induite en premier lieu est dirigée aussi bien contre le sous-groupe A que le sous-groupe B, cependant la durée de protection contre le sous-groupe B est considérée comme insuffisante (Power, 2003). Quelque soit l'adjuvant utilisé avec ce candidat vaccin, aucun phénomène immunopathogène pulmonaire n'a été mis en évidence chez la souris. En revanche, les essais d'innocuité chez le macaque n'ont pas donné de résultats suffisamment clairs pour permettre la poursuite des essais chez des enfants séronégatifs. Ce type de vaccin a cependant été testé chez des adultes volontaires, mais les essais ont dû être arrêtés suite à la manifestation d'effets indésirables.

Les adjuvants utilisés avec les vaccins sous-unités sont déterminants pour la qualité de la réponse immunitaire induite. Pour les vaccins contre les VRS on cherche à obtenir un titre élevé en anticorps neutralisants, une réponse cellulaire stimulant à la fois des cellules LT-CD8 cytotoxiques et l'activation de cellules LT-CD4, ainsi qu'une réponse locale au niveau des muqueuses. Les adjuvants *Quillaja saponaria* et ISCOMs donnent de bons résultats en ce sens (mais ne sont actuellement utilisés que pour des vaccins VRSB).

IV.2.3. Vaccins vivants atténués

L'avantage majeur des vaccins vivants est de reproduire le modèle pathogénique de l'infection naturelle. Ainsi, administrés par voie intra-nasale, ils induisent à la fois une réponse systémique et une réponse locale. Les défauts de ces vaccins sont d'une part l'inhibition par les anticorps maternels (d'autant plus important pour l'infection qui nous occupe qu'on vaccine des individus très jeunes et contre une maladie à très forte prévalence) mais aussi les risques de sur- ou sous-atténuation et de réversion. D'autre part, compte tenu du fait qu'une infection naturelle ne prédispose pas à une aggravation des signes cliniques lors d'une ré-infection, on a pensé que l'utilisation d'un vaccin vivant serait la meilleure alternative à l'apparition de maladies vaccinales.

Des vaccins vivants atténués contre le VRSB sont disponibles sur le marché depuis les années 1970 et sont aujourd'hui couramment utilisés. Ce sont pour la plupart des virus atténués par multiples passages en culture cellulaire. Les études expérimentales qui leur sont consacrées révèlent la mise en place d'une réponse immunitaire partiellement ou complètement protectrice (Mawhinney, 2005 ; Kerkhofs, 2004 ; Harmeyer, 2006 , Ellis, 2007). Les études de terrain montrent quant à elles un effet variable de la vaccination sur la prévalence clinique, les soins apportés aux animaux et la productivité de l'élevage (Ferguson, 1997 ; Thomson, 1986 ; Van Donkersgoed 1994, Verhoeff 1984) . Depuis 2006 un vaccin vivant atténué, en une seule injection et à administrer par voie intra-nasale est disponible contre le VRSB. Une première étude expérimentale de ce vaccin a démontré qu'il était capable de diminuer le portage viral chez des veaux privés de colostrum vaccinés à l'âge de 3 semaines et infectés expérimentalement 10 ou 21

jours après. Une deuxième étude conduite sur des veaux avec des anticorps maternels vaccinés à l'âge de 3 semaines et infectés 66 jours après, a prouvé également une diminution du portage viral, mais aussi une diminution de la sévérité des signes cliniques (Vangeel et al., 2007).

Chez l'Humain, plusieurs méthodes d'atténuation ont été expérimentées. Les candidats vaccins se sont avérés soit trop atténués pour être efficaces, soit pas assez pour être utilisables chez le nourrisson, et des retours de virulence ont été observés. Les recherches se poursuivent cependant et plusieurs candidats vaccins ayant donné des résultats prometteurs sur des modèles animaux sont en cours d'évaluation (Meyer et al., 2008).

IV.2.4. Virus mutants

Les progrès du génie génétique ont rendu possible l'identification précise et la reproduction des mutations responsables de l'atténuation du virus. L'intérêt est de mettre au point, par la combinaison de mutations ponctuelles, des virus atténués génétiquement stables et suffisamment immunogènes. La délétion de gènes non essentiels semble être une stratégie prometteuse, puisqu'elle permettrait de mettre au point des vaccins marqués et présentant peu de risque de retour de virulence. Les résultats les plus encourageants à ce jour semblent être ceux obtenus avec un vaccin délété n'exprimant que la forme ancrée dans la capsule virale de la protéine G. Ce virus se multiplie efficacement dans le nasopharynx des veaux infectés, par contre sa réplication est atténuée au niveau pulmonaire. Les réponses humorales et cellulaires sont tout à fait similaires à celle induite par le virus sauvage. Enfin, ce vaccin recombinant induit une protection complète lors d'une inoculation ultérieure avec une souche virulente. Le fait que ce virus ne soit mis au point que par une mutation ponctuelle suscite par contre des inquiétudes quant à ses capacités de réversion. Des virus délétés pour les protéines NS1 et/ou NS2 ont également été testés. Ils induisent une bonne réponse en anticorps spécifiques, l'activation des cellules LT-CD₄ cytotoxiques et une bonne protection lors d'infection expérimentale chez des veaux sans anticorps colostraux. Par contre, ils n'ont pas été testés sur des veaux ayant des anticorps maternels, et pourraient alors s'avérer trop atténués. D'autres délétions ont été testées. Un VRSH délété pour la protéine SH est en cours d'évaluation. A l'heure actuelle on sait qu'administré par voie intra-nasale et intra-trachéale à des chimpanzés, il induit une réponse en anticorps neutralisants d'intensité semblable à celle induite par une infection naturelle. De même, pour le VRSH délété en protéines NS1 ou NS2. La protection clinique induite chez le chimpanzé par ces deux vaccins reste encore à étudier.

D'autres stratégies faisant appel au génie génétiques sont envisagées à l'heure actuelle. Des équipes ont travaillé sur la modification de l'ordre des gènes viraux. Ces manipulations entraînent une atténuation du virus par la production des protéines virales dans des proportions non-optimales. Il est également possible d'introduire dans le génome viral, un gène codant pour une cytokine capable de modifier la réponse immunitaire face au virus (Valarcher and Taylor, 2007a).

IV.2.5. Vaccins recombinants

Il s'agit de virus vecteurs qui expriment les protéines du virus d'intérêt. Des « virus-vaccins » recombinants porteurs des protéines du VRSB ont été testés sur des souris de la lignée BALB/c : un virus exprimant la protéine M2 (VV-M2) induit une protection de courte durée, tandis que les virus vaccinés VV-F et VV-G provoquent une protection à long terme. Cependant, ces vaccins s'avèrent peu immunogènes chez le chimpanzé ce qui en fait de mauvais candidats pour la vaccination contre le VRSH. Un herpes virus (BoHV-1) recombinant exprimant la protéine G du VRSB a été mis au point et testé sur des veaux. Ce virus induit une protection virologique mais accroît la sensibilité des animaux au virus BoHV-1 (Meyer et al., 2008).

IV.2.6. Vaccins ADN

La vaccination à partir de l'ADN est une façon efficace de stimuler une réponse médiée par les cellules LT-CD₈. En effet elle entraîne l'expression des protéines virales et la présentation de celles-ci par le biais du complexe majeur d'histocompatibilité. De plus, certaines études montrent que la protection vaccinale n'est pas altérée par la présence d'anticorps maternels. La capacité de vaccins ADN exprimant les protéines F ou G à induire une protection a été prouvée pour le VRSH chez la souris et le cobaye et pour le VRSB chez le veau. Cependant, les vaccins ADN ne semblent pas être suffisamment immunogènes chez les primates et nécessiteraient l'administration de un ou plusieurs rappels ce qui paraît peu réalisable chez des enfants en bas âge et pendant la courte période d'incidence clinique maximale. De même, la réponse vaccinale obtenue chez le veau s'avère plus lente et moins protectrice que celle induite par une infection naturelle. L'adjonction de codons augmentant l'expression des protéines pourrait être une méthode pour améliorer l'immunogénicité de ce type de vaccins (Meyer et al., 2008).

Le *Tableau 4* résume les principales stratégies vaccinales ainsi que leurs avantages et inconvénients majeurs.

Tableau 4 : Stratégies vaccinales : avantages et inconvénients (d'après (Brandenburg et al., 2001))

Candidat vaccin	Avantages	Inconvénients
<i>Vaccins tués</i>		
FI-RSV		Maladie vaccinale avérée
Vaccins sous-unité		
• PFP	Vaccin de synthèse (fabrication contrôlée)	Phénomènes immunopathogènes non écartés
• BBG2Na	Vaccin de synthèse (fabrication contrôlée)	Pas de réponse L _T cytotoxiques Phénomènes immunopathogènes non écartés
• Iscom	Innocuité chez les personnes âgées Ac neutralisants et L _T cytotoxiques même en présence d'Ac maternels	Essais cliniques chez l'Homme à venir
<i>Vaccins vivants</i>		
Vivant atténué	Mime l'infection naturelle	Risque de sous-/sur-atténuation, de réversion
Vaccin ADN	Vaccin de synthèse (fabrication contrôlée) Ac neutralisants et L _T cytotoxiques	Essais cliniques chez l'Homme à venir
Vaccins vecteurs		
• adénovirus	Ac neutralisants et L _T cytotoxiques	Essais cliniques chez l'Homme à venir Faiblement immunogène chez les primates
• poxvirus	Ac neutralisants et L _T cytotoxiques	Faiblement immunogène chez les primates

DEUXIEME PARTIE : EVALUATION EXPERIMENTALE D'UN CANDIDAT VACCIN CONTRE LE VRSB

I. Objectif de l'étude

La bronchiolite du nouveau-né est un problème de santé public majeur dans le monde entier. A l'heure actuelle aucun vaccin n'associe une efficacité et une innocuité suffisante pour l'utilisation chez les nourrissons. Les vaccins vivants posent problème du point de vue de l'atténuation : soit ils sont trop atténués et donc peu efficaces, soit ils ne le sont pas assez et leur utilisation est dangereuse chez les nouveau-nés, pourtant population cible. Apparaît alors l'intérêt des vaccins inertes, et notamment des vaccins sous-unitaires. Les protéines F et G ont largement été étudiées en tant qu'antigènes vaccinaux. La nucléoprotéine des VRS a été peu exploitée jusqu'alors pour l'élaboration de vaccins. Cependant, des études ont montré d'une part qu'elle était capable d'initier une réponse cytotoxique, et que d'autre part, qu'elle était particulièrement bien conservée entre les différents sérotypes du VRSH, ce qui en fait un antigène d'intérêt pour l'élaboration de vaccins sous-unités. Une équipe a récemment mis au point une méthode permettant de produire des protéines N recombinantes stables. Ils ont en outre démontré que l'injection de ces protéines N recombinantes limitait la réplication virale au niveau de l'appareil respiratoire profond en modèle murin.

Le but de notre étude est de tester ces nanoparticules en tant que candidat vaccin chez le veau, à la fois espèce cible et modèle animal pertinent de l'infection humaine.

II. Méthodologie

II.1. Cellules et culture cellulaire

Les cellules utilisées pour les différentes opérations d'isolement, préparation de l'inoculum et titrage sont des cellules épithéliales de cornets nasaux d'origine bovine, appelées cellules BT ou « turbinates ». Les cellules sont cultivées en étuve à 37°C sous 5 % de CO₂. Le milieu de culture de base est composée de 500 ml de Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et de la L-glutamine (MEM 1 X completND), de 5ml d'acides aminés non essentiels (AANE 100XND), et 5 ml d'une solution d'antibiotique composée de pénicilline à 100 UI/ ml et de streptomycine à 100 µg / ml (Invitrogen®). Les cellules sont entretenues en flacon de 175 cm². Elles sont utilisées entre les 28^{ème} et 32^{ème} passages. Pour chaque passage, ces cellules sont trypsinées sur le tapis confluent d'un flacon de 175 cm², puis diluées en milieu MEM de base auquel on rajoute 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Après dissociation des cellules par action

de la trypsine et centrifugation, la suspension cellulaire est diluée à 1.10^6 cellules / ml puis répartie sur une plaque de 24 puits ou dans des flacons de 25 et 75 cm².

II.2. Virus et préparation de l'inoculum viral

La souche virale utilisée est la souche VRSB 3761, isolée en 2003 à partir d'un écouvillonnage nasal sur une génisse présentant un syndrome de détresse respiratoire. L'isolement a été réalisé sur culture de cellules de cornets nasaux (BT). Après cinq passages en culture cellulaire BT, la souche a été inoculée par voie intranasale et intra-trachéale (voir paragraphe II.4.4 pour le détail du protocole d'infection) à un veau de race prim^hholstein de 2 à 3 jours d'âge, privé de colostrum. Six jours après l'infection, le veau a été euthanasié, les poumons ont été extraits de la cage thoracique puis un lavage alvéolaire post-mortem a alors été réalisé par introduction de MEM (additionné de 4.10^{-3} µg/ml d'enrofloxacin, de 0,8µg/ml de gentamycine et de 2,5µg/ml de fungizone) dans la trachée, de façon à obtenir environ 200 à 300 ml de liquide de lavage. Ce liquide a ensuite été utilisé pour inoculer un second animal. Le liquide de LBA récupéré selon le même protocole sur le second veau a servi à inoculer un troisième animal. La souche virale sauvage initialement isolée a donc subi trois passages sur veau nouveau-né. Après le troisième passage, l'inoculum final (VRSB 3761 p3-3) a été titré (révélation par immunocytochimie sur cellules BT fixées à l'acétone) : il contenait $6,25 \cdot 10^3$ UFP/ml. Il a également été testé indemne pour les pathogènes suivants : BoHV-1, AdBv, PI3, BVDV, Coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* et *Mycoplasma bovis*.

II.3. Préparation des anneaux de nucléoprotéines

Le candidat vaccin étudié est un vaccin sous-unité à base de protéines de nucléocapside (N) recombinantes du VRSH assemblées en anneaux homogènes de 10 unités protéiques (environ 15 nm de diamètre) enchâssant un ARN bactérien. Les structures ainsi formées sont appelées N SRS pour « sub-nucleocapsid ring structure » (Roux et al., 2008).

Deux formulations vaccinales ont été préparées : une préparation pour injection intramusculaire contenant 2 mg de N SRS en émulsion MontanideTM ISA70 VG, et une préparation pour administration; intra-nasale contenant 10 mg de N SRS en émulsion MontanideTM IMS4132 VG.

II.4. Expérimentation animale

Le diagramme en *Annexe 2* reprend la chronologie du protocole expérimental.

II.4.1. Bâtiment confiné

Compte tenu du risque de contamination des veaux d'expérimentation par une souche sauvage du VRSB, l'expérimentation s'est déroulée en bâtiment confiné de niveau de biosécurité A2 (unité de pathologie infectieuse et immunologique (PII), INRA de Tours-Nouzilly).

Pour chacun des 3 groupes, les huit animaux ont été répartis aléatoirement dans deux loges distinctes, situées dans deux unités différentes. (Voir en *Annexe 3* un plan simplifié du bâtiment.) Un veau sentinelle a été logé dans chacune des 4 loges des animaux vaccinés.

II.4.2. Animaux

L'expérimentation a porté sur 28 veaux mâles croisés (prim'holstein x normand) provenant d'une ferme expérimentale, et âgés de un mois (plus ou moins 10 jours) le jour de la primovaccination. Les veaux ont été sélectionnés dès la naissance et n'ont reçu aucun colostrum. Dans les 3 heures post-partum et pendant 36 heures, ils ont reçu un aliment diététique (EnergaidND, Elanco vétérinaire) à raison de 3 litres par jour distribués en 2 repas. A partir de 36 heures, ils ont bu du lait de premier âge complété avec du sérum de colostrum négatif en anticorps anti-VRSB pendant 5 jours. Par la suite et jusqu'à l'âge de 8 semaines, ils ont été nourris avec du lait en poudre 2 fois par jour à heure régulière. Une fois sevrés, ils ont reçu matin et soir un foin de luzerne (RumiluzND, Sundeshy®) et un concentré croissance (FleuryND) à volonté.

A la naissance les veaux ont été complétés en vitamine E et sélénium (SelenanND, TVM, 5 ml en injection intramusculaire). Pendant leurs 7 premiers jours de vie, ils ont reçu un traitement antibiotique large spectre à base d'enrofloxacin, (BaytrilND 5%, Bayer®, 1 ml pour 10 kg en injection sous-cutané) le matin et de cefquinome (CobactanND, Intervet®, 1 ml pour 10 kg en injection intramusculaire) le soir.

Le statut sanitaire des animaux a été contrôlé en début d'étude. Un premier contrôle sérologique a été effectué à l'âge de 7 jours pour confirmer l'absence de prise de colostrum contenant des anticorps anti-VRSB. Une nouvelle sérologie a été effectuée pour le groupe témoin à J37, pour contrôler l'absence d'infection naturelle par un VRSB sauvage (LVD 37, Elisa indirecte Bicipules Kit LSI). Une infection permanente par le virus de la diarrhée virale bovine (BVD) a été infirmée par une antigénémie effectuée à la naissance (LVD 37, Elisa indirecte Kit Bommeli Monocupule). Une sérologie BVD a été effectuée 16 jours après le rappel de vaccination pour détecter une éventuelle infection néonatale (LVD 37, Elisa indirecte Kit Idexx Monocupule). Celle-ci s'est avérée négative pour l'ensemble des animaux de l'expérimentation.

Trois groupes de 8 animaux ont été constitués de façon à avoir une homogénéité des âges entre les groupes. Quatre veaux ont servi de sentinelles non vaccinées non inoculées.

II.4.3. Vaccination

Trois semaines après leur arrivée en unité expérimentale, à l'âge de un mois (plus ou moins dix jours), les veaux ont reçu un premier vaccin, renouvelé trois semaines plus tard (J0 et J21). Soit en fonction des groupes :

Groupe 1 : Les veaux ont été vaccinés par voie intra-musculaire avec 2 mg de protéines N SRS sous un volume de 2 ml en émulsion Montanide™ ISA70 VG (2 injections dans l'encolure du côté gauche).

Groupe 2 : Les veaux ont été vaccinés par voie intra-nasale avec 10 mg de protéines N SRS en émulsion Montanide™ IMS4132 VG sous un volume de 2 ml injecté pour moitié dans chacune des narines, ainsi que par voie intra-musculaire (2 mg de protéines N SRS sous un volume de 2 ml en ISA70 VG).

A chacun des groupes 1 et 2 ont été adjoints 2 veaux sentinelles non vaccinés et non inoculés.

Groupe 3 : Le dernier groupe est le groupe témoin : les veaux n'ont pas été vaccinés.

II.4.4. Inoculation d'épreuve

L'inoculation d'épreuve a été réalisée 21 jours après le rappel de vaccination (J42) avec la souche VRSB 3761 p3-3, à raison de 10^5 UFP par animal.

Inoculation intratrachéale

L'animal est contenu dans un système de cornadis, immobilisé la tête en l'air à l'aide d'une corde. Dans un premier temps on repère par palpation la trachée de l'animal, à mi hauteur de l'encolure. La peau est rasée avec du matériel à usage unique en regard de la zone d'injection choisie après désinfection à la VétédineND savon (Vétoquinol®). La peau est ensuite rincée à l'eau stérile puis séchée à l'aide d'une compresse stérile. L'opérateur change de gants à cette étape de l'opération afin d'éviter toute inactivation du virus par d'éventuels résidus de savon. La trachée est ensuite cathétérisée avec un cathéter veau IntraflonND 2 (Vycon®) stérile, auquel on adapte la seringue contenant les 10 ml d'inoculum. On s'assure de la bonne position du cathéter dans la trachée en aspirant dans la seringue une dizaine de ml d'air sans aucune résistance. Enfin, on injecte l'inoculum dans la trachée suffisamment rapidement pour que l'animal ne tousse pas le liquide injecté.

Inoculation intranasale

L'animal, toujours contenu dans le cornadis est maintenu tête horizontale par l'opérateur, afin que l'inoculum injecté ne soit pas dégluti. Le système d'injection consiste en un embout, à usage unique, muni d'un vaporisateur à son extrémité et adaptable sur une seringue de 10 ml (MADgic700ND, Wolfe Tory med®). La nébulisation de l'inoculum permet une meilleure

répartition sur l'ensemble de la muqueuse nasale. L'embout est introduit dans la narine du veau jusqu'au méat nasal dorsal où est injectée une partie de l'inoculum, l'autre partie est déposée plus rostralement dans la cavité nasale. On procède de la même manière pour la deuxième narine.

II.4.5. Prélèvements sur animaux vivants

Des prélèvements de sang sur tubes secs (2 tubes de 10 ml par animal, veine jugulaire) ont été effectués, le jour de la vaccination (J0), le jour du rappel de vaccination (J21), puis deux jours avant l'inoculation (J40), le jour de l'inoculation (J42), deux jours après (J44), chaque jour de J46 à J54, puis un jour sur deux jusqu'à la veille de l'euthanasie pour le suivi sérologique (IgM anti-VRSB). Les tubes ont été laissés 24h à température ambiante pour permettre la coagulation. Ils ont été ensuite centrifugés 20 minutes à 3000 tours/min. Enfin, le sérum a été récupéré puis congelé à -20°C.

Des écouvillonnages nasaux ont été réalisés de J39 à J63 pour détection du virus par RT-PCR q. Après prélèvement, le coton de l'écouvillon a été essoré dans un tube épendorf® contenant 0,5 ml de tampon RNA-later Qiagen® (prélèvement analysé par RT-PCR). Les prélèvements ont été congelés immédiatement à -80°C en attendant d'être analysés. Un écouvillonnage supplémentaire a été réalisé à J41, J42, J49, J53, J55 et J57 pour recherche virale par test immuno-enzymatique rapide (Speed®-ReSpiVBND, Biovetotest, Virbac)

II.4.6. Suivi clinique

Post-vaccinal

Une surveillance clinique journalière a été réalisée par les techniciens animaliers de l'unité expérimentale, deux jours avant et pendant les quatorze jours suivant chacune des vaccinations.

Post-inoculation

Un examen clinique a été effectué matin et soir à heure fixe, chaque jour et par le même opérateur à partir de J-3 avant inoculation et jusqu'à l'euthanasie des animaux. On a relevé alors sur une fiche de suivi (voir *Annexe 4*) le comportement général de l'animal, s'il mangeait, sa fréquence respiratoire, sa température rectale, s'il présentait des bruits respiratoires anormaux, de la toux, du jetage ou encore une respiration dyspnéique.

Elaboration d'une grille de score clinique

A partir des données cliniques récoltées en cours d'expérimentation et sur la base des observations effectuées lors de précédentes études, un score clinique a été élaboré. A chaque critère relevé quotidiennement est associé une note et un coefficient (voir *Tableau 1*).

Tableau 1 : Grille de score clinique

Signes	Note	Coefficient
Fréquence respiratoire		
< 30 mvts/min	1	3
30 mvts/min ? < 40 mvts/min	2	
40 mvts/min ? < 60 mvts/min	3	
? 60 mvts/min	4	
Refus alimentaire		
0	1	2
0 < < 30%	2	
30% ? < 60%	3	
? 60%	4	
Comportement général		
Normal	1	2
Moyennement altéré	2	
Très altéré	3	
Écoulement nasal		
Nul	1	1
Modéré	2	
Fort	3	
Toux		
Nulle	1	2
Modérée	2	
Forte	3	
Dyspnée		
Absente	1	3
Abdominale modérée	2	
Abdominale forte	3	
Bruits respiratoires		
normaux	0	3
Légèrement renforcés	1	
renforcés	2	
Renforcés + surajoutés	3	

II.4.7. Prélèvements nécropsiques

Six veaux (2 animaux par groupe, choisi aléatoirement) ont été euthanasiés 6 jours après inoculation (J27), les autres l'ont été 21 jours après inoculation (J63). Les veaux ont été euthanasiés avec un protocole admis par un comité d'éthique, à savoir : une injection intra-veineuse de 5 mg/kg de kétamine puis de 15 mg/kg de pentobarbital, suivie d'une saignée par section des veines jugulaires.

Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) post mortem ont été réalisés à l'aide de milieu MEM additionné d'enrofloxacin, de gentamycine et de fungizone immédiatement après euthanasie des veaux et extraction des poumons de la cage thoracique, de façon à obtenir 200 à

300 ml de liquide de lavage. Ce liquide de LBA a été conservé à -80°C jusqu'au titrage viral (RT-PCR).

Le lobe apical droit du poumon ainsi que les nœuds lymphatiques trachéo-bronchique et médiastinaux ont été prélevés et divisés chacun en 3 échantillons : un a été conservé dans du RNA-later, à température ambiante pour recherche d'ARN viral, un autre a été conservé dans un tube sec à -80°C pour isolement viral et le dernier a été conservé dans du formol 10% pour analyse histologique.¹ Un échantillon de poumon supplémentaire a été conservé dans un pot sec à 4°C pour analyse bactériologique (Laboratoire départementale de Touraine).

II.5. Suivi sérologique

La réponse en IgM des animaux après infection expérimentale a été évaluée, afin de rechercher une éventuelle différence dans le profil sérologique des animaux vaccinés et des animaux non vaccinés (deuxième contact avec l'antigène vs primo-infection). Les IgM ont été détectées et dosées à l'aide du kit ELISA VRSB-IgM de l'institut Pourquier (Montpellier, France). Il s'agit d'un test immuno-enzymatique quantitatif. Les puits sont sensibilisés avec un antigène VRSB. Le test utilise un composé anti-IgM bovine couplé à la peroxydase. L'intensité de la coloration qui résulte de la réaction entre la peroxydase et son substrat enzymatique est proportionnelle au titre d'IgM anti-VRSB du sérum testé. Le test a été effectué sur les prélèvements réalisés de J40 à J60 (jours pairs).

D'autre part, le titrage des anticorps anti-N sériques et des sécrétions nasales a été réalisé en méthode ELISA par une équipe INRA de Jouy-en-Josas qui collaborait au projet.

II.6. Suivi virologique

II.6.1. RT-PCR VRSB en temps réel

Le suivi virologique par RT-PCR en temps réel a été réalisé par une méthode dérivée de celle décrite par Boxus et al. en 2005 (Boxus, 2005). L'ARN viral est extrait des produits d'écouvillonnages nasaux, des biopsies pulmonaires et des liquides de LBA à l'aide de kits RNeasy mini (Qiagen®). Les amorces utilisées ont été dessinées en région stable du génome viral, codant pour la nucléoprotéine. Les amorces MF1959 et MR3333 ont été recherchées par le logiciel Prime. Les amorces Q2216F et Q2215 ainsi que la sonde sont décrites dans l'article de Boxus et al. . Les ARN ont été amplifiés par le kit LightCycler RNA Master HybProbe (Roche®).

¹ Les prélèvements pour isolement viral et analyse histologique ne sont pas exploités à ce jour.

La quantification des charges virales des différents échantillons a été harmonisée par rapport à une quantité constante d'ARN du gène rapporteur codant pour la GAPDH cellulaire afin d'avoir des valeurs comparables d'un échantillon à l'autre, indépendamment de la cellularité du prélèvement.

II.6.2. Test ELISA

La détection virale a aussi été réalisée dans les minutes suivant le prélèvement (écouvillonnage nasal, à la rosée sanguine), à l'aide du test Speed®-ReSpiVBND (Biovetotest, Virbac). Il s'agit d'un test immuno-chromatographique sur bandelette, dont le seuil de détection serait de 15 UFP (données du laboratoire).

II.7. Analyse statistique

L'ensemble des données a été traité par analyse de variance ANOVA paramétrique avec transformation logarithmique et correction par le test de Bonferroni.

III. Résultats

III.1. Tests de contrôles de l'étude

III.1.1. Répartition aléatoire des animaux

Pour s'affranchir du facteur âge, la répartition des animaux au sein des différents groupes devait être homogène du point de vue de l'âge. Dans chacun des groupes, la moyenne d'âge des animaux était de $75,5 \pm 1$ jours le jour de l'inoculation.

III.1.2. Statut sanitaire des veaux

Tous les contrôles sérologiques et virologiques (VRSB et BVDV) effectués sur les veaux en début et en cours d'étude se sont avérées négatifs pour tous les animaux.

Les analyses bactériologiques conduites sur les prélèvements de poumon effectués en fin d'expérimentation après euthanasie des animaux se sont également avérées négatives, les lésions pulmonaires observées pouvaient donc être attribuées au seul VRSB.

III.1.3. Conditions de logement

Compte tenu de l'importance connue des conditions de logement et en particulier de ventilation dans les affections respiratoires, les conditions d'ambiance se devaient d'être stables et homogènes entre les différentes loges. Ceci a été garanti par les contrôles réguliers de ventilation et d'humidité obligatoires en unité A2.

III.1.4. Contrôle de l'inoculum

L'inoculum s'est avéré indemne pour les pathogènes recherchés, à savoir : BoHV-1, AdBv, PI3, BVD, Coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*.

Après l'inoculation d'épreuve, le virus utilisé a été recongelé puis de nouveau titré en culture de cellules BT. Le titre infectieux était alors de 3.10^3 UFP/ml soit 2 fois moins que le titre initial. Cette perte est normale et explicable par les conditions de conservation du virus pendant le processus d'inoculation des animaux.

III.1.5. Déroulement du protocole expérimental

Aucun incident n'est survenu en cours d'expérimentation. L'ensemble du protocole s'est déroulé conformément aux prévisions. D'autre part, aucun animal n'a dû être exclu de l'étude pour des raisons sanitaires, accidentelles ou éthiques.

III.2. Suivi clinique

III.2.1. Signes cliniques induits par l'infection expérimentale

Dans le groupe témoin (groupe 3), infecté mais non vacciné, les signes cliniques induits par l'infection expérimentale se sont avérés légers à modérés. On a observé une atteinte modérée de l'appareil respiratoire avec peu ou pas d'atteinte de l'état général. Un pic d'hyperthermie modéré à marqué a été observé sur l'ensemble des animaux 1 à 3 jours après l'inoculation. Les symptômes se manifestaient essentiellement par une modification de l'auscultation respiratoire. On a pu entendre une augmentation des bruits respiratoires, principalement en zone cranio-ventrale chez la plupart des animaux. Certains animaux présentaient également des bruits surajoutés de sifflement et de ronflement, d'intensité modérée à marquée. Ces signes étaient associés à une augmentation de la fréquence respiratoire (par rapport aux données récoltées avant inoculation d'épreuve). Des épisodes de toux d'intensité légère et n'excédant pas 2 jours, ont été observés sur 2 animaux du lot.

III.2.2. Comparaison des fréquences respiratoires et températures rectales en fonction des groupes

L'ensemble des veaux ont eu un pic d'hyperthermie entre 1 et 3 jours après l'infection. Aucune différence significative n'a été mise en évidence dans les températures rectales moyennes des animaux vaccinés et non-vaccinés après inoculation d'épreuve (voir *Figure 4*).

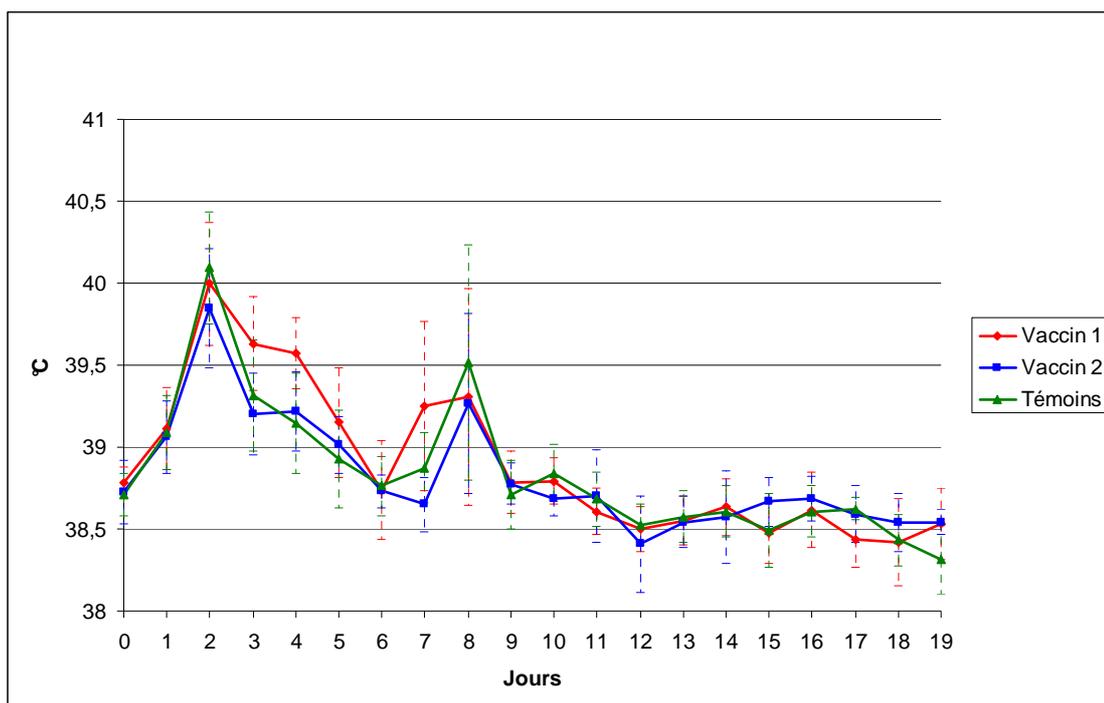


Figure 4 : Températures rectales (valeur moyenne et écart-type, par groupe) des animaux en fonction du jour post-inoculation (J0 est le jour de l'inoculation).

Des différences ont par contre été décelées entre les unités : les animaux de l'unité 2 (tous groupes confondus) ont fait un nouveau pic d'hyperthermie 8 jours après l'infection (voir Figure 5). A ce jour, aucune explication plausible ne permet d'expliquer cet effet.

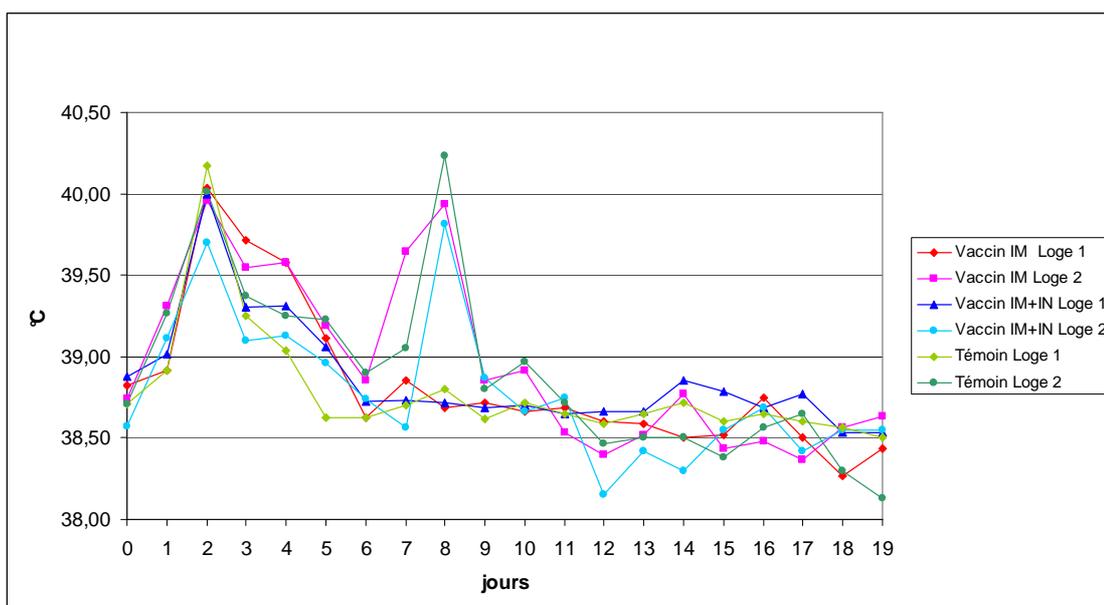


Figure 5 : Températures rectales (valeur moyenne par groupe et par unité) en fonction du jour post-inoculation (J0 est le jour de l'inoculation).

Compte tenu de la variabilité individuelle importante, il n'a pas été possible d'identifier un pic moyen d'augmentation de la fréquence respiratoire suite à l'infection, et donc de comparer les réactions des différents groupes (voir Figure 6).

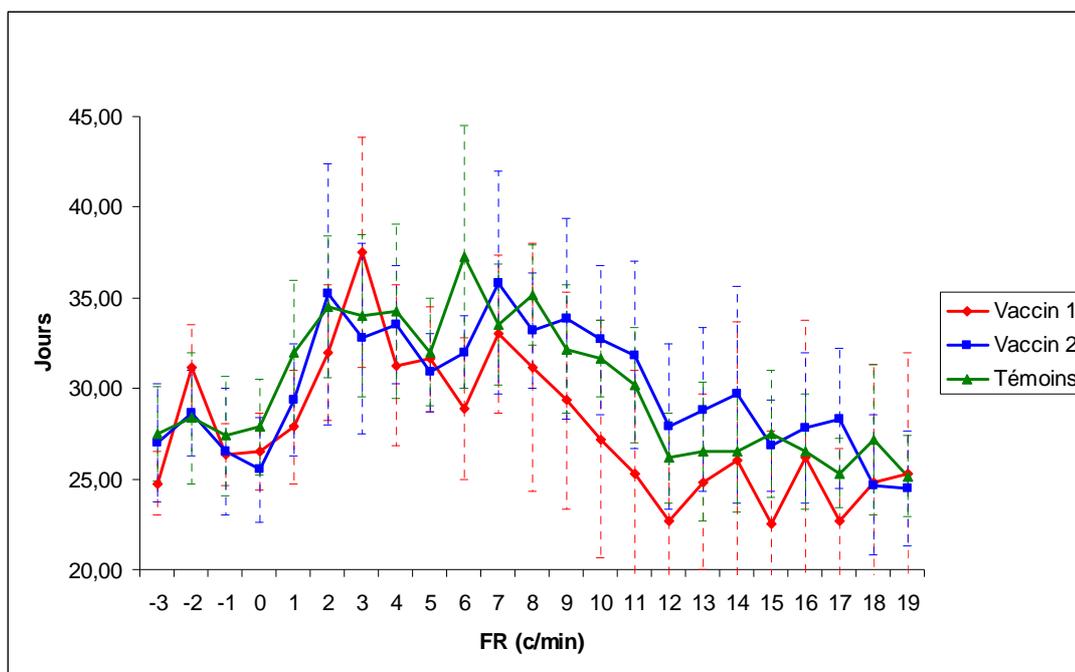


Figure 6 : Fréquences respiratoires (valeur moyenne et écart-type, par groupe) en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

III.2.3. Comparaison des scores cliniques des différents groupes

Les moyennes des scores cliniques en fonction des jours post-infection et par lot sont représentées sur la Figure 7. Les signes cliniques sont apparus en moyenne $3,9 \text{ jours} \pm 0,7$ après inoculation dans le groupe des animaux non vaccinés (groupe 3), $4 \text{ jours} \pm 0,7$ dans le lot vacciné par voie intra-musculaire seule (groupe 1) et $3,6 \text{ jours} \pm 1,2$ dans le groupe des veaux vaccinés par les 2 voies (groupe 2). Le maximum de score clinique moyen par groupe s'est exprimé 7 jours après inoculation dans le groupe 3 et 9 jours après inoculation dans les groupes 1 et 2.

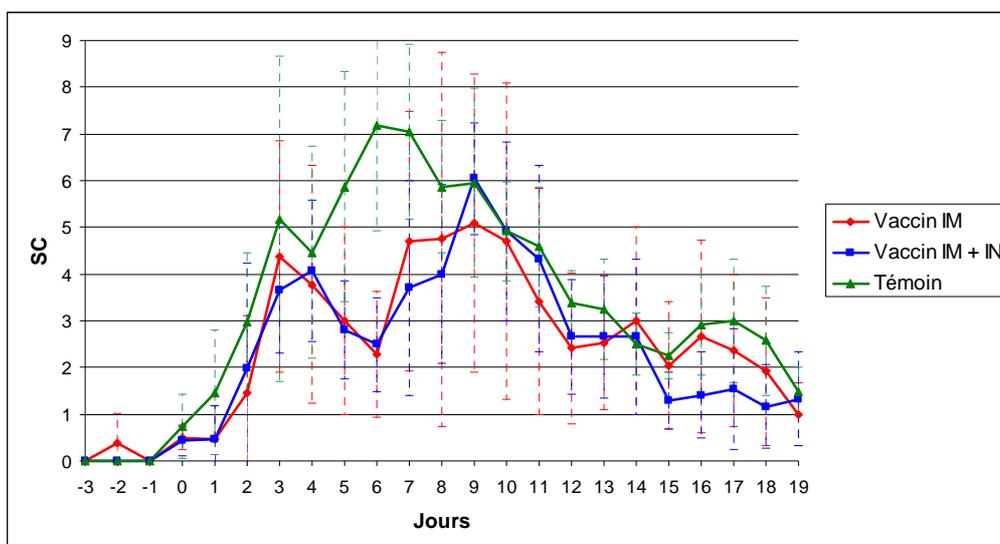


Figure 7 : Scores cliniques (valeur moyenne et écart-type, par groupe) en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

Les analyses statistiques révèlent un effet temps et un effet groupe sur le score clinique moyen de J 39 à J63. Aucune différence statistique n'apparaît entre les groupes 1 et 2. En revanche, il existe une différence statistique entre les groupes 1 et 3, et les groupes 2 et 3. La comparaison des groupes par deux pour chaque jour a montré des différences significatives ($p < 0,05$) pour les jours 5 et 6 entre les groupes 1 et 3, et pour les jours 5, 6 et 7 entre les groupes 2 et 3. En effet, l'évolution des scores suit une courbe différente dans les groupes vaccinés par rapport au groupe témoin. Le score clinique moyen du groupe témoin augmente progressivement jusqu'à son maximum à J9 pi, tandis que le score des groupes vaccinés augmente dans un premier temps (jusqu'à J3 ou J4 respectivement pour les groupes 1 et 2), diminue ensuite (J4, J5 et J6) avant de ré-augmenter et atteindre son maximum à J9 pi. Aucune différence significative n'existe par contre entre les groupes 1 et 2. Des différences individuelles ont également été relevées au sein des groupes, en particulier en ce qui concerne la cinétique d'apparition et d'évolution de la maladie.

III.3. Suivi sérologique : réponse en IgM

Le suivi de la cinétique des IgM anti-VRS a permis de différencier la nature de la réponse humorale des animaux vaccinés et des animaux non vaccinés. Les animaux non vaccinés (groupe 3) ont tous, comme attendu, présenté une forte réponse en IgM. Les veaux ayant présenté la réponse la plus précoce ont passé le titre seuil de positivité en IgM anti-VRS 6 jours après l'infection. Du 10^{ème} au 14^{ème} jour post-infection, tous les veaux du groupe 3 étaient positifs en IgM anti-VRS. En moyenne, la réponse IgM des veaux non vaccinés a duré 10 jours. Pour les

groupes vaccinés (Groupes 1 et 2), une réponse IgM a pu être décelée sur de courtes périodes à des temps divers selon les individus.

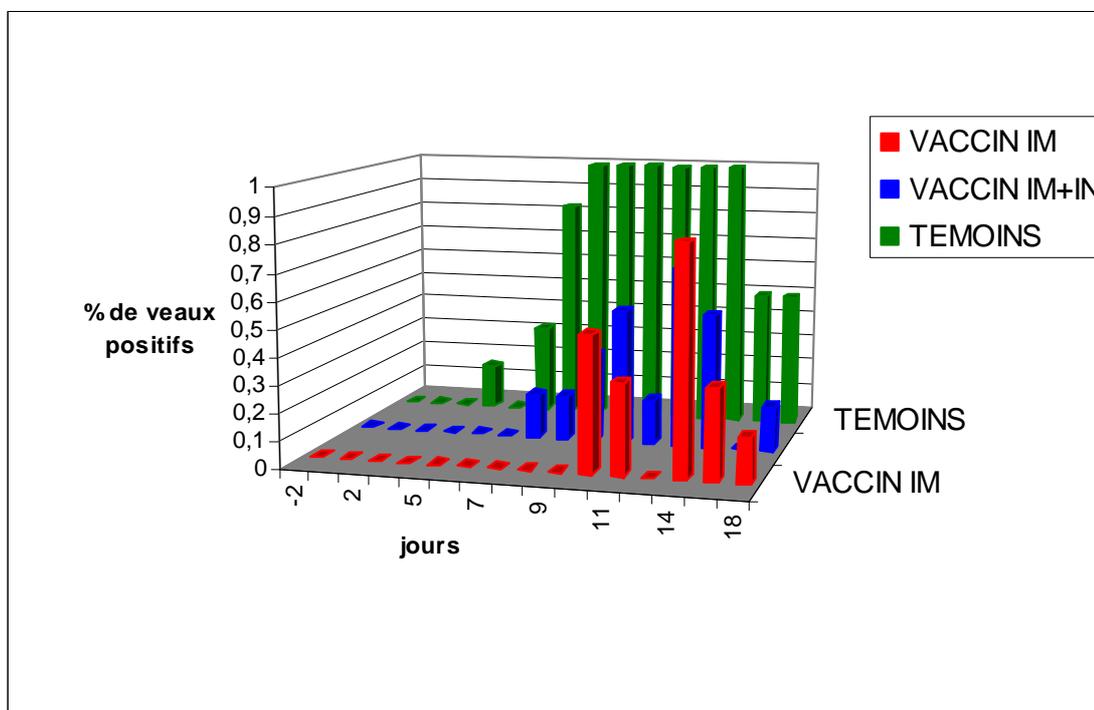


Figure 8 : Pourcentage des animaux séropositifs dans chacun des trois groupes en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

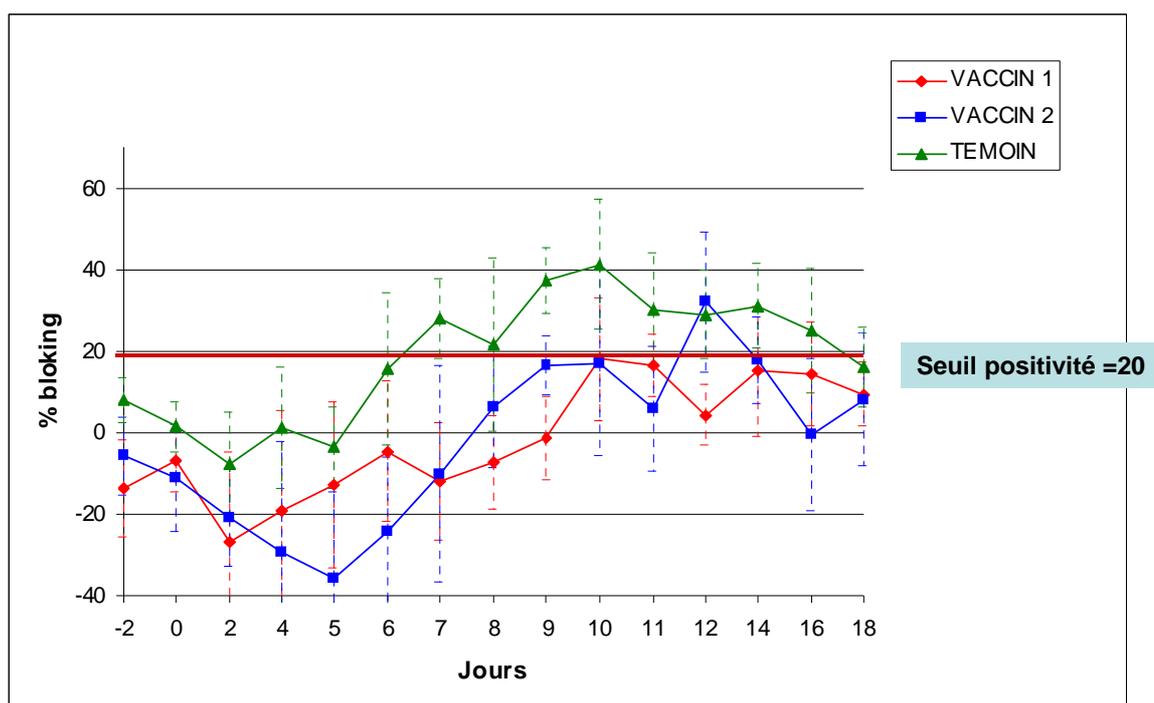


Figure 9 : Pourcentage de fixation des conjugués anti-Ig M du test Pourquoiier® par groupe, en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

La moyenne des titres IgM anti-VRSB des animaux non vaccinés, a excédé le seuil de positivité tel que défini par le laboratoire 6 jours post-infection, et jusqu'à 16 jours post-infection. Les animaux vaccinés en revanche (sauf groupe 2 J12) sont restés négatifs suite à l'infection.

III.4. Suivi virologique

III.4.1. Méthode immuno-chromatographique

La détection virale au moyen du test rapide de terrain Speed®-ReSpiVBND (Biovetotest, Virbac) a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes. Les résultats sont présentés sur la Figure 10 en pourcentage d'animaux positifs. On remarque que dans les trois groupes, le test permet de détecter la présence virale dès deux jours après l'infection expérimentale et jusqu'à treize jours post-infection. La proportion d'animaux positifs est réduite dans le groupe 2 (vaccin intra-nasal et intra-musculaire) par rapport aux deux autres groupes.

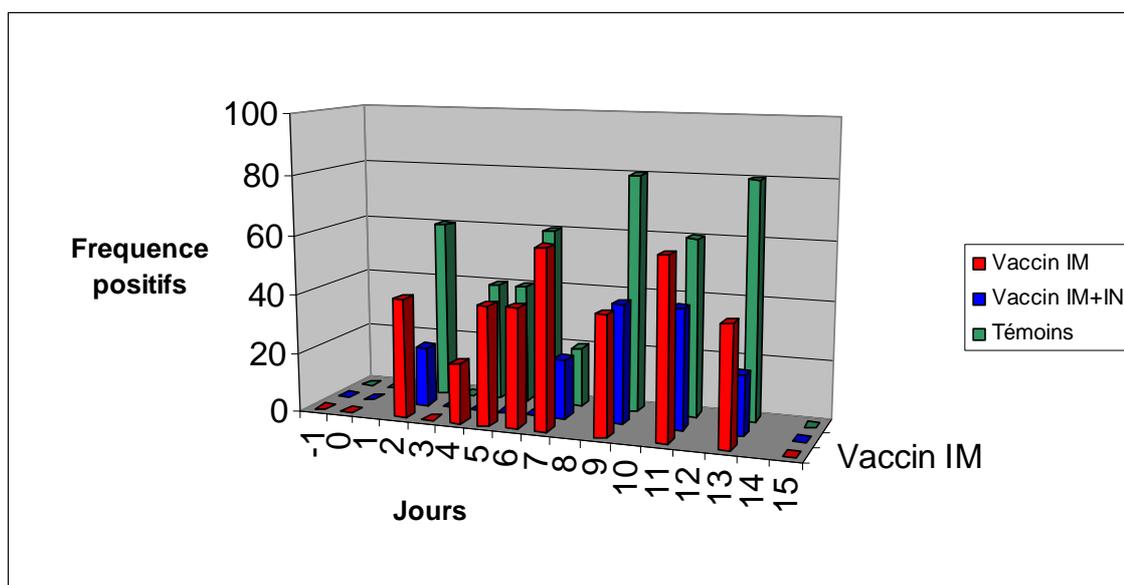


Figure 10 : Pourcentage des animaux positifs pour le test Speed®-ReSpiVBND dans chacun des groupes en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

III.4.2. RT-PCR en temps réel

Analyse sur écouvillons nasaux

La Figure 11 présente l'ensemble des résultats de l'analyse des écouvillons nasaux par RT-PCR. Le virus est détectable de J1 à J17 post-inoculation pour le groupe 3 (Témoins non vaccinés), de J1 à J11 pour le groupe 2 (vaccin IN et IM) et de J1 à J8 pour le groupe 1 (vaccination IM). Pour la variable « titre viral établit par RT-PCR sur écouvillon nasal », il existe un effet temps et un effet groupe sur les dix-huit jours de prélèvement. On remarque un second pic de charge virale, assez important . à J11 dans le groupe 3, beaucoup plus modéré à J17 dans le groupe 2.)

La comparaison des groupes par 2 et pour chaque jour (sur un total de 17 jours) montre des différences significatives ($p < 0,05$) aux jours 4 et 11 pour les groupes 1 et 3 et aux jours 2, 3 et 11 pour les groupes 2 et 3. Pour les autres jours les différences de charge virale n'apparaissent pas significatives entre les groupes.

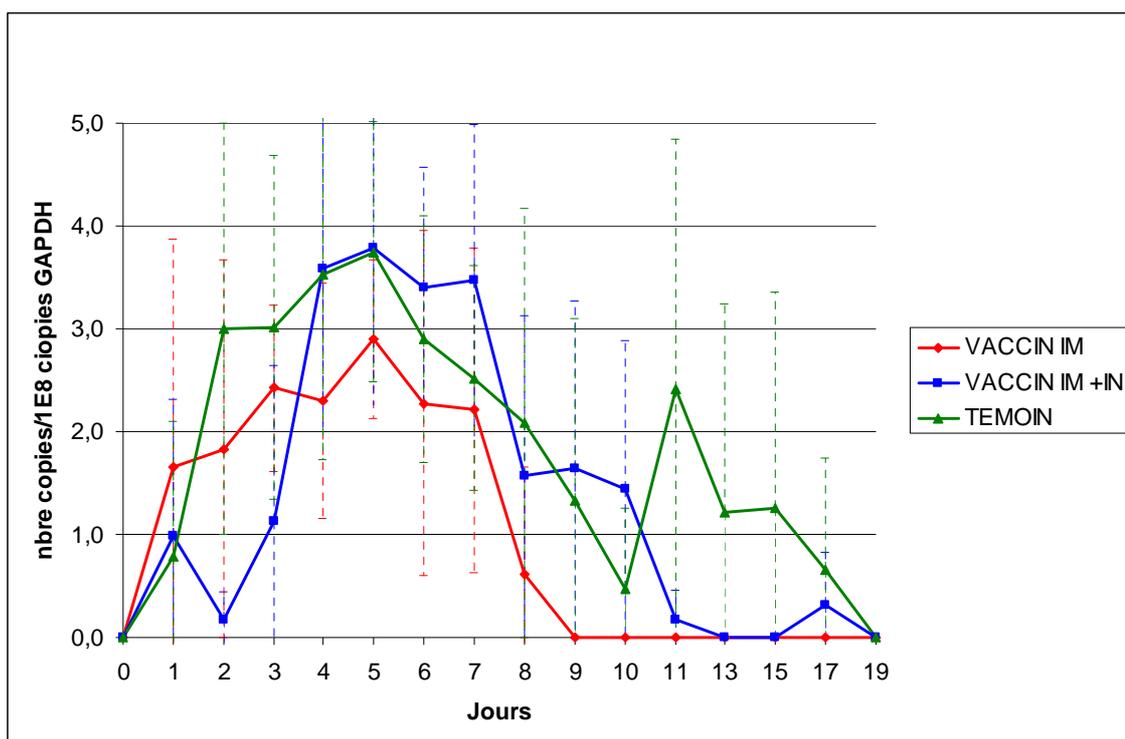


Figure 11 : Charges virales (valeur moyenne et écart-type, par groupe) des écouvillonnages nasaux en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

Notons que comme pour les signes cliniques, il existe une variabilité inter individus assez importante dans les titres viraux obtenus un même jour chez des individus du même groupe. On observe également des cinétiques de réplication virale variable d'un individu à l'autre.

Analyse sur LBA et échantillons pulmonaires

Le virus a été détecté uniquement dans les prélèvements des animaux euthanasiés 6 jours après inoculation virale, quel que soit le groupe. Les différences quantitatives existant entre les titres des différents groupes s'avèrent non significatives après analyse statistique (voir *Figure 12* ci-dessous).

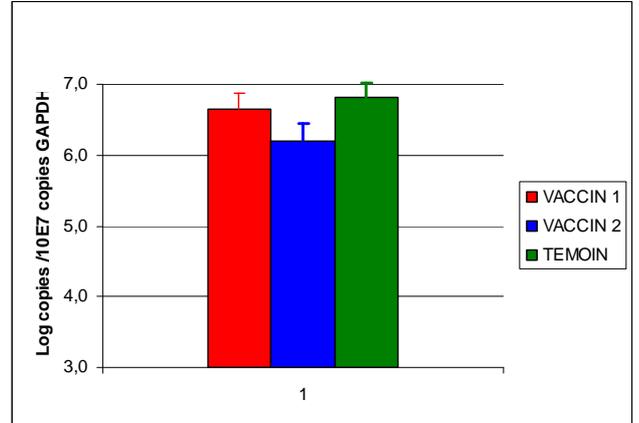
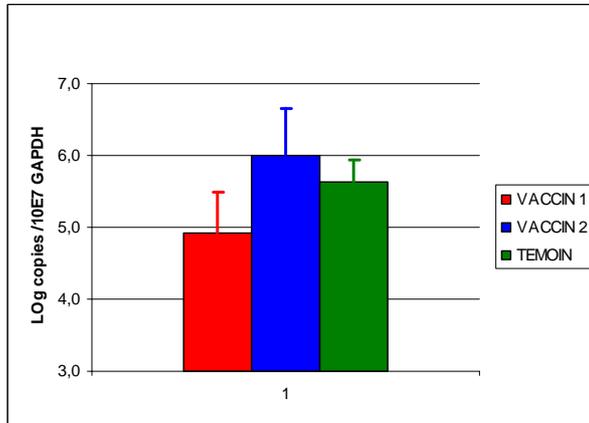


Figure 12a et b : Charge virale (valeur moyenne et écart-type) des LBA (13a) et échantillons de poumons (13b) prélevés sur les animaux euthanasiés six jours post-infection en fonction du groupe.

IV. Discussion

Les résultats montrent que le candidat vaccin est capable d'induire une protection partielle des animaux contre un challenge infectieux avec une souche de VRSB. En effet on observe des différences significatives entre les groupes vaccinés et le groupe non vacciné en ce qui concerne les scores cliniques, la cinétique de la réponse en IgM et la cinétique d'excrétion nasale du virus.

Toutefois, ces données restent discutables en terme de protection car notre modèle d'inoculation d'épreuve n'a pas permis de reproduire la forme sévère de la maladie. Par conséquent, il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes sur des paramètres objectifs tels que la température rectale ou la fréquence respiratoire. L'élaboration d'un score clinique a permis de pallier à ce problème. Ce paramètre est basé sur des critères subjectifs (comportement de l'animal, intensité et modification des bruits respiratoires) qui, si ils ne sont pas un biais majeur pour l'étude puisque recueillis par le même opérateur chaque jour dans les mêmes conditions, rendent difficilement comparables nos résultats à ceux d'autres études.

Comment expliquer le défaut de notre modèle à exprimer une forme sévère de la maladie ? Bien qu'elle ait été prélevée sur un animal sévèrement atteint, la souche isolée sur le terrain pourrait être peu virulente. Il est également possible que les techniques d'isolement du virus aient conduit à une perte de virulence de la souche. Ce phénomène est souvent observé à mesure des passages en culture cellulaire. C'est d'ailleurs pour cette raison que le nombre de passage en culture a été limité et que nous avons choisi de multiplier le virus sur veaux nouveaux-nés. La technique d'inoculation utilisée peut également être remise en question. Il a été montré (Bryson et al., 1983) que le fait d'associer la voie intra-nasale et intra-trachéale comme nous l'avons fait permettait d'obtenir des signes cliniques plus marqués. Cependant d'après les travaux plus récents de deux équipes (Tjørnehoj et al., 2003, West et al., 1999b), il serait possible d'améliorer encore le modèle en procédant à une inoculation plusieurs jours de suite, et en utilisant pour la voie intra-nasale un nébulisateur permettant une exposition sur plusieurs minutes. La souche 3761 utilisée dans cette étude avait pourtant préalablement permis de reproduire une pathologie respiratoire majeure chez des veaux prim'holstein inoculés à un mois (donnés personnelles) et à trois mois d'âge (Boxus et al., 2007), et ce en utilisant le même lot de virus et dans les mêmes conditions d'inoculation. Par ailleurs, on a vu que l'âge était un facteur de sensibilité majeur pour les VRS. L'utilisation d'animaux plus jeunes aurait peut être permis d'obtenir une meilleure expression clinique. En outre, on sait qu'il existe des différences de sensibilité entre les différentes races bovines. Les animaux croisés (holstein x normand) que nous avons utilisés se sont peut être avérés plus résistants que ceux utilisés (holstein) lors de précédentes expérimentations avec la même souche. Enfin, comme cela a été évoqué en médecine humaine, il peut exister une sensibilité individuelle au virus, auquel cas il serait difficile d'obtenir une atteinte clinique sévère sur tout un lot d'animaux n'ayant pas été sélectionnés sur ce

critère. L'amélioration de notre protocole expérimental est limitée en partie par les inconnues qui persistent quant à la modélisation de l'affection par le VRSB.

Si nous avons mis en évidence des différences attendues entre les groupes vaccinés et le groupe non vaccinés du point de vue de l'évolution clinique, nous avons aussi pu noter des différences notables entre les animaux ayant subi le même protocole. Des impressions subjectives en cours de manipulations nous ont conduits à comparer les scores des animaux des différentes unités. En effet, après analyse statistique, il s'avère qu'il existe des différences significatives dans les scores cliniques des animaux vaccinés avec le même protocole mais logés dans 2 unités différentes.

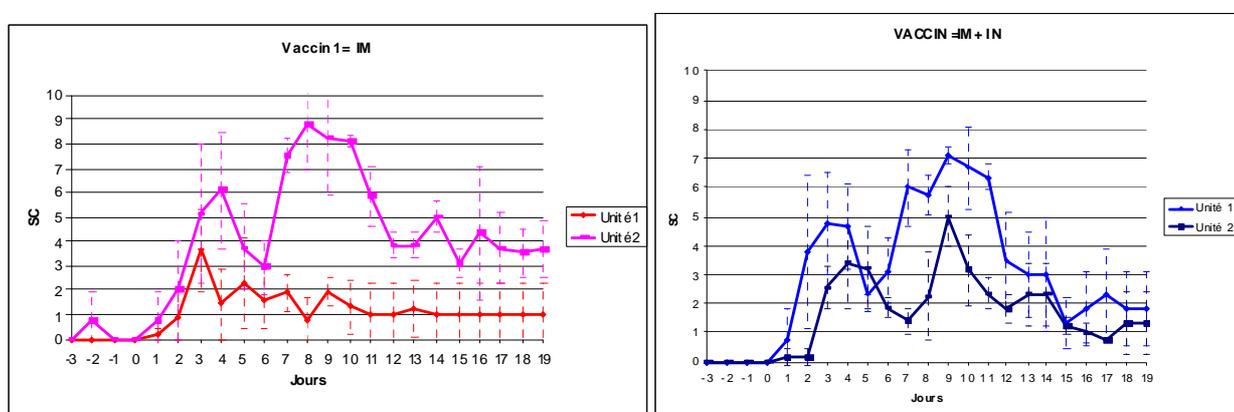


Figure 13 : a) Score clinique (moyenne et écart type) des animaux du groupe 1 selon leur unité de logement et en fonction du jour). b) Score clinique (moyenne et écart type) des animaux du groupe 2 selon leur unité de logement et en fonction du jour (J0 est le jour de l'inoculation).

Les scores cliniques des animaux du groupe 1 (vaccination intramusculaire) sont statistiquement différents à partir du 5^{ème} jour post-inoculation selon s'ils sont logés dans l'unité 1 ou dans l'unité 2. Les veaux de l'unité 2 ont exprimés des signes cliniques plus sévères que ceux de l'unité 1 et les scores cliniques sont même légèrement plus élevés que ceux des animaux non vaccinés. En ce qui concerne les animaux du groupe 2 (vaccination intra-nasale et inta-trachéale) des différences mineures existent entre les 2 loges, avec des scores légèrement supérieurs dans l'unité 1. Aucune explication ne nous semble plausible à ce jour pour expliquer ces différences. Est-ce un effet de l'environnement ? Cette hypothèse paraît peu probable dans la mesure où nous avons travaillé en unités de biosécurité A2 dans lesquelles les conditions d'environnement sont scrupuleusement contrôlées. Peut-il s'agir d'une infection intercurrente non mise en évidence ? Cette hypothèse reste à ce jour la plus satisfaisante, bien que non confirmée par examens de laboratoire et peu probable du fait des conditions de logement et de manipulation des animaux. En outre, l'hypothèse de l'existence d'un phénomène immunopathologique chez les animaux les

plus malades reste possible, et étayée par l'évolution en deux phases du score clinique de certains animaux. Cependant, aucune preuve tangible ne confirme à l'heure actuelle cette hypothèse.

Le suivi sérologique a permis de confirmer la différence de réponse immunitaire sérique entre des animaux naïfs et des animaux ayant déjà rencontré l'antigène viral. En effet, chez les animaux naïfs, on décèle une forte réponse en IgM, qui dure pendant 10 jours en moyenne, tandis que les animaux immunisés ne produisent pas d'IgM, ou alors sur de courtes périodes. L'analyse sérologique a en outre permis de valider la méthode Pourquier préconisée pour diagnostiquer des infections récentes. D'après nos résultats, ce test décèle des anticorps anti-VRSB en moyenne pendant les dix jours suivant l'infection. Le laboratoire préconise son emploi pour le diagnostic des infections datant de moins de 15 jours. Il est possible que la différence dans le délai de détection que nous avons obtenu et de celui du laboratoire soit due au fait que nous avons travaillé en infection expérimentale, tandis que le test est destiné à une utilisation sur des animaux naturellement infectés.

Les résultats virologiques montrent que la vaccination semble surtout agir sur la cinétique de multiplication virale : l'augmentation du titre viral est plus lente et la diminution plus rapide. En revanche, le vaccin n'entraîne pas de réduction significative de la charge virale.

L'absence de protection clinique totale et l'absence de protection virologique pourraient être expliquées par la nature même du vaccin. Celui-ci contient des anneaux de nucléoprotéines du VRSH. Les gènes N des VRSB et VRSH sont extrêmement bien conservés mais il peut cependant exister une différence d'épitope T entre VRSB et VRSH, qui pourrait compromettre l'efficacité du vaccin face à une infection par le virus bovin. D'autre part, la dose de protéine N sous forme N-SRS à administrer a été établie par extrapolation à partir d'un modèle d'infection murin. Les fortes doses de protéines administrées auraient pu entraîner une anergie partielle et il est probable qu'une dose adéquate soit à déterminer directement chez l'espèce cible. Enfin, des recherches devront être menées pour améliorer la réponse vaccinale, notamment via l'utilisation d'autres adjuvants ou de constructions intégrant des nucléoprotéines chimériques contenant des épitopes neutralisants de la protéine de fusion du VRS.

Enfin, aucune différence n'a pu être observée entre les deux protocoles d'immunisation. Ceci pourrait s'expliquer par une réponse à la vaccination par voie nasale de mauvaise qualité ou par une interférence entre les deux voies d'immunisation. La constitution d'un quatrième groupe d'animaux vaccinés uniquement par voie intra-nasale, ainsi qu'une étude précise du profil de la réaction immunitaire locale, auraient sans doute permis d'apporter des renseignements supplémentaires.

V. Conclusion

La vaccination avec les anneaux de N a induit une réponse immunitaire spécifique, et a permis de protéger partiellement les animaux vaccinés contre une infection expérimentale avec le VRSB. Cependant, un certain nombre de points restent à travailler. Si le modèle bovin reste un modèle de choix dans l'étude des VRS les signes cliniques sont difficiles à reproduire et le protocole utilisé dans cette étude est probablement perfectible. Une étude ultérieure gagnerait probablement par exemple et entre autres, à utiliser des animaux plus jeunes et à effectuer plusieurs inoculations d'épreuve sur plusieurs jours. D'autre part, dans l'optique de l'élaboration d'un vaccin destiné à l'espèce bovine, il serait sans doute profitable de produire des anneaux de N à partir d'un VRSB plutôt qu'un VRSH. Enfin, il convient d'améliorer la réponse induite par la vaccination par voie intra-nasale, en optimisant son intensité, sa durée et sa qualité (anticorps et cellulaire, locale et systémique). En effet, c'est une voie à privilégier en période néonatale, et elle s'est avéré nécessaire à l'obtention d'une immunité mucoale protectrice dans le modèle expérimental rongeur préalablement étudié. A cette fin, une première étape pourrait consister à tester chez le veau différents adjuvants pour la voie intra-nasale et les comparer avec la voie intramusculaire pour laquelle est déjà établie l'immunogénicité du candidat vaccin.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BAKER, J. C., 1991: Human and bovine respiratory syncytial virus: immunopathologic mechanisms. *Vet Q*, **13**, 47-59.
- BAKER, J. C., ELLIS, J. A., and CLARK, E. G., 1997a: Bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Clin. North. Am. [Food An. Pract.]* **11**, 425-454.
- BAKER, J. C., ELLIS, J. A., and CLARK, E. G., 1997b: Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **13**, 425-54.
- BELKNAP, E. B., 1993: Recognizing the clinical signs of BRSV infection. *Vet Med*, **88**, 886-887.
- BELKNAP, E. B., BAKER, J. C., PATTERSON, J. S., WALKER, R. D., HAINES, D. M., and CLARK, E. G., 1991: The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *J Infect Dis*, **163**, 470-6.
- BELKNAP, E. B., CISZEWSKI, D. K., and BAKER, J. C., 1995: Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs. *J Vet Diagn Invest*, **7**, 285-98.
- BOXUS, M., 2005: Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*, **125**, 125-130.
- BRANDENBURG, A. H., NEIJENS, H. J., and OSTERHAUS, A. D., 2001: Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*, **19**, 2769-82.
- BRYSON, D. G., 1993: Necropsy findings associated with BRSV pneumonia. *Veterinary Medicine*, 894-899.
- BRYSON, D. G., MCNULTY, M. S., LOGAN, E. F., and CUSH, P. F., 1983: Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings. *Am J Vet Res*, **44**, 1648-16655.
- CHANOCK, R. M., PAROTT, R. H., and VARGOSKO, A. J. (Eds.) (1961) *Respiratory diseases of viral etiology: IV Respiratory Syncytial Virus*.
- EASTON, A. J., DOMACHOWSKE, J. B., and ROSENBERG, H. F., 2004: Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**, 390-412.
- ELVANDER, M., 1996: Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Rec*, **138**, 101-5.
- GADDUM, R. M., COOK, R. S., FURZE, J. M., ELLIS, S. A., and TAYLOR, G., 2003: Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes. *Immunology*, **108**, 220-9.

- GRELL, S. N., TJORNEHOJ, K., LARSEN, L. E., and HEEGAARD, P. M., 2005a: Marked induction of IL-6, haptoglobin and IFN γ following experimental BRSV infection in young calves. *Vet Immunol Immunopathol*, **103**, 235-45.
- GRELL, S. N., TJØRNEHØJ, K., LARSEN, L. E., and HEEGAARD, P. M. H., 2005b: Marked induction of IL-6, haptoglobin and IFN- γ following experimental BRSV infection in young calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **103**, 235-245.
- GRUBBS, S. T., KANIA, S. A., and POTGIETER, L. N. D., 2001: Prevalence of ovine and bovine respiratory syncytial virus infections in cattle determined with a synthetic peptid-based immunoassay. *J Vet Diagn Invest* **13**, 128-132.
- HEEGAARD, P. M., GODSON, D. L., TOUSSAINT, M. J., TJORNEHOJ, K., LARSEN, L. E., VIUFF, B., and RONSHOLT, L., 2000: The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol*, **77**, 151-9.
- KALINA, W. V., WOOLUMS, A. R., BERGHAUS, R. D., and GERSHWIN, L. J., 2004: Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle. *Vaccine*, **22**, 1465-1474.
- KIMMAN, T. G., STRAVER, P. J., and ZIMMER, G. M., 1989: Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings. *Am J Vet Res*, **50**, 684-93.
- KIMMAN, T. G., WESTENBRINK, F., SCHREUDER, B. E., and STRAVER, P. J., 1987: Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J Clin Microbiol*, **25**, 1097-106.
- KIMMAN, T. G., ZIMMER, G. M., WESTENBRINK, F., MARS, J., and VAN LEEUWEN, E., 1988: Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet Rec*, **123**, 104-9.
- LARSEN, L. E., 2000a: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet. Scand*, **41**, 1-24.
- LARSEN, L. E., 2000b: Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Vet Scand*, **41**, 1-24.
- MALLIPEDDI, S. K., and SAMAL, S. K., 1992: Sequence comparison between the phosphoprotein mRNAs of human and bovine respiratory syncytial viruses identifies a divergent domain in the predicted protein. *J Gen Virol*, **73 (Pt 9)**, 2441-4.
- MARS, M. H., BRUSCHKE, C. J., and VAN OIRSCHOT, J. T., 1999: Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol*, **66**, 197-207.

- MEYER, G., DEPLANCHE, M., and SCHELCHER, F., 2008: Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **31**, 191-225.
- OPENSHAW, P. J. M., and TREGONING, J. S., 2005: Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **18**, 541-555.
- PIAZZA, F. M., JOHNSON, S. A., DARNELL, M. E., PORTER, D. D., HEMMING, V. G., and PRINCE, G. A., 1993: Bovine respiratory syncytial virus protects cotton rats against human respiratory syncytial virus infection. *J Virol*, **67**, 1503-10.
- ROUX, X., DUBUQUOY, C., DURAND, G., TRAN-TOLLA, T. L., CASTAGNE, N., BERNARD, J., PETIT-CAMURDAN, A., ELEOUE, J. F., and RIFFAULT, S., 2008: Sub-nucleocapsid nanoparticles: a nasal vaccine against respiratory syncytial virus. *PLoS ONE*, **3**, e1766.
- SAMAL, S. K., and ZAMORA, M., 1991: Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, **72 (Pt 7)**, 1715-20.
- SCHRIJVER, R. S., LANGEDIJK, J. P., VAN DER POEL, W. H., MIDDEL, W. G., KRAMPS, J. A., and VAN OIRSCHOT, J. T., 1996: Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. *Clin Diagn Lab Immunol*, **3**, 500-6.
- SRIKIATKHACHORN, A., and BRACIALE, T. J., 1997: Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med*, **186**, 421-32.
- STENSALLE, L. G., SIMONSEN, J. B., THOMSEN, S. F., LARSEN, A. M., LYSDAL, S. H., AABY, P., KYVIK, K. O., SKYT*THE, A., BACKER, V., and BISGAARD, H., 2009: The causal direction in the association between respiratory syncytial virus hospitalization and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **123**, 131-137 e1.
- STOTT, E. J., THOMAS, L. H., TAYLOR, G., COLLINS, A. P., JEBBETT, J., and CROUCH, S., 1984: A comparison of three vaccines against respiratory syncytial virus in calves. *J Hyg (Lond)*, **93**, 251-61.
- TAYLOR, G., BRUCE, C., BARBET, A. F., WYLD, S. G., and THOMAS, L. H., 2005: DNA-vaccination against RSV in young calves. *Vaccine*, **23**, 1242-1250.
- TAYLOR, G., RIJSEWIJK, F. A., THOMAS, L. H., WYLD, S. G., GADDUM, R. M., COOK, R. S., MORRISON, W. I., HENSEN, E., VAN OIRSCHOT, J. T., and KEIL, G., 1998: Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV. *J Gen Virol*, **79 (Pt 7)**, 1759-67.

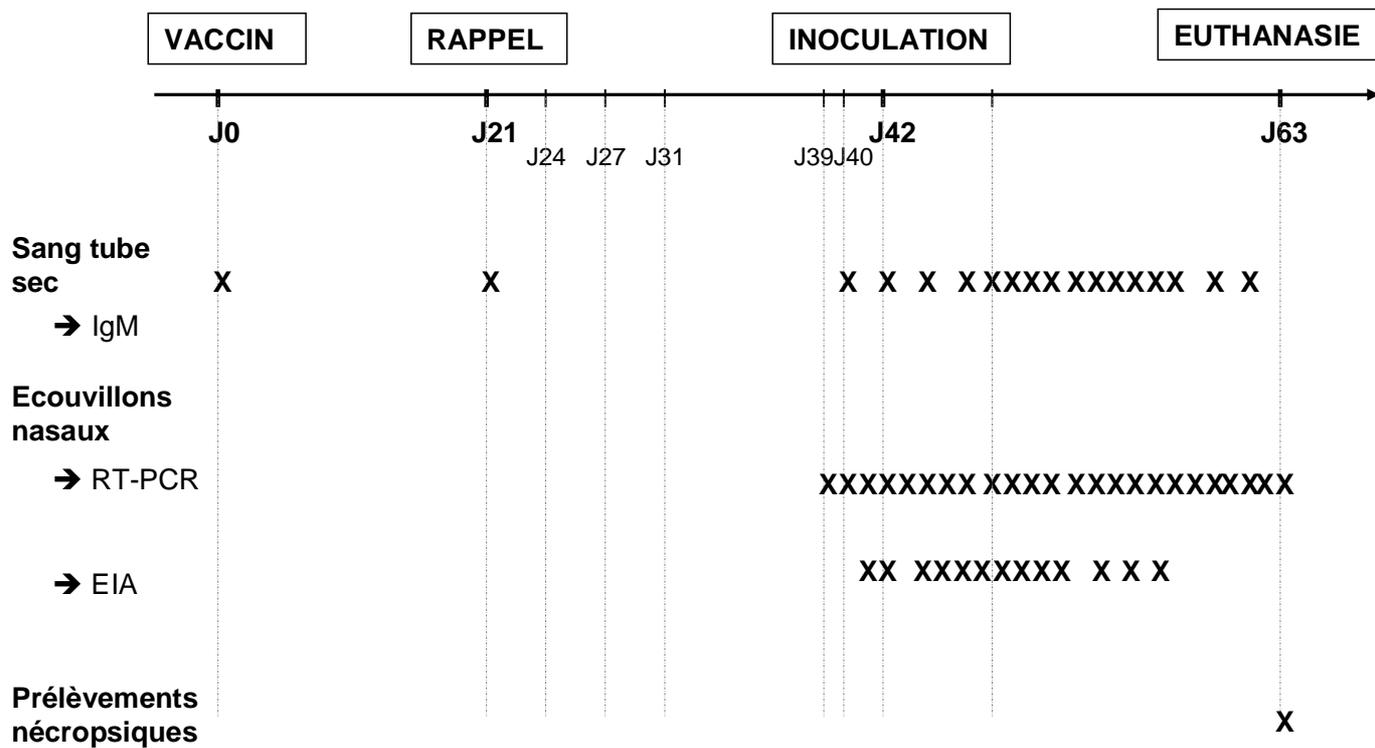
- TAYLOR, G., THOMAS, L. H., FURZE, J. M., COOK, R. S., WYLD, S. G., LERCH, R., HARDY, R., and WERTZ, G. W., 1997: Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions. *J Gen Virol*, **78 (Pt 12)**, 3195-206.
- THOMAS, L. H., SLOTT, E. J., COLLINS, A. P., and JEBBETT, J., 1984: Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus. *Br J Exp Pathol*, **65**, 19-28.
- TJORNEHOJ, K., UTTENTHAL, A., VIUFF, B., LARSEN, L. E., RONTVED, C., and RONSHOLT, L., 2003: An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Res Vet Sci*, **74**, 55-65.
- VALARCHER, J., and TAYLOR, G., 2007a: Bovine respiratory syncytial infection. *Vet. Res.*, **38**, 153-180.
- VALARCHER, J. F., BOURHY, H., LAVENU, A., BOURGES-ABELLA, N., ROTH, M., ANDREOLETTI, O., AVE, P., and SCHELCHER, F., 2001: Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology*, **291**, 55-67.
- VALARCHER, J. F., and TAYLOR, G., 2007b: Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res*, **38**, 153-80.
- VAN DER POEL, W. H., BRAND, A., KRAMPS, J. A., and VAN OIRSCHOT, J. T., 1994: Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J Infect*, **29**, 215-28.
- VANGEEL, I., ANTONIS, A. F., FLUESS, M., RIEGLER, L., PETERS, A. R., and HARMEYER, S. S., 2007: Efficacy of a modified live intranasal bovine respiratory syncytial virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with BRSV. *Vet J*, **174**, 627-35.
- WEST, K., PETRIE, L., HAINES, D. M., KONOBY, C., CLARK, E. G., MARTIN, K., and ELLIS, J. A., 1999a: The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Vaccine*, **17**, 809-20.
- WEST, K., PETRIE, L., KONOBY, C., HAINES, D. M., CORTESE, V., and ELLIS, J. A., 1999b: The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves. *Vaccine*, **18**, 907-19.
- WESTENBRINK, F., KIMMAN, T. G., and BRINKHOF, J. M., 1989: Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. *J Gen Virol*, **70 (Pt 3)**, 591-601.

ANNEXES

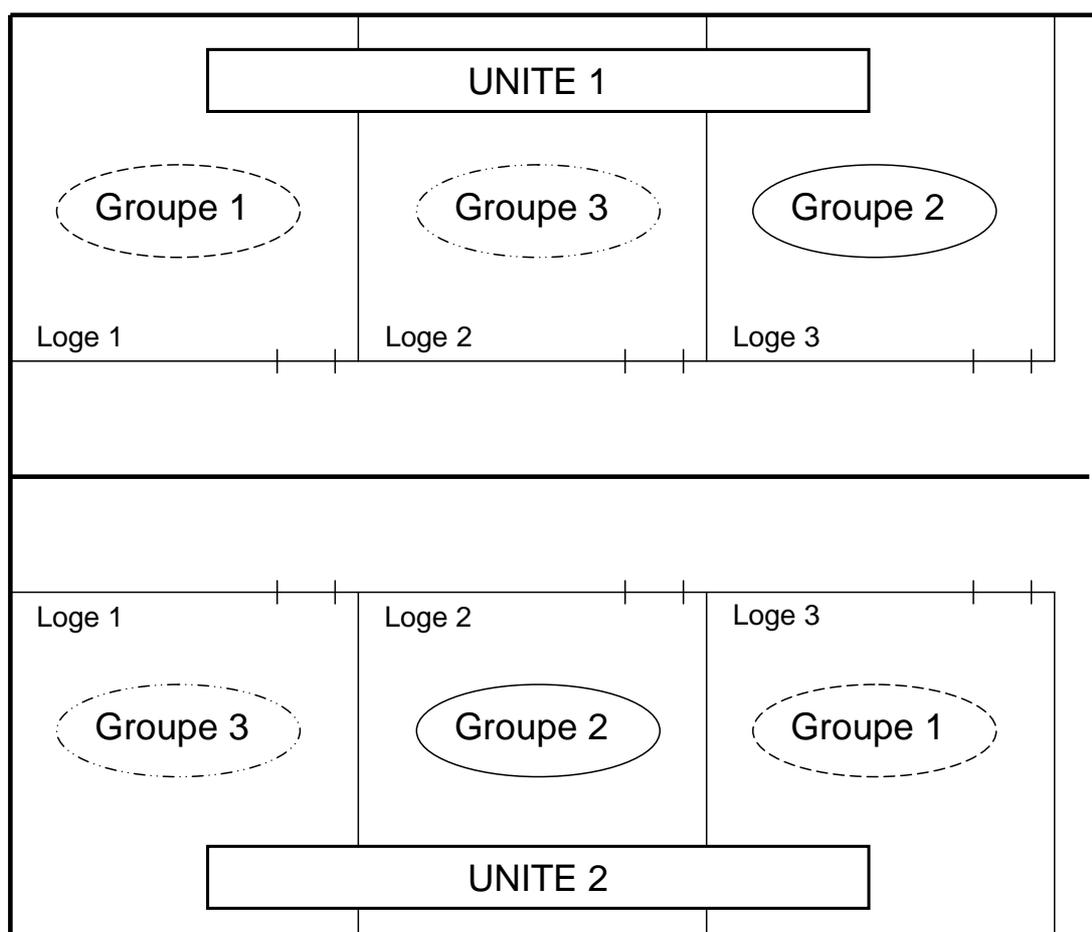
Etude	Inoculum	Animaux	Voie d'inoculation	Signes cliniques	Isolement viral	Lésions macroscopiques	Lésions microscopiques
	HRSV		IN	Fièvre biphasique	sécrétions nasales uniquement 5j PI	aucune	Nécrose épithélia trachéal et des cornets nasaux
Jacob et al., 1975	BRSV 10 ^{5,5} -10 ^{7,6} TCID ₅₀ 3 ^{ème} - 7 ^{ème} passages 10 ml	3 à 14 semaines		<u>Modérés</u> (10/22) Fièvre Abattement Jetage nasal Toux	Majorité des veaux sécrétions nasales 4-10j PI Muqueuses respiratoires, poumons et tonsilles à la nécropsie	aucune	Bronchiolite catarrhale Cellules syncytiales (12/22)
Mohanty et al., 1975	BRSV 10 ^{3,5} TCID ₅₀ /ml 11 ^{ème} passage 10ml	6 à 8 semaines	IN IT IN+IT	<u>Modérés</u> Hyperthermie Jetage nasal léger Toux modérée Légère tachypnée	Tous Sécrétions nasales 7j PI	Légère consolidation pulmonaire	Pneumonie interstitielle Cellules syncytiales Métaplasie squameuse de l'épithélium bronchique Hyperplasie des nœuds lymphatiques bronchiques
Mohanty et al., 1976	BRSV 10 ^{3,5} TCID ₅₀ /ml 11 ^{ème} passage 10ml	6 à 8 semaines Réinoculation 5 semaines après	IN+IT IN + IT	Aucun à la 2 ^{ème} inoculation	3/5 à la 2 ^{ème} inoculation	Légère consolidation pulmonaire	Pneumonie interstitielle Cellules syncytiales Métaplasie squameuse de l'épithélium bronchique Hyperplasie des nœuds lymphatiques bronchiques
Moteane et al., 1977	BRSV 10 ⁵ PFU/ml 2ml	1 semaine 7 mois	IN	<u>Modérés</u> Fièvre Bruits respiratoires augmentés Toux Jetage nasal mucopurulent Lacrimation	Majorité des veaux Cavité nasale	aucune	aucune

Elazhary et al., 1980	BRSV 2x10 ⁶ TCID ₅₀ /10ml	1 à 5 semaines	IN	<u>Modérés (2/11)</u> <u>à sévères (9/11)</u> Fièvre Bruits respiratoires augmentés Jetage nasal et oculaire Max 6 à 9j PI	Sécrétions nasales 1 à 12j PI	NE	NE
Elazhary et al., 1981	BRSV 2x10 ⁵ TCID ₅₀ /10ml +interféron	6 semaines Ré-inoculation 15 ou 37j PI	IT	<u>Modérés à Sévères</u> Fièvre Bruits respiratoires augmentés Dyspnée Conjonctivite et larmimation Max 6-7j PI Aucun signe après ré-inoculation			
Bryson et al., 1983	BRSV 10 ^{3,5} -10 ^{6,5} TCID ₅₀ /ml 3 ^{ème} - 7 ^{ème} passages	3 à 6 jours	Matin: 10 ml IN + 10 ml IT 1 puis soir : 10ml IN x4j 10ml IN matin et soir x 4j	<u>Sévères</u> Toux Tachy-, hyperpnée Bruits respiratoires modifiés Hyperthermie <u>Moins sévères</u>		Consolidation pulmonaire extensive Minimales	Bronchite, bronchiolite, changement alvéolaires Cellules syncytiales Présence, mais moins sévères
Castelman et al., 1985	BRSV 10 ⁴ -10 ^{6,9} TCID ₅₀ /ml	1 mois		<u>Modérés</u> Jetage nasal séreux Toux modérée Sifflement	Epithélium bronchique et trachéal (IF) 3-5j PI	Marquées (1/11)	Rhinite, trachéite, bronchite, bronchiolite (nécrose, œdème et infiltration neutrophilique)

Annexe 2 : Diagramme chronologique des prélèvements réalisés en cours d'expérimentation



Annexe 3 : Plan simplifié du bâtiment et répartition des groupes d'animaux



Annexe 4 : Fiche de suivi clinique des animaux.

INRA - ENVT
UMR 1225 IHAP

Code:VRSB-VaccN-01
Responsable : G. MEYER

Fiche clinique

Veau:
Groupe:
N°identification:

Race:
Sexe:
Date de naissance:

Semaine N°

Date, jour						
Heure						
Température rectale						
Fréquence respiratoire						
Toux 0= absente 1= Sonore 2= faible						
Jetage 0= absent 1= séromuqueux 2= purulent						
Dyspnée abdominale (O/N)						
Refus alimentaire 0 = absent 1 = partiel 2 = total						
Comportement 0 = normal 1= triste 2= abattu						
Prélèvements						
Remarques Paraphe						

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle SOULESTIN Marion
a été admis(e) sur concours en : 2002
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 Juillet 2007
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

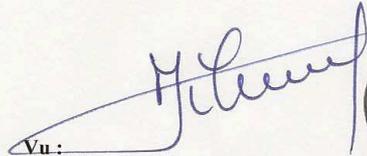
Je soussigné, Gilles MEYER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
Mlle SOULESTIN Marion

intitulée :

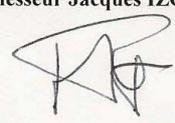
« Evaluation expérimentale de l'efficacité d'un candidat vaccin sous-unitaire contre le virus respiratoire syncytial bovin. »



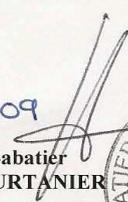
Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur MEYER Gilles



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



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur JACQUES IZOPET



Vu le : 13/01/09
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur GILLES FOURTANIER



Toulouse, 2009

NOM : SOULESTIN

PRENOM : Marion

TITRE : Evaluation expérimentale de l'efficacité d'un candidat vaccin sous-unitaire contre le virus respiratoire syncytial bovin.

RESUME :

Une étude récente a démontré qu'un candidat vaccin sous unitaire composé d'anneaux formés par la nucléoprotéine recombinante du virus respiratoire syncytial humain (nanoparticules N-SRS) pouvait protéger des souris contre une inoculation d'épreuve (Roux et al., 2008). L'objectif de ce projet était d'évaluer l'efficacité de ce vaccin chez le veau, espèce cible naturelle du virus respiratoire syncytial bovin. Pour cela, 24 veaux séronégatifs vis-à-vis du virus et indemnes d'infection respiratoire ont été divisés en 3 groupes homogènes. Deux des groupes ont été vaccinés deux fois à trois semaines d'intervalle selon deux modalités différentes avec deux formulations différentes du vaccin : une administration intra-musculaire seule ou une administration intra-musculaire et intra-nasale. Le troisième groupe constituait le groupe témoin d'animaux non vaccinés. Trois semaines après le rappel, tous les animaux ont été infectés par voie intra-nasale et intra-trachéale avec une souche virulente de VRSB. Les résultats ont montré une protection clinique partielle des veaux vaccinés par rapport aux veaux témoins, en l'absence de protection virologique majeure. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux modes de vaccination. En conclusion, la vaccination avec les nanoparticules N-SRS a induit une réponse immunitaire spécifique, mais n'a protégé que partiellement les veaux vaccinés contre une infection expérimentale avec le virus respiratoire syncytial bovin. Des études sont en cours pour améliorer l'efficacité vaccinale.

MOTS CLES : VRSH - VRSB - Vaccin sous-unitaire - Nucléoprotéine – Infection expérimentale – Efficacité vaccinale - Veau

TITLE : Experimental evaluation of the efficiency of a bovine respiratory syncytial virus subunit candidate vaccine.

ABSTRACT :

A recent study has previously determined that the recombinant respiratory syncytial virus nucleoprotein as a sub-nucleocapsid ring structure constitute an efficient vaccine for mice against human RSV (Roux et al., 2008). The aim of this project was to evaluate the efficiency of this vaccine candidate in calves which are natural host for bovine RSV. Twenty-four calves free of BRSV antibodies and free from respiratory pathogens were separated into three homogenous groups. Two groups were vaccinated twice at 3 weeks interval with two different vaccine formulations and routes: one was vaccinated by the only intra-muscular route, the other received both intra-muscular and intra-nasal vaccination. The third group was the control group. Three weeks after the second vaccine administration, all the animals were inoculated by intra-nasal and intra-tracheal routes with a virulent BRSV strain. Results showed a partial clinical protection of the vaccinated calves as compared with the control ones, but no real virological protection. No differences were observed between the two ways of vaccination. To conclude, vaccination with N nanoparticles induced a specific immunity response, however it only protect calves partly against an experimental infection with a BRSV strain. Studies are underway to improve the vaccine efficiency.

KEY WORDS: BRSV - HRSV - Subunit vaccine – Nucleoprotein – Experimental infection – Vaccine efficiency - Calf