

INFECTION EXPERIMENTALE PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN (VRSB) :

APPLICATION A L'EVALUATION DE L'EFFICACITE D'UN VACCIN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Joël, Jean, Henri, Albert VIGNES
Né, le 16 mai 1974 à TARBES (Hautes-Pyrénées)

Directeur de thèse : **M. le Professeur François SCHELCHER**

JURY

PRESIDENT :
Mme Jacqueline PUEL

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. François SCHELCHER
M. Gilles MEYER

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

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

| | | |
|-----------------------------|------|-------------------------|
| Directeur par intérim | : M. | G. BONNES |
| Directeurs honoraires..... | : M. | R. FLORIO |
| | M. | R. LAUTIE |
| | M. | J. FERNEY |
| | M. | G. VAN HAVERBEKE |
| Professeurs honoraires..... | : M. | A. BRIZARD |
| | M. | L. FALIU |
| | M. | C. LABIE |
| | M. | C. PAVAU |
| | M. | F. LESCURE |
| | M. | A. RICO |
| | M. | A. CAZIEUX |
| | Mme | V. BURGAT |
| | M. | D. GRIESS |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

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 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Fauzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A Madame le Professeur Jacqueline PUEL

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Bactériologie Virologie

qui nous a fait le grand honneur de bien vouloir accepter la présidence de ce jury de thèse.

Nos remerciements respectueux.

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER

De L'école Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse cour

Qui nous a guidé dans notre travail.

Croyez à l'assurance de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Gilles MEYER

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

pour avoir bien voulu participer à ce jury de thèse.

Soyez assuré de notre respectueuse gratitude.

A mon épouse , Karine, pour son soutien sans faille.

A mes parents , ma sœur et ma famille pour leurs encouragements constants.

A Sandrine, Alexandre, Denis , Thierry et Xavier pour leur collaboration amicale.

A Christian, pour son soutien logistique.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| <u>TABLE DES MATIÈRES</u> | 9 |
| <u>TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</u> | 11 |
| <u>Liste des abréviations</u> | 12 |
| <u>INTRODUCTION</u> | 13 |
| <u>I/ LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN</u> | 15 |
| <i><u>I.1/ EPIDÉMOLOGIE DU VRSB</u></i> | 15 |
| <i><u>I.2/ CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES ET IMMUNOGÈNES DU VRSB</u></i> | 17 |
| I.2.1/ STRUCTURE GÉNOMIQUE ET PROTÉIQUE | 17 |
| I.2.2/ VARIABILITÉ ANTIGÉNIQUE | 18 |
| I.2.3/ STRUCTURES IMMUNOGÈNES | 19 |
| <i><u>I.3/ VACCINOLOGIE</u></i> | 20 |
| I.3.1/ CARACTÉRISTIQUES DE LA RÉPONSE IMMUNE | 20 |
| I.3.2/ MISE AU POINT DES VACCINS CONTRE LE VRSB | 21 |
| <u>II/ MATÉRIEL ET MÉTHODE</u> | 23 |
| <i><u>II.1/ MODÈLE D'ÉTUDE</u></i> | 23 |
| <i><u>II.2/ CALENDRIER EXPÉRIMENTAL</u></i> | 24 |
| <i><u>II.3/ ANIMAUX</u></i> | 25 |
| II.3.1/ ORIGINE | 25 |
| II.3.2/ CARACTÉRISTIQUES INDIVIDUELLES | 25 |
| II.3.3/ LOGEMENT ET ALIMENTATION | 26 |
| <i><u>II.4/ INOCULATION D'ÉPREUVE</u></i> | 26 |
| II.4.1/ ORIGINE DE LA SOUCHE D'ÉPREUVE | 26 |
| II.4.2/ INOCULUM | 26 |
| II.4.3/ INOCULATION | 27 |
| <i><u>II.5/ ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ</u></i> | 27 |
| II.5.1/ SCORE CLINIQUE | 27 |
| II.5.2/ VIROLOGIE | 28 |
| II.5.2.1/ PRÉLÈVEMENT ET CONDITIONNEMENT | 28 |
| II.5.2.2/ TECHNIQUES DE DÉTECTION DU VRSB | 29 |
| II.5.2.3/ MISE EN ÉVIDENCE DU VIRUS VRSB | 30 |
| II.5.3/ LÉSIONS | 30 |
| <i><u>II.6/ ANALYSE DES DONNÉES ET STATISTIQUES</u></i> | 31 |
| II.6.1/ CRITÈRES CLINIQUES | 31 |
| II.6.2/ CRITÈRES VIROLOGIQUES | 31 |
| <u>III/ RÉSULTATS</u> | 33 |
| <i><u>III.1/ CRITÈRES CLINIQUES</u></i> | 33 |
| III.1.1/ FRÉQUENCE RESPIRATOIRE | 33 |

| | |
|---|-----------|
| III.1.2/ SCORE CLINIQUE MOYEN..... | 34 |
| III.1.3/ TEMPÉRATURE RECTALE..... | 34 |
| <i>III.2/ CRITÈRES VIROLOGIQUES</i> | 35 |
| III.2.1/ IMMUNODÉTECTION DANS LES SÉCRÉTIONS NASALES | 36 |
| III.2.2/ ISOLEMENT ET QUANTIFICATION DANS LE LLBA..... | 37 |
| III.2.3/ N-RT-PCR SUR LE LLBA..... | 38 |
| III.2.4/ CRITÈRES LÉSIONNELS MACROSCOPIQUES..... | 40 |
| III.2.5/ DÉTECTION DES BACTÉRIES ET DU BVDV..... | 40 |
| IV/ DISCUSSION | 41 |
| <i>IV.1/ LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL</i> | 41 |
| IV.1.1/ ANIMAUX | 41 |
| IV.1.1.1/ ESPÈCE | 41 |
| IV.1.1.1.1/ LE VEAU | 41 |
| IV.1.1.1.2/ L'AGNEAU | 41 |
| IV.1.1.1.3/ AUTRES ESPÈCES..... | 42 |
| IV.1.1.2/ AGE..... | 42 |
| IV.1.1.3/ STATUT SÉROLOGIQUE..... | 43 |
| IV.1.1.4/ STATUT VIS À VIS D'ORGANISMES PATHOGÈNES SPÉCIFIQUES..... | 43 |
| IV.1.2/ INOCULUM ET TECHNIQUES D'INOCULATION | 43 |
| IV.1.2.1/ LES DIFFÉRENTS INOCULUMS..... | 43 |
| IV.1.2.1.1/ ORIGINE DU VIRUS..... | 44 |
| IV.1.2.1.2/ CULTURE DU VIRUS | 44 |
| IV.1.2.1.3/ TITRE EN VIRUS ET VOLUME DE L'INOCULUM | 44 |
| IV.1.2.1.4 STATUT DE L'INOCULUM VIS À VIS DES VIRUS RESPIRATOIRES MAJEURS | 44 |
| IV.1.2.2/ LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'INOCULATION | 45 |
| IV.1.2.2.1/ LES DIFFÉRENTES VOIES..... | 45 |
| IV.1.2.2.2/ LA FRÉQUENCE D'INOCULATION..... | 45 |
| IV.1.3/ SUIVI DES ANIMAUX EN POST-INOCULATION..... | 46 |
| IV.1.3.1/ SUIVI CLINIQUE ET LÉSIONNEL..... | 46 |
| IV.1.3.1.1/ SUIVI CLINIQUE | 46 |
| IV.1.3.1.2/ SUIVI LÉSIONNEL..... | 46 |
| IV.1.3.2 SUIVI VIROLOGIQUE | 47 |
| IV.1.3.2.1 / PRÉLÈVEMENTS..... | 47 |
| IV.1.3.2.2./ TECHNIQUES DE MISE EN ÉVIDENCE | 47 |
| IV.1.3.2.2.1/ ISOLEMENT VIRAL ET QUANTIFICATION..... | 48 |
| IV.1.3.2.2.2/ DÉTECTION D'ANTIGÈNES | 48 |
| IV.1.3.2.2.3/ DÉTECTION D'ARN. VIRAL | 49 |
| IV.1.4/ CONCLUSION SUR LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL..... | 49 |
| <i>IV.2/ LES RÉSULTATS</i> | 50 |
| IV.2.1/ INNOCUITÉ DU VACCIN | 50 |
| IV.2.2/ EFFICACITÉ DU VACCIN | 51 |
| IV.2.2.1/ RÉSULTATS CLINIQUES..... | 51 |
| IV.2.2.2/ RÉSULTATS VIROLOGIQUES | 51 |
| IV.2.3/ CONCLUSION SUR LES RÉSULTATS | 51 |
| CONCLUSIONS | 53 |
| REFERENCES | 55 |
| ANNEXE 1: FICHE D'EXAMEN CLIBIQUE STANDARD | 67 |
| ANNEXE 2 : MODE DE CALCUL DU SCORE CLINIQUE .. | 69 |

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Evolution des fréquences respiratoires corrigées moyennes des groupes en fonction du temps..... | 33 |
| Figure 2 : Evolution par groupe des scores cliniques moyens rééchelonnés en fonction du temps | 34 |
| Figure 3 : Evolution des températures rectales corrigées moyennes des groupes en fonction du temps..... | 35 |
| Figure 4 : Immunodétection du VRSB. dans les sécrétions nasales avec le Tespack-Abbott | 36 |
| Figure 5 : Isolement du VRSB dans le LLBA. | 37 |
| Figure 6 : Détection du gène N du VRSB par n-RT-PCR dans le LLBA. | 39 |

TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques épidémiologiques des infections par le VRSH et le VRSB | 16 |
| Tableau 2 : Structure génomique et protéique du VRSH | 17 |
| Tableau 3 : Les structures immunogènes | 19 |
| Tableau 4 : Calendrier détaillé. | 24 |
| Tableau 5: Caractéristiques individuelles des veaux. | 25 |
| Tableau 6 : Signification statistique des résultats de comparaison de la détection du VRSB dans les SN par Tespack-Abbott entre G_2 et G_1 pour chaque jour d'observation | 36 |
| Tableau 7 : Titre du virus VRSB dans LLBA (UFS / 10 ml)..... | 37 |
| Tableau 8 : Signification des tests de comparaison de la détection du VRSB par isolement dans le LLBA pour chaque jour d'observation | 38 |
| Tableau 9 : Signification statistique des comparaisons G_2 / G_1 par un test unilatéral non paramétrique, pour le premier temps de détection et la durée de détection du VRSB. par isolement dans le LLBA | 38 |
| Tableau 10 : Signification des tests de comparaison de la détection de VRSB par n-RT-PCR dans le LLBA pour chaque jour d'observation | 39 |
| Tableau 11 : Signification statistique des comparaisons G_2 / G_1 par un test unilatéral non paramétrique, pour le premier temps de détection et la durée de détection du VRSB. par n-RT-PCR dans le LLBA | 39 |

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : anticorps

ARN : acide ribonucléique

BHV1 : hêrpes virus bovin de type 1

BVDV : virus de la maladie des muqueuses

ECP : effet cytopathogène

EN : écouvillon nasal

ENVT : école nationale vétérinaire de Toulouse

FR : fréquence respiratoire

IF : Immunofluorescence

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LLBA : liquide de lavage broncho-alvéolaire

M : Mâle

MEM : milieu essentiel minimum

ND : non déterminé

NS : non significatif

PH : prim⁷ holstein

PI3 : *para-influenza 3*

RT-PCR : transcription reverse et amplification génique

SN : anticorps neutralisant

UFS : unité formant syncytium

VRSB : virus respiratoire syncytial bovin

VRSH : virus respiratoire syncytial humain

VRSO : virus respiratoire syncytial ovin

INTRODUCTION

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) est un agent pathogène respiratoire majeur des bovins. Le VRSHumain (VRSH) joue un rôle identique en médecine humaine. Les structures de ces deux virus ont de grandes similitudes. Les infections qu'ils provoquent sont également très proches sur le plan clinique et épidémiologique. La séroprévalence du VRSB chez les bovins adultes est supérieure à 60 % en France. La moitié des bovins sont infectés pour la première fois avant 12 mois ; on peut enregistrer dans cette tranche d'âge des taux de mortalité élevé. L'étude du VRSB présente donc un intérêt direct en production bovine ainsi qu'en pathologie comparée avec le VRSH.

La vaccination apparaît comme une solution pour le contrôle de la maladie. Elle se heurte cependant à différents obstacles : immunisation en présence d'anticorps maternels, réaction immunopathologique possible, variabilité antigénique démontrée pour le VRSH ainsi que pour le VRSB. Enfin, une infection sauvage induit une protection partielle et de courte durée, ce qui limite les ambitions de la vaccination. Des vaccins contre le VRSB ont cependant été mis au point. Avant de les commercialiser, il convient de vérifier leur innocuité et leur efficacité. Cette évaluation nécessite un modèle expérimental d'infection performant. Il a souvent été difficile de reproduire des troubles respiratoires sur des jeunes bovins inoculés expérimentalement.

Notre objectif est de présenter les résultats d'évaluation de l'efficacité d'un vaccin vivant modifié dirigé contre le VRSB, dans un modèle d'épreuve en station expérimentale.

I/ LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN

Le VRSB est un virus pneumotrope dont la durée d'incubation est estimée entre 2 et 5 jours. L'infection se traduit par une anorexie, de l'hyperthermie, de la toux, du jetage et une dyspnée pouvant être sévère, allant parfois jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë.

I.1/ Epidémiologie du VRSB.

Les bovins sont les hôtes naturels du VRSB et l'existence d'un autre réservoir animal n'a pas été démontrée. La fréquence des infections est maximale dans les premiers mois de vie : 50 % des animaux sont infectés pour la première fois avant 1 an. Ainsi, la séroprévalence chez les adultes en France, aux Etats-Unis ou en Suède est supérieure à 60 % ou 70 % (Perrin et *al.* 1979 ; Ames 1993 ; Elvander 1996) et rares sont les cheptels où les adultes sont dépourvus d'anticorps.

La fréquence des troubles liés au VRSB varie en fonction de la classe d'âge et des facteurs d'élevage. Les troubles cliniques sont le plus souvent observés sur des veaux de moins d'un an. Dans cette classe d'âge, 71 % des troubles respiratoires ont été associés au VRSB (Kimman et *al.* 1988). Les troubles les plus graves sont observés chez les veaux de 1 à 9 mois. Cependant, des veaux de moins de 3 semaines peuvent être atteints, au même titre que les adultes, chez qui l'infection peut parfois induire de graves troubles respiratoires (Ellis et *al.* 1996 ; Elvander 1996). En fait, l'atteinte de toutes les tranches d'âge se limiterait aux troupeaux jusque là entièrement séronégatifs. Lorsque le virus circule régulièrement, seuls les veaux semblent cliniquement atteints (Ames 1993 ; Van der Poel et *al.* 1994).

Les maladies respiratoires associées au VRSB culminent en hiver (Baker et *al.* 1985), souvent en relation avec des chutes de pression atmosphérique (Wellemans et Leunen 1975) et des chutes de températures (Mahin et Shimi 1982 ; Key et Derbyshire 1984).

L'infection par aérosol est considérée comme dominante (Bryson et *al.* 1978). La transmission aérienne horizontale semble influencée par les changements climatiques (Florman

et Mc Laren, 1988) ainsi que par la densité de population (Elvander 1996). L' infection verticale n'a jamais été prouvée et semble peu probable.

La persistance virale est suggérée par le suivi sérologique de troupeaux sans introduction d'animaux extérieurs. L'analyse des épisodes infectieux a permis de conclure que la transmission continue entre bovins séropositifs était un scénario peu plausible ; En revanche, il semble que l'infection prolongée des vaches séropositives soit probable (De Jong et al 1996). Les stimuli classiques (Dexamethasone ou 3 methyl-indole) permettant la réexcrétion de l'I.B.R. n'ont pas permis la réexcrétion du VRSB (Thomas et al 1984). Comme cela a déjà été démontré pour d'autres Paramyxoviridae (Randall et Russell, 1991), la persistance du VRSB chez les bovins paraît probable (Valarcher et al. 2001)

Les caractéristiques épidémiologiques comparées des infections par le VRSH et le VRSB sont présentées dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Caractéristiques épidémiologiques des infections par le VRSH et le VRSB (Van Der Poel 1994)

| | VRSH | VRSB |
|---|-----------------------------|--------------------------|
| Hôte naturel | Homme | Bovins |
| Autres espèces | ? | ? |
| Age de la maladie | < 1 an | < 1 ans ; parfois adulte |
| Prévalence des anticorps après 3ans d'age | >95% | >70% |
| Répartition géographique | mondiale | mondiale |
| Saisonnalité | automne hiver | automne hiver |
| Transmission | contact aérosol vectorielle | contact. aérosol |
| Durée d'excrétion virale | 2à10 jours | 3à5 (1à12)jours |
| Reexcrétion virale lors de réinfections | oui | ? |
| Infection persistante | ? | ? |
| Troubles cliniques | rhinite. bronchite | rhinite. Bronchite |

I.2/ Caractéristiques structurales et immunogènes du VRSB

I.2.1/ Structure génomique et protéique

L'organisation génomique et la composition protéique du VRSB et du VRSH sont semblables (Lerch et *al* 1989 ; Westenbrink et *al* 1989). Elles sont résumées dans le tableau suivant (Collins 1991).

Tableau 2 : Structure génomique et protéique du VRSH

| Protéines | | | Longueur du gène | Poids moléculaire | | Fonction |
|--------------------|----------------------|---|---------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| | | | | Protéine | Protéines Glycosylées | |
| Structurale | Enveloppe | F (F ₂ -S-S-F ₁) | 1 903 | 63 453 | 68 à 70 000 | Pénétration Fusion des cellules |
| | | G | 923 | 32 587 | 84 à 90 000 | Attachement |
| | | 1A = SH | 410 | 7 536 | 13 à 30 000 | |
| | Enveloppe interne | M | 958 | 28 717 | | Morphogénèse Réplication ARN |
| | | M ₂ (22K) | 961 | 22 153 | | |
| | Nucléocap- side | N | 1 203 | 44 423 | | Nucléoprotéine |
| | | P | 914 | 27 150 | | |
| | | L | 6 578 | 250 226 | | Polymérase |
| | Non | 1C (= NS1) | | 532 | 15 567 | |
| Structurale | 1B (= NS2) | | 503 | 14 674 | | ? |

Le virus comporte 10 protéines dont 2 non structurales (NS1 et NS2). Les protéines F, G et 1A sont glycosylées et sont exprimées sur la membrane cellulaire. F et G constituent des spicules ; F assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et permet la

pénétration du virus dans la cellule ainsi que la fusion des membranes des cellules infectées aboutissant à la formation de syncytia. G assure quant à elle l'attachement.

1.2.2/ Variabilité antigénique

Sur le plan antigénique, le VRSH comprend deux sous-groupes A et B sur la base de la réactivité vis à vis d'anticorps mono et polyclonaux. Six subdivisions ont ultérieurement été identifiées au sein du sous-groupe A, ainsi que deux ou trois dans le sous-groupe B. L'utilisation d'anticorps monoclonaux montre que les protéines virales N, F, P, M, et M₂ sont en général assez bien conservées entre les deux sous-groupes A et B et à l'intérieur d'un même sous-groupe. La protéine N apparaît comme la plus conservée. Les différences majeures entre groupes et sous-groupes portent sur la glycoprotéine G. Les conséquences pratiques de cette variabilité du VRSH sont incomplètement évaluées. L'association virulence sous-groupes antigéniques est largement discutée (Mc Connachie et *al* 1990). Les réinfections seraient plus fréquentes avec des souches hétérologues (Anderson et Heilman 1995).

Pour le VRSB, les études de variabilité antigénique à l'aide de batteries d'anticorps monoclonaux sur G ont autorisé une classification en sous-groupes (Furze et *al.* 1994 ; Schrijver et *al.* 1996a). L'évolution du gène de cette glycoprotéine paraît plus rapide que les autres, avec une pression de sélection positive exercée particulièrement sur deux segments codant pour des régions protéiques de type mucine. Ces deux régions sont accessibles aux anticorps et sont riches en sites antigéniques (Norrby et *al.* 1987 ; Akerlind-Stopner et *al.* 1990 ; Langedijk et *al.* 1996b ; 1997). Les mutations détectées seraient à l'origine de la disparition de deux ponts disulfures et d'une hélice α dans cette zone immunodominante (Doreleijers et *al.*, 1996). Certaines conséquences immunitaires (perte de reconnaissance par les anticorps) de ces modifications ont déjà été évaluées (Martinez et *al.* 1997 ; Langedijk et *al.* 1997). Cependant, le degré de divergence nucléotidique sur G observé entre les souches les plus éloignées est inférieur à celui décrit à l'intérieur d'un même sous-groupe de VRSH (Prozzi et *al.*, 1997).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-F de VRSH sur neuf souches de VRSB ne révèle aucune différence de réactivité (Baker et *al.*, 1992). En revanche, des variations ont été observées sur le poids moléculaire des protéines P et de la sous-unité F₂ (Stine et *al.* 1997 ;

Prozzi et *al.* 1997). La comparaison de sous-groupe de VRSH sur la séquence nucléotidique de la protéine F indique une identité globale supérieure à 94 % (96 % en F1 et 91 % en F2) (Zamora et *al.* 1992 ; Elvander et *al.* 1998).

Enfin, la nucléoprotéine est considérée comme une protéine très conservée chez les pneumovirus sans qu'il y ait eu de vérifications spécifiques pour le VRSB (Johnson et Collins, 1989).

1.2.3/ Structures immunogènes

Les structures immunogènes et la nature de la réponse qu'elles induisent sont présentées dans le tableau 3 (Collins 1991 ; Duncan et Potgieter 1993 ; Westenbrink 1989) :

Tableau 3 : Les structures immunogènes

| Protéines | Hommes-Rongeurs | | | | Bovins | |
|-----------------------|-----------------|--------|------------|-------------|--------|----|
| | Ac | | LT | | Ac | LT |
| | SN | non SN | Auxiliaire | Cytotoxique | | |
| F | +++ | | +++ | +++ | +++ | ND |
| G | + | ++ | + | - | + | ND |
| 1A = SH | | + | + | ? | + | ND |
| M | | + | | | + | ND |
| M ₂ = 22 K | - | + | | + | + | ND |
| N | - | +++ | + | +++ | +++ | ND |
| P | - | + | | | + | ND |
| L | | + | | | + | ND |
| 1C | | ? | - | ? | | ND |
| 2B | | ? | - | ? | | ND |

ND : Non déterminé

Ac : anticorps

SN : Ac neutralisants

LT : lymphocytes T

Globalement, l'immunisation de souris ou de rats des cottonniers avec des virus vaccine recombinants démontre que les structures immunogènes majeures sont les protéines F, G et N.

Cependant, les animaux vaccinés avec N sont moins bien protégés qu'avec F ou G. Par ailleurs, F induit une meilleure protection que G (Kimman et Westenbrink, 1990). De plus, la protection induite par G s'avère 13 fois moins efficace lorsque l'épreuve est réalisée avec un virus de sous-groupe hétérologue sur des souris (Jonhson et *al* 1987), ce qui tendrait à démontrer que le dimorphisme antigénique est associé à une réduction de la protection croisée, pour le VRSH au moins.

I.3/ Vaccinologie

I.3.1/ Caractéristiques de la réponse immune

La notion de protection après une infection par un virus sauvage est relative. En effet, on peut observer, chez les bovins, des phénomènes de réinfections successives qui ne semblent cependant pas s'accompagner de symptômes patents (Baker et *al* 1986 ; Van der Poel *et al* 1993).

Les anticorps jouent un rôle important dans la protection. D'un point de vue cinétique, les anticorps neutralisants générés par une infection primaire ou d'origine colostrale décroissent très vite, jusqu'à des titres très faibles au bout de 3 à 5 mois. Les anticorps sériques neutralisants, même à titres élevés, n'empêchent pas la réinfection que ce soit chez l'homme (Hall et *al* 1991) ou chez les bovins (Westenbrink et *al* 1989). Cependant, différentes expériences d'immunisation passive chez les rongeurs et chez l'enfant démontrent que des anticorps neutralisants dirigés contre F et G et des anticorps inhibant la fusion apportent une protection avec une diminution significative mais non totale des troubles cliniques chez l'enfant, diminution proportionnelle au titre en anticorps. Les anticorps maternels ne protègent pas contre l'infection. Cependant, dans les conditions de terrain, la fréquence et la gravité des troubles cliniques sont inversement liées aux concentrations en anticorps neutralisants d'origine maternelle (Kimman et *al* 1988). Dans un modèle expérimental, la gravité des symptômes et des lésions est moindre sur les veaux pourvus d'anticorps maternels par rapport à des veaux sans anticorps (Belknap et *al* 1991). Au contraire, l'apparition de troubles cliniques en présence d'anticorps (Kimman, 1993) suggère que ceux-ci puissent participer à la

physiopathologie. Ainsi les anticorps sériques ont un rôle controversé. Les anticorps locaux pourraient jouer un rôle favorable dans la protection en « bloquant » le virus dans le mucus respiratoire (Kimman, 1993).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est encore moins bien connue. Cependant, chez l'homme, les troubles cliniques sont beaucoup plus graves sur les patients souffrant de déficits acquis ou congénitaux de la réponse cellulaire (Anderson et Heilman, 1995). Chez les bovins, une prolifération des lymphocytes T a été mise en évidence par des réactions d'hypersensibilité retardée (Field et Smith, 1984) ou de transformation lymphoblastique (Taylor et *al* 1987). La réponse de type T cytotoxique est essentielle dans l'élimination virale. Chez les bovins, une activité lymphocytaire T cytotoxique associée au phénotype CD₈⁺ est mise en évidence dans le sang périphérique 7 à 10 jours après l'inoculation et dans le poumon 10 jours après l'inoculation (Gaddum et *al.*, 1996). Une déplétion lymphocytaire CD₈⁺ provoque une excrétion prolongée par rapport à des animaux déplétés en CD₄⁺ (Taylor et *al.*, 1995). Les lésions semblent plus marquées chez les veaux déplétés en CD₈⁺ que celles observées chez les veaux déplétés en CD₄⁺ (Thomas, 1996). La réponse à médiation cellulaire joue donc un rôle curatif majeur.

1.3.2/ Mise au point des vaccins contre le VRSB.

Le développement de vaccins contre le VRSB souffre de plusieurs difficultés. Suite à une infection sauvage, la protection est partielle et de courte durée, ce qui limite les ambitions de la vaccination. De plus, la réponse immunitaire cellulaire ou humorale peut être protectrice ou, à l'inverse, participer aux troubles cliniques. Ainsi, apparaît-il indispensable, pour chaque vaccin, d'évaluer strictement l'équilibre entre l'innocuité et l'efficacité.

Le problème crucial de l'innocuité a été mis en avant pour la première fois avec le vaccin VRSH inactivé au formol et précipité à l'alun. Les enfants vaccinés ont développé de graves troubles cliniques, lors d'infections sauvages ultérieures, par rapport au groupe témoin immunisé avec un virus *para-influenza*. Diverses théories explicatives ont été avancées. L'inactivation au formol altérerait les propriétés immunogènes, en particulier de la glycoprotéine F, conduisant ainsi à la prédominance d'anticorps « non fonctionnels » qui

participeraient ensuite à une réaction d'Arthus (Ellis et *al* 1995). Le vaccin activerait sélectivement une sous-population de lymphocytes T auxiliaires, les Th₂, qui lors d'infections ultérieures produiraient ou stimuleraient la production de cytokines et de médiateurs de l'inflammation. On ne peut toutefois généraliser l'absence d'innocuité à l'ensemble des vaccins inactivés. A titre d'exemple, un vaccin adjuvé à l'adjuvant incomplet de Freund ou à l'hydroxyde d'alumine a semblé d'une innocuité satisfaisante (Mohanty, et *al* 1981).

Les vaccins vivants modifiés sont souvent considérés comme non susceptibles d'induire des réactions immunopathologiques (Kelling, 1993). Il convient cependant d'évaluer leur innocuité, en particulier leur virulence résiduelle et les possibilités de réversion de virulence.

L'activité des vaccins est mise en lumière par les titres obtenus en anticorps neutralisants.

L'évaluation de l'efficacité se fait en station expérimentale et sur le terrain. Les essais en station se heurtent aux difficultés d'obtenir un modèle expérimental expressif et reproductible. En particulier, il est difficile que les bovins témoins, non vaccinés et éprouvés, soient atteints de troubles respiratoires marqués. Expérimentalement, la reproduction de formes cliniques graves observées sur le terrain est difficile (Belknap et *al* 1995). En particulier, la létalité observée dans les conditions d'infections naturelles n'a pas été jusqu'à présent reproduite dans les modèles expérimentaux. Outre les critères cliniques souvent peu discriminants, l'évaluation de l'efficacité des vaccins s'appuie sur des critères virologiques : excrétion du virus dans les sécrétions nasales et/ou pulmonaires.

Les essais terrains sont beaucoup plus difficiles à mettre en place et à valider. Ils se font dans les élevages. Parmi toutes les publications, seules certaines font référence à des essais contrôlés (présence de lot témoin, répartition au hasard, évaluation de l'épreuve virulente).

II/ MATERIEL ET METHODE

II.1/ Modèle d'étude

Deux groupes de veaux ont été inclus dans l'étude :

- groupe 1 : les veaux ont été vaccinés à l'aide d'un vaccin vivant modifié trivalent(BHV1,PI3, VRSB) 2 fois à 4 semaines d'intervalle, le 21/07/97 et le 18/08/97.
- groupe 2 : Ces veaux témoins n'ont pas été vaccinés.

Vingt et un jours après la dernière vaccination (08/09/97), tous les veaux ont été éprouvés avec le VRSB.

Les animaux ont été observés et suivis cliniquement pendant les 16 jours suivant l'inoculation, à la suite de quoi ils ont été autopsiés.

II.2/ Calendrier expérimental

Le calendrier expérimental est résumé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Calendrier détaillé.

| | Jour | Pesée | Examen clinique | Inoculation | Antibiotiques | Prélèvements | | |
|----------|-----------------|-------|-----------------|-------------|---------------|--------------|-------|------|
| | | | | | | E.N. | L.B.A | Sang |
| 06/09/97 | J ₋₂ | + | + | | | + | + | |
| 07/09/97 | J ₋₁ | | + | | + | | | |
| 08/09/97 | J ₀ | | + | + | + | | | + |
| 09/09/97 | J ₁ | | + | + | + | | | |
| 10/09/97 | J ₂ | | + | + | + | | | |
| 11/09/97 | J ₃ | | + | | + | + | | |
| 12/09/97 | J ₄ | | + | | | + | + | |
| 13/09/97 | J ₅ | | + | | | + | | |
| 14/09/97 | J ₆ | | + | | | + | + | |
| 15/09/97 | J ₇ | | + | | | + | | |
| 16/09/97 | J ₈ | | + | | | + | + | + |
| 17/09/97 | J ₉ | | + | | | + | | |
| 18/09/97 | J ₁₀ | | + | | | + | + | |
| 19/09/97 | J ₁₁ | | + | | | + | | |
| 20/09/97 | J ₁₂ | | + | | | + | + | |
| 21/09/97 | J ₁₃ | | + | | | + | | |
| 22/09/97 | J ₁₄ | | + | | | + | + | |
| 23/09/97 | J ₁₅ | | + | | | + | | |
| 24/09/97 | J ₁₆ | | + | | | + | + | + |
| 25/09/97 | J ₁₇ | + | + | | | | | |

E.N. : Ecouvillonnage Nasal.

L.B.A. : Lavage Broncho-Alvéolaire.

II.3/ Animaux

II.3.1/ Origine

Les veaux utilisés pour cet essai sont nés par césariennes, ont été élevés dans une ferme expérimentale et n'ont pas reçu de colostrum.

II.3.2/ Caractéristiques individuelles

La race, le sexe et le poids des veaux inclus dans les deux lots sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques individuelles des veaux.

| | Identification | Race | Sexe | Date de naissance | Poids (en kg) (06/09/97) |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Groupe 1 (Vaccinés) | 361 | PH | M | 22/06/97 | 87 |
| | 362 | PH | M | 23/06/97 | 73 |
| | 363 | PH | M | 22/06/97 | 93 |
| | 364 | PH | M | 19/06/97 | 86 |
| | 365 | PH | M | 16/06/97 | 90 |
| Groupe 2 (Non Vaccinés) | 366 | PH | M | 16/06/97 | 84 |
| | 367 | PH | M | 17/06/97 | 103 |
| | 368 | PH | M | 16/06/97 | 89 |
| | 369 | PH | M | 20/06/97 | 91 |
| | 370 | PH | M | 19/06/97 | 83 |

P.H. : Prim Holstein.

M. : Mâle.

Le veau 360 (appartenant initialement au groupe 1) a été exclu pour avoir présenté des signes cliniques de maladie respiratoire chronique.

Tous les veaux ont été pesés au début de l'essai avec une bascule calibrée.

II.3.3/ Logement et alimentation

Dès leur réception, les veaux ont été répartis en 2 lots, dans 2 box contigus de 15 m² et 50 m³ chacun. Le sol bétonné a été paillé. La ventilation était de type statique et la température non contrôlée. L'éclairage était naturel. Les veaux des deux groupes n'avaient pas de contact physique pendant l'essai.

Les examens cliniques et les prélèvements se faisaient toujours du lot vacciné vers le lot témoin, de façon à éviter les contaminations croisées. Cet ordre fut toujours respecté.

L'alimentation était composée de lait reconstitué (Univor élevage - Sodiavit) distribué 2 fois par jour. Le foin et l'eau étaient disponibles à volonté. Le concentré était distribué tous les jours (1 kg / veau / jour).

II.4/ Inoculation d'épreuve

II.4.1/ Origine de la souche d'épreuve

La souche de VRSB (A2) choisie pour l'inoculation expérimentale est une souche sauvage isolée dans le laboratoire de l'E.N.V.T. en 1994, à l'occasion d'une sévère épidémie de VRSB touchant les adultes et les veaux.

Aucun autre virus que le VRSB n'a pu être identifié dans l'inoculum par culture et immunodétection (BVDV, BHV1, PI₃, Coronavirus, Mastadénovirus). La détection de BVDV par RT-PCR s'est, elle aussi, avérée négative.

II.4.2/ Inoculum

Le virus d'épreuve a été cultivé sur des cellules BT(Bovine Turbinate) en milieu dit "essentiel minimum" (M.E.M.) avec du sel de EARLE, à 37°C, avec 5 % de CO₂. L'inoculum final était à son 6^{ème} passage en culture.

Le titre de virus a été déterminé sur un échantillon d'inoculum prélevé après l'inoculation. L'inoculum contenait $1,1 \times 10^5$ UFS / ml, 1×10^5 UFS / ml et $2,5 \times 10^5$ UFS / ml respectivement les jours J_0 , J_1 et J_2 .

II.4.3/ Inoculation

L'inoculation a été faite sur 3 jours consécutifs : J_0 , J_1 et J_2 . Chaque jour, 10 ml d'inoculum ont été instillés dans les cavités nasales et 10 ml ont été injectés sous endoscopie dans la trachée. Ainsi, chaque veau a reçu entre 2×10^6 UFS et 5×10^6 UFS chaque jour, pendant 3 jours.

Pendant 5 jours (J_{-1} ; J_0 ; J_1 ; J_2 ; J_3), 3 mg / kg/ jour de ceftiofur (Excenel-Upjohn) ont été injectés en I.M. afin de prévenir une éventuelle complication bactérienne.

II.5/ Evaluation de l'efficacité

II.5.1/ Score clinique

Un examen clinique standard a été réalisé 2 fois par jour, par le même clinicien, pour les 2 groupes (Annexe 1). Les paramètres quantitatifs (température rectale, fréquence respiratoire, refus de lait et de concentré) ainsi que les paramètres qualitatifs (comportement général, écoulements nasaux, toux et dyspnée) ont été notés sur une échelle de sévérité. Les résultats des symptômes individuels ont été pondérés afin de calculer un score clinique moyen (Annexe 2).

II.5.2/ Virologie

La présence de VRSB a été évaluée simultanément dans les sécrétions nasales après écouvillonnage nasal (EN) et dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA). Le titre en virus a été évalué seulement sur le LLBA.

II.5.2.1 Prélèvements et conditionnement

✓ Ecouvillonnage nasal

Les cellules de la muqueuse nasale et les sécrétions ont été recueillies à l'aide d'écouvillons nasaux (Biolyon-Unipath) à J₂, J₃ et chaque jour suivant, jusqu'au 16^{ème} jour. Un échantillon a été gardé par sécurité.

✓ Lavage bronchoalvéolaire

Les lavages bronchoalvéolaires ont été réalisés à J₂, J₄, J₆, J₈, J₁₀, J₁₂, J₁₄, J₁₆. Après une anesthésie à la Kétamine (Imalgene 1000. Rhône-Mérieux) (4 mg / kg IV), 3 x 50 ml de M.E.M. à température ambiante, supplémenté avec du sel de EARLE, de la L-glutamine, des Acides Aminés Non Essentiels (Gibco-BRL), de la gentamicine à 200 mg/ml (Gibco-BRL) et de la fungizone à 2,5 µg / ml (Gibco-BRL) ont été injectés dans les bronches et immédiatement réaspirés sous endoscopie (endoscope GIF Q-Olympus). L'endoscopie a été réalisée par voie orale toutes les 48 heures. Les poumons droits et gauches ont été prélevés alternativement. Des endoscopes spécifiques étaient utilisés pour chaque lot. Entre chaque veau, l'endoscope était désinfecté chimiquement : 2 lavages à l'ammonium (Hexanios-Anios) : 1 litre de NaCl à 0,9 % ; immersion dans une solution de glutaraldehyde (Stéranios-Anios) pendant 15 minutes ; 2 litres de NaCl à 0,9 %. Ainsi, il a été démontré préalablement que le VRSB était détruit par cette technique de stérilisation.

Après le prélèvement, les LLBA étaient maintenus à 4°C et traités dans un délai maximum d'une heure. Après une centrifugation (700g x 10 mn à 4°C) les cellules d'origine contenues dans les 10 ml de LLBA étaient remises en suspension dans 1 ml M.E.M. avant d'être congelées puis décongelées et finalement ensemencées dans une culture cellulaire ou mélangées à 1 ml de Trizol TM (Gibco) conservé à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN. Un échantillon de cellules du LLBA était conservé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 % par sécurité.

II.5.2.2/ Techniques de détection du VRSB

✓ Immunodétection

La détection des antigènes V.R.S.B. a été réalisée au moyen d'un test commercial ELISA (Tespac-Abbott) selon les instructions du fabricant. Ce test permet de détecter le VRSB dans des cultures cellulaires titrant 10^4 UFP / ml diluées au 1/1000.

✓ n-RT-PCR

La méthode pour extraire l'ARN a été décrite (CHOMCZINSKI et SACCHI 1987). La RT-PCR emboîtée (n-RT PCR) a été développée sur le gène (N) de la nucléocapside en trois sites. Pour la transcription reverse, le Superscript TMII (Gibco) a été utilisé comme transcriptase reverse avec l'amorce N₂₋₁ (position n°65 : 5' - ATG GCT CTC AGC AAG GTC A - 3'). Pour la première étape de la PCR nichée, les amorces N₂₁ et N₂₂ (position n°1079 : 5' - TCT TGG TGG TTT CTT GGT GTA CCT C - 3') ont été utilisées avec la polymérase Amplitaq Gold (Perkin Elmer). La PCR a été réalisée sur Gene Amp PCR System 480 (Perkin Elmer) en utilisant le programme suivant : 94°C pendant 12 minutes, puis 35 cycles (94°C pendant 60 secondes ; 58°C pendant 60 secondes ; 72°C pendant 90 secondes), et enfin une élongation pendant 10 minutes. Les amplicons produits ont été dilués 100 fois et 100 µl ont été utilisés pour réaliser une nouvelle PCR avec le même mix sauf les amorces internes qui ont été N₂₋₃, position n°191 (5' - CAT CTC AAT AAG TTG TGT GG - 3') et N₂₋₄, position n°713 (5' - TCT ACA ACC TGT TCC ATT TC - 3'). Dans la PCR interne, le programme suivant a été utilisé : 94°C pendant 12 minutes, puis 35 cycles (94°C pendant 45 secondes ; 49°C pendant 60 secondes ; 72°C pendant 60 secondes), puis enfin une élongation de 10 minutes. Les produits de RT-PCR ont été détectés par électrophorèse de 5,5 µl d'échantillon sur gel d'Agarose à 2 % en présence de bromure d' ethidium.

✓ Isolement et identification du VRSB

L' isolement a été réalisé sur une couche unicellulaire de cellules Bovine Turbinate (BT) entre le 35^{ème} et le 38^{ème} passage et cultivées à 37°C, à 5 % CO₂ en présence de M.E.M. et 10 % de sérum de veau foetal. Après congélation et décongélation, les cellules du LLBA ont été ensemencées avec une phase d'adsorption de 2 heures à 37°C sous agitateur. Après incubation, l'inoculum a été retiré et les cellules ont été recouvertes avec 5 ml de M.E.M. à 3 % de sérum de veau. Le milieu de culture a été changé après 24 heures. Les cultures cellulaires ont été observées chaque jour afin de mettre en évidence un effet cytopathogène (E.C.P.). Si la présence d'E.C.P. n'était pas détectée après 7 jours, la culture cellulaire était alors congelée

puis décongelée et 1 ml était ensemencé pour deux autres passages consécutifs. Si un E.C.P. caractéristique était au contraire observé, ou en l'absence d'E.C.P. détectable après 3 passages en subculture, une réaction d'immunofluorescence indirecte était réalisée sur Labtek (Poly Labo) pour identifier le V.R.S.B.. Le premier anticorps utilisé était un anticorps monoclonal F-spécifique (Argene Biosoft). Le deuxième anticorps était un anticorps polyclonal de lapin marqué à la fluorescéine (Diagnostic Pasteur Sanofi).

✓ Quantification du VRSB

Le titrage viral a été réalisé sur une couche unicellulaire de cellules BT dans des plaques à puits (Falcon-Subra). Deux puits ont été utilisés pour chaque dilution. Chaque puits a été ensemencé avec 200 µl d'inoculum. Après adsorption (avec une légère agitation pendant 2 heures à 37°C), l'inoculum était enlevé et chaque puits recouvert avec 1,5 ml de milieu de culture. Après 24 heures, le milieu de culture était changé. Après 5 jours de culture, les cellules étaient fixées avec du méthanol. Une coloration au May-Grumwald-Giemsa était alors réalisée. Dans la plus forte dilution où des syncytia pouvaient être identifiés, ceux-ci étaient comptés et le titre était finalement exprimé en UFS / ml de LLBA.

II.5.2.3./Mise en évidence du virus BVDV

La RT-PCR est réalisée sur l'extrémité 5' non transcrite selon le protocole décrit par HAMEL (HAMEL et *al.* 1995). La détection du BVDV a été réalisée sur les cellules du LLBA prélevées les jours J₄, J₁₀, et J₁₆ de l'essai.

II.5.3/ Lésions

A J₁₇, les veaux ont été euthanasiés par saignée après anesthésie. D'éventuelles lésions pulmonaires ont été évaluées qualitativement (nature) et quantitativement (% de lobules atteints).

II.6/ Analyse des données et statistiques

II.6.1/ Critères cliniques

- **Homogénéité entre les deux groupes** : pour chaque facteur quantitatif (fréquence respiratoire, température rectale, score clinique moyen), l'homogénéité entre les groupes est évaluée à J_0 en utilisant une analyse de variance. Toutes les comparaisons sont faites avec une précision de 5%.

- **Comparaison globale des résultats** : lorsqu'une hétérogénéité est mise en évidence à J_0 , on rééchelonne de façon à ce que les deux groupes soient comparables. Le rééchelonnement se fait en enlevant à l'ensemble des données la donnée correspondante à J_0 .

- **Une analyse en mesures répétées a été entreprise** pour analyser les critères cliniques quantitatifs selon le modèle suivant :

$$Y_{i,j,k} = \mu + \text{jour}_i + \text{groupe}_j + (\text{jour} * \text{groupe})_{i,j} + \text{veau } \{\text{groupe}\}_{k,j} + E_{i,j,k}$$

où $Y_{i,j,k}$ est la réponse (rééchelonner si nécessaire) du veau k appartenant au groupe j au jour i ;

où μ est une constante ;

où jour_i est l'effet différentiel du jour i ;

où groupe_j est l'effet différentiel du groupe j ;

où $(\text{jour} * \text{groupe})_{i,j}$ est l'effet différentiel jour i / groupe j ;

où $\text{veau } \{\text{groupe}\}_{k,j}$ est l'effet différentiel veau k dans le groupe j .

II.6.2/ Critères virologiques

La comparaison du traitement statistique est réalisée sur la P.C.R. des lavages broncho-alvéolaires, sur la culture, et sur les sécrétions nasales de la façon suivante :

➤ Dans un premier temps, le score du groupe i au jour j , noté $X_{i,j}$ est défini comme le nombre des individus de ce groupe pour lesquels le virus est détecté.

On suppose que $X_{i,j}$ suit la loi binomiale $B(5; P_{i,j})$ où $P_{i,j}$ est la proportion des individus infectés dans le groupe i et le jour j .

Ensuite, en utilisant ces scores, les différences entre les groupes sont testées pour chaque jour d'observation.

Le test unilatéral suivant est utilisé pour chaque jour (indexé par j)

$$H_{-0} : P_{2j} = P_{1j} \text{ contre } H_{-1} : P_{2j} > P_{1j}$$

Ce test consiste à montrer que le groupe témoin est significativement plus infecté ou non que le groupe vacciné (à priori moins infecté).

Enfin, un test global (pour chaque jour) est obtenu pour chaque variable en utilisant la Méthode de Bonferroni.

➤ Dans un second temps, la cinétique individuelle pour chaque variable a été résumée en considérant la première détection du virus et la durée de détection. Lorsque le virus n'a pas été détecté, le premier jour de la détection est arbitrairement fixé au dernier jour d'observation. Un tel critère permet de prendre en compte les veaux pour lesquels le virus n'a pas été détecté et ainsi d'augmenter la puissance du test. Mais, du fait de cet artifice, le critère devra être interprété comme un score qui permettra de mettre en évidence les différences entre les groupes, plutôt qu'un réel premier jour de détection.

Ainsi, pour chaque variable, la différence entre les groupes a été testée par une analyse de variance non paramétrique sur les critères de temps et de durée d'infection.

III/ RESULTATS

III.1/ Critères cliniques

Une analyse de variance faite à J_0 a montré que pour chaque critère clinique, la réponse moyenne n'est pas homogène entre les groupes. Ainsi, la comparaison des groupes a été soumise à un rééchelonnement des critères.

III.1.1/ Fréquence respiratoire

L'analyse globale de variance en mesures répétées met en évidence des différences entre l'évolution des courbes des 2 groupes (Figure 1). L'analyse jour par jour montre que la moyenne des FR rééchelonnées est significativement plus importante pour le G2 (témoin) par rapport au G1 (vacciné) de J_6 à J_{10} .

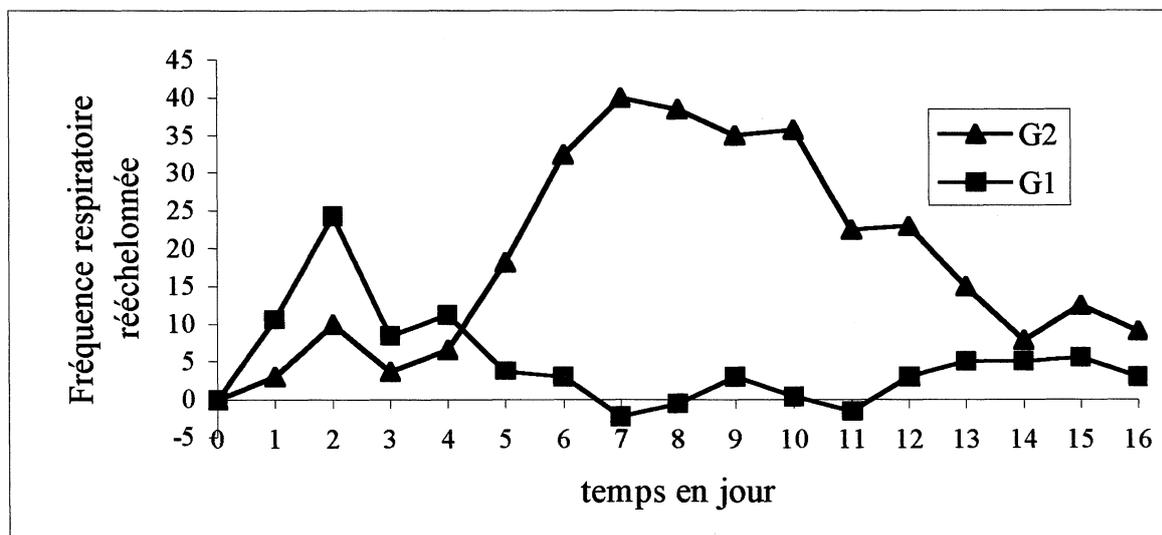


Figure 1 : Evolution des fréquences respiratoires corrigées moyennes des groupes en fonction du temps

III.1.2/ Score clinique moyen

L'analyse globale de variance en mesures répétées met en évidence des différences entre l'évolution des courbes des deux groupes (Figure 2).

L'analyse jour par jour montre que la moyenne des scores cliniques rééchelonnés est significativement plus importante pour le G₂ (témoin) par rapport au G₁ (vacciné).

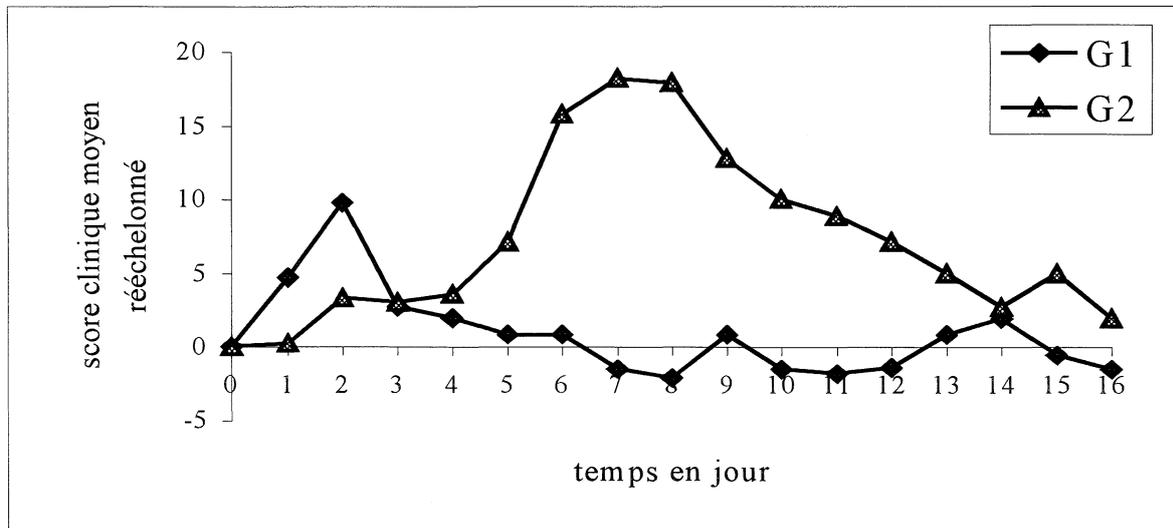


Figure 2 : Evolution par groupe des scores cliniques moyens rééchelonnés en fonction du temps

III.1.3/ Température rectale

L'analyse de variance en mesures répétées met en évidence une différence entre l'évolution des courbes des deux groupes (Figure 3).

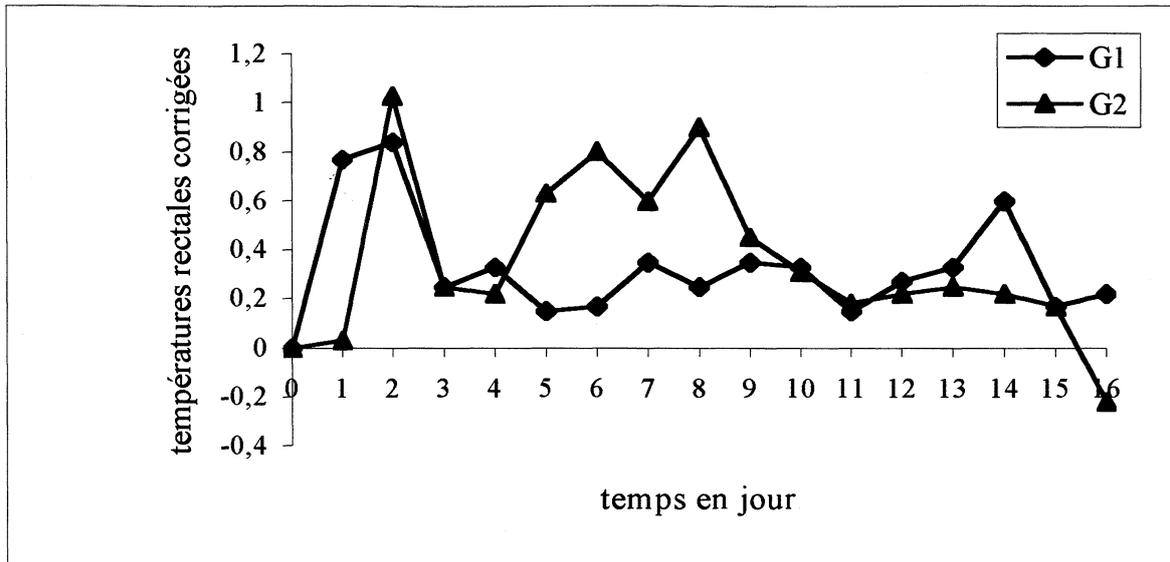


Figure 3 : Evolution des températures rectales corrigées moyennes des groupes en fonction du temps

III.2/ Critères virologiques

Nous donnons dans cette partie les résultats des analyses statistiques pour chaque variable.

Les tableaux suivants résument pour chaque jour les comparaisons qui ont été faites.

La valeur p des différents tests sera notée **p** et les symboles standards suivants seront utilisés :

| | |
|-----|------------------------|
| NS | pour $p > 5 \%$ |
| * | pour $5 \% < p < 1 \%$ |
| ** | pour $1 \% < p < 1 \%$ |
| *** | pour $1 \text{‰} < p$ |

III.2.1/ Immunodétection dans les sécrétions nasales

Le VRSB a été détecté seulement sur les veaux de G₂ (témoin) entre J₄ et J₈. (Figure 4)

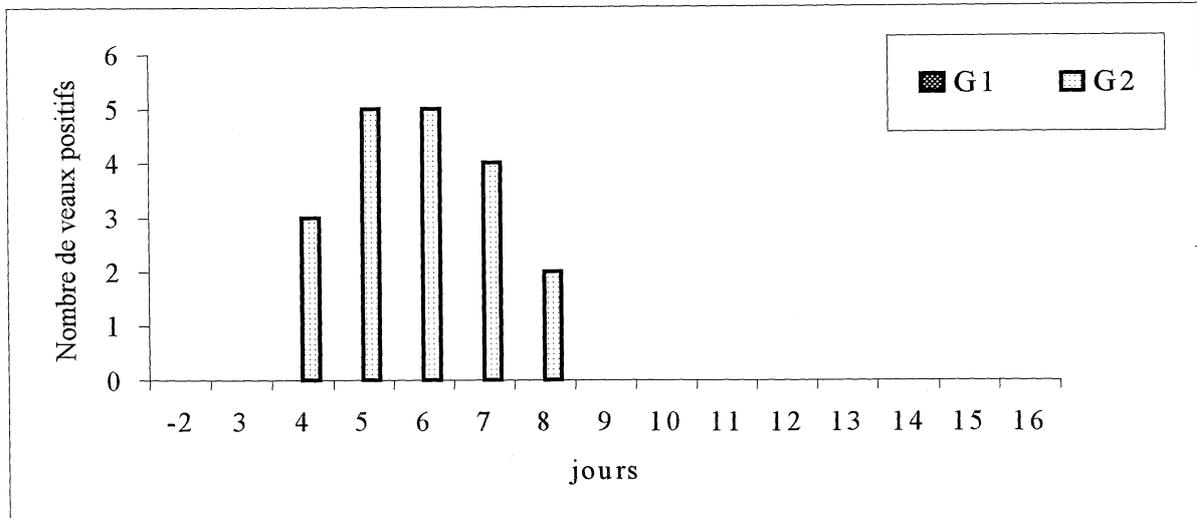


Figure 4 : Immunodétection du VRSB dans les sécrétions nasales avec le Tespack-Abbott

L'analyse globale montre que l'évolution des courbes entre G₁ et G₂ est significativement différente.

Les tests jour par jour montrent que la détection dans G₂ est significativement différente par rapport à G₁ de J₅ à J₇. (Tableau 6)

Tableau 6 : Signification statistique des résultats de comparaison de la détection du VRSB dans les SN par Tespack-Abbott entre G₂ et G₁ pour chaque jour d'observation

| | -2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|--------------------------------|----|----|----|-----|-----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| P ₂ -P ₁ | NS | NS | NS | *** | *** | * | NS |

III.2.2/ Isolement et quantification dans le LLBA

◆ Pour les veaux du G₂ (témoin), le VRSB a été isolé (Figure 5) et quantifié (Tableau 7) entre J₄ et J₈.

◆

Tableau 7 : Titre du virus VRSB dans LLBA (UFS / 10 ml)

| Groupe | Veau | - 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
|--------|------|-----|------|-------|-----|----|----|----|----|
| = 1 | 361 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 1 | 362 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 1 | 363 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 1 | 364 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 1 | 365 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 2 | 366 | 0 | 3000 | 10917 | 535 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 2 | 367 | 0 | 284 | 26000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 2 | 368 | 0 | 266 | 5688 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 2 | 369 | 0 | 7225 | 29500 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| = 2 | 370 | 0 | 912 | 18242 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |

◆ Pour les veaux du G₁, le VRSB a pu être isolé sur deux veaux (361 et 363) à J₄ et au second passage en culture. (Figure 5)

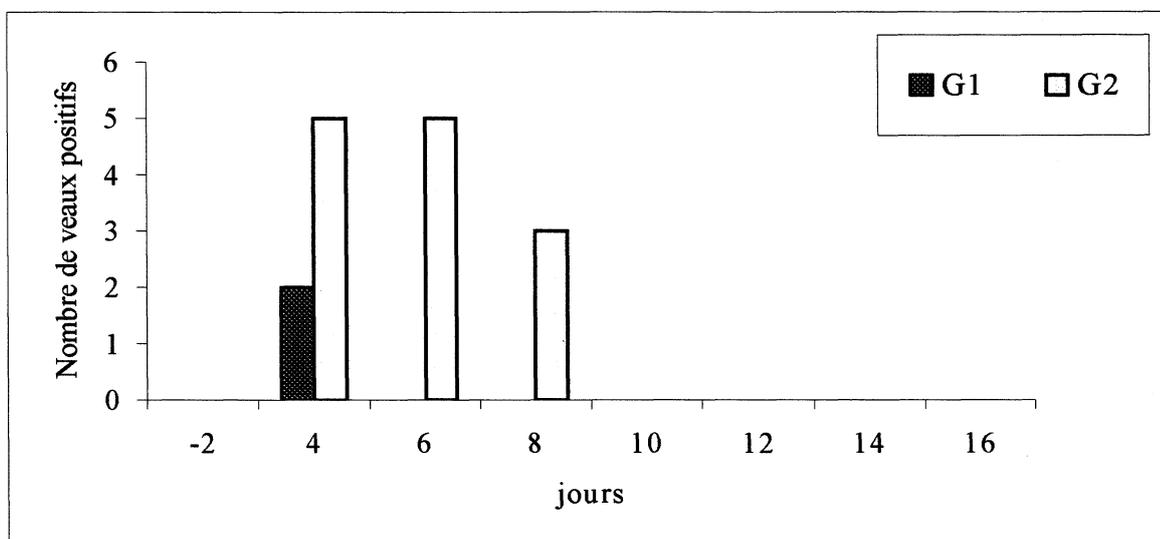


Figure 5 : Isolement du VRSB dans le LLBA

L'analyse statistique globale montre que l'évolution des courbes est significativement différente entre G_1 et G_2 .

◆ Les tests jour par jour montrent que le virus est plus souvent détecté dans le groupe 2 que dans le groupe 1 à J_6 . (Tableau 8)

Tableau8 : Signification des tests de comparaison de la détection du VRSB par isolement dans le LLBA pour chaque jour d'observation

| | | | | | | | | |
|-------------|-----|----|-----|----|----|----|----|----|
| | - 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| $P_2 - P_1$ | NS | NS | *** | NS | NS | NS | NS | NS |

◆ Le test non paramétrique montre que le virus a été détecté plus tôt et plus longtemps dans G_2 que dans G_1 . (Tableau 9)

Tableau9 : signification statistique des comparaisons G_2 / G_1 par un test unilatéral non paramétrique, pour le premier temps de détection et la durée de détection du VRSB par isolement dans le LLBA

| | | |
|-------------|-------|-------|
| | Temps | Durée |
| $P_2 - P_1$ | * | ** |

III.2.3/ n-RT-PCR sur le LLBA

◆ Pour les veaux du G_2 (témoin), le gène N du VRSB a pu être détecté par n-RT-PCR entre J_4 et J_{10} (5/5) et ultérieurement jusqu'à J_{16} (1/5). (Figure 6)

Pour les veaux du G_1 (vaccinés), le gène N du VRSB. a pu être détecté par n-RT-PCR à J_4 (4/5) et J_6 (2/5). (Figure 6)

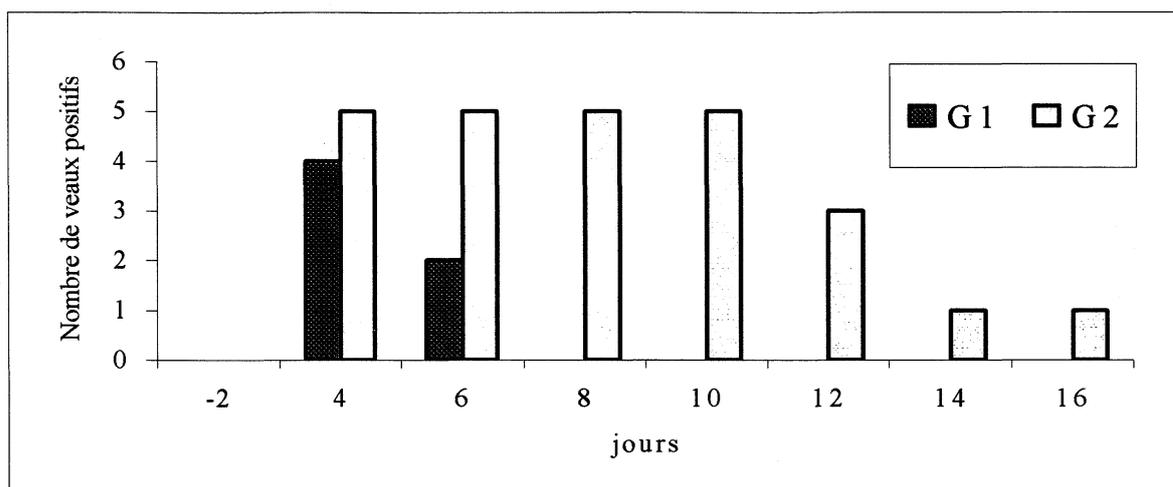


Figure 6 : Détection du gène N du VRSB par n-RT-PCR dans le LLBA

L'analyse globale montre que l'évolution des courbes entre G_1 et G_2 est significativement différente.

◆ Les tests jour par jour montrent que le virus est plus souvent détecté dans G_2 que dans G_1 de J_8 à J_{10} . (Tableau 10)

◆

Tableau 10 : Signification des tests de comparaison de la détection de VRSB par n-RT-PCR dans le LLBA pour chaque jour d'observation

| | - 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
|-------------|-----|----|----|-----|-----|----|----|----|
| $P_2 - P_1$ | NS | NS | NS | *** | *** | NS | NS | NS |

◆ Le test non paramétrique montre que le virus est détecté plus longtemps dans G_2 que dans G_1 . (Tableau 11)

Tableau 11 : Signification statistique des comparaisons G_2 / G_1 par un test unilatéral non paramétrique, pour le premier temps de détection et la durée de détection du VRSB par n-RT-PCR dans le LLBA

| | Temps | Durée |
|-------------|-------|-------|
| $P_2 - P_1$ | NS | ** |

III.2.4/ Critères lésionnels macroscopiques

Pour chaque veau des 2 groupes, aucune lésion de pneumonie n'a été observée macroscopiquement à l'autopsie à J₁₇.

III.2.5/ Détection des bactéries et du BVDV

Aucune bactérie pathogène n'a été isolée sur les échantillons du poumon.

Le BVDV n'a pu être détecté par RT-PCR sur des tests effectués à J₄, J₁₀ et J₁₆ sur les cellules du LLBA.

IV/ DISCUSSION

IV.1/ Modèle expérimental

Différents modèles expérimentaux (espèces, techniques d'inoculation, outils de suivi) ont été développés pour évaluer le pouvoir pathogène du VRSB ou pour tester l'efficacité des vaccins.

IV.1.1/ Animaux

IV.1.1.1/ Espèce

La réplication virale se réalise dans le tractus respiratoire. Les symptômes, les lésions et la réaction immunitaire doivent être proches de ceux présentés par l'hôte naturel.

L'agneau, mais aussi la souris, le rat des cotonniers, le cobaye, le hamster, le furet, le vison et le singe remplissent plus ou moins complètement les conditions citées.

IV.1.1.1.1/ Le veau

Le veau a souvent été utilisé pour étudier le VRSB, dont il est l'hôte naturel, mais aussi le VRSH (Jacobs et Edington, 1975 ; Thomas et *al.*, 1984 *b*) et le V.R.S.Ovin (VRSO) . (Bryson et *al.*, 1988).

Dans cette espèce, des signes cliniques ont pu être reproduits (Belknap, 1991 ; Bryson, 1983 ; Mc Nulty, 1983).

IV.1.1.1.2/ L'agneau

L'agneau a fait l'objet d'inoculation expérimentale avec du V.R.S.B. (Lehmkuhl, 1979 ; Trigo et *al* 1984 ; Sharma , Woldehiwet.1990a), mais aussi avec du V.R.S.O. (Bryson et *al* 1988) et du V.R.S.H. (Lapin et *al* 1993).

De par sa facilité d'entretien, cette espèce permet à la fois un travail sur des effectifs élevés (Trigo et *al* 1984) et des euthanasies séquentielles utiles en histopathologie. En revanche, les

troubles respiratoires et les lésions sont souvent de faible intensité (Lehmkuhl et Cutlip 1979). Une inoculation parallèle avec *Pasteurella haemolytica* permet d'exacerber les troubles cliniques (Al Darraji 1982.).

IV.1.1.1.3/ Autres espèces

Les autres espèces sont essentiellement utilisées pour étudier le VRSH. Parmi les primates, le chimpanzé apparaît le plus sensible au VRSH, mais il n'est pas souvent utilisé du fait de sa rareté, de son prix et des difficultés d'entretien (Belshe et *al* 1977 ; Kakuk et *al* 1993).

Les autres espèces sensibles sont le vison (Coates et Chanock, 1962), le furet (Prince et Porter 1976.), la souris et le rat des cotonniers (Collins et *al* 1996). Les signes cliniques après infection sont très réduits à nuls. La pertinence de la réaction immune par rapport aux témoins reste à démontrer.

IV.1.1.2/ Age

L'expression clinique et lésionnelle est apparue maximale sur des veaux de 3 à 6 jours (Bryson, 1983). Toutefois, des veaux de cet âge sont très rarement atteints dans les conditions naturelles.

Les inoculations sont souvent réalisées entre 4 et 10 semaines (Smith et *al* 1975 ; Mohanty, 1975 ; Moteane, 1977 ; Kimman et *al* 1987).

Les veaux de notre étude ont été inoculés entre 10 et 11 semaines. Cet âge correspond d'une part à ce qui est observé en pathologie naturelle. D'autre part, le temps nécessaire au protocole vaccinal et à la mise en place de l'immunité ne permettait pas de les inoculer plus jeunes.

IV.1.1.3/ Statut sérologique

Les veaux de notre étude ont été privés de colostrum. Tous étaient séronégatifs avant la vaccination. Le lot témoin l'est resté alors que les anticorps sont apparus après vaccination dans le groupe 1. L'expression clinique a été maximale sur le lot témoin en accord avec les expériences les plus récentes (Belknap, 1991). En revanche l'utilisation de veaux séronégatifs s'éloigne des conditions de terrain. Il paraît par ailleurs souhaitable d'évaluer la protection lors de vaccination de veaux initialement pourvus d'anticorps d'origine maternelle, afin d'évaluer une possible interférence.

IV.1.1.4/ Statut vis à vis d'organismes pathogènes spécifiques

La plupart des veaux utilisés sont élevés de façon conventionnelle (Castleman et *al* 1985 *a* ; Ciszewski et *al* 1991 ; Belknap et *al* 1995). Cependant, certains essais ont eu recours à des veaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques (Thomas et *al* 1984 *b* ; Kimman et *al* 1987 ; Van der Poel, 1996). C'est le cas de notre étude : les veaux sont nés par césarienne et ont été isolés.

Il existe, enfin, des veaux dits axéniques. L'élevage de ces veaux nécessite des précautions très lourdes à assumer.

IV.1.2/ Inoculum et techniques d'inoculation

Le choix de l'inoculum et la technique d'inoculation sont le deuxième point majeur qui caractérise un modèle expérimental. Sur ce point, les différences entre les modèles sont encore plus marquées que sur le choix des animaux.

IV.1.2.1/ Les différents inoculums

Les inoculums diffèrent par l'origine du virus, la technique de culture, le titre et le contrôle des autres virus respiratoires pathogènes.

IV.1.2.1.1/ Origine du virus

La souche utilisée est la souche A₂, isolée à l'ENVT, lors d'une sévère épidémie en 1994. Bien que le virus utilisé soit souvent isolé d'une épizootie (Inaba et *al* 1972 ; Smith et *al* 1975 ; Kimman et *al* 1987), ceci ne conditionne pas toujours la réussite de l'inoculation (Smith et *al* 1975).

IV.1.2.1.2/ Culture du virus

La virulence semble associée au nombre de passages du virus sur cellules. Le virus de notre inoculum est passé 6 fois en culture cellulaire. Dans les essais rapportés le nombre de passages varie de 0 (Van der Poel, 1996) à plus de 20 (Thomas et *al* 1984). Les expériences les plus récentes utilisent les inoculums où le virus a subi un petit nombre de passages en culture cellulaire (moins de 5). (Ciszewski et *al* 1991 ; Kimman et *al* 1987). Le faible nombre de passages en culture est associé à une virulence accrue (Belknap, 1995).

IV.1.2.1.3/ Titre en virus et volume de l'inoculum

Le titre en virus de l'inoculum a été exprimé en UFS / ml (Unité Formant Syncytium par millilitre). Notre inoculum titrait entre 1 et $2,5 \times 10^5$ UFS/ ml selon le jour de l'inoculation. Les titres sont en général voisins de 10^5 UFS / ml. Le volume de l'inoculum administré est très variable (Mohanty, 1975 ; Elazhary et *al* 1980 ; Kimman et *al* 1987, Belknap et *al* 1991)

IV.1.2.1.4/ Statut de l'inoculum vis à vis des virus respiratoires majeurs

Dans notre inoculum, aucun autre virus respiratoire majeur (BHV₁, PI₃, Coronavirus, Mastadenovirus, BVDV) n'a pu être détecté par culture ou immunodétection. Bien qu'il paraisse évident de s'assurer que l'inoculum soit dépourvu de virus pathogène, la majorité des études ne rapporte rien concernant l'absence de BHV₁, PI₃, Coronavirus ou Mastadenovirus (Inaba et *al* 1972 ; Jacobs , Edington 1975 ; Mohanty, 1975 ; Prince, 1976 ; Smith , Porter 1975). Seul le BVDV a récemment été pris en compte.

IV.1.2.2/ Les différentes techniques d'inoculation

Les techniques d'inoculation diffèrent par la voie choisie et par la fréquence retenue.

IV.1.2.2.1/ Les différentes voies

L'inoculation par voie intranasale est la plus fréquemment utilisée (Jacobs, 1975 ; Elazhary et *al* 1980 ; Thomas et *al* 1984 ; Van der Poel, 1996). Néanmoins, ce type d'inoculation est souvent à l'origine de troubles cliniques discrets.

Une autre méthode d'inoculation consiste à nébuliser l'inoculum à l'aide d'un masque, ce qui se rapproche des conditions naturelles d'infection (Stewart, Gershwin 1989 ; Otto et *al* 1996 ; Gershwin et *al* 1998).

Enfin, l'inoculation combinée par voie intranasale et endotrachéale a été utilisée par plusieurs expérimentateurs (Mohanty et *al* 1975 et 1976 ; Bryson et *al* 1983, Castleman et *al* 1985 ; Kimman et *al* 1987 ; Ciszewski et *al* 1991). Cette méthode a été retenue dans notre essai. La voie endotrachéale permet d'éviter les pertes par déglutition et court-circuite les défenses des voies respiratoires hautes. Cependant, cette voie s'éloigne des conditions naturelles d'infection. On peut en outre lui reprocher d'induire une irritation lors de l'endoscopie intratrachéale ; ce point est néanmoins à nuancer puisque l'irritation est identique pour le lot témoin.

IV.1.2.2.2/ La fréquence d'inoculation

Dans notre essai, les veaux ont été inoculés 3 fois à 24 heures d'intervalle. Les expérimentateurs ayant procédé à 1 ou 2 inoculations par jour pendant 3 à 4 jours (Bryson et *al* 1983 ; Kimman et *al* 1987, Belknap et *al* 1991) semblent avoir obtenu des signes cliniques beaucoup plus marqués que ceux n'ayant procédé qu'à une seule inoculation (Inaba et *al* 1972 ; Mohanty, 1975 ; Moteane et *al* 1977).

IV.1.3/ Suivi des animaux en post-inoculation

IV.1.3.1/ Suivi clinique et lésionnel

IV.1.3.1.1/ Suivi clinique

Nombreux sont les expérimentateurs qui n'ont obtenu aucune expression clinique lors d'infection expérimentale avec le V.R.S.B. (Inaba et *al* 1972 ; Jacobs et Edington 1975 ; Mohanty et *al* 1975 ; Moteane et *al* 1977 ; Odegaard , Krogsrud 1977 ; Stott et *al* 1978). Lors de succès (Bryson et *al* 1983 ; Kimman et *al* 1987 ; Belknap et *al* 1991), les manifestations cliniques doivent s'appréhender d'un point de vue quantitatif pour certaines, qualitatif pour d'autres.

Ainsi, notre suivi clinique a été confié deux fois par jour à un même clinicien qui a relevé les paramètres quantitatifs (températures rectales, fréquence respiratoire, toux, refus de lait et de concentrés) et les paramètres qualitatifs (comportement général, écoulements nasaux, dyspnée).

La traduction de l'ensemble de ces paramètres sur une échelle de gravité a permis, en pondérant chaque paramètre, la détermination d'un score clinique. Ainsi, les comparaisons entre lots ont-elles été possibles.

Le critère « taux de mortalité » n'apparaît pas dans notre suivi , compte tenu de l'absence de létalité dans les modèles expérimentaux. Un tel critère n'est évaluable que dans un second temps, sur un essai terrain.

IV.1.3.1.2/ Suivi lésionnel

Le suivi lésionnel implique une autopsie qui n'est pratiquée qu'à la fin de l'essai dans beaucoup d'études. Cependant, certains expérimentateurs ont procédé à des euthanasies séquentielles (Moteane et *al* 1977 ; Trigo et *al* 1984, Bryson et *al* 1983, Castleman et *al* 1985). Quoique nécessitant un effectif important au départ, ces études ont montré que les lésions les plus marquées apparaissent avant J₁₀ (Bryson et *al* 1983) et qu'elles disparaissent

après J₁₇ (Castleman et *al* 1985). Dans notre étude , les autopsies à J₁₇ sont donc un peu tardives ; il s'agit d'un choix privilégiant le suivi virologique.

IV.1.3.2 Suivi virologique

Lorsque les modèles expérimentaux sont utilisés pour évaluer l'efficacité d'un vaccin, les paramètres cliniques et lésionnels sont souvent insuffisants. Ainsi, un suivi de l'excrétion virale est généralement réalisé (Mohanty et *al* 1976 ; Elazhary et *al* 1980 ; Thomas et *al* 1984 ; Kimman et *al* 1987 ; Van der Poel, 1996).

IV.1.3.2.1/ Prélèvements

Notre suivi a porté sur des écouvillonnages nasaux réalisés de façon quotidienne , et sur des lavages bronchoalvéolaires (LBA) pour optimiser la détection du virus à l' étage pulmonaire.

Sur des enfants, le LBA permet de détecter un plus grand nombre de positifs que l'écouvillonnage nasal, que l'on utilise par la suite l'isolement ou l'immunomarquage (Master, 1987 ; Derish, et *al* 1991). De même, sur 4 veaux infectés expérimentalement, le VRSB a été détecté par isolement ou immunofluorescence plus souvent à partir de prélèvements par LBA que par écouvillonnages nasaux (Kimman et *al* 1986).

Les prélèvements issus du tractus respiratoire profond semblent donc, *à priori*, plus riches en virus. En effet le LBA est riche en cellules, le VRSB a une localisation pulmonaire et est fortement lié aux cellules.

La nature invasive de l'endoscopie nécessaire à la réalisation du LBA est susceptible de faire augmenter les scores cliniques. Il n'en reste pas moins que, dans l'absolu, c'est la différence entre les lots qui prévaut sur les scores cliniques.

IV.1.3.2.2/ Techniques de mise en évidence

Si le prélèvement conditionne la performance du suivi virologique, la technique de mise en évidence est, elle aussi, déterminante.

IV.1.3.2.2.1/ Isolement viral et quantification

Dans notre essai, la technique d'isolement viral a été appliquée sur le LLBA (cf. calendrier). Les échantillons ont été traités dans un délai très court (moins de 30 mn). L'isolement a été réalisé sur une couche unicellulaire de cellules BT. D'autres expérimentateurs avaient déjà utilisé ce type de cellules (Werdin et Baker, 1985 ; Mohanty et al 1978). Des cellules de poumon de veau fœtal (Pacaud and Jacquier) ou des cellules de rein de veau fœtal (Wellemans and Leunen, 1975) peuvent également servir de support.

Cette méthode est la seule qui permette une approche quantitative de la charge virale. Cependant, elle est peu utilisée en routine car c'est une méthode contraignante. En effet, les échantillons doivent être traités très rapidement (moins d'1 heure) du fait de la labilité du virus. Les prélèvements sur le tractus respiratoire haut sont plus difficiles à traiter car les contaminations fongiques et bactériennes, très fréquentes, gênent l'isolement. Enfin, l'apparition d'un ECP peut nécessiter plusieurs passages et être observée seulement au bout de 30 jours de culture (Pacaud and Jacquier, 1970).

IV.1.3.2.2.2/ Détection d'antigènes

La détection d'antigènes sur les écouvillons nasaux a fait appel au Test pack ABBOT qui utilise une technique d'immunocapture d'antigènes. Cette technique est plus facile à utiliser que l'I.F. ; elle offre une plus grande rapidité d'exécution et d'obtention des résultats.

L'I.F. permet de détecter un plus grand nombre d'échantillons positifs et sur une plus longue période que l'isolement viral (Mc Nulty et al 1983 ; Kimman et al 1986 ; Collins et al 1996).

L'immunocapture d'antigènes s'avère plus sensible et spécifique que l'I.F. et l'isolement viral pour la mise en évidence de VRSH (Ahluwalia et Hammond, 1988 ; Hughes, 1988).

Enfin, l'isolement viral est délicat à partir d'échantillons des voies nasales car ceux-ci présentent de nombreuses contaminations fongiques et bactériennes qui gênent l'isolement.

IV.1.3.2.2.3/ Détection d'ARN viral

Notre étude a utilisé, pour l'analyse des LLBA une technique de transcription reverse, puis d'amplification génique (RT-PCR) localisée sur le gène de la nucléoprotéine. Cette technique permet de doubler la fenêtre de détection par rapport aux techniques conventionnelles de culture ou d'immunodétection (Valarcher et al; 1999).

Plusieurs RT-PCR ont été développées pour le VRSH. Si certaines ont permis d'améliorer les performances de détection par rapport à la détection d'antigènes (Freyth, 1995 ; Henkel et al 1997), d'autres avaient une sensibilité équivalente (Van Milaan, 1994) ou inférieure (Cubie, 1992 ; Paton, 1992).

Pour le VRSB, 3 RT-PCR localisées sur F(2) et sur G(1) ont été décrites (Oberst et al 1993 ; Vilcek, 1994). Seules les RT-PCR développées par Vilcek ont été évaluées : au cours d'une infection expérimentale, l'excrétion détectée par RT-PCR localisée sur F, dans les sécrétions nasales, dure jusqu'à 8 jours après l'inoculation (West, 1998).

IV.1.4/ Conclusion sur le modèle expérimental

Notre modèle expérimental présente deux caractéristiques marquées :

- Il s'agit d'un modèle expressif sur le plan clinique.
- En outre, il fait appel à des critères d'évaluation virologique très complets ; l'étage nasal et l'étage bronchopulmonaire sont explorés en faisant appel à des techniques diversifiées comprenant l'isolement viral, la détection d'antigènes par immunocapture enzymatique et la détection d'ARN viral par RT-PCR.

IV.2/ Les résultats

Deux critères majeurs sont évalués : l'innocuité et l'efficacité.

IV.2.1/ Innocuité du vaccin

L'évaluation de l'innocuité a une importance très particulière dans le cas des vaccins VRSH. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué dans la première partie, le lot 100 du premier vaccin VRSH développé dans les années 60, inactivé au formol et précipité à l'alun, a provoqué chez les enfants vaccinés, lors d'infections sauvages ultérieures, des troubles beaucoup plus graves que chez les enfants témoins immunisés avec un virus *para-influenza*. Cet épisode a jeté la suspicion sur les vaccins inactivés, alors que pour le VRSB, certains ont montré une innocuité satisfaisante (Baker. 1991. Mohanty et *al* 1981.). Inversement, si les vaccins vivants modifiés sont souvent considérés comme non susceptibles d'induire des réactions immunopathologiques chez les animaux vaccinés (Kelling et *al* 1993), des accidents ont parfois été répertoriés (Kimman et *al.* 1989d).

Le vaccin que nous avons évalué est un vaccin vivant modifié. Dans notre essai, il a montré une totale innocuité. Son niveau de virulence résiduelle, critère déterminant pour ce type de vaccin, a paru bon.

Cependant l'innocuité du vaccin mériterait d'être évaluée sur des veaux séropositifs (immunité active ou passive). Enfin, la possibilité de réversion de virulence et d'extension latérale ne pourra être écartée qu'après une évaluation spécifique.

IV.2.2/ Efficacité du vaccin

IV.2.2.1/ Résultats cliniques

On a déjà exposé la difficulté d'obtenir des signes cliniques lors d'infection expérimentale par le VRSB . Beaucoup d'expérimentateurs ont échoué par le passé. Ceci rend difficile l'évaluation d'un vaccin sur les seuls critères cliniques.

Cependant, dans notre étude, le score clinique moyen et les fréquences respiratoires ont été significativement supérieurs dans le lot témoin non vacciné par rapport au lot vacciné entre J₆ et J₁₀. Le caractère expressif de notre modèle expérimental permet de démontrer l'efficacité du vaccin sur les seuls critères cliniques.

IV.2.2.2/ Résultats virologiques

Le virus n'a été mis en évidence par immunodétection dans les sécrétions nasales que sur le lot témoin non vacciné de J₄ à J₈ ; le virus a été isolé et quantifié dans le LLBA entre J₄ et J₈ sur tous les veaux du lot témoin alors qu'il ne l'a été qu'à J₄ et sur seulement deux veaux dans le lot vacciné ; le gène N du VRSB a été détecté par n-RT-PCR sur les veaux du groupe témoin entre J₄ et J₁₆ alors qu'il ne l'a été qu'à J₄ et J₆ sur au maximum 4 des 5 veaux du lot vacciné.

Ainsi, tous les veaux du groupe témoin non vacciné ont été infectés par le VRSB. L'identification du VRSB dans les sécrétions nasales à J₄ alors qu'il était absent à J₃ montre que le virus s'est bien développé dans le tractus respiratoire des veaux non vaccinés et qu'il ne s'agit pas des virus rémanents issus de l'inoculation. La comparaison entre le groupe vacciné et le groupe témoin montre clairement et significativement pour les trois méthodes d'identification virale et pour les deux étages du tractus respiratoire , l'efficacité du vaccin testé.

IV.2.3/ Conclusion sur les résultats

L'essai réalisé démontre l'efficacité du vaccin. Ceci demande à être confirmé par un essai terrain.

Conclusions

Le VRSB est un pathogène respiratoire majeur en élevage bovin. La séroprévalence des adultes et le taux de mortalité chez les jeunes bovins rendent nécessaire la mise au point de vaccins. Beaucoup ont été développés ou sont en cours de développement en médecine vétérinaire pour le VRSB. La médecine humaine s'intéresse aussi au développement de vaccins contre le VRSH.

L'objet de notre étude visait à évaluer en station l'efficacité et l'innocuité d'un vaccin contre le VRSB. Notre modèle expérimental présente différentes qualités :

- Il est très expressif.
- Les critères d'évaluation virologique sont très complets ; l'étage nasal et l'étage bronchoalvéolaire sont explorés en faisant appel à des techniques diversifiées comprenant l'isolement viral, la détection d'antigènes par immunocapture enzymatique et la détection d'ARN viral par RT-PCR.

Dans les conditions d'évaluation en station, le vaccin s'est révélé d'une bonne innocuité et d'une efficacité satisfaisante.

La durée de l'immunité n'a pas été évaluée. La dissection de la réponse protectrice nous éclairerait aussi sur la part à attribuer à l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Enfin, les résultats que nous avons obtenus nécessitent obligatoirement d'être confirmés par un essai terrain.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

M. Joël VIGNES

a été admis(e) sur concours en : 1994

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 16 septembre 1998

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, F. SCHELCHER, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

déclare que j'ai lu la thèse de :

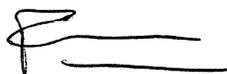
M. Joël VIGNES

intitulée :

" Infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin : application à l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin"

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



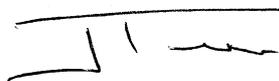
Professeur François SCHELCHER

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



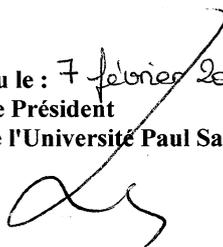
Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur Jacqueline PUEL

**Vu le : 7 février 2002
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur Raymond BASTIDE



REFERENCES

AHLUWALIA , G.S. and HAMMOND , G.W.. 1988. Comparison of cell culture and three enzyme linked immunosorbent assays for the rapide diagnosis of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirate and tracheal secretion specimens. *Diagn. Microbiol. Infect . Dis.* 9 , 182-187.

AL-DARRAJI, A.M., CUTLIP, R.C., LEHMKUHL, H.D., GRAHAM, D.L.. 1982. Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and *pasteurella haemolytica* : clinical and microbiologie studies. *Am. J. Vet. Res.* 42 : 224-229.

AMES T.R The epidemiology of BRSV infection. *Vet. Med.* 1993 : 881-884

ANDERSON L.J., HEILMAN C.A. Protective and disease-enhancing immune responses to respiratory syncytial virus. *J. Inf.Dis* 1995,171: 1-7.

BAKER J.C. Human and bovine respiratory syncytial virus: immunopathologic mechanisms. *Vet . Quart.* 1991,13: 47-59

BAKER J.C et al. Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle. *Am.J.Vet.Res.*1985,46:891-892.

BAKER J.C et al. Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a diary herd. *Am.J.Vet.Res.*1986a47:240-245.

BAKER, J.C., VELICER, L.F.. Bovine respiratory syncytial virus vaccination : current status and future vaccine development. *Comp. Cont. Educ. Food Animal*, 1991, 13 : 1323-1324.

BAKER J.C. et al. Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. *J.Microbiol.*1992,30:1120-1126.

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. Inf. Dis.* 163, 470-476.

BELKNAP E.B. et al. Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs .J.Vet.Diagn.Invest.1995,7: 285-298.

BELSHE R.B., RICHARDSON ,L.S .,LONDON ,W.T.,et al. 1977. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates J. Med. Virol. 1 157-162.

BRYSON D.G et al. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. Epidemiological and clinical findings.Vet.Rec.1978,103: 485-489.

BRYSON D.G et al. Studies on the pathogenesis and interspecies transmission of respiratory syncytial virus isolated from sheep.Am.J. Vet .Res. 1988,49:1424-1430.

CASTELMAN W.L et al. Experimental Bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves:light microscopic lesions,microbiology,and studies on lavaged lung cells.Am.J.Vet.Res.1985a,46:547-553.

CASTELMAN W.L et al. Experimental Bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves:ultrastructural respiratory lesions.Am.J.Vet.Res.1985b,46:554-560.

CHOMCZYNSKI P. et SACCHI K. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extration. Analyt. Biochem. 1987, 162 : 156-159.

CISZEWSKI D.K. et al. Experimental reproduction of respiratory tract disease with bovine respiratory syncytial virus.Vet.Microbiol.1991,28:39-40.

COATES , H.V. and Chanock, R.M.. 1962. Experimental infection with respiratory syncytial virus in several species of animals . Am J. Hyg. 76, 302-312.

COLLINS P.L The molecular biology of Human respiratory Syncytial Virus (RSV) of genus Pneumovirus in D.W KINGSBURY.The Paramyxoviruses,1991:103-162,Plenum Press, New York, USA.

COLLINS P.L. et al. Respiratory syncytial virus in B.N FIELDS, D.M KNIPE, P.M HOWLEY et al. Fields Virology 3 rd ed.1996: 1313-1351, Lippincott Raven Publ.,Philadelphia, USA.

CUBIE , H.A., INGLIS,J.M. ,LESLIE, E.E., EDMUNDS, A.T. and TOTAPALLY, B.. 1992. Detection of respiratory syncytial virus in acute bronchiolitis in enfants. J. Med. Virol. 38 : 283-287.

DE JONG M.C.M et al. A quantitative investigation into outbreaks of bovine respiratory syncytial virus infections in cattle herds. Am. J. Vet. Res. 1996, 57:628-633.

DERISH , M.T., KULHANJIAN, J.A.,FRANKEL, L.R. and SMITH, D.W.. 1991. Value of bronchoalveolar lavage in diagnosing severe respiratory syncytial virus infections in infants. J. Pediat. 119, 761-763.

DORELEIJERS , J.F., LANGEDIJK, J.P.M., HARD, K ., et al. 1996. Solution structure of immunodominant region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. Biochemistry 35, 14684-14688.

DUNCAN R.B., POTGIETER L.N.D. Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunoprophylaxis in ruminants . Vet. Microbiol. 1993,37:319-341.

ELAZHARY M.A.S.Y. et al. Experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus (Quebec strain). Can. J. Comp. Med. 1980, 44: 390-395.

ELLIS J.A et al. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1995, 206:354-361.

ELLIS J.A et al. Fatal pneumonia in adult dairy cattle associated with acute infection with bovine respiratory syncytial virus. Can. Vet. J. 1996, 37:103-104.

ELVANDER M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet. Rec. 1996, 138:101-105.

FIELD E.W., SMITH M.H. Cell mediated immune response in cattle to bovine respiratory syncytial virus. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45:1641-1643.

FLORMAN A.L., Mc LAREN L.C. The effect of altitude and weather on the occurrence of outbreaks of respiratory syncytial virus infections. *J. Infect. Dis.*, 1988, 158: 1401-1402.

FREYMUTH , F., EUGENE, G., VABRET, A., et al. 1995. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 3352-3355.

FURZE J et al. Antigenic heterogeneity of the attachment protein J. *Gen. Virol.* 1994, 75:363-370.

GADDUM R.M. et al. Mutant forms of the F protein of human respiratory syncytial (RS) virus induce a cytotoxic T lymphocyte response but not a neutralizing antibody response and only transient resistance to RS virus infection. *J. Gen. Virol.* 1996a, 77:1239-1248.

GADDUM R.M. et al. Primary cytotoxic t-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves. *Immunology* 1996b, 88: 421-427.

GERSWHWIN, L.J., SCHELEGLE, E.S., GUNTHER , R.A. ,et al. 1998. A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. *Vaccine* 16, 1225-1236.

HALL C.B. et al. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Inf. Dis.* 1991,163:693-698.

HAMEL A .L. et al. Rapid detection of Bovine Viral Diarrhea Virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 : 287-291.

HENKEL , J.H., ABERLE, S.W., KUNDI , M. and POPOW-KRAUPP , T.. 1997. Improved detection of respiratory virus in nasal aspirates by seminested RT-PCR. *J. Med. Virol.* 53 : 366-371.

HUGHES , J.H., MANN, D.R. and HAMPARIAN, V.V.. 1988. Detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens by viral culture, direct and indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. *J. Clin. Microb.* 26 , 588-591.

INABA Y. et coll. Bovine respiratory syncytial virus: studies on an outbreaks in Japan. *Jpn J. Microbiol.* 1972, 16: 373-383.

JACOBS J.W., EDINGTON N. Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.* 1975 ,18: 299-306.

JOHNSON P.R. et al. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evalutio of the contribution of F and G glycoproteins to immunity. *J. Virol.* 1987,61: 3163-3166.

JOHNSON, P.R., and COLLINS, P.L.. 1989. The 1B(NS2), 1C(NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic serogroups A and B : sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70, 1539-1547.

KAKUK, T.J., SOIKE, K., BRIDEAU, R.J. et al. 1993. A human respiratory syncytial virus (RSV) primate model of enhanced pulmonary pathology induced with a formalin-anactivated RSV vaccine but not a recombinant FG subuniy vaccine . *J. Inf. Dis.* 167, 553-561.

KELLING, C.L. 1993. Controlling BRSV infected in calves. *Vet. Med.* 903- 906.

KELLING C. L. et al. Potentiation of bovine respiratory syncytial virus infection in calves by bovine viral diarrhoea virus. *Proc. 19 th World Buiatric Congress Edimburgh, Scotland, 1996,* p20-26.

KEY D. W., DERBYSHIRE J. B. Serological studies of parainfluenza type3 virus bovine adenovirus type3 and respiratory syncytial virus infection in beef calves. *Vet. Microbiol.* 1984, 9: 587-592.

KIMMAN T. G. The immune response to and pathogenesis of BRSV infections. *Vet. Med.* 1993: 1196-1204.

KIMMAN T.G. et al. Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47: 143-147.

KIMMAN T.G. et al Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25: 1097-1106.

KIMMAN T. G. et al. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet. Rec.* 1988,123: 104-109.

KIMMAN T. G. et al. A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine. *Vet. Quart.* 1989d, 11: 250-253.

LANGEDIJK , J.D.M., SCHAAPER , V.M.M., MEULOEN, R.H.,and VAN OIRSCHOT, J.T..1996b. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus *J. Gen. Virol.* 77, 1249-1257.

LANGEDIJK , J.P.M., MELEON,R.H., TAYLOR ,G.et al.1997. Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 71, 4055-4061.

LAPIN C.D. et al. A lamb model for human respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Pulmonol.* 1993, 15: 151-156.

LEHMKULH H. D. et CUTLIP R. C. Experimental respiratory syncytial virus infection in feeder-âge lambs. *Am J. Vet. Res.* 1979, 40: 1729-1730.

LERCH R. A. et al. Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. *J. Virol.* 1989, 63:833-840.

Mc CONNOCHIES K. M. et al. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtypes *J. Pediatr.* 1990, 117: 52-62.

Mc NULTY M. S. et al. Experimental respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: microbiologic and immunofluorescent findings. *Am. J. Vet. Res.* 1983, 44: 1656-1659.

MAHIN L., SHIMI A. Weather and bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Rec.* 1982, 111: 87.

MARTINEZ, I., DOPAZO, J., and MELERO, J.A.. 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 78, 2419-2429.

MASTER, H.B., WEBER, K.O., GROOTHUIS, J.R. and WREN, C.G., 1987. Comparison of nasopharyngeal washings and swab specimens for diagnostic of respiratory syncytial virus by EIA, EAT and cell culture. *Diag. Microb. Infect. Dis.* 16, 105-109.

MOHANTY, S.B., INGLID, A. and LILLIE, M.G. 1975. Experimentally induced respiratory syncytial virus infection in calves. *Am. J. Vet. Res.* 36, 417-419.

MOHANTY S. B. et al. Effect of serum and nasal neutralizing antibodies on bovine respiratory syncytial virus infection on calves. *J. Inf. Dis.* 1976, 134: 409-413.

MOHANTY, S.B.. 1978. Bovine respiratory viruses. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 22, 83-109.

MOHANTY, S.B., et al. Effect of serum antibodies on bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42: 881-883.

MOTEANE M. et al. Studies on the occurrence and significance of bovine respiratory syncytial virus in Saskatchewan. *Can J. Comp. Med.* 1977, 42: 246-248.

OBERTS R.D. et al. Characteristics differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, 5: 322-328.

ODEGAARD, O.A., KROGSRUD, J.. 1977 . A field outbreak caused by bovine respiratory syncytial virus. *Acta. Vet. Scand.* 18 : 429 6 431.

OTTO P. et al. A model for respiratory syncytial virus (RSV) infection based on experimental aerosol exposure with bovine RSV in calves. *Comp. Immun. Microbiol. Infect.* 1996, 19: 85-97.

PATON, A.W., PATON, J.C., LAWRENCE , A.J., GOLDWATER, P.N. and HARRIS, R.J., 1992. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microb.* 30 :901-904.

PERRIN B. et al. Mise en evidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français. *Rec. Med. Vet.* 1979, 155: 465-471.

PRINCE , G.A.and PORTER, D.D.. 1976. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in infants ferrets. *Am. J . Pathol.* 82, 339-352.

PROZZI D. et al. Antigenic and molecular analysis of the variability of the BRSV G glycoprotein. *J. Virol.* 1997, 78: 359-366.

RANDALL R.E., RUSSELL W.C. Paramyxovirus persistence. Consequences for host and virus in D.W. KINGSBURY, *The Paramyxoviruses* 1991, p. 299-321, Plenum Press, New York, USA.

SCHRIJVER R.S. et al. Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996a, 3: 500-506.

SHARMA R., WOLDEHIWET Z. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. *Vet. Microbiol.* 1990a, 23: 267-272.

SMITH M.H., FREY, M.L. and DIERK, R.E.. 1975. Isolation, characterization, pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 47, 237-247.

STEWART R.S., GERSHWIN L.J. Role of Ig E in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in vaccinated and non-vaccinated calves. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50: 349-355.

STINE L.C. et al. Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates. *Vet. Microbiol.* 1997, 54: 201-221.

STOTT, E.J., THOMAS, L.H., COLLINS, A.P., et al. 1978. The role of viruses in acute respiratory disease of cattle. IN: *respiratory diseases in cattle*, ed. MARTIN WB, pp. 230-240. MARTINUS NIJHOFF, Boston, MA.

TAYLOR G. et al. Lymphocyte transformation response of calves to respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 1987, 22: 333-334.

TAYLOR G. et al. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *J. Virol.* 1995, 69: 6658-6664.

THOMAS L.H. et al. Infection of gnotobiotic calves with a bovine and human isolate of respiratory syncytial virus. Modification of the responses by dexamethasone. *Arch. Virol.* 1984, 79: 67-77.

THOMAS L.H. et al. Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.* 1996, 61: 38-44.

TRIGO J.F. et al Pathogenesis of experimental bovine respiratory syncytial virus infection in sheep Am. J. Vet. Res. 1984, 45: 1663-1670.

VALARCHER et al. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. Virol. 2001,291 : 55-67.

VALARCHER et al. Evaluation of nested RT-PCR based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections .J. Clin. Microbiol.1999, 37 :1858-1862.

VAN DER POEL V.H.M et al. Respiratory syncytial virus infections in human beings and the cattle. J. Inf. 1994, 29: 215-228.

VAN DER POEL V.H.M. et al. Five fields trials on the efficacy of a bovine respiratory syncytial virus vaccine. Can. Vet. J. 1990, 31: 93-100.

VAN DER POEL , V.H.M., KRAMPS , J.A. , MIDDEL , W.G.J., VAN OIRSCHOT , J.T. and BRAND , A.. 1993. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections, a longitudinal epidemiological study in dairy herds. Arch. Virol. 133, 309-321.

VAN DER POEL , V.H.M., SCHRIVER, R., MIDDEL, KRAMPS, J.A. ? BRAND, A. and VAN OIRSCHOT, J.T. 1996. Experimental reproduction of respiratory disease in calves non-cell-cultur-passaged bovine respiratory syncytial virus. Vet. Quart. 18, 81-86.

VAN MILAAN, A.J., SPENGER , M.J.W.,ROTHBARTH, Ph.H. et al. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA polymerase chain reaction and differentiation of subgroup with oligonucleotide probes. J. Med. Virol. 44 :80-87.

VILCEK, S.,ELVANDER, M., BALLAGI-PORDANY, A. and BELAK, S.. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. J. Clin. Microb. 32 : 2225-2231.

WELLEMANS GOND LEUNEN J 1975 . Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins . Am. Med. Vet. 119,359-369.

WERDIN , R.E. and BAKER, J.C.. 1985. Diagnostic features of bovine respiratory syncytial virus-associated pneumonia of dairy calves. Amer. Assn. Vet. Diagnosticians. 28th annual proceedings. P. 1-14.

WESTENBRINK F. et al. Analysis of the antibody responses to bovine respiratory syncytial virus protein in calves. J. Gen. Virol. 1989, 70: 591-601.

WHITEHEAD, S.S., JUHASZ, K., FIRESTONE, C ,et al. Recombinant respiratory syncytial virus (RSV) bearing a set of mutations from cold-passaged RSV is attenuated in chimpanzees. J. Virol. 72, 4467-4471.

ZAMORA M., SAMAL S.K. Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic Mrna suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 1992, 73:737-741.

ANNEXE 1 : Fiche d'Examen clinique standard

| Examen clinique | Matin | Soir |
|----------------------------------|--|--|
| Heure : Examineur : | | |
| Température rectale (°C) | | |
| Comportement général | <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Moyennement altéré <input type="checkbox"/> Très altéré | <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Moyennement altéré <input type="checkbox"/> Très altéré |
| Fréquence respiratoire (nbre/mn) | | |
| Ecoulement nasal | <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Fort | <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Modéré <input type="checkbox"/> Fort |
| Toux (nbre/mn) | | |
| Respiration abdominale | <input type="checkbox"/> Absente <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Forte | <input type="checkbox"/> Absente <input type="checkbox"/> Modérée <input type="checkbox"/> Forte |
| Refus de lait | | |
| Refus de concentré | | |
| Remarques : | | |

ANNEXE 2 : Mode de calcul du score clinique

| Signe | Note | Coefficient |
|--|------------------|-------------|
| Température rectale : $< 39,5^\circ$ $39,5^\circ \leq < 40^\circ$ $40^\circ \leq < 40,5^\circ$ $\geq 40,5^\circ$ | 1 2 3 4 | 3 |
| Fréquence respiratoire : $< 30/\text{mn}$ $30/\text{mn} \leq < 40/\text{mn}$ $40/\text{mn} \leq < 60/\text{mn}$ $\geq 60/\text{mn}$ | 1 2 3 4 | 3 |
| Refus de lait : 0 $0 < < 30 \%$ $30 \leq < 60 \%$ $\geq 60 \%$ | 1 2 3 4 | 3 |
| Refus de concentré : 0 $0 < < 30 \%$ $30 \leq < 60 \%$ $\geq 60 \%$ | 1 2 3 4 | 3 |
| Comportement général : Normal Moyennement altéré Très altéré | 1 2 3 | 3 |
| Ecoulement nasal : Nul Modéré Fort | 1 2 3 | 2 |
| Toux : Nulle Modérée Forte | 1 2 3 | 1 |
| Dyspnée : Absente Abdominale modérée Abdominale forte | 1 2 3 | 3 |

Toulouse, 2002

NOM : VIGNES

PRENOM : Joël

TITRE : Infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) : application à l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin.

RESUME :

L'étude présente une inoculation de VRSB sur deux groupes de cinq veaux. Les animaux du groupe 1 (G1) ont été vaccinés deux fois à quatre semaines d'intervalle. Les animaux du groupe 2 (G2) ne l'ont pas été pour constituer un groupe témoin.

L'inoculation a été réalisée 21 jours après la seconde vaccination sur trois jours consécutifs. Chaque veau a reçu de 1 à $2,5 \cdot 10^6$ UFS en intra-nasal et en endotrachéal par jour d'une souche sauvage de VRSB, au 6^{ème} passage en culture cellulaire. Les veaux ont ensuite été suivis pendant 16 jours sur le plan clinique (fréquence respiratoire, température rectale, refus alimentaire, comportement général, écoulements nasaux, toux, dyspnée) et sur le plan virologique (immunodétection sur les écouvillonnages nasaux, RT-PCR, isolement et quantification sur le liquide du lavage broncho-alvéolaire).

Des différences cliniques et virologiques statistiquement significatives ont permis de conclure à l'efficacité du vaccin.

MOTS CLES : VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN - VACCIN

TITLE : Challenge inoculation with Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) : application to vaccine efficacy evaluation.

ABSTRACT :

The aim of the study is to evaluate a BRSV vaccine efficacy during a challenge inoculation on two groups of five calves. The animals of group 1 (G1) were vaccinated on two occasions, four weeks apart. The animals of group 2 (G2) has been left unvaccinated as a control group.

Challenge inoculation has been performed 21 days after the second injection of vaccine on three consecutive days. Each calf was inoculated with 1 to $2,5 \cdot 10^6$ SFU via intranasal route and 1 to $2,5 \cdot 10^6$ SFU via endotracheal route per day, of a field BRSV strain, at 6th culture passage level.

Then, calves have been followed during 16 days, at the clinical level (respiratory rate, rectal temperature, feed refusal, general demeanour, nasal discharge, cough, dyspnea) and at the virological level (immunodetection on nasal swabs, RT-PCR, isolation and quantification on broncho-alveolar lavage fluid).

Significative virological and clinical differences have been put on evidence which allowed to conclude to the vaccine efficacy.

KEY WORDS : BOVIN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS - VACCINE