

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES.....	20
LISTE DES TABLEAUX	20
LISTE DES PHOTOGRAPHIES	20
INTRODUCTION.....	23
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
I. LA VIROLOGIE DU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN.....	27
I.1. Taxonomie	27
I.2. Propriétés physico-chimiques	27
I.3. Structure et génome.....	28
I.4. Protéines virales	29
II. INFECTION PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN	32
II.1. Epidémiologie	32
<i>II.1.1. Les espèces sensibles</i>	<i>32</i>
<i>II.1.2. La sensibilité des bovins</i>	<i>32</i>
<i>II.1.3. Prévalence de l'infection</i>	<i>32</i>
<i>II.1.4. Mortalité et morbidité des bovins</i>	<i>32</i>
<i>II.1.5. Les voies de transmission</i>	<i>33</i>
<i>II.1.6. Saisonnalité de l'infection et persistance virale</i>	<i>33</i>
<i>II.1.7. Facteurs favorisants</i>	<i>34</i>
II.2. Signes cliniques et lésions	34
<i>II.2.1. Les signes cliniques</i>	<i>34</i>
<i>II.2.2. Les lésions.....</i>	<i>35</i>
II.3. Immunité	36
<i>II.3.1. Les structures immunogènes.....</i>	<i>36</i>
<i>II.3.2. Réponse immunitaire humorale</i>	<i>37</i>
<i>II.3.2.1. Cinétique des anticorps.....</i>	<i>37</i>
<i>II.3.2.2. Anticorps sériques</i>	<i>39</i>
<i>II.3.2.3. Anticorps locaux.....</i>	<i>39</i>
<i>II.3.3. Réponse immunitaire cellulaire</i>	<i>40</i>
II.4. Pouvoir pathogène.....	41
<i>II.4.1. Cinétique de l'infection</i>	<i>41</i>
<i>II.4.2. Cibles cellulaires</i>	<i>42</i>
<i>II.4.3. Les mécanismes pathogéniques</i>	<i>43</i>
<i>II.4.3.1. Pathogénie</i>	<i>43</i>
<i>II.4.3.2. Immunopathogénie</i>	<i>44</i>
II.5. Diagnostic de l'infection par le VRSB	46
<i>II.5.1. Généralités.....</i>	<i>46</i>
<i>II.5.2. Animal vivant</i>	<i>47</i>
<i>II.5.2.1. Sérologie : recherche indirecte</i>	<i>47</i>
<i>II.5.2.2. Virologie : recherche directe</i>	<i>48</i>
<i>II.5.3. Animal mort</i>	<i>49</i>

III. VACCINATION CONTRE LE VRSB ET EVOLUTION VIRALE.....	51
III.1. Vaccination.....	51
<i>III.1.1. Innocuité.....</i>	<i>52</i>
<i>III.1.2. Activité et réponse immunitaire.....</i>	<i>52</i>
<i>III.1.3. Variabilité antigénique et vaccination</i>	<i>53</i>
<i>III.1.4. Immunité passive et vaccination</i>	<i>54</i>
<i>III.1.5. La vaccination anti-VRSB en France.....</i>	<i>55</i>
<i>III.1.6. Les vaccins du futur (recombinants et à ADN)</i>	<i>57</i>
III.2. Variabilité du VRSB.....	59
<i>III.2.1. Réactivité croisée avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G.....</i>	<i>59</i>
<i>III.2.2. Analyse comparative du génome des différentes souches de virus respiratoire syncytial bovin.....</i>	<i>61</i>
<i>III.2.3. Notion de quasi-espèce et potentiel d'adaptation</i>	<i>64</i>
<i>III.2.4. Bilan sur la variabilité du VRSB</i>	<i>65</i>
 DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION ANIMALE.....	 67
I. MATERIEL ET METHODES	69
I.1. Préparation de l'inoculum viral	69
<i>I.1.1. Cultures cellulaires.....</i>	<i>69</i>
<i>I.1.2. Isolement des souches virales</i>	<i>70</i>
<i>I.1.2.1. Isolement de la souche virale 3761</i>	<i>70</i>
<i>I.1.2.2. Isolement de la souche virale 220/69.....</i>	<i>70</i>
<i>I.1.3. Titrage des souches virales.....</i>	<i>71</i>
<i>I.1.4. Préparation des souches virales</i>	<i>71</i>
<i>I.1.5. Inoculum final</i>	<i>72</i>
I.2. Expérimentation animale	72
<i>I.2.1. Animaux et entretien des animaux</i>	<i>72</i>
<i>I.2.2. Infection expérimentale.....</i>	<i>74</i>
<i>I.2.3. Suivi expérimental.....</i>	<i>75</i>
I.3. Tests sérologiques	76
I.4. Techniques de suivi virologique	77
<i>I.4.1. Immunocapture (antigène).....</i>	<i>77</i>
<i>I.4.2. RT-PCR discriminative quantitative (ARN viral)</i>	<i>77</i>
<i>I.4.2.1. Détermination des séquences complètes des génomes viraux des souches 3761 et 220/69.....</i>	<i>77</i>
<i>I.4.2.2. Sélection d'amorces discriminatives pour les souches 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b (1^{ère} étape)</i>	<i>77</i>
<i>I.4.2.3. Amplification des génomes viraux des souches 3761 et 220/69 à l'aide des amorces discriminatives : vérification de la spécificité des amorces....</i>	<i>79</i>
<i>I.4.2.4. Validation de la PCR discriminative quantitative.....</i>	<i>80</i>
<i>I.4.2.4.1. Construction des plasmides de référence pour la réalisation de la gamme</i>	<i>80</i>
<i>I.4.2.4.2. Analyse des courbes étalons</i>	<i>80</i>
<i>I.4.2.4.3. Analyse des courbes de dénaturation.....</i>	<i>81</i>
<i>I.4.2.4.4. Spécificité et sensibilité de la PCR discriminative</i>	<i>81</i>
<i>I.4.2.4.5. Amplification sur des échantillons biologiques après validation.....</i>	<i>81</i>

II. RESULTATS	83
II.1. Résultats du suivi clinique	83
<i>II.1.1. Observations cliniques</i>	83
<i>II.1.2. Scores cliniques moyens</i>	84
<i>II.1.3. Température rectale et fréquence respiratoire</i>	86
II.1.3.1. Courbes de température rectale	86
II.1.3.2. Courbes de fréquence respiratoire	87
II.2. Résultats lésionnels	88
II.3. Suivi virologique	89
<i>II.3.1. Immunocapture d'antigènes</i>	89
<i>II.3.2. RT-PCR discriminative sur les écouvillons nasaux</i>	89
<i>II.3.3. RT-PCR discriminative et quantitative totale sur N sur les LBA</i>	90
II.4. Suivi immunologique	91
<i>II.4.1. Réponse sérologique</i>	91
<i>II.4.2. Réponse sérologique des Ig M</i>	92
 DISCUSSION	 95
 CONCLUSION	 105
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 107
 ANNEXES	 127
Annexe 1 : Fiche d'évaluation clinique biquotidienne	129
Annexe 2 : Mode de calcul du score clinique	130
Annexe 3 : Récapitulatif des vaccins disponibles et des vaccins ayant été commercialisés en France.	131
Annexe 4 : dosages des équivalents plasmides de β actine sur les EN des veaux du groupe vacciné et du groupe non vacciné aux jours J 4, J 5 et J 6	132
Annexe 5 : dosages des équivalents plasmides de β actine sur les EN des veaux A1 (du groupe vacciné) et B1 (du groupe non vacciné) des jours J 1 à J 14	132

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps
Ag : Antigène
AdBV : Adénovirus bovin
ATT : Aspiration trans-trachéale
BoHV-1 : Herpès virus bovin de type 1
BT : Bos taurus
BVDV : Virus de la maladie des muqueuses
Cellules BT (Bovine Turbinates) : souche de cellules primaires d'origine bovine dérivée des cornets nasaux ; n° de référence ATCC CRL-1390
Cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) : lignée continue de cellules rénales de hamster ; référence CRL-6282
Cellules Hep-2 (Human Epithelium) : lignée continue de cellules épithéliales humaines ; référence ATCC CCL-23
EN : Ecouvillon nasal
ENVT : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse
FMDV : Virus de la fièvre aphteuse
FR : Fréquence respiratoire (en mvts / min : mouvements par minute)
ICC : Immunocytochimie
Ig G : Immunoglobuline G
Ig M : Immunoglobuline M
J x p.i. : Jour x post-infection
LBA : Lavage broncho-alvéolaire
MEM : Milieu essentiel minimum
PH : Prim Holstein
PI 3 : Virus *Parainfluenza* 3
RT-PCR : Transcription réverse suivie d'amplification génique
Souche 220/69 : souche de terrain isolée en 1969 en Belgique par Wellemans à partir d'écouvillons nasaux de veaux présentant des signes respiratoires, mise en culture sur des cellules de reins de fœtus et des cellules testiculaires de veaux, puis passée 3 fois en aveugle sur des cobayes par inoculation intra nasale et injection intrapéritonéale
Souche 3761 : souche de terrain isolée en 2003 à partir de l'écouvillon nasal d'un veau présentant des signes cliniques respiratoires ; amplifiée en cultures cellulaires (cellules BT) pendant 8 passages
Th 1 : réponse immunitaire spécifique T auxiliaire de type 1
Th 2 : réponse immunitaire spécifique T auxiliaire de type 2
TR : Température rectale
UFP : Unité formant plaque
VRSB : Virus respiratoire syncytial bovin
VRSH : Virus respiratoire syncytial humain
VRSO : Virus respiratoire syncytial ovin

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du VRSB	28
Figure 2 : Structure du génome du VRSB.....	28
Figure 3 : Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, 1 isolat de VRSO (Virus Respiratoire Syncytial Ovin) et 2 isolats de VRSH.	63
Figure 4 : Comparaison des génomes viraux 220/69 et 3761 entre les positions 4000 et 4116	78
Figure 5 : Séquence des amorces discriminatives et	78
Figure 6 : Hybridation des amorces 3761 sur le génome viral 220/69	78
Figure 7 : Hybridation des amorces 220/69 sur le génome viral 3761	79
Figure 8 : Essai d'amplification des génomes 3761 P _{3,2} et 220/69 H4b	79
Figure 9 : Essais d'amplification avec les amorces 3761 sur des ADNc	82
Figure 10 : Essais d'amplification avec les amorces 220/69 sur des ADNc.....	82
Figure 11 : Moyenne des scores cliniques pour les lots vacciné et non vacciné.....	85
Figure 12 : Moyenne des températures rectales pour les lots vacciné et non vacciné	86
Figure 13 : Moyenne des fréquences respiratoires pour les lots vacciné et non vacciné	87
Figure 14 : Charge virale en virus 3761 et 220/69 dans les écouvillons nasaux des veaux A1 (lot vacciné) et B1 (lot non vacciné) exprimée en équivalents de copies de plasmides	90
Figure 15 : Réponse en Ig M (E/P en %) pour les lots « vacciné » et « non vacciné » testés..	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les protéines du VRSB (nom, taille et fonction)	31
Tableau 2 : Identification des trois sous-groupes antigéniques de VRSB	60
Tableau 3 : Variabilité de la glycoprotéine G du VRSB sur la base de la réactivité à des anticorps monoclonaux et de la séquence en acides aminés selon plusieurs auteurs ; (a) poumons infectés par le VRSB ; (b) neutralisation croisée avec sérum polyclonal.	60
Tableau 4 : Sous-groupes de VRSB et mutations ponctuelles	61
Tableau 5 : Origine et classement des veaux.	74
Tableau 6 : Résultats lésionnels exprimés en pourcentage du lobe pulmonaire atteint	88
Tableau 7 : Résultats des tests Speed ReSpiVB pour les lots vacciné et non vacciné.....	89
Tableau 8 : Comparaison des résultats sur les LBA.....	91
Tableau 9 : Sérologies réalisés avant et au cours de l'expérience	91

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : <i>Pneumovirus</i>	27
Photo 2 : Réalisation du LBA lors du troisième passage sur veaux.....	72
Photo 3, photo 4 : Bâtiments de niveau 2 de biosécurité de l'INRA de Tours-Nouzilly	73
Photo 5, photo 6 : Pose du cathéter intratrachéal, puis inoculation intratrachéale.....	75
Photo 7, photo 8 : Instillateur pour inoculation intranasale et instillation intranasale.	75
Photo 9, photo 10, photo 11 : Photos des poumons des veaux A1 (lot vacciné), Se et B2 (lot non vacciné) à l'autopsie.....	88

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les virus respiratoires syncytiaux bovins (VRSB) et humains (VRSH) sont des agents pathogènes importants et fréquents en matière d'affections respiratoires. Ils induisent une pathologie respiratoire, qui se traduit par différentes formes cliniques allant du syndrome grippal jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë. En France, la séroprévalence du VRSB est de 60 %. Ce virus est coresponsable de plus de 50 % des troubles respiratoires chez les bovins de moins de 12 mois. Il est mis en évidence seul dans 30 % des cas, ce qui le place en tête des pathogènes respiratoires (Kimman, 1988). Le taux de mortalité dans cette tranche d'âge varie entre 2 et 5 %, mais peut atteindre 30 %. L'étude du VRSB présente donc un double intérêt :

- direct par son aspect médical en élevage bovin,
- indirect par les pertes économiques entraînées pour les éleveurs.

La vaccination représente actuellement le seul moyen de lutte contre l'infection par le VRSB. Elle est pratiquée depuis plus de vingt ans en France à l'aide de vaccins atténués et inactivés. D'une manière générale, les vaccins protègent cliniquement les animaux et ont très probablement permis de limiter la circulation virale. Cependant, ils n'empêchent pas la réinfection du veau par une autre souche. De plus, la vaccination se heurte à différents obstacles à savoir l'immunisation en présence d'anticorps maternels, la possibilité de réaction immunopathologique vaccino-induite et la variabilité antigénique du virus.

Le VRSB et le VRSH, étant des virus à ARN de polarité négative, ils ont la capacité de muter à chaque cycle de réplication virale. Une souche virale est ainsi constituée de différents génomes hautement hétérogènes qui forment un spectre de mutants ; ce spectre représente un formidable réservoir de variants phénotypiques, qui confère au virus un remarquable potentiel de variation et d'adaptation. Cette capacité adaptative peut donc poser des problèmes variés en matière de réponse à la vaccination.

Cette étude avait donc pour but de tester *in vivo* une technique permettant de discriminer différentes souches virales du VRSB et d'analyser l'impact de la variabilité génomique sur la vaccination.

Dans une première partie, nous ferons une synthèse bibliographique sur les caractéristiques virales du VRSB, de l'infection par ce virus, puis nous résumerons les connaissances sur la vaccination contre celui-ci.

Dans une seconde partie, nous présenterons l'évaluation *in vivo* d'une technique de transcription réverse suivie d'amplification génique (RT-PCR) en temps réel permettant de différencier deux souches de VRSB (les souches 220/69 et 3761) et nous montrerons que l'utilisation d'un vaccin entier élaboré à partir d'une souche ancienne (220/69), protège partiellement d'une infection hétérologue vis-à-vis d'une souche récente (3761).

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA VIROLOGIE DU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN

I.1. Taxonomie

Le VRSB est un virus à ARN de polarité négative, qui appartient à l'ordre des *Mononegavirales*.

L'ordre des *Mononegavirales* est subdivisé en 4 familles différenciées selon des critères morphologiques et structuraux : la famille des *Rhabdoviridae* à laquelle appartiennent le virus de la Stomatite Vésiculeuse et le virus Rabique, la famille des *Filoviridae* dont l'unique genre *Filovirus* comprend le virus Ebola, la famille des *Bornaviridae* avec le virus de la maladie de Borna et la famille des *Paramyxoviridae* à laquelle appartient le VRSB.

La famille des *Paramyxoviridae* est divisée en 2 sous-familles : les *Paramyxovirinae* et les *Pneumovirinae*. La sous-famille des *Pneumovirinae* comprend 2 genres dont le genre *Pneumovirus* (Photo 1) auquel appartiennent le VRSH, le VRSB (Figure 1), le pneumovirus de la souris et les virus respiratoires syncytiaux caprin (VRSC) et ovin (VRSO).

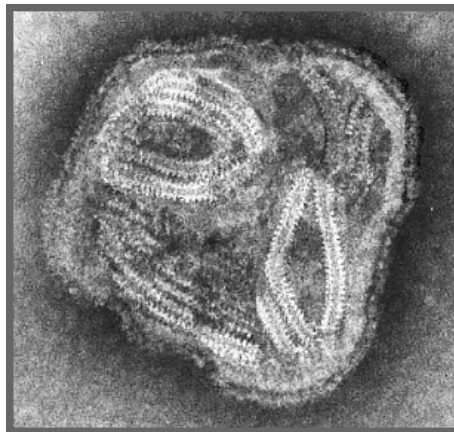


Photo 1 : *Pneumovirus*

I.2. Propriétés physico-chimiques

Le VRSB n'est pas un virus résistant dans le milieu extérieur. Son infectiosité est détruite en 30 minutes à 56 °C et quelques heures à 37 °C (Paccaud, 1970). L'infectiosité du virus est maintenue pendant des mois voire des années, si le virus est conservé à - 80 °C ou à - 196 °C (Inaba, 1973).

I.3. Structure et génome

La structure du VRSB en microscopie électronique est variable, le virus étant fréquemment observé sous forme filamenteuse (diamètre de 60-110 nm) ou arrondie (diamètre de 100-350 nm) (Figure 1). Les particules virales du VRSB peuvent, à l'aide de ponts, former un réseau (Belanger, 1988). Cependant, cette structure n'a pas de fonction précise connue.

Le VRSB est un virus enveloppé contenant une nucléocapside de symétrie hélicoïdale.

L'enveloppe virale est une bicouche lipidique formée autour du virion lors de sa fusion avec la membrane cytoplasmique de la cellule. Les protéines retrouvées sur cette enveloppe forment à sa surface des spicules de 11 à 20 nm de long.

La nucléocapside a un diamètre compris entre 12 et 25 nm (Ulloa, 1998). Elle est constituée de la nucléoprotéine (N), de la phosphoprotéine (P), de la polymérase (L) et d'une protéine de matrice (M2), protégeant l'ARN génomique.

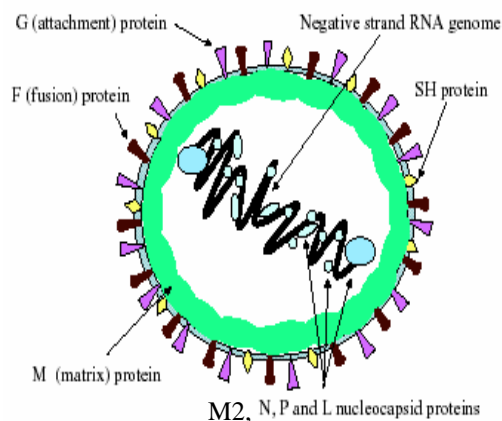


Figure 1 : Structure du VRSB

Le génome du VRSB est un brin d'ARN simple de polarité négative non segmenté, qui comprend environ 15 140 nucléotides et 10 gènes (Figure 2).



Figure 2 : Structure du génome du VRSB

Le génome du VRSB est très proche de celui du VRSH. Ainsi, à partir des connaissances sur le VRSB et le VRSH, l'organisation du génome viral est la suivante :

- En 3', une région « leader », extra génique, de 44 nucléotides qui contient vraisemblablement un promoteur viral majeur (Mink, 1991).

- En 5', après le gène L, une région « trailer » qui est constituée de 155 nucléotides (Mink, 1991).

- Deux segments nucléotidiques agissant en *Cis* et localisés entre 5' et 3' qui paraissent indispensables pour la transcription, la réplication et l'assemblage viral. En 3', cette région est constituée de 88 nucléotides, comprenant la région « leader », le signal d'initiation de transcription du gène codant pour la protéine non structurale (NS1) et son extrémité non codante (Zamora, 1992). En 5', cette région est constituée de 192 nucléotides, incluant l'extrémité 5' non codante du gène de la polymérase, le signal de terminaison de transcription, ainsi que l'extrémité 5' extra génique du génome (Yunus, 1998).

- Entre les régions 5' et 3', 88 % du génome est codant. Dix gènes ont été identifiés pour le VRSH et le VRSB. Chaque gène débute par un signal d'initiation de transcription, dont la séquence est conservée sur presque tous les gènes chez le VRSB (Zamora, 1992). Chaque gène se termine par un signal de terminaison, qui ordonne la fin de la transcription et la polyadénylation. Ce signal de terminaison est semi conservé entre chaque gène et a une longueur de 12 à 13 nucléotides. Les 9 premiers gènes sont non chevauchants et séparés par des régions de longueur de 1 à 52 nucléotides. Les gènes M2 et L se chevauchent sur 67 nucléotides. Chez le VRSH, ce chevauchement aurait une fonction régulatrice de la transcription de la polymérase (Collins, 1987).

I.4. Protéines virales

Les 10 gènes du VRSB codent pour 11 ARN messagers qui, eux-mêmes, donnent 11 protéines (le gène M codant pour 2 protéines M2-1 et M2-2) (Tableau 1) :

- Deux protéines non structurales : NS1 et NS2.
- Trois protéines de nucléocapside : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P) et la polymérase (L).
- Trois protéines de matrice : les protéines M, M2-1 et M2-2.
- Trois protéines d'enveloppe : la protéine de fusion (F), la glycoprotéine (G) et la petite protéine hydrophobe (SH).

Les protéines non structurales NS1 et NS2 sont caractéristiques des *Pneumovirus* et interviennent dans l'inhibition de la réponse cellulaire en interférons de type I (α et β).

La nucléoprotéine N possède plusieurs fonctions : elle participe à la formation de la nucléocapside tout en lui conférant une résistance aux ARNases et elle intervient lors de la réplication et de la transcription (Samal, 1993 ; Mallipeddi, 1996) en formant un complexe avec d'autres protéines. La phosphoprotéine P est un facteur de transcription et de réplication. Elle joue aussi un rôle dans l'assemblage du virion. Cette protéine est phosphorylée (Bishnu, 1997). La polymérase L est ARN dépendante (Yunus, 1998). Elle est responsable de la transcription et de la réplication en s'associant à la nucléoprotéine N et à la phosphoprotéine P (Yu, 1995 ; Yunus, 1998).

La protéine hydrophobe SH est présente sous plusieurs formes plus ou moins glycosylées. La fonction de SH est inconnue. La protéine de fusion F permet la pénétration du virus dans la cellule cible par fusion avec la membrane plasmique. Elle est aussi responsable de la formation des syncytia en permettant la fusion de la membrane des cellules infectées et non infectées (Hemingway, 1994). Cette protéine est une protéine d'enveloppe peu glycosylée de 574 acides aminés. Dans la cellule, elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif Fo, qui est clivée dans le réticulum endoplasmique. Le résultat de ce clivage est la formation d'une protéine mature et fonctionnelle F comprenant deux sous unités F1 et F2 reliées par un pont disulfure. La glycoprotéine G est une protéine fortement glycosylée, qui présente une grande variabilité entre les différentes souches de VRSB. Elle est composée de 257 à 263 acides aminés selon les souches (Mallipeddi, 1993). La glycoprotéine G est synthétisée sous deux formes, une forme ancrée dans l'enveloppe virale et une forme tronquée sécrétée par la cellule infectée (Hendricks, 1987). La forme tronquée semblerait jouer un rôle de leurre pour la réaction immunitaire (Collins, 1996). La forme attachée, sous la forme d'un trimère à la surface du virion (Langedijk, 1996), serait responsable de l'attachement aux cellules cibles en association avec la protéine F (Levine, 1987).

Les protéines M et M2, possèdent respectivement 256 et 186 acides aminés. Par analogie avec la fonction des protéines de matrice chez les *Mononegavirales*, la protéine M agirait sur l'arrêt de la transcription de la nucléocapside et l'association de celle-ci à la future enveloppe. La protéine M2 jouerait un rôle dans la régulation de la transcription du génome viral.

Protéine	Nom de la protéine	Taille (Acides aminés)	M _r (kd)	Fonctions
NS1	Protéine non-structurale 1	136	13,8	Inhibition et résistance aux interférons de type I (α et β)
NS2	Protéine non-structurale 2	124	14,5	Inhibition et résistance aux interférons de type I (α et β)
F	Protéine de fusion	574	70	Fusion avec la membrane plasmique
G	Glycoprotéine	257 - 263	90	Leurre pour la réaction immunitaire Attachement aux cellules cibles avec F
SH	Petite protéine hydrophobe	73	7,5 – 60	Fonction inconnue
M	Protéine de matrice	256	25	Arrêt de la transcription de la nucléocapside Association de la nucléocapside à la future enveloppe
M2-1	Protéine de matrice 2-1	186	22	Régulation de la transcription du génome viral
M2-2	Protéine de matrice 2-2	95	11	Régulation de la transcription du génome viral
N	Nucléoprotéine	391	45	Formation de la nucléocapside et résistance aux ARNases Réplication et transcription en formant un complexe protéique
P	Phosphoprotéine	241	33	Transcription, réplication et assemblage du virion
L	Polymérase	2161	250	Transcription et réplication

Tableau 1 : Les protéines du VRSB (nom, taille et fonction)

II. INFECTION PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN

II.1. Epidémiologie

II.1.1. Les espèces sensibles

Les bovins sont les hôtes naturels du VRSB. Jusqu'à présent la transmission interspécifique n'a pas été démontrée, même si la possibilité d'une transmission entre hommes et bovins ainsi qu'entre bovins et petits ruminants ne peut pas être écartée. L'infection par ce virus n'est pas considérée comme une zoonose (Thiry, 2000).

II.1.2. La sensibilité des bovins

En milieu naturel, l'âge des animaux est un facteur prédominant par rapport aux signes cliniques. En effet, les signes cliniques sont surtout observés chez les jeunes de moins de 1 an (Elvander, 1996 ; Valarcher, 1999 b). Dans cette classe d'âge, 71 % des troubles respiratoires ont été associés au VRSB (Kimman, 1988).

Des signes cliniques peuvent être observés sur des veaux âgés de moins de 2 semaines, ainsi que sur des adultes, mais avec une incidence encore mal connue.

II.1.3. Prévalence de l'infection

De nombreuses enquêtes épidémiologiques impliquent le VRSB dans l'apparition de troubles respiratoires. En effet, des études menées en Suède, au Danemark et aux Etats-Unis sur des élevages laitiers ont montré que 60 à 70 % des troubles respiratoires étaient liés à ce virus (Elvander, 1996 ; Baker, 1986 a ; Uttenthal, 1996). En élevage allaitant, il a été associé aux troubles respiratoires dans 16 à 61 % des cas (Stott, 1980 ; Caldow, 1988-1993 ; Kimman, 1988 ; Schelcher, 1990), ce qui place cette pathologie au premier rang des pathologies respiratoires. Environ 50 % des animaux sont primo-infectés avant l'âge de 12 mois. En France, sa séroprévalence est supérieure à 60 % (Perrin, 1979).

II.1.4. Mortalité et morbidité des bovins

La morbidité est très élevée, de l'ordre de 80 à 100%. Mais, la mortalité induite par le VRSB n'excède pas 5 à 10 %, sauf dans les cas d'épidémies au sein d'un même élevage où elle peut atteindre 20 % (Thiry, 2000).

II.1.5. Les voies de transmission

Chez le veau, l'infection par aérosol a longtemps été pressentie comme un mode majeur de transmission du virus (Bryson, 1978). La transmission par voie aérienne a été confirmée dans le début des années 1990, notamment sur de courtes distances (par exemple lors des toux ou par contact direct de naseaux à naseaux) (Van Der Poel, 1993 et 1994).

L'existence d'infection fœtale par ce virus n'a jamais été démontrée, bien que la présence d'anticorps anti-VRSB dans le sérum fœtal ait déjà été décrite (Gould, 1978). De plus, des avortements sont parfois observés pendant un épisode clinique sans que ceux-ci puissent être associés à une action directe du virus (Inaba, 1972).

II.1.6. Saisonnalité de l'infection et persistance virale

Chez les bovins, la saisonnalité de l'infection est très importante. En effet, en région tempérée le nombre de cas de VRSB est culminant en automne ainsi qu'en hiver (Baker, 1985). Cette saisonnalité serait due aux changements climatiques et notamment aux baisses de température (Mahin, 1982 ; Key, 1984) et de pression atmosphérique (Wellemans, 1975). Bien que le virus ne semble circuler pendant le reste de l'année qu'à un très faible niveau, des réinfections sont possibles (Van Der Poel, 1994 ; Elvander, 1996).

L'absence de maladie à VRSB pendant la période estivale pose la question de la persistance virale. Dans une région déjà infectée par ce virus, la maladie devient endémique et peut affecter les mêmes troupeaux chaque année (Horzinek, 1990). Compte tenu de la fragilité du virus, la réapparition d'épisodes respiratoires dans les mêmes exploitations sur plusieurs années consécutives, suggère une réintroduction du virus et / ou son maintien au sein du réservoir animal.

Etant donné que des épisodes respiratoires à VRSB peuvent réapparaître au sein des mêmes cheptels tous les hivers sans introduction de nouveaux animaux, il semblerait que, soit le virus circule à bas bruit de façon permanente chez les animaux infectés subcliniques, soit il persiste au sens strict chez l'animal infecté (Van Der Poel, 1994 et 1995). Les modes de persistance virale ne sont pas encore totalement élucidés. Néanmoins, l'infection chronique est bien connue pour d'autres virus de la famille des *Paramyxoviridae* (Randall, 1991). De plus, quelques éléments expérimentaux sont favorables à l'hypothèse d'une persistance.

In vitro, le virus est capable d'infecter des cellules de façon persistante en perdant son pouvoir cytopathogène (Stott, 1984) et des études ont montré que le VRSB pouvait être détecté jusqu'à 71 jours post-inoculation (p.i.) dans les lymphocytes B des nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux (Valarcher, 2001). Cependant, une persistance du virus chez l'animal associée à un phénomène de réexcrétion n'a pas été démontrée.

II.1.7. Facteurs favorisants

Selon de nombreuses études épidémiologiques, les changements climatiques paraissent augmenter les infections par le VRSB, particulièrement lorsque le temps devient humide et venteux (Baker, 1986 a ; Van Der Poel, 1994).

Parmi les facteurs favorisant cette infection se trouvent les autres infections virales, les facteurs d'ambiance et tous les facteurs affectant l'activité mucociliaire (forts taux d'ammoniac, forte humidité, variations importantes de température et de pression). Cependant, même des animaux vivant dans de très bonnes conditions d'élevage peuvent contracter cette maladie et les conditions d'élevage ne permettent pas d'expliquer les fortes incidences dans certains élevages (Bryson, 1978 ; Baker, 1986 a ; Van Der Poel, 1994).

II.2. Signes cliniques et lésions

II.2.1. Les signes cliniques

L'incubation de la maladie est de 2 à 8 jours d'après les observations lors de contamination naturelle. Dans 21 à 47 % des cas, l'infection naturelle est subclinique (Baker, 1985). Sinon, l'infection clinique se traduit par un syndrome fébrile et des symptômes respiratoires.

Les symptômes généraux (hyperthermie élevée, baisse modérée de l'état général, anorexie) sont souvent transitoires (1 à 3 jours) et perceptibles en début d'infection, mais peuvent s'aggraver en forte dépression et coma.

Ce sont surtout les signes respiratoires qui prédominent. Du jetage nasal muqueux à mucopurulent et de la toux persistent jusqu'à 10 à 20 jours dans la moitié des cas. Une polypnée, un renforcement des bruits à l'auscultation (expiration très audible), des bruits surajoutés (sifflements, crépitements) et une dyspnée abdominale avec un emphysème sous-cutané peuvent durer de 6 à 10 jours.

Deux tableaux cliniques principaux peuvent alors être rencontrés :

- Une atteinte de l'appareil respiratoire supérieur, se traduisant par des signes cliniques de rhinotrachéite. L'animal présente une difficulté inspiratoire, de la toux et du jetage. L'évolution de la maladie est généralement bénigne d'allure grippale.

- Une atteinte de l'appareil respiratoire inférieur se traduisant par une bronchiolite ou bronchopneumonie. L'évolution de la maladie peut aussi s'aggraver de manière brutale. Dans certains cas très sévères, apparaît une exacerbation de la bronchiolite qualifiée de « syndrome de détresse respiratoire aiguë ». On note la présence d'une dyspnée extrêmement sévère avec la tête portée basse sur une encolure tendue, la bouche ouverte, des plaintes expiratoires et une respiration abdominale (témoin de la difficulté expiratoire causée par l'obstruction des voies respiratoires inférieures et l'emphysème pulmonaire). L'animal ne peut plus ni bouger, ni s'alimenter et fait d'énormes efforts pour respirer (Horzinek, 1990). Il est possible de déceler à l'auscultation un œdème et un emphysème pulmonaires. Cet emphysème peut même gagner le tissu conjonctif sous cutané ou abdominal par voie lymphatique (Belknap, 1993).

Ces 2 tableaux cliniques peuvent être observés conjointement dans un même élevage.

L'observation de ces signes cliniques est modulée par de nombreux facteurs tels que les particularités anatomiques, physiologiques et immunitaires du jeune par rapport à l'adulte, la virulence de la souche virale du VRSB, les déficits immunitaires congénitaux ou acquis ainsi que les surinfections bactériennes.

Les symptômes observés lors d'infection naturelle par le VRSB sont difficilement reproductibles par des inoculations expérimentales et apparaissent en général avec une intensité nettement plus faible (Castleman, 1985 a ; Otto, 1996).

II.2.2. Les lésions

Deux régions pulmonaires peuvent être différenciées sur le plan des lésions que l'on peut observer macroscopiquement lors d'atteinte par le VRSB : la région crânio-ventrale et la région caudo-dorsale.

- En région crânio-ventrale, zone d'atteinte privilégiée lors d'atteinte pulmonaire par voie aérienne, on retrouve des lésions caractéristiques de pneumonie broncho-interstitielle. Le parenchyme est généralement congestionné (couleur rouge brique à lie de vin) avec une induration modérée. A la coupe, on peut noter la présence de mucopus dans les bronches.

A l'examen histologique, cette pneumonie interstitielle se caractérise principalement, lors d'évolution rapide, par des lésions de bronchite et bronchiolite nécrosantes avec présence de cellules épithéliales desquamées dans les lumières, souvent associées à des polynucléaires neutrophiles et des macrophages, obstruant la lumière (Castleman, 1985 b). On note fréquemment la présence de cellules syncytiales dans les lumières bronchiques et alvéolaires ; cellules que l'on peut également retrouver dans les muqueuses nasales et trachéales. Des fausses membranes de fibrine tapissant les parois alvéolaires sont également fréquemment rencontrées. Dans le cas d'évolutions plus longues, une hyperplasie épithéliale avec bronchiolite oblitérante peuvent être observées.

- En région caudo-dorsale, la lésion macroscopique dominante est généralement un emphysème interlobulaire et sous-pleural, parfois même alvéolaire, associé parfois à une légère induration du parenchyme. Toutefois, l'absence d'emphysème n'exclut pas une atteinte pas le VRSB.

A l'examen histologique, les lésions de bronchiolite nécrosante et la présence de syncytia sont plus discrètes. On retrouve en revanche les lésions d'emphysème alvéolaire et interlobulaire, et la présence fréquente de fausses membranes fibrineuses, probablement responsables de la légère induration que l'on observe macroscopiquement (Kimman, 1989 d). Les lésions peuvent également suivre les voies de drainage lymphatique. Ainsi, on observe parfois un emphysème médiastinal marqué, qui peut s'étendre au plan sous-cutané, en région de l'épaule et de l'encolure (Horzinek, 1990), ainsi qu'une hypertrophie des nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux (Bryson, 1983).

II.3. Immunité

II.3.1. Les structures immunogènes

Les structures immunogènes ont surtout été étudiées pour le VRSH, cependant des revues concernant le VRSB sont disponibles (Kimman, 1990 ; Duncan, 1993).

Lors d'une primo-infection, les anticorps sont surtout dirigés contre les protéines F et N. En revanche, lors de réinfection, la réponse immunitaire est surtout dirigée contre les protéines F et G, alors que les taux des anticorps dirigés contre les autres protéines sont extrêmement faibles (Valarcher, 1999 a ; Westenbrink, 1989). L'immunogénicité des protéines non structurales NS1 et NS2, malgré leur importante production au cours du cycle viral, n'est pas connue.

La glycoprotéine G s'avère moins immunogène que la protéine F et la protection induite par G est peu efficace contre un virus d'un sous groupe différent (Johnson, 1982). La plupart des anticorps monoclonaux spécifiques de F neutralisent l'infectiosité. En revanche, très peu d'anticorps monoclonaux spécifiques de G sont neutralisants, à la différence des anticorps polyclonaux (Collins, 1996 et 2001). En résumé, les glycoprotéines F et G induisent une réponse protectrice marquée, évaluée sur la réduction de la multiplication virale dans les poumons et basée sur les anticorps neutralisants circulants, avec une efficacité plus marquée de la réponse induite par la protéine F.

La plupart des connaissances lors d'infection naturelle par le VRSB concernent la réaction humorale, mais l'induction d'une réponse par les lymphocytes T auxiliaires a été démontrée pour les protéines F et G. En effet, certains épitopes T auxiliaires ont été identifiés sur les protéines F et G (Corvaisier, 1993), cependant la notion d'épitope protecteur doit être considérée avec précaution, car des peptides chevauchants peuvent entraîner des réponses immunitaires opposées.

Enfin, il a été démontré que les protéines F, N et M2 étaient les antigènes majeurs de la réponse aux lymphocytes T cytotoxiques (Gaddum, 2003).

II.3.2. Réponse immunitaire humorale

II.3.2.1. Cinétique des anticorps

Au début et au cours de l'infection, le VRSB se multiplie dans l'épithélium de l'appareil respiratoire. Pour cette raison, les anticorps sériques neutralisants ne peuvent agir sur le virus au cours de l'infection précoce comme cela est observé lors de la phase virémique de certains pathogènes (virus de la rougeole ou de la varicelle). Cependant, chez le veau et l'enfant, la protection du tractus respiratoire profond semble être corrélée à un titre élevé en anticorps sériques neutralisants.

Chez les bovins, la placentation étant de type syndesmochoriale, la transmission des anticorps naturels se fait lors de la prise colostrale dans les premières heures de la vie du veau. Les anticorps maternels étant d'origine colostrale, ils disparaissent en moyenne vers 3 ou 4 mois, mais peuvent persister jusqu'à 7 mois (Baker, 1986 a - b).

La cinétique des différents isotypes d'immunoglobulines dirigées contre le VRSB a été évaluée expérimentalement chez des veaux privés de colostrum, lors d'une infection primaire et lors de réinfection (Kimman, 1987).

Lors d'infection expérimentale, les anticorps neutralisants apparaissent dans le sérum entre 3 et 9 jours après inoculation (Elazhary, 1981 ; Thomas, 1984 a - b). Le pic d'anticorps sériques neutralisants apparaît vers 21 à 30 jours après inoculation (Elazhary, 1981). Dans les conditions naturelles, les anticorps diminuent très vite pour atteindre des valeurs de concentration faibles à très faibles en 3 à 7 mois (Baker, 1986 a - b).

Les immunoglobulines impliquées dans cette réaction immunitaire sont : les Ig M, les Ig G (1 et 2), ainsi que les Ig A sécrétoires.

Les immunoglobulines (Ig) M sont les premières à apparaître dans le sérum ou les sécrétions respiratoires. Dans le sérum, elles sont détectées 6 à 10 jours p.i. avec un pic vers 10 à 13 jours et restent détectables jusqu'à presque 1 mois (Thomas, 1984 b ; Kimman, 1987). Les Ig G1 spécifiques apparaissent une semaine après les précédentes, forment un pic vers 24 à 38 jours et sont détectables jusqu'à 8 mois après l'infection (Kimman, 1988 ; Schrijver, 1996 b). Les Ig G2 n'apparaissent pas avant 1 à 3 mois post infection, sont au taux le plus élevé vers 2 à 4 mois et sont présentes au moins pendant 8 mois (Kimman, 1987). Les Ig A et les Ig M sécrétoires peuvent être détectées à partir de 10 jours p.i. dans les sécrétions oculaires, nasales et pulmonaires, chez des animaux infectés expérimentalement. Les Ig M semblent y persister 10 à 18 jours, contrairement aux Ig A qui semblent y rester 3 mois voire plus (Kimman, 1987).

La protection par les anticorps varie en fonction de leur isotype et des cibles antigéniques. Deux types d'anticorps sont à considérer différemment : les anticorps neutralisants sériques et les anticorps locaux.

II.3.2.2. Anticorps sériques

Les Ig G1 et les Ig M dirigées contre le VRSB activent le complément en présence de cellules infectées et provoquent la lyse cellulaire (Kimman, 1989 b).

En conditions naturelles, la fréquence et la gravité de la maladie sont inversement liées aux concentrations en anticorps sériques neutralisants d'origine maternelle (Kimman, 1988). Mais malgré cela, l'infection est possible même avec un titre en anticorps moyennement élevé, que ceux-ci soient d'origine passive ou acquise suite à une primo-infection (Beem, 1987 ; Van Der Poel, 1993). De même, un titre élevé en anticorps neutralisants dirigés contre le VRSB dans le colostrum ne protège pas le veau contre une éventuelle infection et les anticorps sériques neutralisants post-infection n'empêchent pas non plus une réinfection (Jacobs, 1975 ; Kimman, 1986 et 1988 ; Westenbrink, 1989).

Des études expérimentales ont également montré, qu'après infection expérimentale, l'excrétion virale est assez proche en durée comme en titre entre un veau initialement séronégatif et un veau porteur d'anticorps maternels d'origine colostrale (Ig G1) avant inoculation (Kimman, 1989 a).

Le rôle protecteur de ces anticorps semble supérieur à l'étage pulmonaire qu'à l'étage nasal (Hemming, 1995).

II.3.2.3. Anticorps locaux

La protection contre les réinfections est habituellement attribuée aux anticorps « sécrétés » dans les mucosités de l'appareil respiratoire.

La disparition du VRSB dans les sécrétions nasales est corrélée à l'apparition des Ig A au niveau local. Leur présence dans les sécrétions nasales est liée à une résistance à la réinfection. Les Ig A sont peu ou pas neutralisantes *in vitro*, mais leur rôle supposé est de piéger le VRSB dans les mucosités et de favoriser son élimination en synergie avec les cellules « Natural Killer » et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (LTc) (Kimman, 1989 a).

Néanmoins, le rôle protecteur de l'immunité locale est plutôt déduit que directement déterminé. Il intervient surtout à l'étage supérieur des voies respiratoires.

II.3.3. Réponse immunitaire cellulaire

Les études sont en pleine expansion en ce qui concerne la réponse immunitaire à médiation cellulaire. L'immunité de type cellulaire, et particulièrement la réponse de type T cytotoxique, est essentielle dans l'élimination du virus. En effet, les déficiences de la réponse à médiation cellulaire sont associées à des troubles cliniques plus graves et à une excrétion prolongée (Hall, 1986 ; Harrington, 1992 ; Taylor, 1995).

Chez des animaux infectés expérimentalement par le VRSB, une activité lymphocytaire T cytotoxique associée au phénotype CD8 + peut être mise en évidence dans le sang 7 à 10 jours p.i. et dans les poumons 10 jours p.i. (Gaddum, 1996 ; Thomas, 1996).

En outre, une augmentation significative de la réponse cellulaire de type CD4 + et des concentrations accrues en interleukine de type 2 (IL-2) et en interféron gamma (IFN γ) ont été observés sur des animaux préalablement vaccinés avec des vaccins vivants recombinés ou inactivés (Ellis, 1992 a).

Une augmentation des lymphocytes T de type CD8+ (LT CD8 +) est présente lors de primo-infection. Les LT CD8 + semblent posséder un rôle prépondérant dans l'élimination du virus.

Les cellules CD4 + et les autres cellules T orientent la réponse immunitaire vers une balance Th 1 / Th 2. La réponse de type Th 1 est une réponse associée à la production d'IFN γ . La réponse de type Th 2 permet d'activer les cellules inflammatoires par le biais des IL4, IL5. Ainsi, l'activation des mastocytes et des éosinophiles est responsable des phénomènes inflammatoires des bronchiolites et de bronchiolo-constriction. La réaction et l'orientation de la réponse immune se font sous l'influence des cytokines produites dans le milieu. Dans une étude réalisée sur des veaux inoculés expérimentalement avec du VRSB, les profils d'interleukines obtenus à partir de cellules mononucléées pulmonaires et sanguines prélevées 7 jours p.i. et sans restimulation sont apparus variables entre individus. Les cytokines détectées, à savoir IFN γ , IL-2, IL-4 et IL-10, indiquent un mélange de réponse Th 1 et Th 2 (Mc Innes, 1998). L'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th 1 ou Th 2 varie en fonction des protéines virales et du type de présentation (Alwan, 1993 ; Srikiatkachorn, 1999).

Une série d'infections expérimentales, par le VRSH, de souris préalablement sensibilisées avec des vaccins recombinants exprimant indépendamment les protéines d'enveloppe du virus ont montré que (Srikiatchkachorn, 1997 a et b, 1999 ; Braciale, 2005 ; Tripp, 2005) :

- la protéine G est à l'origine d'une forte production d'IL-4 et IL-5 et d'une importante éosinophilie pulmonaire (indication d'une forte induction de la réponse de type Th 2), mais n'induit aucune réponse cytotoxique.
- la protéine F entraîne une production d'IL-2 et une infiltration de cellules mononucléaires, ainsi qu'une forte réponse en lymphocytes T cytotoxiques.
- la protéine G induit une réponse Th 1 simultanément à la réponse Th 2 et l'orientation vers l'une ou l'autre semble indépendante de la spécificité d'épitope.
- les protéines G et / ou SH diminuent la réponse Th 1 médiée par les chemokines CCL2, CCL3 et CCL4.
- la réponse en LT CD8 + est corrélée à une diminution des cytokines de type Th 2 et du recrutement des éosinophiles dans le poumon.

II.4. Pouvoir pathogène

Bien que lors d'infections expérimentales, les symptômes soient moins graves que lors d'infections naturelles, les modèles expérimentaux ont permis de compléter l'étude des étapes de l'infection et des mécanismes pathogéniques.

II.4.1. Cinétique de l'infection

D'après les modèles expérimentaux, le temps d'incubation chez les bovins est estimé à 4 ou 5 jours (Belknap, 1995).

La contamination de l'animal s'effectue par les voies nasales supérieures en condition naturelle. La dissémination du virus des cavités nasales vers les poumons se réalise par aspiration de mucosités et de sécrétions contenant des particules virales infectieuses. La protéine F est à l'origine de la fusion entre les cellules infectées et non infectées voisines entraînant ainsi la formation de syncytia et permettant ainsi la propagation du virus sans passage par le milieu extracellulaire. Ce mode de contamination permet au virus d'échapper à la réaction immunitaire humorale de l'hôte (Collins, 2001).

Chez le veau, il semblerait que l'incubation soit de 4 à 5 jours après l'infection expérimentale par voie nasale (Thomas, 1984 a ; Belknap., 1995). Lors d'infection expérimentale, le VRSB peut être isolé des sécrétions nasales entre 1 et 10 jours p.i. (Elazhary, 1980), et des muqueuses trachéales et bronchiques entre 3 et 10 jours p.i. (Jacobs, 1975 ; Castelman, 1985 a). La progression du virus semble se faire du tractus respiratoire supérieur vers le tractus respiratoire profond par les mucosités et les sécrétions (Collins, 1996). Dans certains cas spontanés, l'infection paraît limitée au tractus respiratoire supérieur sans qu'il y ait de réplication dans les bronches et les alvéoles (Viuff, 1996).

Le VRS semble être strictement localisé à l'appareil respiratoire. Ainsi, Larsen (1999) ne détecte le virus par RT-PCR que dans les poumons, la muqueuse trachéale, nasale et les nœuds lymphatiques trachéo-bronchiques et médiastinaux.

II.4.2. Cibles cellulaires

Le tropisme cellulaire du VRSB est limité aux cellules de l'appareil respiratoire. *In vivo* et *ex vivo*, les cellules ciliées de l'épithélium sont les cibles primaires du VRS. Ainsi, on retrouve du VRSB dans les cellules épithéliales nasales, trachéales, bronchiques ainsi que dans les pneumocytes alvéolaires de type I et II (Castleman, 1985 b ; Mc Nulty, 1983 ; Bryson, 1991). Toutes les populations cellulaires ne permettent pas la réplication virale avec la même intensité. En effet, d'après des résultats *in vitro*, le VRSH se réplique mieux dans les cellules épithéliales nasales que bronchiques (Becker, 1992).

De plus, des particules virales peuvent être détectées dans les macrophages (Castleman, 1985 a - b ; Adair, 1992) et les éosinophiles (Olszewska-Pazdrak, 1998), mais la réplication virale semble limitée dans ces cellules. Bien qu'aucune donnée ne soit disponible pour le veau, des antigènes viraux ont aussi été détectés *in vitro* dans les monocytes et les lymphocytes de mouton (Sharma, 1996).

Même si la réplication du VRS ne paraît pas optimale, l'infection des cellules mononucléées semblent modifier les fonctions cellulaires. *In vitro*, la phagocytose, la bactéricidie et la production de monoxyde d'azote sont diminuées. En plus de la réaction inflammatoire, les macrophages infectés inhiberaient la transformation lymphoblastique et produiraient des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles, d'où l'affluence de ces cellules dans la lumière broncho-alvéolaire et la neutrophilie observée (Adair, 1992).

II.4.3. Les mécanismes pathogéniques

Les mécanismes pathogéniques sont mal connus. Les lésions observées sont dues à un effet cytopathogène (ECP) du virus, à des mécanismes immunopathogéniques induisant une réaction inflammatoire exacerbée et enfin à divers facteurs influençant le devenir de l'infection et la gravité des signes cliniques observés (Collins, 2001).

II.4.3.1. Pathogénie

L'ECP du virus sur l'épithélium respiratoire conduit à une bronchiolite nécrosante et obstructive, ce qui peut expliquer les symptômes de broncho-pneumonie. Cette dernière est plus ou moins grave en fonction de différents facteurs (Hoffman, 2004) :

- l'immaturation des poumons des jeunes veaux d'un point de vue anatomique, physiologique et immunitaire, ainsi que la prédisposition des bovins (surtout des animaux culards) aux troubles respiratoires (Valarcher, 1999 b ; Collins, 2001).
- les déficits immunitaires congénitaux et acquis qui favorisent une multiplication virale et une exacerbation des signes cliniques (Thomas, 1996 ; Collins, 2001).

D'autres facteurs sont liés au virus :

- la virulence de la souche virale infectieuse ainsi que la charge virale.
- l'inhibition des IFN de type I : les IFN de type I jouent un rôle important dans l'activité antivirale et de nombreux virus ont développé des stratégies pour inhiber la voie des IFN. Ainsi, il a été montré que les protéines non structurales NS1 et NS2 du VRS bloquent l'induction des IFN α / β (Young, 2000 ; Schlender, 2000 ; Bossert, 2003).
- les surinfections bactériennes favorisées par l'altération de l'appareil mucociliaire, l'accumulation des débris cellulaires et l'altération des fonctions macrophagiques lors de l'infection par le VRS (Adair, 1992).

La réponse inflammatoire locale est confirmée par la présence de médiateurs inflammatoires non spécifiques retrouvés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) : entre autres les thromboxanes, les cytokines et les prostaglandines (Gershwin, 1989).

II.4.3.2. Immunopathogénie

La pathogénie du VRSB est très peu connue, mais de nombreuses études montrent que le système immunitaire jouerait un rôle primordial. La deuxième composante est donc de nature immunopathologique (Larsen 2000 ; Collins, 2001). Cette composante semble être notamment responsable du syndrome de détresse respiratoire aiguë non expliqué par l'effet direct du virus. Bien qu'il y ait des évidences considérables qui suggèrent le rôle de la réponse immune innée dans la pathogenèse du VRS, son importance n'a pas encore été confirmée (Hoffman, 2004). Plusieurs autres hypothèses ont été formulées, sans pour autant avoir été confirmées.

- Hypothèse d'une hypersensibilité de type III

Plusieurs observations sont à l'origine d'une hypothèse impliquant l'activation du complément par des complexes immuns :

- une incohérence entre la durée d'évolution clinique (brève) et la nature des lésions (lésions microscopiques anciennes et qui paraissent antérieures à l'apparition des signes cliniques) (Kimman, 1989 c).
- la présence d'anticorps spécifiques, qui seraient d'origine passive ou consécutifs à une infection discrète sur le plan clinique, chez les individus infectés.
- la différence de nature des lésions crânio-ventrales (lobes légèrement densifiés) et caudo-dorsales (lobes oedémateux et emphysémateux).
- l'hétérogénéité de répartition des antigènes viraux dans les lobes pulmonaires antérieurs.

L'effet cytopathologique du virus entraîne dans les lobes pulmonaires antérieurs une lyse cellulaire et ainsi l'apparition d'une réaction inflammatoire et la libération d'antigènes viraux. Ces derniers formeraient des complexes immuns, strictement localisés aux poumons, avec des anticorps spécifiques (Ig M ou Ig G1 qui apparaissent 8 à 10 jours après l'infection) et provoqueraient un phénomène d'Arthus en activant le complément (Kimman, 1989 b). L'activation du complément favoriserait l'afflux de neutrophiles. Les facteurs du complément,

anaphylatoxines C3a et C5a, diffuseraient dans l'ensemble du poumon, induisant la libération d'histamine et de leucotriènes (LTC₄ et LTD₄) par les cellules mastocytaires et provoquant une bronchoconstriction, œdème et emphysème pulmonaire (Kimman, 1989 a ; Valarcher, 1999 a).

Cette hypothèse explique donc l'hétérogénéité de répartition du virus et de l'emphysème dans les poumons, ainsi que l'allure parfois biphasique de la maladie : une première atteinte respiratoire légère suite à l'infection virale, puis une pneumonie emphysémateuse, après plusieurs jours lorsque les anticorps apparaissent.

De plus, une étude réalisée par Polack (2002) démontre que la gravité de la maladie semble être médiée par les complexes immuns, puisqu'elle est abrogée chez les souris déficientes en élément C3 du complément, et met en évidence post mortem une activation du complément dans les sections de poumon des enfants atteints d'une forme sévère de l'infection par le VRS.

Cependant, chez les bovins atteints de VRSB, des immuns complexes n'ont jamais été identifiés et l'évolution biphasique de la maladie est rarement observée chez ces animaux.

- Hypothèse d'une hypersensibilité de type I

Des mécanismes pathogéniques analogues à ceux observés lors d'une HS de type I sont souvent proposés. Suite à une sensibilisation spécifique, l'orientation Th2 pourrait être la plaque tournante de la pathogénie. Cette hypothèse est étayée par la démonstration chez des enfants d'une corrélation précoce et élevée en Ig E et en médiateurs pro-inflammatoires dans les sécrétions respiratoires, et la gravité de la maladie (Welliver, 1994). De plus, Kimman (1989 c) observe des mastocytes dégranulés et des Ig E sur des coupes de poumon de veaux infectés de manière naturelle par le VRSB.

- Hypothèse d'une modulation de la réponse immunitaire cellulaire

Cette hypothèse est en relation avec la détection d'IgE et de médiateurs pro-inflammatoires dans les sécrétions respiratoires.

Les principales études ont été menées avec le VRSH sur modèles souris, dans un premier temps dans le but d'expliquer l'exacerbation des signes cliniques dû à ce virus chez les enfants primo-vaccinés avec un vaccin inactivé (Alwan, 1993 ; Hancock, 1996). Ces études ont montré que lors d'une primo-infection ou vaccination, la glycoprotéine G serait responsable de l'orientation de la réponse immune cellulaire vers une voie Th 2. Lors d'une infection ultérieure au VRSH, cette réponse Th2, caractérisée par une production d'IL-4, IL-5 et IL-13, serait à l'origine d'une libération de médiateurs pro-inflammatoires, responsables des signes cliniques observées, et d'une infiltration éosinophilique dans les poumons. Par la suite, Antonis (2003), dans un modèle d'infection bovin par le VRSB, a retrouvé une réponse Th2 exacerbée, accompagnée d'une réponse Ig E hyperactive, après pré-immunisation des bovins avec un vaccin inactivé à la formaline et adjuvé à l'alun.

En résumé, la protéine G contient un épitope, suffisant mais non nécessaire, qui peut induire indifféremment une réponse LT CD4+ de type Th 1 ou Th 2. Les facteurs influençant le contexte immunologique induit par G sont multiples : l'induction préalable de cellules T mémoires CD4+ de type Th2 spécifiques du VRS, la diminution des LT cytotoxiques et des cellules NK, l'exposition primaire à la protéine G sécrétée plutôt qu'à la protéine G transmembranaire, une inflammation allergique concomitante des voies respiratoires, les propriétés intrinsèques de l'hôte favorisant la réponse de type Th2 (Graham, 2000).

Ces mécanismes sont décrits principalement chez les souris et lors d'une pré-immunisation.

II.5. Diagnostic de l'infection par le VRSB

II.5.1. Généralités

Un diagnostic uniquement basé sur la symptomatologie est impossible, car les troubles respiratoires sont peu spécifiques. Seul un diagnostic de laboratoire peut confirmer une suspicion d'infection par le VRSB dans un élevage.

Les résultats obtenus lors des examens de laboratoires doivent être interprétés en tenant compte de plusieurs paramètres :

- l'âge de l'animal : le pic d'incidence clinique survient sur des animaux de moins de 6 mois, et les anticorps sériques d'origine maternelle, encore présents à cet âge, peuvent gêner le diagnostic de certitude.

- le type et la qualité du prélèvement : le VRSB est très fortement lié aux cellules, donc un prélèvement contenant peu de cellules est peu utilisable pour une analyse virologique.
- le mode de conservation des prélèvements : ce virus est très faible et fragile, une conservation sous froid négatif est préférable à la température ambiante.
- la sensibilité de la technique utilisée.
- les délais entre le début des signes cliniques et la réalisation des prélèvements, entre la mort et la réalisation des prélèvements, et entre la réalisation des prélèvements et la mise en route des analyses : le virus est très fragile dans le milieu extérieur et la réplication virale est de courte durée dans le tractus respiratoire.

Les techniques les plus utilisées en médecine vétérinaire sont la RT-PCR (ARN) ou la détection d'antigènes viraux chez les animaux vivants ou morts, car ce sont des techniques faciles à mettre en œuvre. Malgré tout, elles n'apportent pas toujours une réponse satisfaisante.

II.5.2. Animal vivant

II.5.2.1. Sérologie : recherche indirecte

Le diagnostic sérologique nécessite au moins deux prélèvements, afin de détecter une séroconversion ou une augmentation significative du titre en anticorps dirigés contre le VRSB. La première prise de sang doit être effectuée pendant la phase aiguë de l'infection et la deuxième entre 2 et 3 semaines après le premier prélèvement (Elazhary, 1981 ; Westenbrink, 1989).

Parmi les différentes techniques disponibles pour mettre en évidence ces anticorps sériques (immunofluorescence indirecte, séroneutralisation ou fixation du complément), la plus utilisée reste la technique ELISA. Outre sa sensibilité et sa spécificité, elle permet une obtention rapide et facile des résultats. Etant donné la forte séroprévalence du virus chez les bovins adultes, la fréquence des veaux porteurs d'anticorps anti-VRSB d'origine colostrale est très élevée et gêne le diagnostic sérologique. L'immunité passive bloque partiellement ou totalement la synthèse d'Ig G (mais pas celle d'Ig M) suite à une infection. Les tests ELISA

conventionnels ne détectant que les Ig G sont donc souvent d'intérêt limité dans le diagnostic de certitude du VRSB chez les jeunes animaux (Collins, 2001).

II.5.2.2. Virologie : recherche directe

- Prélèvements :

Différentes techniques de prélèvements sont utilisées pour détecter le VRSB, à savoir l'écouvillonnage nasal (EN), l'aspiration trans-trachéale (ATT) et le lavage broncho alvéolaire (LBA). Cependant, les prélèvements issus du tractus respiratoire profond (LBA) semblent plus riches en virus, ce qui peut s'expliquer par la richesse en cellules du LBA et par la localisation pulmonaire du virus lors d'infections graves (Jacobs, 1975 ; Larsen, 2000).

- Isolement viral :

C'est la technique classique, mais elle est très peu utilisée en diagnostic de routine, car les résultats sont incertains du fait de la labilité du virus et des difficultés de conditionnement et de conservation jusqu'au laboratoire.

- Détection d'antigènes viraux :

C'est la technique la plus sûre en phase aiguë de l'infection. La détection d'antigène est réalisée sur les prélèvements obtenus par EN ou LBA. La contamination des sécrétions nasales par des bactéries ou des champignons n'interfère pas avec la détection d'antigène.

La technique d'immunofluorescence (IF) permet de détecter un plus grand nombre d'échantillons positifs et sur une plus longue période (jusqu'à 14 jours p.i. sur des cellules nasales et 18 jours p.i. sur des cellules de LBA) que l'isolement viral, quelque soit l'étage respiratoire où est effectué le prélèvement (Collins, 2001).

Des techniques immunoenzymatiques de détection d'antigènes ont été développées pour le VRSH avec de très bonnes spécificité et sensibilité par rapport à l'isolement viral ou l'IF (Ahluwalia, 1988). Certains de ces tests ont été utilisés pour le VRSB du fait des grandes similarités antigéniques avec le VRSH (Rodgers, 1990). Il existe maintenant un test vétérinaire spécifique (test Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test). L'intérêt de ce test de terrain est qu'il est réalisable par le vétérinaire de manière immédiate à la clinique. Le prélèvement est réalisé en élevage en 5 minutes, la mise en solution en 30 secondes et l'analyse réalisée à

la clinique nécessite : 10 minutes pour l'isolement du virus via la solution d'extraction et 15 minutes pour la lecture du test immunochromatographique. Ce test rapide et fiable permet de s'affranchir des analyses de laboratoires longues, coûteuses et tardives. La conservation des prélèvements à + 4 °C pendant 12 heures ne réduit pas la sensibilité de ce test (West, 1998).

- Détection de l'ARN viral :

La technique de transcription réverse, suivie d'amplification génique (RT-PCR) semble intéressante, notamment lors d'amplification d'un segment de gène peu variable comme celui de la nucléoprotéine N (Larsen, 1999). La conservation des prélèvements (sécrétions nasales) à + 4 °C pendant 12 heures ne réduit pas la sensibilité de la RT-PCR (West, 1998). Selon une étude récente, le VRSB a pu être détecté à partir du LBA de veaux inoculés expérimentalement jusqu'à 17 jours p.i. par la technique de RT-PCR sur le gène N, alors que cette détection n'est possible que jusqu'à 9 jours p.i. par les techniques d'isolement viral et d'IF indirecte (Valarcher, 1999 a).

De même, au laboratoire de l'UMR INRA-ENVIT IHAP, il a été possible de détecter le virus jusqu'à 14 jours p.i. dans les EN de veaux infectés grâce à une technique de RT-PCR quantitative (Boxus, 2005).

II.5.3. Animal mort

A l'autopsie, la mise en évidence des antigènes viraux peut se faire par des techniques de RT-PCR (fragment de parenchyme pulmonaire frais ou congelé) ou d'immunofluorescence (IF) sur coupes de poumon frais ou congelé. Des techniques immunoenzymatiques peuvent être utilisées sur le mucopus présent dans les bronches, pour détecter l'antigène du VRSB (test Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test).

L'examen histologique possède l'avantage de visualiser les lésions caractéristiques d'infection par le VRSB (voir paragraphe lésions). Cet examen peut être complété par des techniques immunohistochimiques (immunoperoxydase IP) sur coupes de poumon congelé ou sur coupes en paraffine pour mettre en évidence la présence des antigènes viraux, ainsi que les structures cellulaires hébergeant ces antigènes (Kimman, 1989 a ; Masson, 1993).

Les tests de capture d'antigènes ont une grande sensibilité sans présenter les difficultés d'interprétation de l'immunomarquage. Sur 25 prélèvements de poumons positifs par détection d'antigènes par immunocapture, 6 ont été positifs par IF directe et aucun par isolement viral (Rodgers, 1990). Dans une autre étude basée sur un grand nombre de poumons ($n = 251$), le même test s'est révélé positif sur 63 poumons et simultanément sur 37 par IF sur coupe (Osorio, 1989).

Les prélèvements doivent être effectués de préférence dans les lobes pulmonaires crânio-ventraux, en raison notamment de la pauvreté en antigènes viraux des régions plus caudales (Kimman, 1989 a). En raison de la grande labilité du virus, la réussite du diagnostic est surtout conditionnée par la fraîcheur du prélèvement.

III. VACCINATION CONTRE LE VRSB ET EVOLUTION VIRALE

III.1. Vaccination

La prévention par la vaccination passe par l'obtention et l'utilisation de vaccins efficaces. En médecine vétérinaire, des vaccins atténués et inactivés dirigés contre le VRSB sont d'ores et déjà commercialisés.

Les vaccins vivants ont pour avantage de susciter une réaction immunitaire proche de celle observée lors d'infection naturelle, même en présence d'anticorps maternels. Les inconvénients de ces vaccins peuvent être les mutations réverses et la circulation des souches vaccinales dans la population (Dudas, 1998).

Les vaccins inactivés sont totalement incapables de se multiplier, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur) ou surtout actuellement chimique (formol, β propiolactone, éthylèneimine, ...) qui entraîne une perte totale d'infectivité sans dénaturer son pouvoir immunogène. De manière à obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une masse importante d'antigène et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé que les vaccins à souche vivante modifiée.

D'une manière générale, les vaccins vivants et inactivés protègent cliniquement les animaux et ils ont très probablement permis de limiter la circulation du virus. Cependant, ils n'empêchent cependant pas la réinfection du veau. En 1999, un des vaccins inactivés a été retiré du marché (Vacores®), car les études de pharmacovigilance montraient une fréquence considérée comme anormalement élevée de mortalité associée au VRSB sur des bovins préalablement vaccinés. Les pays du Sud de l'Europe, comme la France, l'Italie ou l'Espagne, pratiquent la vaccination à grande échelle depuis plus de 20 ans, tandis que les pays nordiques comme la Suède ou le Danemark, pratiquent la vaccination seulement depuis 1996. En France, d'après une étude marketing portant sur 400 éleveurs possédant au moins 40 bovins adultes et représentatifs de l'élevage français, sont vaccinés 16 % des bovins laitiers, 36 % des bovins allaitants de moins de 1 an et 30 % des taurillons (Petit, J. L., communication personnelle, Vétouinol).

La problématique de la vaccination contre le VRSB repose sur différents critères :

- l'innocuité des vaccins, notamment des vaccins inactivés.
- la nécessité de vacciner à un âge où le système immunitaire des veaux est immature.
- la présence d'anticorps colostraux qui interfèrent avec le développement d'une réponse immunitaire post vaccinale.
- la nécessité d'induire une réponse immunitaire locale forte.
- la variabilité des souches virales par rapport aux différents vaccins.

III.1.1. Innocuité

Les problèmes liés à l'utilisation du vaccin contenant le VRSH inactivé au formol (Lot 100) ne semblent pas avoir été observés pour le VRSB lors d'essais terrains (Kim, 1969). Expérimentalement, l'immunisation de veaux à l'aide d'un vaccin formolé peut induire une exacerbation clinique et lésionnelle lors d'épreuve virulente (Gershwin, 1998 ; Antonis, 2003). En revanche, les vaccins vivants modifiés sont souvent considérés comme peu susceptibles d'induire une exacerbation des troubles cliniques. Cependant, une forme clinique grave est apparue suite à la vaccination par un vaccin vivant (Rispoval RS ®) (Kimman, 1989 b). La responsabilité du vaccin n'a cependant pas été clairement démontrée. En 1999, l'AMM d'un vaccin inactivé par la β propiolactone et adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium et à la saponine (Vacores ®) a été retirée en raison d'un nombre de mortalités attribuées au VRSB et survenues sur des bovins vaccinés (environ 1 / 1000) élevées. Néanmoins, aucun élément à l'heure actuelle ne permet de déterminer si ces cas étaient dus à une inefficacité ou à un manque d'innocuité. De plus, depuis 1999, il existe des vaccins inactivés BarVac ® RS et Bovilis Bovigrip ® qui ont été utilisés sur le marché avec plusieurs milliers de doses, sans accident connu d'innocuité.

III.1.2. Activité et réponse immunitaire

La réponse immune protectrice envers le VRSB implique une réponse humorale et à médiation cellulaire.

Pour certains vaccins inactivés, la réponse humorale paraît satisfaisante à travers le rapport anticorps neutralisants sur anticorps « totaux » détectés par technique immunoenzymatique (Brun, 1994 ; Stott, 1984). Néanmoins ce rapport demeure inférieur à celui obtenu à l'aide des vaccins vivants (Ellis, 1992 b ; Ellis, 1995 ; Thomas, 1984 b).

L'immunisation de vaches séropositives en fin de gestation à l'aide du Rispoval RS ® (vaccin atténué par passage répété en cultures cellulaires) provoque une augmentation significative des anticorps neutralisants sans augmentation des anticorps totaux détectés par Elisa (Ellis, 1996 a). Ceci se traduit par un renforcement de l'immunité passive spécifique chez le nouveau-né.

La réponse à médiation cellulaire n'a été évaluée que par des tests de prolifération lymphoblastique. La comparaison de vaccins inactivés commercialisés ou non et de vaccins vivants modifiés mono ou polyvalents commercialisés montre qu'une réponse cellulaire est induite dans tous les cas (Ellis, 1992 a – b ; Ellis, 1995). La réponse immunitaire engendrée par le Rispoval RS ®, appréciée par des tests de prolifération lymphoblastique, devient supérieure à celle obtenue pour un vaccin inactivé, au bout de 3 injections successives (Ellis, 1992 a).

III.1.3. Variabilité antigénique et vaccination

Selon des études récentes, la variabilité génétique et antigénique du VRSH semble plus faible par rapport au VRSH (Prozzi, 1997 ; Stine, 1997 ; Larsen, 1998 a – b ; Elvander, 1998). L'étude de la protection croisée a été peu étudiée (Schrijver, 1998). La primo-infection par la souche Waiboerhoeve (souche WBH), n'appartenant à aucun des trois sous groupes bovins antigéniques A, B et AB, n'a suscité qu'une protection partielle du tractus respiratoire supérieur (2/4 veaux) et profond (1/4 veaux) lors d'épreuve avec une souche hétérologue (Souche Odjik) appartenant au sous-groupe antigénique A. En revanche, la protection a été totale chez les veaux initialement infectés avec la souche Odjik et éprouvés avec cette souche. Cependant, la primo infection avec la souche WBH fut moins sévère que celle provoquée par la souche Odjik tant sur un plan virologique que clinique. De plus, la primo infection avec la souche WBH n'a induit l'apparition d'Ig M spécifiques que sur 2 des 4 veaux inoculés.

III.1.4. Immunité passive et vaccination

Les bovins âgés de moins de 1 an sont les plus gravement touchés par le VRSB. La fréquence maximale des troubles cliniques est observée à un âge (< 6 mois) où les anticorps d'origine colostrale sont présents. Ces derniers peuvent interférer avec une immunisation active.

Deux stratégies sont théoriquement possibles :

- vacciner les vaches en fin de gestation afin d'obtenir une protection suffisante via le colostrum, qui sera limitée aux premières semaines de vie,
- vacciner les veaux très précocement mais, dans ce cas, la période de protection apparaît plus tardivement et l'efficacité peut être réduite par les anticorps maternels.

Chez la souris (Brandt, 1997) et chez le veau (Ellis, 1996 b), la vaccination peut induire une réponse immune en présence d'anticorps maternels spécifiques. Chez le veau, une protection a pu être obtenue avec un vaccin inactivé et adjuvé, malgré des titres élevés en anticorps d'origine maternelle (Stott, 1986). La vaccination de veaux âgés de moins de trois semaines porteurs d'anticorps maternels, par voie intra musculaire avec un vaccin vivant, a suscité une synthèse d'anticorps (Debouk, 1994). Néanmoins, un rappel paraît nécessaire à l'âge de 4 mois sur les animaux initialement porteurs d'anticorps pour prolonger la fenêtre de protection (Zygraich, 1982 ; Herout, 1985 ; Debouk, 1994).

L'intérêt majeur de l'immunisation par voie intranasale est d'apporter une protection très précoce, dès quelques jours suivant l'immunisation, réalisée en une seule administration (Vangeel, 2005). L'immunisation intranasale permet ainsi le développement d'une immunité locale au site de multiplication initiale des agents infectieux : le tissu lymphoïde associé aux étages nasal (Nasal Associated Lymphoid Tissue ou NALT) et bronchique (Bronchus Associated Lymphoid Tissue ou BALT) et d'une immunité générale (Anderson, 1986 ; Chen, 1989 ; Schuh 1992). Chez des veaux porteurs d'anticorps d'origine maternelle, l'immunisation par voie nasale à l'aide d'un virus vivant est apparue plus protectrice que l'immunisation induite par voie intramusculaire (Kimman, 1987 et 1989 b). L'efficacité de cette immunisation locale a aussi été démontrée chez des veaux initialement séronégatifs (Kimman, 1989 b ; Schmidt, 2002 ; Woolums, 2004) et séropositifs (Kimman, 1988 ; Miao, 2004 ; Woolums, 2004).

Au cours de ce même essai, la présence d'une mémoire immunitaire a pu être démontrée. Lors de la réinfection, une réponse anamnétique humorale locale et sérique est apparue seulement chez les veaux vaccinés par voie nasale (qu'ils aient été ou non porteurs d'anticorps passifs). En revanche, par voie intramusculaire, les animaux séropositifs n'ont pas développé de mémoire immunitaire après une primo-infection. L'immunisation par voie nasale paraît donc être une solution intéressante pour la protection des jeunes veaux porteurs d'anticorps colostraux.

En l'absence d'anticorps maternels ou en présence d'une faible concentration, l'immunisation des veaux rencontre moins d'obstacles. Mais la protection induite par les vaccins commercialisés semble être d'une durée limitée à 4 mois (Zygraich, 1982).

III.1.5. La vaccination anti-VRSB en France

Actuellement plusieurs vaccins dirigés contre le VRSB sont commercialisés. Certains sont des vaccins vivants atténués par passages répétés ou culture à « basse température » (Wellemans, 1975 ; Kubota, 1990) et d'autres sont inactivés (Stott, 1984). Il n'existe pas de vaccins recombinants ou « ADN » commercialisés, mais certains font actuellement l'objet d'études.

Actuellement en France, les vaccins commercialisés sont au nombre de 5 (4 vaccins vivants, dont un par voie intra nasale et un vaccin inactivé) et ils sont conçus à partir de :

- la souche 220/69 (sous groupe AB et sous groupe II) isolée en 1969 en Belgique (Wellemans, 1970) pour les vaccins atténués : Rispoval RS ® et Rispoval RS-BVD ® (et l'ancien vaccin Vacores®). Le vaccin vivant Rispoval RS ® est commercialisé depuis 1983 en France, depuis 1977 en Belgique et depuis 1978 en Hollande. Il contient la souche RB 94, qui a été obtenue par atténuation de la souche 220/69 par 96 passages successifs en culture cellulaire. Il existe aussi sous forme de valence associée au virus BVD (Rispoval RS-BVD ® commercialisé depuis 2003 en France). Ils sont tous les deux administrés par voie intra musculaire.
- la souche Lehmkuhl ou 375 (sous groupe A et sous groupe III) isolée en 1975 aux USA pour les vaccins atténués : Rispoval 3 ® (RS-PI3-BVD) et Rispoval RS-PI3 IntraNasal ® (et l'ancien vaccin Bayovac ® BRSV). Le vaccin atténué Rispoval 3 ® (RS-PI3-BVD) est commercialisé depuis 2003 en France. Il a été obtenu par

atténuation de la souche Lehmkuhl ou 375 par un nombre inconnu de passages successifs en culture cellulaire. Il est administré par voie intra musculaire. Le vaccin atténué Rispoval RS-PI3 Intra Nasal ® est commercialisé depuis 2006 en France. Il a été obtenu comme le Rispoval 3 ® par atténuation de la souche Lehmkuhl ou 375. Par contre, sa voie d'administration étant la voie intra nasale, elle lui confère des avantages particuliers : une protection très précoce, le développement d'une immunité locale et l'acquisition d'une mémoire immunitaire en présence d'une immunité passive d'origine colostrale.

- la souche EV 908 (sous groupe antigénique et génétique inconnus) isolée en 1990 au Danemark pour le Bovilis Bovigrip ®. Le vaccin trivalent Bovilis Bovigrip ® est dirigé contre le VRSB, le PI3 et Mannheimia haemolytica. C'est un vaccin inactivé contenant la souche EV 908 isolée en 1990 au Danemark et adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium et à la saponine.
- la souche Tennessee (sous groupe antigénique inconnu et génétique inconnus) isolée aux USA (année inconnue) pour le vaccin ancien Barvac ®.

Le Vacores® (vaccin inactivé issu de la souche 220/69), le Bayovac BRSV ® (vaccin atténué issu de la souche Lehmkuhl ou 375) et le Barvac ® (vaccin inactivé issu de la souche Tennessee) ne sont plus commercialisés en France.

Un tableau récapitulatif des vaccins disponibles et anciennement commercialisés en France est reporté dans l'annexe n°3.

Une étude comparant un vaccin inactivé (obtenu par fixation du glutaraldéhyde d'une lignée de cellules de muqueuse trachéale bovine infectée de façon persistante (souche 127)) et d'un vaccin vivant modifié (souche 220/69 après 96 passages ; Rispoval RS ®) fait apparaître une efficacité supérieure, sur un plan virologique, pour le vaccin inactivé, vis à vis de la souche homologue du vaccin inactivé (Stott, 1984). Mais ces résultats doivent être considérés avec prudence, car la souche d'épreuve n'était autre que la souche 127. Aux cours d'essais terrain, ce vaccin inactivé (127) sous forme monovalente ou inclus dans un vaccin polyvalent a eu un effet protecteur significatif sur la morbidité (Howard, 1987 ; Stott, 1987).

L'efficacité du Rispoval RS ® a été évaluée dans un essai terrain au sein de 27 élevages régulièrement infectés par le VRSB. Des infections par le VRSB ont été détectées dans 6 des 8 élevages où aucun veau n'avait été vacciné, dans 9 des 10 élevages où 50 % des veaux avaient été vaccinés et seulement dans 2 des 9 élevages où 100 % des veaux avaient été vaccinés (Verhoeff, 1984 a – b).

Dans des ateliers d'engraissement des jeunes bovins, les résultats de la vaccination sont favorables sur des critères médicaux et / ou techniques dans seulement 2 essais sur 4 avec vaccin inactivé et 2 essais sur 9 avec vaccin vivant modifié (Perino, 1997).

Enfin, selon les études, l'efficacité de la vaccination vis-à-vis de VRSB chez les bovins avant ou après sevrage, paraît variable. Dans certains essais terrain, l'intérêt économique de la vaccination paraît justifié (Bohlender, 1984), tandis que dans d'autres il est remis en question (Van Donkergoed, 1990).

III.1.6. Les vaccins du futur (recombinants et à ADN)

Pendant ces 15 dernières années, des efforts intensifs de recherche ont permis de proposer de nouveaux vaccins, qui ont été évalués en modèle animal.

Des vaccins recombinants du virus de la vaccine ont surtout été utilisés en station pour étudier le rôle immunogène de certaines protéines virales (Thomas, 1994 a – b).

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse de type 1 délété gE, exprimant la glycoprotéine G du VRSB (BHV1-G) (vaccin recombinant utilisant le BHV-1 comme vecteur exprimant la glycoprotéine G) induit une protection, équivalente à celle observée avec un vaccin vivant atténué (Schrijver, 1998).

Les recherches actuelles se sont concentrées sur la production de vaccins sous-unitaires avec adjuvants orientant la réponse cellulaire T CD4+ vers une voie de type Th 1, sur la production de vaccins vivants atténués construits par génie génétique pour le VRSH. Pour le VRSB, différents candidats vaccins ADN ont été testés.

Les premiers candidats vaccins ADN dirigés contre le VRSB ont fait l'objet d'études pour évaluer leur efficacité. L'immunisation de veaux avec un plasmide codant pour la glycoprotéine G induit une moins bonne protection que le recombinant BHV1-G VRSB. Mais la vaccination de veaux, par voie intradermique, avec un plasmide exprimant la protéine F du VRSB suscite une réponse humorale (4/4 veaux) et cellulaire T cytotoxique (2/4 veaux). Lors d'épreuve virulente, l'excrétion virale et le score lésionnel ont été réduits par rapport aux témoins (Thomas, 1998). Pour être efficace, les protocoles vaccinaux incluent cependant un nombre trop important de rappels, ce qui limite l'utilisation de tels vaccins chez les jeunes animaux où avoir une immunisation rapide est espérée.

Un vaccin à ADN incluant le gène de fusion (F) du VRSB (DNA-F) induit une protection significative contre l'infection par le VRSB de jeunes veaux. Cependant, les anticorps contre le VRSB se développent plus lentement chez les animaux vaccinés avec le vaccin précédent que chez ceux infectés uniquement avec du VRSB. La protection contre l'infection par le VRSB n'est donc pas aussi importante que celle induite par une primo infection. Bien qu'il y ait des différences dans le niveau de protection induit chez des veaux vaccinés DNA-F par les deux voies IM et SC, seule la voie IM induit une réponse spécifique Ig A plus rapide après un challenge vis-à-vis du VRSB (Taylor, 2005).

Des vaccins plasmidiques codant pour les protéines de fusion F et de nucléocapside N ont été testés chez des jeunes veaux vis-à-vis de leur immunogénicité. Deux administrations de ces 2 plasmides entraîne de faibles niveaux d'anticorps, mais il permettent une importante immunité cellulaire caractérisée par une réponse lymphoproliférative et une production d'IFN γ *in vitro* et *in vivo*. Cette importante réponse cellulaire réduit considérablement la réplication virale, les signes cliniques et les lésions pulmonaires après un challenge très virulent. Cependant, des veaux vaccinés avec un vaccin entier à ADN développent de haut taux d'anticorps neutralisants et sont protégés totalement à la suite du challenge. Ces résultats indiquent que la vaccination à ADN peut être une alternative prometteuse face aux vaccins classiques contre le VRSB chez les veaux (Boxus, 2007).

III.2. Variabilité du VRSB

Comme tous les virus à ARN, le VRSB a la capacité de muter à chaque cycle de réplication virale. Une souche virale est ainsi constituée de différents génomes hautement hétérogènes qui forment un spectre de mutants ; ce spectre représente un formidable réservoir de variants phénotypiques, qui confère au virus un remarquable potentiel de variation et d'adaptation. Cette capacité adaptative peut donc poser des problèmes variés en matière de réponse à la vaccination.

III.2.1. Réactivité croisée avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G

Les premières expériences concernant la variabilité du VRSB ont consisté en l'analyse de la réactivité des souches existantes vis-à-vis d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines virales. Ainsi ces études ont montré que les différences concernaient essentiellement la glycoprotéine G et la sous-unité F2 (Prozzi, 1997 ; Stine, 1997). Les études suivantes ont donc été axées principalement sur la protéine G, car elle est apparue comme étant la protéine virale la plus variable de toutes et une des cibles principales des anticorps (Elvander, 1998 ; Furze, 1997 ; Mallipeddi, 1993).

Pour le VRSH, le dimorphisme antigénique (contre G) observé a permis de définir deux sous-groupes A et B (Mufson, 1985 ; Norrby, 1986) avec 6 subdivisions au sein du sous-groupe A, et 2 à 3 subdivisions au sein du sous-groupe B. Sur le plan épidémiologique, la prévalence des sous-groupes varie d'un foyer à l'autre, géographiquement et dans le temps (Freymuth, 1991). Sur le plan immunitaire, l'importance de la variabilité antigénique n'est pas claire. Des observations, en nombre limité, suggèrent que, dans certains cas au moins, les réinfections seraient plus fréquentes avec des souches hétérologues (Anderson, 1991). Aucune corrélation entre la variabilité et le pouvoir pathogène des souches virales isolées n'a pu être mise en évidence.

Par analogie, les souches de VRSB ont été classées en sous-groupes sur la base de la réactivité antigénique de la protéine G. L'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette même protéine G a permis de classer les souches de VRSB en 2 sous-groupes, A et B (Furze, 1994). Par la suite, en 1996, en utilisant les mêmes anticorps, un troisième sous-groupe, nommé AB, a été rajouté (Schrijver, 1996 a ; Prozzi, 1997) (Tableau 2).

Sous-groupes antigéniques de VRSB	Mab70 (aa : 199-209)	Mab 20 et48 (aa : 174-185)
A	-	+
AB	+	+
B	+	-

Tableau 2 : Identification des trois sous-groupes antigéniques de VRSB à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G (Schrijver, 1996 b).

En Suède, des souches (n=5) isolées entre 1992 et 1995 ont été considérées comme des souches intermédiaires, car inclassables dans les sous-groupes A, B et AB (non A, non B et non AB) (Elvander, 1998). Ainsi, on estimait en 1998 qu'il existait au moins 4 sous-groupes différents de souches de VRSB : A, AB, B et intermédiaire (Tableau 3).

Auteurs	Souches		Identité de séquence des acides aminés	Groupes génétiques et antigéniques
	n	origine		
Mallipeddi, 1993	4 (b)	USA	>84 %	1 (B)
Furze, 1994	19 (b)	Europe	ND	2 (A et B)
Schrijver, 1996 b	14 (a)	Pays Bas	ND	3 (A ; AB ; non A, non B et non AB)
Stine, 1997	18 (b)	USA	>89 %	1
Prozzi, 1997	8 (b)	Europe, USA, Japon	>85 %	3 (A, B, AB)
Elvander, 1998	12 (b)	Europe, USA, Japon	>84 %	intermédiaire
Larsen, 1998	17 (b)	Europe, USA	>84 %	3 (A, B, AB)

Tableau 3 : Variabilité de la glycoprotéine G du VRSB sur la base de la réactivité à des anticorps monoclonaux et de la séquence en acides aminés selon plusieurs auteurs ; (a) poumons infectés par le VRSB ; (b) neutralisation croisée avec sérum polyclonal.

De plus, une corrélation entre la réactivité antigénique sur G et des mutations ponctuelles sur la séquence de cette protéine, exclusivement sur un site épitopique majeur situé entre les acides aminés 171 et 208 est possible (Furze, 1997 ; Langedijk, 1997). Enfin, sur la base de l'étude de la région codante 171-208, de nombreuses souches récemment isolées n'appartiennent à aucun des 4 sous-groupes définis (Tableau 4).

Dans la population bovine, les différents sous-groupes circulent simultanément (Stine, 1997), sans qu'une différence de pouvoir pathogène n'ait pu être mise en évidence entre eux. Aucune souche pouvant être classée dans le sous-groupe B n'a été isolée depuis 1976 (Furze, 1997 ; Furze, 1994).

Sous-groupes antigéniques	Mutations sur le segment 171-208				
A	L ¹⁸⁰	L ¹⁸³	S ¹⁸⁴	H ¹⁸⁷ ou Q ¹⁸⁷	T ²⁰⁵
AB	L ¹⁸⁰	S ¹⁸³	S ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	A ²⁰⁵
B	P ¹⁸⁰	S ¹⁸³	P ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	A ²⁰⁵
Souche non typée (WBH)	P ¹⁸⁰	S ¹⁸³	S ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	T ²⁰⁵

Tableau 4 : Sous-groupes de VRSB et mutations ponctuelles (Furze, 1997 ; Langedijk, 1997).

III.2.2. Analyse comparative du génome des différentes souches de virus respiratoire syncytial bovin

L'analyse du génome viral du VRSH a permis de confirmer l'hétérogénéité de la protéine G. La divergence moyenne des séquences en acides aminés de G est de l'ordre de 3 à 20 % entre des souches virales appartenant à un même sous-groupe, et de l'ordre de 40 à 50 % pour des souches virales de deux sous-groupes différents (Collins, 1991). Les protéines les mieux conservées sont les protéines N, F, M et M2 pour le VRSH.

Concernant le VRSB, l'homologie entre les divers sous-groupes viraux est de 88 à 100%, la variabilité est donc beaucoup moins marquée par rapport au VRSH (Elvander, 1998 ; Furze, 1997). Les mécanismes à l'origine de la variabilité sont principalement représentés par des mutations ponctuelles.

Valarcher (2000) a étudié l'évolution et la variabilité du génome du VRSB à partir de souches virales isolées durant 32 ans, de 1967 à 1999. Les séquences nucléotidiques de fragments situés sur les gènes codant pour les protéines F, G et N provenant de 54 isolats de VRSB y ont été déterminées et comparées avec 33 séquences connues provenant des banques de données, parmi lesquelles 3 sont des souches vaccinales très utilisées en Europe. Cette étude a permis de tirer de nombreuses conclusions.

Premièrement, cette étude a mis en évidence une faible variabilité entre les souches de VRSB avec des taux moyens de divergences nucléotidiques de 2 % pour les protéines F et N et de 8 % pour la protéine G. Ces taux de divergence restent cependant très inférieurs à ceux observés entre les protéines G de deux souches de VRSH appartenant à des sous-groupes différents.

Deuxièmement, la constitution d'arbres phylogénétiques concernant les gènes F, G et N a montré une évolution continue et parallèle des souches virales. Ces arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes F, G et N sont similaires, ce qui montre que l'évolution de ces trois gènes est parallèle. Les souches testées de VRSB ont été classées en 6 sous-groupes génétiques (Figure 3). Cette classification a une réalité à la fois géographique et temporelle : en effet, le sous-groupe I contient uniquement des souches isolées avant 1976. Les souches du sous-groupe III proviennent exclusivement des USA. Celles qui appartiennent aux sous-groupes II, IV, V et VI, sont européennes.

Les souches récemment isolées dans les pays européens comme la France, la Grande-Bretagne, la Belgique et les Pays-Bas, sont regroupées en haut de l'arbre, dans les sous-groupes V et VI. Ces pays pratiquent une vaccination intensive contre le VRSB depuis de nombreuses années. Par contre les souches plus anciennes de ces mêmes pays sont regroupées avec les isolats, anciens et récents jusqu'en 1995, des pays nordiques européens (Danemark, Suède) dans le sous-groupe II. Jusqu'en 1995, la vaccination contre le VRSB n'existait pas au Danemark et en Suède. D'une façon générale, au sein de chaque sous-groupe, les souches ont

des dates d'obtention très proches ou des localisations voisines. En plus d'un regroupement géographique des souches de VRSB au sein des différents sous-groupes, les souches virales européennes sont également rassemblées temporellement entre les sous-groupes IV, V et VI, supposant une évolution du VRSB.

L'analyse de l'évolution virale en fonction du pays d'isolement a montré que les souches qui ont évolué le plus rapidement sont issues de pays pratiquant la vaccination contre le VRSB.

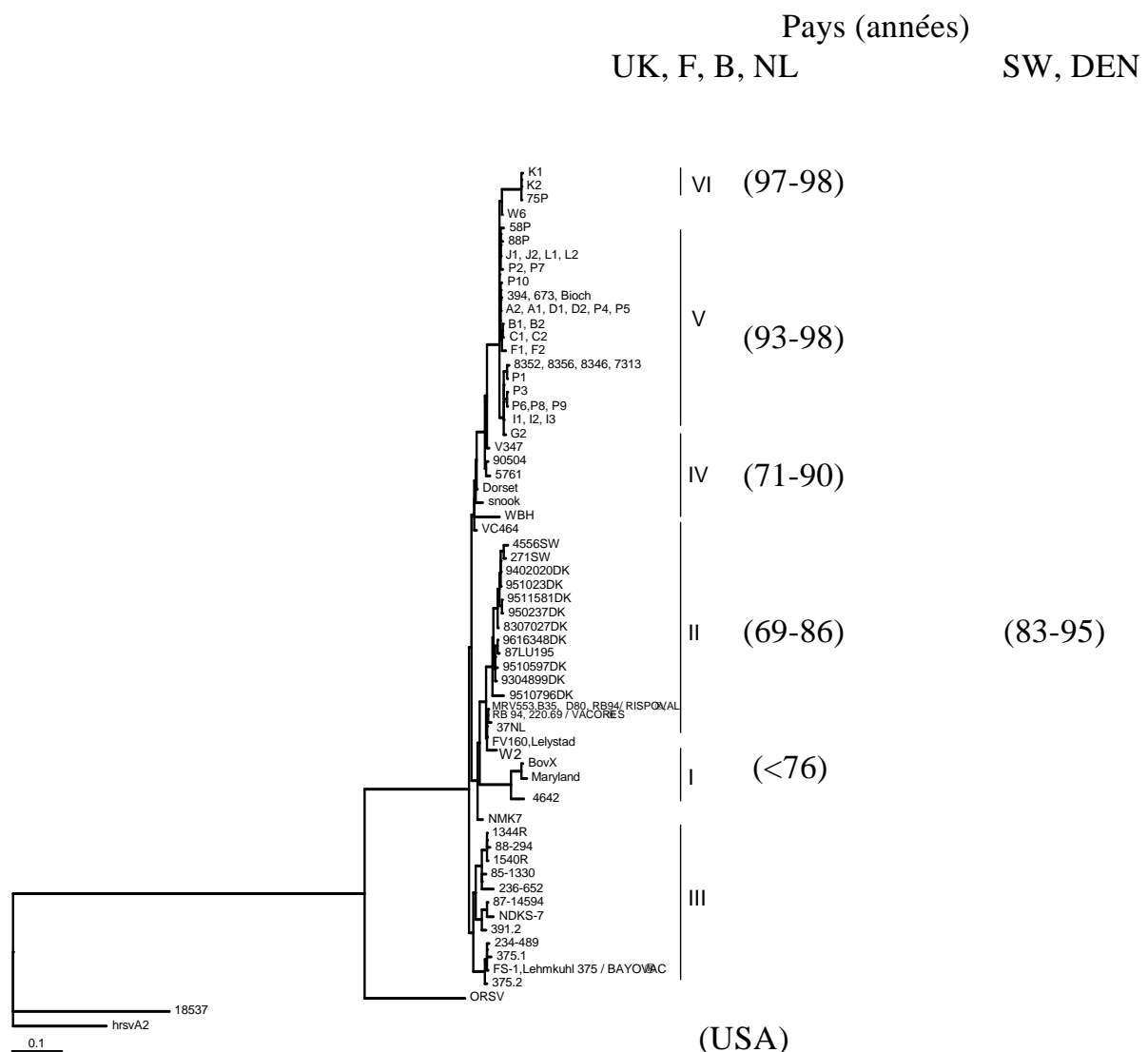


Figure 3 : Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, 1 isolat de VRSO (Virus Respiratoire Syncytial Ovin) et 2 isolats de VRSH.

Enfin, une pression de sélection positive serait exercée sur les souches provenant de pays où la vaccination est largement pratiquée (pays du Sud de l'Europe comme la France) (Valarcher, 2000). Les analyses du ds (nombre de substitutions nt par site synonyme), du dn (nombre de substitutions nt par site non synonyme) et du rapport dn/ds du segment étudié de G étaient significativement plus élevées que celles obtenues sur N et F. La même analyse sur un segment de G a été effectuée sur des souches appartenant aux sous-groupes V et VI, c'est-à-dire provenant de pays où la vaccination est pratiquée depuis au moins 15 ans, d'une part et sur des souches appartenant aux sous-groupes I et II, incluant les 3 souches vaccinales, à savoir de l'isolat le plus ancien (Belgique, 1969) à l'isolat le plus récent (Danemark, 1995), représentant 26 années d'évolution sans aucune pression de sélection. Le rapport dn/ds des souches des sous-groupes V et VI est plus élevé que celui des souches du sous-groupe II. Cela montre alors l'existence d'une pression de sélection positive dans les sous-groupes V et VI par rapport aux autres souches virales testées. Les taux d'évolution calculés sur les protéines N, F et G indiquent une évolution continue des séquences nucléotidiques du VRSB en présence de la vaccination.

III.2.3. Notion de quasi-espèce et potentiel d'adaptation

En raison du taux de mutation élevé, une population de virus à ARN est constituée d'un spectre de génomes mutants, décrit sous le terme de quasi-espèce virale. Le concept théorique de quasi-espèce fut établi initialement par Eigen (1979) pour la description des premiers réplicons sur terre. Ce concept décrit les populations virales comme des distributions dynamiques de génomes mutants étroitement apparentés mais non identiques et qui se trouvent soumis à un processus continu de variation génétique, de compétition et de sélection (Domingo, 1999). Le modèle de quasi-espèce s'applique à tous les virus à ARN étudiés à ce jour.

Les implications biologiques de la variabilité virale sont nombreuses :

- l'échappement aux anticorps neutralisants ou aux cellules cytotoxiques,
- la résistance aux agents antiviraux,
- la réversion de l'atténuation de la virulence,
- l'inhibition de la réponse antivirale,
- la persistance virale,
- les changements de tropisme cellulaire.

Une série de paramètres peuvent influencer la capacité d'adaptation des virus à ARN. Ces paramètres sont, par exemple, la taille de la population virale, la complexité du génome, la fréquence de mutations nécessaires pour répondre à un facteur de sélection.

Récemment, les travaux de Deplanche et al. (2007) ont montré que le VRSB évoluait aussi sous forme de quasi-espèces *in vitro* et *in vivo* avec des fréquences de mutation variant entre 6 et 10×10^{-4} substitutions par nucléotide. Vu les fréquences de mutations observées pour le VRSB, le risque de sélectionner rapidement des mutants d'échappement aux vaccins peut se poser, notamment dans le cadre de vaccin peptidique. Le développement de tels vaccins ne représente donc pas une solution adéquate à la lutte contre l'infection par le VRSB. La vaccination à l'aide de vaccins à agents vivants ou inactivés ou modifiés dans lesquels coexistent divers mutants viraux reste probablement le meilleur moyen pour éviter l'échappement à la réponse immune.

III.2.4. Bilan sur la variabilité du VRSB

Grâce à ces études, une évolution spatiale et temporelle du VRSB a pu être mise en évidence ainsi que l'existence d'une pression de sélection positive exercée par la vaccination sur celui-ci. En effet, les souches virales les plus éloignées des souches vaccinales anciennes ont récemment été isolées dans les pays pratiquant la vaccination intensive depuis longtemps contre le VRSB. Ainsi, la vaccination sélectionnerait sur le terrain de nouvelles souches possédant des mutations dans des régions immunogènes et pouvant ainsi échapper à la réponse immunitaire induite par la vaccination.

Cependant, aucune démonstration n'a encore été faite concernant une résistance des souches virales, qui circulent actuellement vis-à-vis de la réponse immune post-vaccinale induite par des vaccins utilisant des souches anciennes.

Cette étude avait pour but de tester *in vivo* une technique permettant de discriminer différentes souches virales et d'analyser avec cette technique l'impact de la variabilité génomique sur la vaccination.

Dans cette seconde partie expérimentale, nous présenterons l'évaluation *in vivo* d'une RT-PCR en temps réel permettant de différencier deux souches de VRSB (souches 220/69 et 3761) et nous montrerons que l'utilisation d'un vaccin entier élaboré à partir d'une souche ancienne (220/69), protège partiellement d'une infection hétérologue vis-à-vis d'une souche récente (3761).

DEUXIEME PARTIE :
EXPERIMENTATION ANIMALE

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Préparation de l'inoculum viral

I.1.1. Cultures cellulaires

La lignée utilisée est une lignée cellulaire d'origine épithéliale constituée de cellules des cornets nasaux d'origine bovine. Elle a pour dénomination BT (*Bovine turbinata*) (n° ATCC : CRL-1390).

Les cellules sont cultivées en étuve à 37 °C et 5 % de CO₂. Le milieu de culture de base est composée de 500 ml de Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et de la L-glutamine (MEM 1 X), de 5 ml d'acides aminés non essentiels (AANE) 100 X, et 5 ml d'une solution d'antibiotiques composée de pénicilline à 10 000 U / ml et de streptomycine à 10 000 µg / ml (Invitrogen) (concentration initiale de 100 X).

Les cellules sont entretenues en flacon de 175 cm². Elles sont utilisées entre les 28^{ème} et 32^{ème} passages. Pour chaque passage, ces cellules sont trypsinées sur un tapis confluent, puis diluées en milieu MEM de base contenant en plus 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Après dissociation des cellules par action de la trypsine et centrifugation, la suspension cellulaire est diluée à 1 x 10⁶ cellules / ml puis répartie sur une plaque de 24 puits ou dans des flacons de 25 et 75 cm².

Les cellules turbinates ont été utilisées pour amplifier le VRSB et titrer le virus. Lors d'infection à partir de LBA le milieu de culture est ramené à 3 % de SVF final pour les deux premiers passages, additionnés de 5 ml de fungizone à 250 µg / ml (Invitrogen).

I.1.2. Isolement des souches virales

I.1.2.1. Isolement de la souche virale 3761

La première souche virale utilisée dans cette étude est une souche nommée 3761 (sous groupes antigénique et génétique inconnus). Elle a été isolée en 2003 en Europe à partir d'un écouvillonnage nasal d'un veau présentant des signes cliniques respiratoires. Des dilutions au 1/5^e et 1/20^e ont été déposées le jour de l'isolement sur une boîte de culture cellulaire BT (25 cm²) puis agitées doucement à 37 °C pendant 2 heures. L'inoculum a ensuite été éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de base + 3 % de SVF + 1 % de fungizone. Le milieu est à nouveau changé au bout de 24 heures. Le flacon a été congelé à – 80 °C sept jours après inoculation. Cinq passages successifs sur des cellules BT ont été réalisés. Pour cela, les cellules infectées ont été rapidement décongelées au bain-marie à 37 °C et ainsi récupérées. Un à 2 ml de suspension cellulaire infectée sont redéposés sur une boîte de cellules BT. Le reste de la suspension cellulaire est conservé à – 80 °C en tube de 5 ml.

Un effet cytopathique caractéristique du VRSB a été observé lors du deuxième passage sur les cellules BT. Le virus a alors été identifié par immunocytochimie (ICC) sur les cellules BT fixées à l'acétone.

I.1.2.2. Isolement de la souche virale 220/69

La deuxième souche virale utilisée dans cette étude est une souche nommée 220/69 H4b (sous groupe antigénique AB et sous groupe génétique II). Cette souche a été isolée sur des lavages bronchoalvéolaires de jeunes bovins infectés naturellement en Belgique en 1969 (souche aimablement fournie par P Kherkhofs, CODA-CERVA-LMMA Belgique). Cette souche avait été isolé en 1969 par Wellemans à l'aide d'écouvillons nasaux mis en culture sur des cellules de reins de fœtus et des cellules testiculaires de veaux , puis 3 passages aveugles sur cobayes par inoculation intranasale et injection intrapéritonéale (Wellemans, 1975 ; Wellemans, 1970). Le virus du BVD est un contaminant fréquent du sérum de veau fœtal (SVF), mais aussi un cofacteur des troubles respiratoires. Ce virus a été retrouvé dans l'inoculum par RT-PCR. Cette souche a donc été passée sur 2 lignées cellulaires : initialement sur Hep2 (cellules épithéliales d'origine humaine), puis sur BHK21 (cellules de rein de hamster, cellules non permissives au BVD) pour s'affranchir du virus BVD. L'utilisation additionnelle d'AcMO (Monoclonal) antipestivirus a permis l'élimination du BVDV qui infectait cette souche.

I.1.3. Titrage des souches virales

A partir d'une suspension virale de 100 µl, des dilutions au dixième sont réalisées dans des tubes contenant chacun initialement 900 µl de MEM sans sérum. 200 µl de ces dilutions sont ensuite déposées sur une plaque de 24 puits à raison de 4 puits par points de dilution. Cette plaque est incubée 2 heures à 37 °C (adsorption), puis le surnageant est enlevé. Un ml de milieu contenant 3 % de SVF est déposé dans chaque puits, puis la plaque est incubée à 37 °C sous CO₂ pendant 5 jours. La révélation est réalisée par ICC.

I.1.4. Préparation des souches virales

Les deux inoculum ont été préparé de la même manière. Un inoculum viral a été fabriqué à partir de la souche VRSB 3761 ou 220/69 au 5^e passage en BT (5 passages en culture cellulaire).

L'inoculum a été obtenu en réalisant 3 passages sur des veaux nouveaux-nés. Pour cela, des veaux nouveaux nés de race Prim Holstein et dépourvus d'anticorps colostraux ont été inoculés par voie intranasale et intratrachéale entre 2 et 3 jours après la naissance avec la souche VRSB 3761 ou 220/69 au 5^e passage en cellules BT.

Le premier veau a reçu 10⁶ UFP au total. 5 jours après l'inoculation, les veaux sont euthanasiés sous anesthésie générale, le poumon est ensuite récupéré pour réaliser un lavage bronchoalvéolaire (LBA), avec 500 ml de milieu MEM complémenté à 100 µl d'enrofloxacin à 50 mg / ml, 2 ml de gentamycine à 50 mg / ml et 5 ml de fungizone à 250 µg / ml. Le LBA ainsi obtenu permet l'isolement de virus et est conservé en azote liquide à - 196 °C. Le veau suivant est inoculé avec le LBA du veau précédent à raison de 10 ml par voie intranasale et 10 ml par voie intratrachéale. Un 3^e passage est réalisé suivant le même protocole. Le LBA récupéré au 3^e passage sur veaux (Photo 2) est utilisé comme inoculum pour l'expérimentation animale. Son titre est de 2 x 10³ UFP / ml. Il a été testé comme indemne des pathogènes recherchés : BoHV-1, AdBV, PI3, BVDV, Coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*.



Photo 2 : Réalisation du LBA lors du troisième passage sur veaux.

I.1.5. Inoculum final

L'inoculum final correspond à un mélange de liquides broncho-alvéolaires dérivés de veaux inoculés expérimentalement par le VRSB :

- LBA 3761 p3.2 (titre de 2×10^3 UFP / ml)
- LBA 220/69 HB4 (titre de 2×10^4 UFP / ml)

On prépare un mélange 220/69 / 3761 à raison de 1 ml de LBA 220/69 H4b pour 4 ml de LBA 3761 p3.2, afin d'obtenir un mélange des 2 souches virales dans des proportions recherchées et connues : 4×10^3 UFP de 220/69 / ml et $1,6 \times 10^3$ UFP de 3761 / ml.

I.2. Expérimentation animale

L'expérimentation animale a consisté à infecter 6 veaux répartis en deux groupes : un lot de 3 veaux vaccinés et un lot de 3 veaux non vaccinés. Un veau supplémentaire non vacciné et non infecté a servi de sentinelle parmi les veaux vaccinés.

I.2.1. Animaux et entretien des animaux

Les veaux mâles de race Prim Holstein ont été retirés à la naissance de leur mère et privés de colostrum d'origine maternelle. Ils ont reçu dans les 24 premières heures 1 à 2 litres de colostrum négatif en anticorps anti-VRSB importé de Suède par l'UMR 1225.

Une sérologie VRSB a été réalisée à 7 jours, pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de prise colostrale (Ig G d'origine maternelle).

L'entretien des veaux avant infection expérimentale est le suivant : pendant les 36 premières heures, ils reçoivent un lactoreplaceur (Energaid®, Elanco Vétérinaire), puis de la poudre de lait premier âge. Par la suite, les veaux sont nourris au seau de lait de remplacement 2 fois par jour à heures régulières, avant la réalisation des examens cliniques et des prélèvements.

Les animaliers responsables des veaux, ayant reçu une formation spécifique, sont au nombre de 5 ou 6, et ont alterné au cours de l'expérience.

Les veaux sont ainsi maintenus en unités expérimentales de niveau 2 de biosécurité (Photos 3 et 4), pour éviter toute infection naturelle par le VRSB (unité de pathologie infectieuse et immunologique (PII), INRA de Tours-Nouzilly).



Photo 3, photo 4 : Bâtiments de niveau 2 de biosécurité de l'INRA de Tours-Nouzilly

Durant cette période de pré-infection, les animaux sont évalués cliniquement 2 fois par semaine et des contrôles sont réalisés pour exclure toute infection naturelle par le VRSB. Une sérologie VRSB est réalisée 7 jours avant la vaccination, 10 jours avant l'infection et le jour de l'infection avant inoculation. Des tests par immunocapture rapide d'antigènes (test Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test) sur EN sont réalisés à partir du jour précédant l'inoculation. Un contrôle de l'infection par le BVDV est réalisé par antigénémie à la naissance (pour s'assurer qu'il n'y ait aucun veau IPI vis-à-vis du BVDV) et par sérologie 7 jours avant la vaccination et 7 jours avant le début de l'épreuve virulente.

Une fois les veaux âgés de 4 à 6 semaines, on réalise une vaccination vis-à-vis du VRSB (souche 220/69) chez les animaux du groupe vacciné avec le vaccin Rispoval® RS (Pfizer Santé Animale) avec une dose de 2 ml par animal, après reconstitution du vaccin, selon le protocole suivant : 2 injections à 4 semaines d'intervalle par voie intramusculaire.

I.2.2. Infection expérimentale

Les veaux sont inoculés à l'âge de 91,5 +/- 10,7 jours (1 lot vacciné et 1 lot non vacciné). Le veau sentinelle présent dans le groupe des animaux vaccinés n'a été ni vacciné vis-à-vis du VRSB, ni inoculé. Cet animal sert de témoin d'une éventuelle circulation et excrétion du virus dans le groupe vacciné. Deux groupes de 3 veaux ont été réalisés par groupage en fonction de la date de naissance (Tableau 5).

Numéro du veau	Référence attribuée	Lot	Date de naissance	Age à JO	Age moyen par lot à JO	Commune d'origine
2446	A1	Lot vacciné (A)	09/09/2005	90 jours	94,3 +/- 4,0	Le Boulay (37110)
2447	A2		01/09/2005	98 jours		Le Boulay (37110)
2466	A3		04/09/2005	95 jours		Les Hermites (37110)
9029	Se	Sentinelle	05/10/2005	64 jours	64	Neuvy Le Roi (37370)
606	B1	Lot non vacciné (B)	05/09/2005	94 jours	88,7 +/- 15,7	Les Hermites (37110)
615	B2		28/09/2005	71 jours		Les Hermites (37110)
2448	B3		29/08/2005	101 jours		Le Boulay (37110)

Tableau 5 : Origine et classement des veaux.

L'inoculation est réalisée avec un volume d'inoculum final de 20 ml au total à raison de 10 ml par voie intranasale (IN) et 10 ml par voie intratrachéale (IT), soit un total de $3,2 \times 10^4$ UFP du virus 3761 et de 8×10^4 UFP du virus 220/69 par animal, quel que soit le lot (et l'animal).

L'inoculation intratrachéale est réalisée à l'aide d'un cathéter veau (Intraflon 2, Vycon, après tonte, rasage et désinfection) (Photos 5 et 6) et la nébullisation intranasale à l'aide d'un instillateur nasal (Vaccin IBR atténué, Pfizer Santé Animale) (Photos 7 et 8). L'intérêt de cet appareil est de permettre de pulvériser l'inoculum sur toute la muqueuse de la cavité nasale. L'inoculum a été titré sur culture cellulaire (BT) après l'infection expérimentale : titre de $8,4 \times 10^2$ UFP / ml. Le titre attendu aurait pu être proche de : 5×10^3 UFP / ml. Le titre faible obtenu après la mise en culture peut s'expliquer par le délai post inoculation supérieur à 12 heures pour la mise en culture, c'est à dire le trajet Tours-Toulouse et la grande fragilité du VRSB.



Photo 5, photo 6 : Pose du cathéter intratrachéal, puis inoculation intratrachéale.

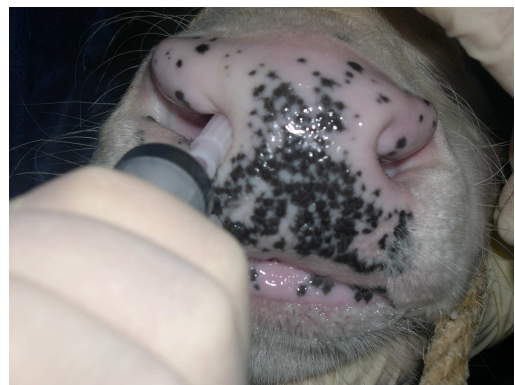


Photo 7, photo 8 : Instillateur pour inoculation intranasale et instillation intranasale.

Le jour de l'inoculation est considéré comme le jour 0 (J 0).

Les euthanasies sont réalisées à J 14 p.i. (post infection) pour tous les veaux.

1.2.3. Suivi expérimental

- Examen clinique : il est réalisé 2 fois par jour de J -1 à J 14 p.i. (fiche de suivi clinique en annexe 1) par le même examinateur selon un protocole bien défini (l'ordre de réalisation a toujours été le même, d'abord le lot vacciné, puis le lot non vacciné). Dans chaque lot, une fois l'évaluation clinique établie, on fait les prélèvements avant de passer au lot suivant afin de limiter les passages dans les lots.

- Sérologie : deux prises de sang sur tube sec sont réalisées sur chaque animal de J -1 à J14. Les prélèvements sanguins sont conservés à + 4 °C puis, après centrifugation, aliquotés sous forme de sérum, identifiés avec le jour et l'identifiant correspondant à l'animal et conservés à - 20 °C.

- Ecouvillonnage nasal : des EN sont réalisés dans chaque narine de J -1 à J 14 p.i., 15 minutes après la fin de la buvée et conservés dans du sérum physiologique et du tampon d'extraction d'ARN (tampon RLT, Qiagen). Les tests d'immunocapture d'antigène (test Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test) sont réalisés directement et les EN dans le tampon RLT sont immédiatement conservés à – 80 °C pour être utilisés plus tard en RT-PCR discriminative.

- Lavages broncho alvéolaires : les LBA ont été réalisés les jours J 5 et J 6 p.i. selon la méthode suivante : ils sont réalisés à l'aide d'un endoscope à fibre optique (GIF-Q, Olympus) stérile. Sous anesthésie générale (kétamine hypochloride à la posologie de 3 à 4 mg / kg en Intra Veineuse), les veaux sont couchés en décubitus latéral sur un plan de travail. L'endoscope passe à l'intérieur d'un tuyau rigide, placé dans la bouche et destiné à le protéger, avant d'être dirigé dans le larynx, puis la trachée jusqu'à la bifurcation bronchique principale. Enfin, l'endoscope est stabilisé dans la bronche droite. On lave 2 à 3 fois avec 50 ml de milieu de culture (Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle, de la L-glutamine, des acides aminés non essentiels (AANE), 200 mg / ml de Gentamicine, 0,2 µg / ml d'Enrofloxacin et 2,5 µg / ml de Fungizone). Le prélèvement proprement dit dure moins de 5 minutes. Les LBA sont conservés dans un congélateur à – 80 °C. Les endoscopes sont décontaminés chimiquement entre chaque utilisation.

- Prélèvements post-mortem : Les échantillons sont conservés dans du formol à 10 % pour l'histologie et directement à - 80°C ou dans du milieu RLT (pour extraction de l'ARN viral).

I.3. Tests sérologiques

- Sérologies VRSB : la recherche a été réalisée au laboratoire de Touraine à l'aide du kit LSI® Elisa RSV Ig G Sérum Bicupule (Insitut LSI), permettant la recherche des anticorps spécifiques du VRSB par méthode Elisa dans les sérums.

- Recherche des immunoglobulines M (Ig M) : Les Ig M ont été détectées et dosées à l'aide du kit Pourquoiier® Elisa RSV Ig M Sérum Bicupule (Institut Pourquoiier), permettant la recherche des anticorps spécifiques du VRSB par méthode Elisa dans les sérums.

I.4. Techniques de suivi virologique

Les techniques utilisées sont des techniques de détection d'antigène et d'ARN viral.

I.4.1. Immunocapture (antigène)

Le suivi virologique par immunocapture rapide d'antigène est réalisé à l'aide du kit Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test.

I.4.2. RT-PCR discriminative quantitative (ARN viral)

Les échantillons sont repris dans un tampon de lyse (100 µl), puis l'ARN est extrait selon le protocole QIAGEN RNeasy. La solution récupérée, contenant de l'ARN total, est conservée à – 80 °C. La RT-PCR discriminative a été réalisée sur les EN selon le protocole mis en place *in vitro* à l'ENVT (UMR 1225 IHAP) :

I.4.2.1. Détermination des séquences complètes des génomes viraux des souches 3761 et 220/69

La mise au point d'un test de PCR discriminative nécessite la caractérisation génétique des souches à analyser. Les séquences complètes des génomes des souches 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b issues des LBA ont été déterminées par l'UMR 1225 IHAP.

I.4.2.2. Sélection d'amorces discriminatives pour les souches 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b (1^{ère} étape)

Afin d'identifier des régions spécifiques, les séquences des génomes viraux 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b ont été comparées grâce à l'utilisation du logiciel SeqMan (DNASTAR). Un alignement entre les génomes viraux 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b a été réalisé. Les résultats montrent la présence de nombreuses différences dans la région située entre les nucléotides 4000 et 4116 (située dans la région du gène M (en non codant)), ce qui en fait une région particulièrement favorable à la sélection d'amorces discriminatives (Figure 4). Les couples d'amorces discriminatives spécifiques des génomes 3761 ou 220/69 sont présentés dans la figure 5. Les amorces F4009_3761 et F4009_220 ont été sélectionnées manuellement en positionnant l'extrémité 3' des oligonucléotides au niveau des positions divergentes entre les deux génomes viraux (Figures 5, 6 et 7).

Les figures 6 et 7 montrent les mésappariements entre les amorces et les génomes contraires. Ces figures montrent aussi les différences entre les amorces F4009 et les génomes apparentés. Une mutation supplémentaire a été introduite dans la région 3' des amorces F4009_3761 et F4009_220 afin d'augmenter le degré de divergence de l'oligonucléotide avec le génome apparenté et de diminuer ainsi le risque d'amplification non-discriminative. Les amorces antisens R4095_3761 et R4095_220 ont été sélectionnées grâce à l'utilisation du logiciel Primer Express® (applied Biosystems). Il existe 7 différences nt entre les amorces 220/69 et 3761. La température d'hybridation des amorces a été fixée à 59°C. Les couples d'amorces génèrent des amplicons de 107 nucléotides.

```
3761-CATCTTAACACAACAGAAGAATCCCTTGACGACC->
220 -TATCTTAACACAACAGAAGACTCCCTTAATAGCTTACAAATCATCA...CATCATATTTCTCAACCTGATTAACCCCTTCG
```

Figure 4 : Comparaison des génomes viraux 220/69 et 3761 entre les positions 4000 et 4116

```
F4009_3761 ACAACAGAAGAATCCCTTGACGACC->
3761-CATCTTAACACAACAGAAGAATCCCTTGACGACCATAAATCATCA...CCATAATCATCATATTTCTCAACCTGATTAACCCCTTCG
GTAGAATTGTGTTGTCTTCTTAGGGAATGTTGGATATTAGTAGT...GGTATTAGTAGTATAAAAGAGTTGGACTAATTGGGAAGC
R4095_3761 <-AGAGTTGGACTAATTGGGAAGC

F4009_220 ACAACAGAAGACTCCCTTAATGGCT->
220 -TATCTTAACACAACAGAAGACTCCCTTAATAGCTTACAAATCATCA...CCATAATCATCATATTTCTCAACCTGATCAACCCCTTCA
ATAGAATTGTGTTGTCTTCTGAGGGAATTATCGAATGTTAGTAGT...GGTATTAGTAGTATAAAAGAGTTGGACTAGTTGGGAAGT
R4095_220 <-AGAGTTGGACTAGTTGGGAAGT
```

Figure 5 : Séquence des amorces discriminatives et hybridation sur leur fragment complémentaire

```
F4009_3761 ACAACAGAAGAATCCCTTGACGACC->
220 -TATCTTAACACAACAGAAGACTCCCTTAATAGCTTACAAATCATCA...CCATAATCATCATATTTCTCAACCTGATCAACCCCTTCA
ATAGAATTGTGTTGTCTTCTGAGGGAATTATCGAATGTTAGTAGT...GGTATTAGTAGTATAAAAGAGTTGGACTAGTTGGGAAGT
R4095_3761 <-AGAGTTGGACTAATTGGGAAGC
```

Figure 6 : Hybridation des amorces 3761 sur le génome viral 220/69


```

F4009_220 ACAACAGAAGACTCCCTTAATGGCT->
3761-CATCTTAACACAACAGAAGAATCCCTTGACAACCTATAAATCATCA...CCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTTCG
GTAGAATTGTGTTGTCTTCTTAGGGAACGTGTGGATATTAGTAGT...GGTATTAGTAGTATAAAAGAGTTGGACTAATTGGGAAGC
R4095_220 <-AGAGTTGGACTACTTGGGAAGT

```

Figure 7 : Hybridation des amorces 220/69 sur le génome viral 3761

Légende des figures 5, 6 et 7 : Les différences de séquences sont indiquées en jaune.

Les différences de séquence entre les amorces 3761 et le génome viral 220/69 sont indiquées dans la figure 6. De même, les différences de séquence entre les amorces 220/69 et le génome viral 3761 sont indiquées dans la figure 7.

I.4.2.3. Amplification des génomes viraux des souches 3761 et 220/69 à l'aide des amorces discriminatives : vérification de la spécificité des amorces

L'étape de la transcription réverse (RT) a été réalisée sur ARN total extrait de 2 échantillons de LBA. L'amorce N2.1, qui s'hybride dans une région conservée entre les deux génomes viraux, a été utilisée pour cette étape. Dans un premier temps, ces amorces ont été validées sur des LBA issus des souches 220/69 Hb4 et 3761 P_{3,2} (voir préparation des inoculums en I.1.).

Puis une PCR qualitative a été réalisée. Les résultats montrent une bonne discrimination (Figure 8). Les ADNc des LBA 3761 P₃₋₂ et 220/69 Hb4 sont bien amplifiés par les amorces spécifiques de chaque génome. A l'inverse, ils ne sont pas amplifiés par les amorces non spécifiques (c'est-à-dire amplification du LBA 3761 P₃₋₂ par les couples d'amorces 3761, mais pas par les couples d'amorces 220/69 et idem pour le LBA 220/69 Hb4 non reconnu par les amorces 3761).

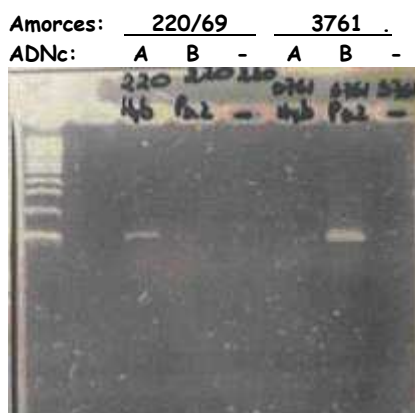


Figure 8 : Essai d'amplification des génomes 3761 P_{3,2} et 220/69 H4b à l'aide d'amorces discriminatives (PCR qualitative).

Note : Dans le premier puits est déposé le marqueur de poids moléculaire. Amorces discriminatives 220/69 (220/69) ou 3761 (3761); ADNc du génome 220/69 H4b (A) ou 3761 P_{3,2} (B); sans ADNc (-). Les amplicons ont été séparés sur gel de polyacrylamide pour réaliser une électrophorèse.

I.4.2.4. Validation de la PCR discriminative quantitative

Des essais de la PCR discriminative quantitative avec différentes températures ont permis d'obtenir la température optimale, qui est de 59 °C. Une gamme de dilution des plasmides de référence 220/69 et 3761 est utilisée sur chaque plaque pour générer une courbe étalon 220/69 et 3761. Les échantillons d'ADNc sont des prélèvements d'EN de veaux infectés par un seul virus après des temps d'incubations différents.

I.4.2.4.1. Construction des plasmides de référence pour la réalisation de la gamme

Les séquences virales qui correspondent aux amplicons 220/69 et 3761 ont été clonées dans un plasmide d'Escherichia coli pCR 2.1-TOPO (Invitrogen).

La vérification de ces constructions plasmidiques a ensuite été réalisée par analyse du profil de restriction par EcoRI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, par PCR et par séquençage nucléotidique.

Ensuite, la concentration des préparations plasmidiques, qui seront utilisées en PCR quantitative pour obtenir une gamme de dilutions (courbe étalon) des plasmides de référence, a été mesurée. Ce dosage est réalisé par spectrophotométrie.

Afin de construire les courbes étalons, une gamme de dilution des plasmides de référence 220/69 et 3761 a été préparée en les diluant de 10 en 10 à partir d'une solution mère à 0,1 ng/μL (équivalent à $2 \cdot 10^7$ copies (1 μL) (gamme de 10^6 à 10^7))

I.4.2.4.2. Analyse des courbes étalons

Les courbes étalons obtenues indiquent des coefficients de corrélation R_2 (évaluant les performances des amorces) supérieurs à 0,99 pour les gammes de dilution des plasmides 3761 et 220/69. Or, les coefficients de corrélation étant supérieurs à 0,99, on a une efficacité de 95 à 100 % dans nos essais.

I.4.2.4.3. Analyse des courbes de dénaturation

Les courbes de dénaturation des amplicons générées par l'amplification des plasmides 3761 et 220/69 sont homogènes et superposables, à l'exception des puits correspondant aux contrôles sans matrice (NTC). Ces courbes de dénaturation indiquent la spécificité des amplifications.

I.4.2.4.4. Spécificité et sensibilité de la PCR discriminative

Des études de comparaison de l'amplification des plasmides 3761 et 220 par les amorces spécifiques du génome viral 3761 montrent que la spécificité de la PCR discriminative est bien supérieure pour les plasmides 3761 que pour les plasmides 220/69 (données non montrées).

Les résultats obtenus avec la gamme de dilution des plasmides de référence indiquent que, dans les conditions utilisées ($T_m = 59\text{ °C}$), la limite de détection de notre PCR discriminative est de 10^2 copies de plasmides pour les séquences 220/69 et 3761 (sensibilité).

I.4.2.4.5. Amplification sur des échantillons biologiques après validation

A partir des échantillons biologiques (EN de bovins infectés expérimentalement), on a une bonne spécificité sur le couple d'amorces 3761, mais une hybridation non spécifique de l'ADNc A6 (3761) par le couple d'amorces 220/69. Toutefois, le signal de fluorescence non spécifique est nettement inférieur au signal de fluorescence spécifique (Figures 9 et 10).

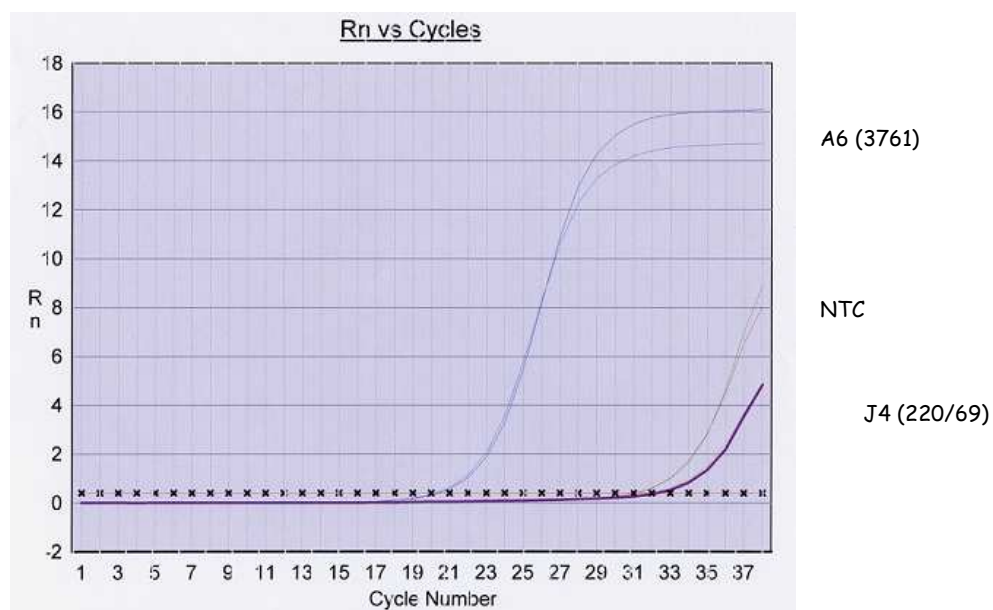


Figure 9 : Essais d'amplification avec les amorces 3761 sur des ADNc

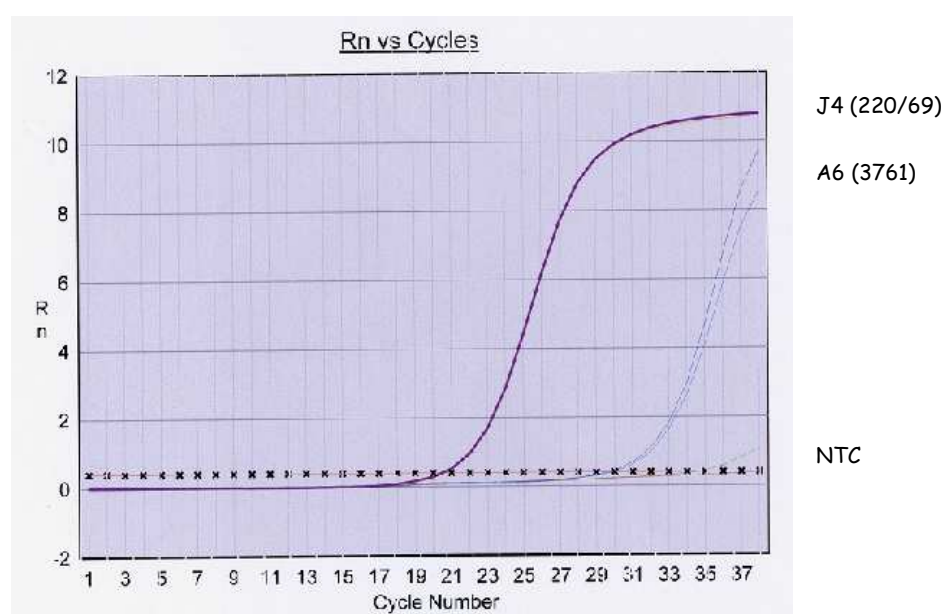


Figure 10 : Essais d'amplification avec les amorces 220/69 sur des ADNc

II. RESULTATS

Dans la suite de notre exposé, nous décrirons les deux lots d'animaux en utilisant les dénominations suivantes :

- Pour le lot non vacciné : « lot non vacciné » (animaux B1, B2, B3)
- Pour le lot vacciné avec le vaccin Rispoval® RS (Pfizer Santé Animale) : « lot vacciné » (animaux A1, A2, A3)
- Un veau non vacciné et non infecté nommé sentinelle (Se) a été introduit parmi le lot de veaux vaccinés.

II.1. Résultats du suivi clinique

II.1.1. Observations cliniques

* Pour le lot non vacciné, des signes cliniques respiratoires avec ou sans atteinte de l'état général ont été observés.

Les veaux B1 et B2 ont présenté progressivement des bruits respiratoires légèrement renforcés et quelques bruits surajoutés légers à l'auscultation (bruits respiratoires de sifflement en zone crâniale de l'aire d'auscultation pulmonaire essentiellement à l'inspiration) associés à une respiration dyspnéique discordante modérée (pendant 1 à 3 jours). Ils ont présenté un jetage d'intensité modérée de J 5 à J 14 p.i. et des épisodes de toux d'intensité légère n'excédant pas 3 jours. Aucune atteinte de l'état général n'a été observée chez ces veaux.

Le veau B3 a présenté progressivement des bruits respiratoires renforcés et surajoutés marqués à sévères à l'auscultation (bruits respiratoires de râle et de sifflement en zone crâniale de l'aire d'auscultation pulmonaire à l'inspiration et à l'expiration) associés à une respiration dyspnéique discordante marquée (de J 4 à J 14 p.i.). Il a présenté un jetage d'intensité modérée à marquée de J 4 à J 14 p.i., une toux d'intensité marquée de J 3 à J 9 p.i. et une phase d'abattement léger pendant 3 jours de J 5 à J 7 p.i..

Un léger refus alimentaire des concentrés a été constaté sur tout le lot aux jours J 4, J 6 et J 7 p.i..

* Pour le lot vacciné, des signes cliniques d'atteinte respiratoire sans atteinte générale ont été observés.

Tous les veaux ont présenté progressivement des bruits respiratoires légèrement renforcés et quelques bruits surajoutés légers à l'auscultation (bruits respiratoires de sifflement en zone crâniale de l'aire d'auscultation pulmonaire essentiellement à l'inspiration) associés à une respiration dyspnéique discordante modérée uniquement chez le veau A2 (de J 9 à J 14 p.i.). Tous les animaux ont présenté du jetage d'intensité modérée durant des périodes variant de 1 (A1) à 6 jours (A2 et A3). Tous les veaux ont présenté une toux d'intensité modérée (A1 et A3) à marquée (A2). Ces épisodes de toux n'ont jamais excédé 1 à 3 jours. Le veau A1 a eu le plus grand nombre de jours de toux (9 au total). Aucune atteinte de l'état général n'a été observée chez les animaux de ce groupe. Un léger refus alimentaire des concentrés a été constaté sur tout le lot (ainsi que sur le veau Se) à J 3 p.i..

* Le veau Se a présenté progressivement à partir de J 8 p.i. des bruits respiratoires légèrement renforcés et quelques bruits surajoutés légers à l'auscultation (bruits respiratoires de sifflement en zone crâniale de l'aire d'auscultation pulmonaire essentiellement à l'inspiration) associés à une respiration dyspnéique discordante modérée à marquée. Il a présenté un jetage d'intensité modérée de J 6 à J 12 p.i., de la toux d'intensité légère de J 6 à J 13 p.i.. Aucune atteinte de l'état général n'a été observée chez ce veau.

II.1.2. Scores cliniques moyens

La détermination du score clinique se réalise d'après un mode de calcul (détaillé dans l'annexe 2) prenant en compte la température rectale, la fréquence respiratoire, le refus de concentrés, le jetage, la toux, la dyspnée abdominale et le comportement de l'animal.

Les moyennes des scores cliniques par lot et par jour sont représentées sur la figure 11.

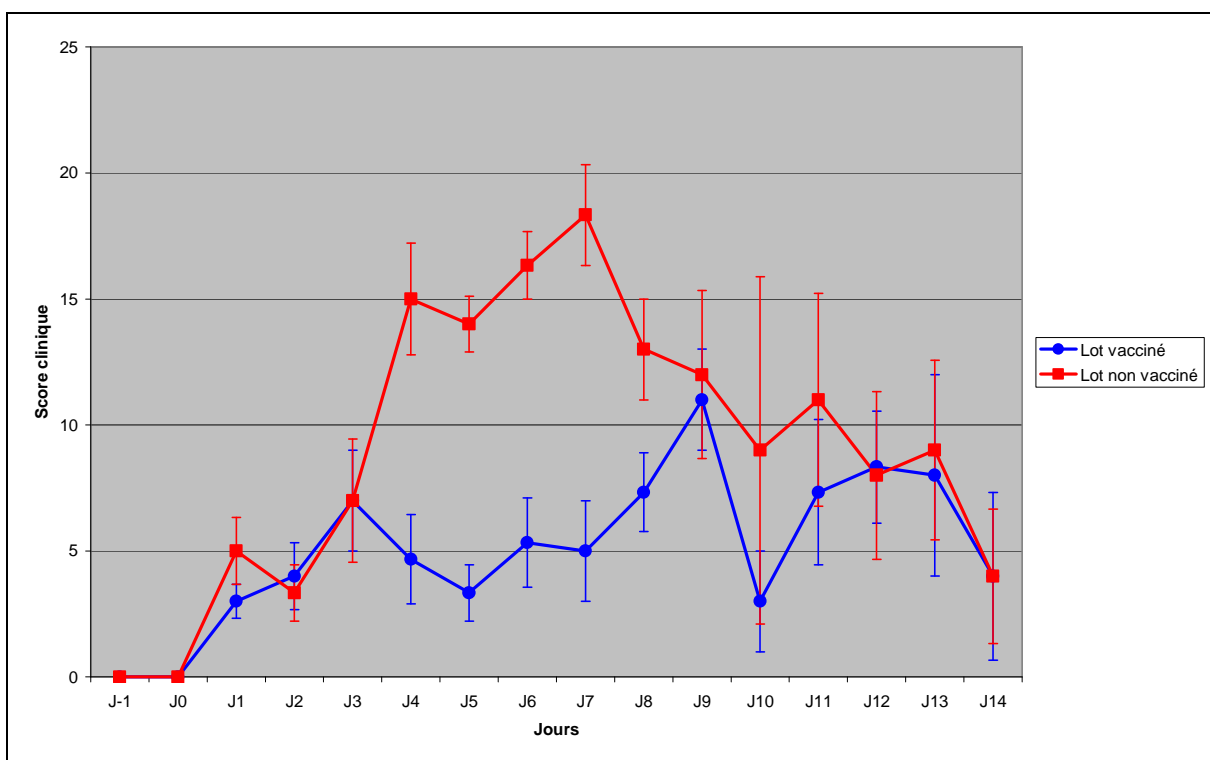


Figure 11 : Moyenne des scores cliniques pour les lots vacciné et non vacciné

On note des scores cliniques moyens plus élevés dans le lot non vacciné que dans le lot vacciné.

On note une différence significative quant à l'intensité des signes cliniques entre les animaux du lot vacciné et ceux du lot non vacciné pour les jours J 4 à J 8 p.i. (test de rang de Wilcoxon avec $p < 0,05$, sauf pour le jour J5 où la différence est marginalement significative). Avec le test de la médiane, on note aussi des différences significatives entre les animaux des 2 groupes pour tous les jours de J 4 à J 8 p.i..

Le lot non vacciné a également exprimé de manière plus intense et plus précoce les signes cliniques que le lot vacciné. Il y a en effet une différence dans le délai d'apparition et dans la cinétique d'évolution de la maladie entre les deux lots (vacciné et non vacciné) ainsi que dans l'intensité de l'expression du pic (mais cette différence n'est pas significative statistiquement). Pour le lot non vacciné, le pic clinique moyen apparaît à J 6,3 \pm 0,44 p.i. pour une valeur de 18,3 \pm 5,78, puis décroît progressivement jusqu'à J 14 p.i. avec une valeur de 4 \pm 1,33. Pour le lot vacciné, le pic clinique moyen apparaît à J 8,7 \pm 0,44 p.i. pour une valeur de 11,0 \pm 2,00.

II.1.3. Température rectale et fréquence respiratoire

Les courbes de température rectale (TR) et de fréquence respiratoire (FR) sont présentées respectivement sur les figures 12 et 13.

II.1.3.1. Courbes de température rectale

Pour la TR moyenne par lot, la valeur à J 0 est de $38,7 \pm 0,04$ °C pour le lot vacciné et de $38,8 \pm 0,07$ °C pour le lot non vacciné.

Pour le lot non vacciné, il y a deux pics de TR : un à J 1 p.i. d'une valeur de $40,0 \pm 0,29$ °C et un à J 5 p.i. de $39,5 \pm 0,64$ °C. De J 1 à J 6 p.i., les valeurs moyennes de TR sont supérieures à 39,0 °C.

Pour le lot vacciné, il y a un pic de TR à J 1 p.i. d'une valeur de $39,8 \pm 0,49$ °C, puis la TR reste supérieure à 39,0 °C jusqu'à J 4 p.i. ($39,3 \pm 0,41$ °C), puis décroît progressivement pour atteindre la valeur de $38,2 \pm 0,18$ °C à J 14 p.i..

Pour la TR moyenne par lot, il n'y a pas de différence significative (statistiquement à l'aide des tests de rang de Wilcoxon et de la médiane) entre les 2 lots (vacciné et non vacciné), excepté au jour J 5 p.i.

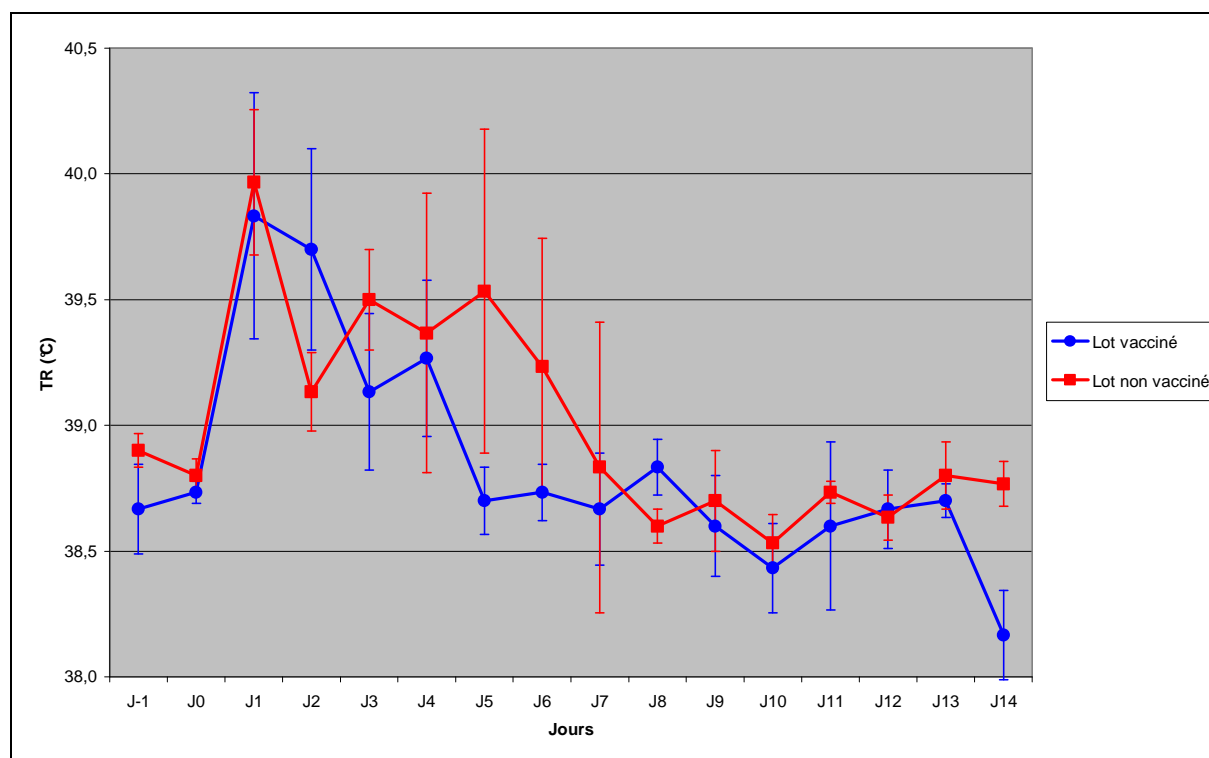


Figure 12 : Moyenne des températures rectales pour les lots vacciné et non vacciné

II.1.3.2. Courbes de fréquence respiratoire

Pour la FR moyenne, la valeur à J 0 est de 21 ± 2 mvts / min pour les 2 lots.

Pour le lot non vacciné, la courbe démarre à partir de J 3 p.i., avec un pic à J 7,7 $\pm 0,44$ p.i. d'une valeur de 63 ± 18 mvts / min, puis diminue progressivement jusqu'à J 14 p.i. à une valeur de 29 ± 8 mvts / min.

Pour le lot vacciné, la courbe démarre à partir de J 6, avec un premier pic à J 8,3 $\pm 0,44$ p.i. d'une valeur de 44 ± 4 mvts / min, puis décroît jusqu'à J 10 p.i., pour réaliser un deuxième pic à J 12,7 $\pm 0,44$ p.i. d'une valeur de 40 ± 5 mvts / min.

On n'observe pas de décalage dans le temps entre le pic des 2 groupes, par contre on observe un pic plus important pour le groupe non vacciné par rapport à celui du groupe vacciné (différences significatives entre les 2 pics statistiquement à l'aide du test de rang de Wilcoxon).

On observe des différences significatives entre les 2 groupes entre les jours J 5 à J 8 p.i. (test de rang de Wilcoxon avec $p < 0,05$).

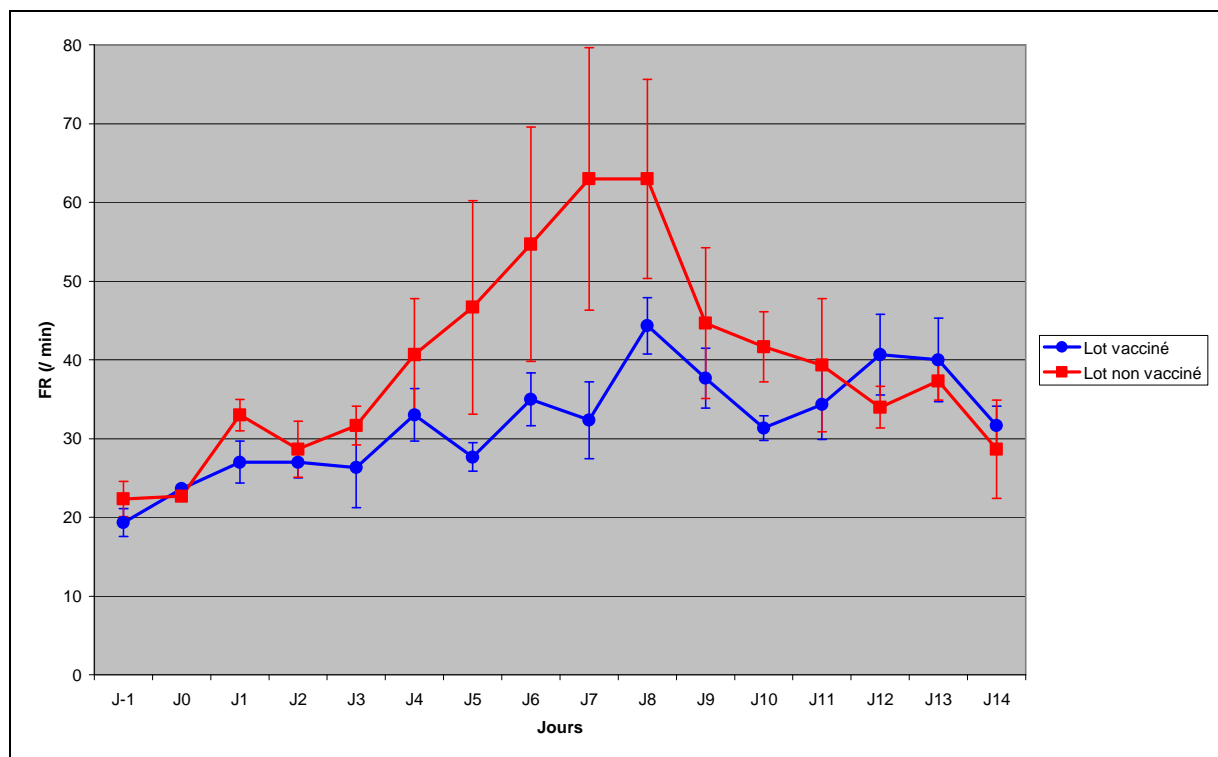


Figure 13 : Moyenne des fréquences respiratoires pour les lots vacciné et non vacciné

II.2. Résultats lésionnels

Les veaux ont tous été autopsiés à J 14 p.i..

Leurs résultats lésionnels sont présentés dans le tableau 6.

	Veau	Lésions (% du lobe atteint)	Lobe(s) atteint(s)
Lot vacciné	A1	RAS	
	A2	RAS	
	A3	RAS	
	Se	RAS	
Lot non vacciné	B1	RAS	L Cr D
	B2	5	
	B3	RAS	

Tableau 6 : Résultats lésionnels exprimés en pourcentage du lobe pulmonaire atteint
Légende : L Cr G : Lobe Crânial Gauche ; L Cr D : Lobe Crânial Droit

L'atteinte est absente à très limitée, quel que soit le lot infecté (photos 9, 10 et 11).

Les rares lésions observées sont des lésions modérément indurées, de couleur rouge brique à lie de vin.

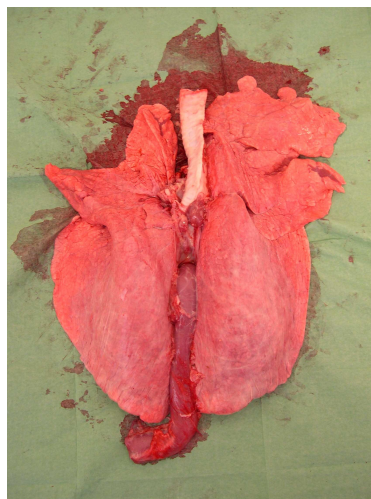
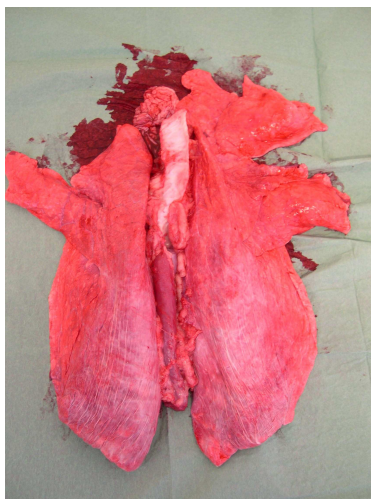


Photo 9, photo 10, photo 11 : Photos des poumons des veaux A1 (lot vacciné), Se et B2 (lot non vacciné) à l'autopsie.

II.3. Suivi virologique

II.3.1. Immunocapture d'antigènes

Les résultats de recherche du VRSB par le kit Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test sont reportés dans le tableau 7.

Dans les deux lots, la détection d'antigènes a été très faible. Elle a eu lieu chez tous les animaux du groupe vacciné et chez 2 animaux sur 3 du groupe non vacciné.

JOUR \ VEAU	Lot vacciné			Se	Lot non vacciné		
	A1	A2	A3		B1	B2	B3
J-1	-	-	-	-	-	-	-
J0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J1	-	-	ND	ND	+	-	-
J2	-	-	-	ND	-	-	-
J3	-	-	-	ND	-	-	-
J4	-	-	-	ND	-	-	-
J5	-	-	-	ND	-	-	-
J6	-	-	+	ND	-	-	-
J7	-	-	-	ND	-	-	-
J8	+	+	+	ND	+	+	-
J9	+	+	+	ND	-	+	-
J10	-	-	-	ND	-	-	-
J11	-	-	+	ND	-	-	-
J12	+	+	-	ND	-	-	-
J13	-	-	-	ND	-	-	-

Tableau 7 : Résultats des tests Speed ReSpiVB pour les lots vacciné et non vacciné

II.3.2. RT-PCR discriminative sur les écouvillons nasaux

Les résultats de la RT-PCR discriminative sont présentés sur la figure 16.

La charge virale est exprimée en équivalents de copies de plasmides d'*Escherichia coli* pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) établie à partir d'une gamme test.

On n'a pas réussi à détecter d'ARN viral chez les veaux A2, A3 et B2, B3 (la limite de détection de la RT-PCR discriminative étant de 10^2 équivalents de copies de plasmides pour les séquences 220/69 et 3761).

Chez le veau A1 (groupe vacciné), on a détecté 1 pic d'ARN viral à J 4 p.i. correspondant à une valeur de $1,3 \times 10^3$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 3761 et à une valeur de $2,6 \times 10^2$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 220/69.

Chez le veau B1 (groupe non vacciné), on a détecté 2 pics successifs d'ARN viral pour chaque souche à J 5 ($2,1 \times 10^3$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 3761 et $6,4 \times 10^2$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 220/69) et J 7 p.i. ($2,5 \times 10^3$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 3761 et $1,1 \times 10^3$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 220/69).

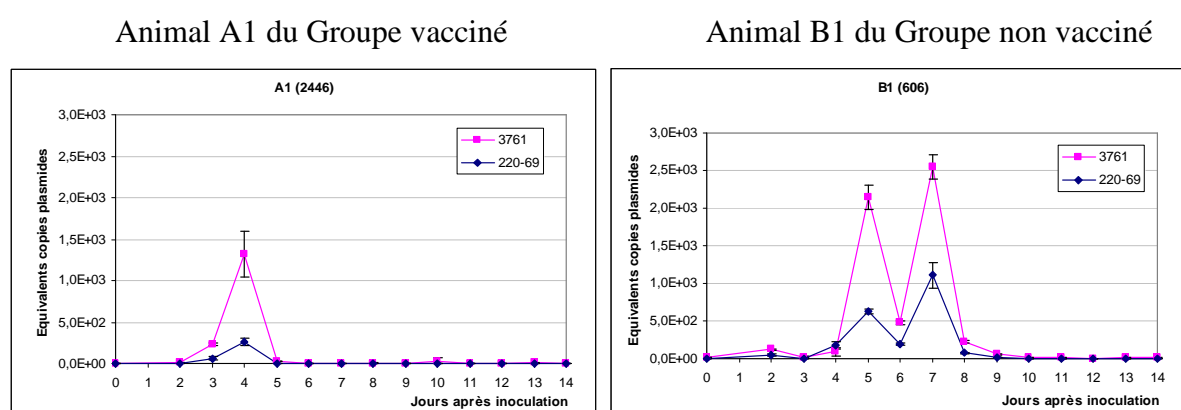


Figure 14 : Charge virale en virus 3761 et 220/69 dans les écouvillons nasaux des veaux A1 (lot vacciné) et B1 (lot non vacciné) exprimée en équivalents de copies de plasmides

II.3.3. RT-PCR discriminative et quantitative totale sur N sur les LBA

Les résultats de la RT-PCR discriminative et quantitative totale sur N sont présentés sur le tableau 8. La RT-PCR quantitative totale sur N a été réalisée selon la méthode décrite par Boxus (2005).

Pour le lot vacciné, l'ARN viral n'a été détecté que chez le veau A1 avec des valeurs de $1,5 \times 10^3$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 3761 et $2,5 \times 10^2$ équivalents de copies de plasmides pour la souche 220/69 avec la RT-PCR discriminative et une valeur de $1,1 \times 10^4$ équivalents de copies de plasmides pour la RT-PCR quantitative totale sur N. Pour le veau A1, la valeur des équivalents plasmides pour la souche 3761 est plus élevée que celle pour la souche 220/69.

Pour le lot non vacciné, l'ARN viral a été détecté chez les 3 animaux avec les 2 RT-PCR (RT-PCR discriminative des souches 220/69 et 3761 et RT-PCR quantitative totale sur N). Les valeurs des équivalents plasmides pour la souche 3761 sont plus élevées que celles pour la souche 220/69.

	q RT PCR Discriminative		q RT PCR VRSB
	Amorces 220/69	Amorces 3761	
A1	2,50E+02	1,50E+03	1,10E+04
A2	<10	<10	<10
A3	<10	<10	<10
B1	2,50E+03	1,60E+04	2,90E+04
B2	6,00E+02	3,30E+03	1,30E+04
B3	7,50E+04	9,50E+04	1,90E+05

Tableau 8 : Comparaison des résultats sur les LBA de la RT-PCR discriminative et de la RT-PCR quantitative totale sur N

II.4. Suivi immunologique

II.4.1. Réponse sérologique

Les résultats du suivi sérologique figurent sur le tableau 9.

Date	Primovaccination 1 : le 12/10/2005			Primovaccination 2 : le 09/11/2005			Epreuve Virulente : le 08/12/2005	
	19/10/2005	26/10/2005	02/11/2005	09/11/2005	15/11/2005	23/11/2005	07/12/2005	14/12/2005
A1	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	25 % (+)	32 % (+)	36 % (+)
A2	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	8 % (+)	35 % (+)	37 % (+)	53 % (+)	49 % (+)
A3	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	13 % (+)	38 % (+)	50 % (+)	54 % (+)	59 % (+)
B1	0 % (-)	0 % (-)	ND	0 % (-)	0 % (-)	9 % (-)	13 % (dout)	2 % (-)
B2	0 % (-)	0 % (-)	ND	0 % (-)	0 % (-)	10 % (dout)	0 % (-)	1 % (-)
B3	0 % (-)	0 % (-)	ND	0 % (-)	0 % (-)	10 % (dout)	8 % (-)	6 % (-)

Tableau 9 : Sérologies réalisés avant et au cours de l'expérience (test Pourquier réalisé au Laboratoire de Touraine (37))

Pour le lot vacciné, le taux d'anticorps augmente et devient positif 1 à 2 semaines après la deuxième injection de primo vaccination du vaccin Rispoval RS ®.

Pour le lot non vacciné, le taux d'Ac est toujours négatif ou douteux, ce qui montre une absence d'infection par le VRSB avant le début de la manipulation (jour de l'inoculation : le 08/12/2005).

II.4.2. Réponse sérologique des Ig M

La réponse sérologique en Ig M est présentée sur la figure 15.

Pour le lot vacciné, le taux d'Ig M reste toujours faible, tandis que pour le lot non vacciné le taux d'Ig M augmente fortement à partir de J 8 p.i. (22 %) et présente une augmentation continue jusqu'à J 10 p.i. (81 %), puis stagne jusqu'à J 13 p.i. (74 %). Les Ig M apparaissent à J 9 p.i. pour B2 et B3 et à J 10 p.i. pour B1. On observe des différences significatives entre les 2 groupes pour les jours J 9 à J 14 p.i. (test de rang de Wilcoxon avec $p < 0,05$) (J 14 exclu par manque une donnée).

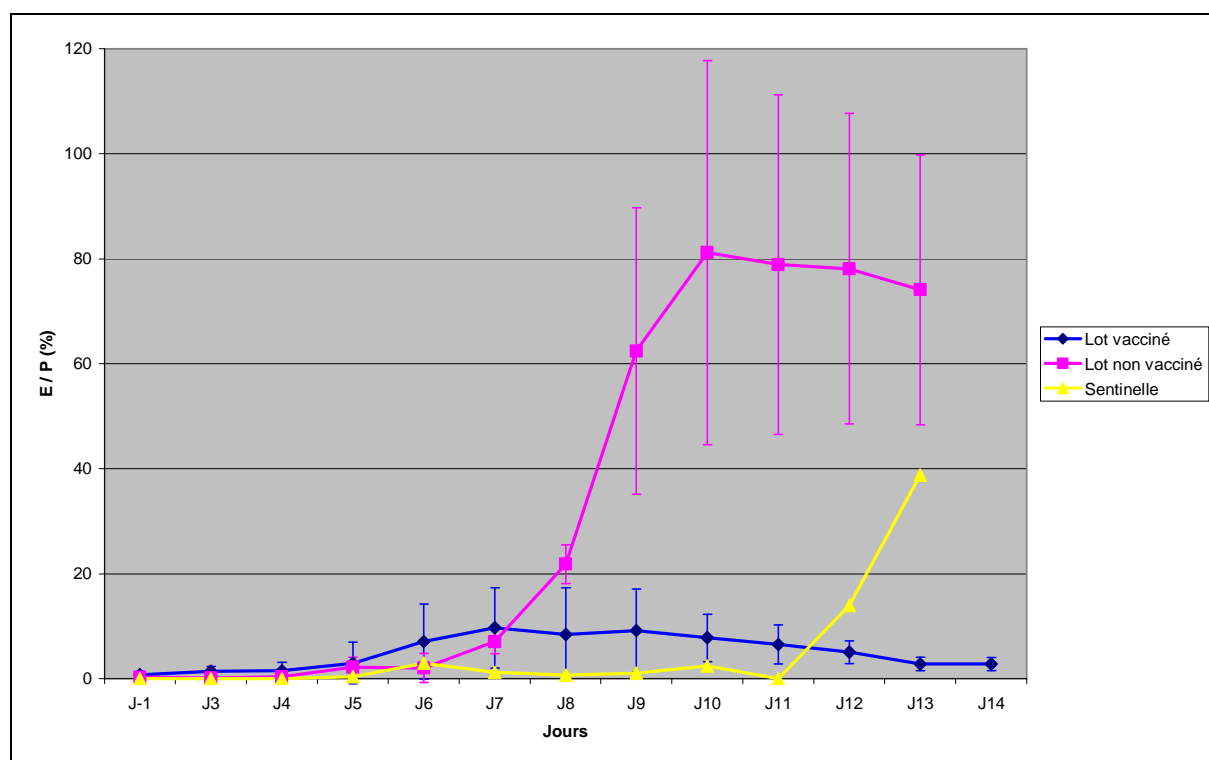


Figure 15 : Réponse en Ig M (E/P en %) pour les lots « vacciné » et « non vacciné » testés

Légende : $E/P = (DO.450 \text{ corrigée de l'échantillon à tester} / DO.450 \text{ moyenne corrigée de l'échantillon de contrôle positif}) \times 100$ Tout échantillon dont E/P est supérieur à 20 % sera considéré comme issu d'un animal ayant eu un contact récent (< 15 jours post-infection) avec le VRSB.

DISCUSSION

DISCUSSION

Cette étude était la première étape d'une expérience visant à déterminer l'effet de la vaccination sur l'évolution du VRSB. Elle avait pour but d'évaluer *in vivo* une technique de RT-PCR en temps réel permettant de différencier deux souches de VRSB (souches 220/69 et 3761) et d'avoir une première idée de l'impact de la vaccination sur la variabilité du virus.

Pour ce dernier point, nous voulions savoir :

- si l'immunité vaccinale contre une souche ancienne atténuée (220/69) pouvait modifier le fitness relatif d'un mélange de deux isolats comprenant la souche ancienne vaccinale non atténuée (220/69) et une souche récente (3761) de VRSB,
- si cette vaccination protégeait sur un plan clinique les animaux infectés avec la souche 3761.

La souche 220/69 a été isolée en 1969 et la souche vaccinale dérivée a été atténuée par 96 passages en culture cellulaire. La comparaison des séquences nucléotidiques entre ces deux souches 220/69 sauvage et atténuée n'a pas permis de mettre en évidence de différences au niveau des séquences consensus des gènes immunogènes F et G. La souche 3761 a été isolée en 2003.

Modèle expérimental et protection clinique hétérologue

Etudier la protection clinique et virologique induite par un vaccin nécessite l'utilisation d'un modèle animal efficace permettant de reproduire des signes cliniques suffisamment importants et correspondant à ceux observés lors d'infection naturelle. Pour le VRSB, de nombreux modèles d'infection expérimentale ont été proposés, notamment pour évaluer le pouvoir pathogène du virus ou pour tester l'efficacité de vaccins.

Sur les plans cliniques et lésionnels, les résultats se sont souvent avérés insatisfaisants (Jacobs, 1975 ; Bryson, 1983 ; Thomas, 1984 a-b ; Otto, 1996 ; Van Der Poel, 1996). Les signes cliniques ne sont souvent que transitoires, de faible intensité, limités aux voies respiratoires supérieures. Ils ne sont la plupart du temps observés que sur une fraction des animaux inoculés. Au niveau macroscopique, les lésions sont rarement observées, souvent de faible intensité et d'extension modérée. Sur le plan clinique, les meilleurs résultats ont été observés avec des souches à faible nombre de passages en cultures cellulaires (4 à 7), à un titre élevé ($> 10^5$ à 10^6 UFP / ml), avec une combinaison de voies d'inoculation (voie intranasale et intratrachéale), pendant 3 à 4 jours consécutifs sur de jeunes veaux (< 2 mois) séronégatifs. Dans ces conditions, aucune mortalité n'était observée mais, après 3 à 5 jours d'incubation, apparaissaient des signes cliniques tels qu'un syndrome fébrile, des troubles respiratoires associés à de la polypnée et de la dyspnée, ainsi que des lésions macroscopiques d'extension légère à modérée (15 à 20 % de la surface pulmonaire) (Belknap, 1991 ; Ciszewski, 1991). Récemment, des modèles expérimentaux d'infection utilisant des souches virales préalablement passées sur veaux et inoculées à l'aide de nébuliseur ou par voies intranasale et intratrachéale ont permis de reproduire des signes cliniques proches de ceux obtenus dans les conditions naturelles (West, 1999 a-b ; Ellis, 2001 ; Tjornehoj, 2003, Valarcher, 2003, Le Mercier, 2005). L'hypothèse actuelle consiste à dire que le passage en cultures cellulaires du VRSB sélectionne des souches moins pathogènes pour l'hôte naturel et que la réamplification sur veaux resélectionnerait des mutants mieux adaptés et plus pathogènes. Dans notre étude, nous avons utilisé ce type de modèle en utilisant le même protocole que Le Mercier (2005). Ce protocole d'inoculation intranasale et intratrachéale de la souche 3761 préalablement amplifiée sur veaux avait en effet permis de reproduire la pathologie observée dans les conditions naturelles, avec des signes cliniques respiratoires majeurs chez les veaux infectés.

Dans notre étude, les résultats cliniques, virologiques et la présence d'une réponse humorale en Ig M indiquent que l'infection virale a été correctement réalisée. D'autres recherches comme la détection d'IFN γ , libérés lors de la réponse immunitaire cellulaire (Ellis, 2001) ou le dosage de protéines sériques inflammatoires comme l'haptoglobuline (Boxus, 2007) n'ont pas été envisagées, car elles ne correspondaient pas au but fixé. Des signes cliniques respiratoires ont bien été observés dans le lot infecté non vacciné, mais seulement de manière modérée par rapport à ce qui aurait pu être attendu. Ainsi, aucun syndrome de détresse respiratoire n'a pu être observé, contrairement à une étude précédente (Le Mercier, 2005). Différentes hypothèses peuvent être discutées pour expliquer ces différences.

Premièrement, le choix des souches virales utilisées pour l'inoculation d'épreuve, les titre en virus (exprimé en UFP / ml) et les volumes utilisés pour l'inoculation peuvent être très différents selon les protocoles (Mohanty, 1975 ; Elazarhy, 1980 ; Kimman, 1987 ; Belknap, 1991 ; Thomas, 1984 a et b ; Ellis, 2001 ; Jacobs, 1975). Le volume de l'inoculum administré est très variable et les titres généraux sont habituellement compris entre 10^3 et 10^5 UFP / ml. Dans notre étude, l'inoculum 3761 ne semble pas être incriminé, car il est le même que celui précédemment utilisé par Le Mercier (2005) et Boxus (2007). Dans ces études, l'inoculation de la souche 3761 entraînait de graves signes cliniques respiratoires. De même, le protocole d'inoculation était le même pour les trois expériences. Notre inoculum étant un mélange de 2 souches virales, on peut supposer une compétition entre souches avec la prédominance d'une souche moins pathogène, telle que la 220/69. L'inoculum 220/69 avait été testé au préalable pour induire des signes cliniques sur des veaux âgés de 1 semaine, mais pas sur des animaux plus âgés (Bryson, 1983). De plus, nous n'avons pas obtenu d'éléments concrets allant dans ce sens au vu des résultats virologiques sur LBA et EN, car la souche 3761 semble prédominante dans ces échantillons. La qualité des résultats ne nous permet cependant pas d'avoir une interprétation univoque.

Deuxièmement, concernant l'âge des animaux, dans les conditions naturelles, les troubles respiratoires sont préférentiellement observés sur des veaux âgés entre 1 et 7 mois. Dans les conditions expérimentales, les veaux sont âgés de 3 jours à 7 mois avec le plus souvent des inoculations réalisées entre 4 et 10 semaines (Smith, 1975 ; Mohanty, 1975 ; Moteane, 1977 ; Kimman, 1987 ; Bryson, 1983 ; Mc Nulty, 1983 ; Knott, 1998). L'expression clinique et lésionnelle est apparue maximale sur des veaux de 3 à 6 jours (Bryson, 1983). Toutefois, les veaux de cet âge sont très rarement atteints dans les conditions naturelles. Dans les protocoles de Ellis (2001) et West (1999 a et b), l'utilisation de veaux âgés jusqu'à 7 mois ne semble pas empêcher l'observation de signes cliniques sévères. Les veaux de notre étude ont été inoculés à l'âge d'environ 3 mois (91,5 +/- 10,7 jours), temps nécessaire au protocole vaccinal et à la mise en place de l'immunité. Les veaux utilisés dans notre étude avaient deux mois de plus que ceux utilisés dans l'expérience de Le Mercier (2005), ce qui peut expliquer les différences observées. Cependant, d'autres expériences avec veaux du même âge et inoculés avec la même souche virale (3761) ont permis une expression clinique forte (Boxus, 2007). L'âge ne peut donc à lui tout seul expliquer les différences observées. Malgré, l'importance très probable de ce critère, il n'existe aucune étude comparative en infection expérimentale de la pathogénie du VRSB en fonction de l'âge des veaux.

Troisièmement, la réponse de l'hôte joue un rôle important dans la pathogénie des infections à VRS et de nombreux critères liés à l'hôte peuvent intervenir. Les veaux utilisés lors des infections expérimentales sont la plupart du temps des veaux de race Prim Holstein (Le Mercier, 2005 ; Boxus, 2007) comme dans notre manipulation. Toutefois, Bryson (1983) a infecté parallèlement à 11 veaux PH, 5 veaux croisés PH x Hereford et 1 veau Simmental. Il a obtenu des signes cliniques sévères chez tous les veaux inoculés, sans distinction. L'effet race n'est pas connu lors d'infection expérimentale, car la race PH reste très largement majoritaire dans les plans d'expérimentation pour des raisons pratiques et économiques, mais il semble que certaines différences de sensibilité existent.

Dans notre étude, le score clinique moyen et les fréquences respiratoires ont été significativement supérieurs dans le lot non vacciné par rapport au lot vacciné respectivement entre J 4 et J 8 et entre J 5 et J 8. Cela suggère une protection clinique par le vaccin contre un mélange de souches hétérologue et homologue. Toutefois, compte tenu de la variabilité individuelle entre veaux d'un même lot, il aurait fallu utiliser plus d'animaux par lot. De plus, si nous avions voulu faire une expérience complète de protection hétérologue, il aurait fallu pouvoir intégrer dans l'expérience les lots témoins suivants : un lot non vacciné et non infecté, un lot vacciné et infecté par la souche 220/69 uniquement, un lot vacciné et infecté par la souche 3761 uniquement, deux lots non vaccinés et infectés uniquement par les souches 3761 ou 220/69. Toutefois, le but premier de cette pré-manipulation était de savoir si l'immunité vaccinale contre une souche ancienne atténuée (220/69) pouvait modifier le fitness relatif d'un mélange de deux isolats comprenant la souche ancienne non atténuée (220/69) et une souche récente (3761) de VRSB. Ces lots témoins ont donc été volontairement exclus dans un premier temps. Le faible nombre d'animaux utilisés dans chaque lot s'explique en partie par le coût des manipulations dans des unités de niveau II de biosécurité et par la difficulté à obtenir sur le terrain des veaux séronégatifs.

En effet, en raison de la forte prévalence du VRSB, il est très difficile de trouver sur le terrain des veaux séronégatifs. Comme les anticorps colostraux peuvent limiter l'intensité des signes cliniques et contrecarrer la réponse humorale induite (Belknap, 1995), la maîtrise de ce statut est ainsi évidente lors d'expériences à visées vaccinales chez des veaux. Pour obtenir des veaux séronégatifs, nous avons séparé les veaux de leur mère à la mise bas, puis nous les avons alimenté avec uniquement du colostrum ne contenant aucun anticorps dirigés contre le VRSB. Ce type de colostrum est difficile à obtenir en France. C'est pourquoi, nous avons dû nous fournir en Suède. La faible quantité de colostrum disponible a ainsi limité le nombre d'animaux dans notre expérience.

Malgré ces difficultés, on peut émettre certaines idées quant aux résultats obtenus. Les différences cliniques observées entre les deux lots suggèrent une protection des veaux conférée par le vaccin actuel contre l'ensemble des 2 souches et donc la souche hétérologue 3761 récemment isolée. Il n'y a donc pas d'évasion vaccinale complète avec cette souche. Cela peut s'expliquer par le fait que le vaccin est constitué du virus complet contenant par conséquent l'ensemble des épitopes viraux. Si l'échappement à un site épitopique est assez facile pour un virus à ARN, l'échappement à plusieurs sites est extrêmement compliqué et ne peut probablement se réaliser que de manière continue sur plusieurs années. Les souches utilisées ont été isolées à 34 ans d'intervalle. Ces résultats doivent aussi être discutés en rapport avec les résultats du suivi virologique sur EN et LBA.

Vaccination et suivi virologique

Le suivi virologique a porté sur des EN réalisés de façon quotidienne pour quantifier l'infection de l'étage naso-pharyngé et sur des LBA réalisés à J 5 ou J 6 p.i. pour optimiser la détection du virus à l'étage pulmonaire. En effet, les EN permettent un suivi quotidien de façon non invasive et n'influencent donc pas l'expression clinique. Malgré tout, la réalisation de ces prélèvements limite l'étude à l'atteinte des voies respiratoires hautes. Le choix des EN provient d'une manipulation précédente (Le Mercier, 2005) avec l'inoculum 3761 ayant permis la détection du virus entre J 1 et J 17 p.i. via une technique de RT-PCR quantitative (Boxus, 2007). La détection de virus au niveau des voies respiratoires basses a été réalisée sur un seul point de cinétique. Ce choix a été dicté par le fait que nous voulions privilégier les EN et par le fait que les LBA présentent l'inconvénient d'être invasifs et risquent de moduler l'expression clinique. Les techniques de détection du VRSB choisies ont été la détection d'antigènes et la détection d'ARN via des RT-PCR en temps réel discriminative et totale.

La détection d'antigènes sur les EN a fait appel au test Speed® ReSpiVB, Bio Veto Test (réalisé directement après la réalisation de la totalité des prélèvements), qui utilise une technique d'immunocapture d'antigènes. Cette technique a une sensibilité de 88 %, une spécificité de 100 % et est plus facile à utiliser pour les EN que l'IF et l'isolement viral (Mc Nulty, 1983 ; Kimman, 1986 ; Collins, 1996). Dans notre étude, la détection d'antigènes a été possible chez tous les individus sauf un, mais uniquement sur un faible nombre de jours. Cela

suggère soit que l'excrétion du virus était limitée dans les deux groupes, soit que nous étions en limite de sensibilité avec cette technique. La détection d'ARN viral dans les EN a été pratiquée tous les jours à l'aide de la RT-PCR discriminative. La détection de l'ARN viral dans les LBA a été pratiquée à J 5 et J 6 p.i. à l'aide de deux RT-PCR : une RT-PCR quantitative totale sur N et la RT-PCR discriminative élaborée lors d'une étude précédente.

La technique de RT-PCR discriminative n'a permis de détecter de l'ARN viral dans les EN que chez deux animaux, l'animal A1 du groupe vacciné et l'animal B1 du groupe non vacciné. Cela pose le problème de la non détection du virus chez les 2 veaux infectés et non vaccinés. Pour les animaux vaccinés, on peut supposer que la vaccination induit une protection virologique. Toutefois, du virus a pu être détecté chez presque tous les animaux dans les EN par le test Speed® ReSpiVB, qui est une technique considérée comme moins sensible. D'autres hypothèses peuvent être avancées, mettant en cause soit le modèle expérimental, soit la technique en elle-même :

- Le premier problème concerne la conservation de l'inoculum non optimale. L' inoculum a été transporté dans de la carboglace ($- 80^{\circ}\text{C}$) de Toulouse à Tours. Il a été conservé ensuite au congélateur à $- 80^{\circ}\text{C}$ à son arrivée le soir, jusqu'au lendemain matin, où il a été décongelé au bain marie et inoculé aux animaux. Ensuite, un échantillon de l'inoculum a été conservé au frigo à $+ 4^{\circ}\text{C}$, puis ramené sous couvert du froid positif de Tours à Toulouse pour y être dosé. Le titre après mise en culture de l'inoculum est de $8,4 \times 10^2$ UFP / ml. Le titre attendu aurait pu être de : $5,6 \times 10^3$ UFP / ml. Ce titre plus faible peut s'expliquer par le délai post inoculation supérieur à 12 heures pour la mise en culture, (c'est à dire le trajet Tours-Toulouse) vu l'importante fragilité du virus.
- Par ailleurs, il peut y avoir eu un défaut lors du prélèvement des EN avec une insuffisance de raclage de la muqueuse nasale, ne permettant pas de recueillir suffisamment de cellules, auxquelles sont étroitement liées les particules virales. Cela n'explique pas pourquoi les veaux A1 et B1, testés en premier, ont donné des résultats quantitatifs et pas les veaux suivants. Cette hypothèse est aussi réfutée par les contrôles dosant la β actine (témoin de l'ARN cellulaire) sur les EN. Ces contrôles β actine montrent la présence d'ARN cellulaire (mais pas de témoin de l'ARN viral) dans les EN à des concentrations souvent proches de 5×10^5 équivalents de plasmides (Annexes n°4 et 5).

- Un défaut lors de l'extraction et de la conservation des ARN peut également entrer en jeu. Cependant, les contrôles β actine témoignent de la bonne extraction et conservation des ARN.
- Un défaut dans la RT-PCR discriminative peut encore être envisagé, avec soit :
 - o Un manque de sensibilité dans la RT-PCR non encore découvert, avec un seuil de détection minimal pas assez faible. Cette hypothèse provient du fait que la détection du virus dans les EN par les tests Speed RespiSV, réputés peu sensibles, est possible chez 5 veaux sur 6 et uniquement chez 2 sur 6 par la RT-PCR discriminative. Une comparaison entre la RT-PCR discriminative et la RT-PCR quantitative totale sur N sur les mêmes EN pourrait être réalisée.
 - o Une erreur lors la manipulation technique des réactifs : hypothèse peu probable sachant que, chez 2 veaux, de l'ARN viral a été détecté.

In fine de nombreuses vérifications ont été entreprises, qui ne permettent pas pour le moment d'identifier de causes précises au manque de résultats de la RT-PCR discriminative pour les EN.

Concernant les résultats des LBA, les résultats suggèrent que la vaccination protège partiellement vis-à-vis d'une infection de l'appareil respiratoire bas. En effet, l'ARN viral est détecté chez 1 animal vacciné sur 3, tandis qu'il est détecté chez tous les veaux non vaccinés. Cependant un seul point de cinétique a été réalisé pour les LBA, ce qui ne permet pas d'exclure une cinétique de réplication différente entre les 2 lots. Cette différence n'a pas pu être observée sur les EN. Soit il n'y a pas de différences en terme de protection virale de l'appareil respiratoire haut, soit les échecs d'amplification probablement inhérents à la technique ne permettent pas d'interprétation. Enfin, l'animal sentinelle du groupe vacciné a présenté un tableau clinique et une réponse Ig M décalés par rapport aux autres veaux du même groupe. Cet animal a très probablement été infecté à partir d'un de ses congénères vaccinés et donc la vaccination semble ne pas empêcher la contamination entre animaux.

Compétition entre souches 220/69 et 3761

Un des objectifs de cette thèse était de savoir si la vaccination à l'aide de la souche 220/69 pouvait modifier le fitness entre deux souches virales, la souche vaccinale ancienne 220/69 et une souche récente 3761. L'idée étant que, si la vaccination pouvait avoir un impact sur l'évolution virale, le fitness de la souche 3761 par rapport à celui de la souche 220/69 serait supérieur chez les veaux vaccinés. Le fitness était mesuré à l'aide d'une RT-PCR temps réelle discriminative, préalablement élaborée *in vitro* à l'UMR.

Les 2 souches de virus ont été détectées par RT-PCR discriminative dans les EN des veaux A1 à J 5 et B1 à J 5 et J 7. Chez les 2 animaux, les pics d'ARN viraux de la souche 3761 sont plus élevés que ceux de la souche 220/69, mais les rapports 3761 / 220-69 en charge virale ne sont pas significativement différents entre les 2 lots. Le faible nombre de veaux utilisés et le faible nombre de points de détection obtenus ne permettent aucune interprétation.

Le virus a aussi été isolé et quantifié dans le LBA sur les veaux de chaque groupe grâce à 2 RT-PCR temps réel. Les résultats montrent une sensibilité légèrement supérieure pour la RT-PCR quantitative totale sur N, des charges légèrement supérieures pour les animaux non vaccinés et une absence de différences significatives pour les rapports 3761/220-69 entre les deux lots. Là encore, le faible nombre d'individus et de points de cinétique ne permettent pas d'interprétation. Ainsi, à partir des éléments disponibles, nous ne pouvons pas conclure sur l'impact de la vaccination sur l'évolution virale.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le VRSB est un pathogène majeur en élevage bovin. La vaccination représente actuellement le seul moyen de lutte contre l'infection par le VRSB. Beaucoup de vaccins ont été développés depuis plus de vingt ans en France 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. Le VRSB et le VRSH, étant des virus à ARN de polarité négative, ils ont la capacité de muter à chaque cycle de réplication virale. Cette capacité adaptative peut donc poser des problèmes variés en matière de vaccination.

Cette étude avait pour but d'analyser l'impact de la variabilité génomique du VRSB sur la vaccination, et d'évaluer *in vivo* une technique permettant de discriminer différentes souches virales de VRSB.

Nous avons présenté l'évaluation *in vivo* d'une RT-PCR en temps réel permettant de différencier deux souches de VRSB (souches 220/69 et 3761), mais il reste encore des incertitudes quant à la sensibilité de cette technique *in vivo*.

Nous avons montré que l'utilisation d'un vaccin entier élaboré à partir d'une souche ancienne (220/69), protège partiellement d'une infection vis-à-vis d'une combinaison de souches homologue et hétérologue sur le plan clinique, mais pas sur le plan virologique. Cette pré-étude doit cependant être complétée avec un plus grand nombre d'animaux par lots et la présence de groupes témoins supplémentaires.

Enfin, en l'état actuel des connaissances, rien ne permet de dire si la vaccination a un impact sur l'évolution du VRSB. De plus, ce travail confirme également les difficultés inhérentes aux essais *in vivo* sur veaux avec du VRSB.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

M. DEUTSCHER Mathieu, Charles, Robert

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 6 juillet 2006

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

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Gilles MEYER, Maître de Conférences, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

M. DEUTSCHER Mathieu, Charles, Robert

intitulée :

Infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin : étude des interactions entre la vaccination et l'évolution du virus

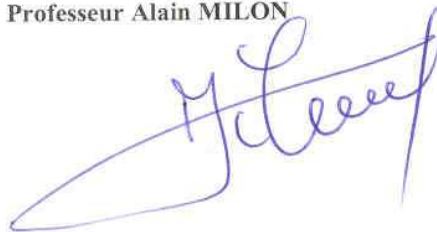
Vu :

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



Vu :

Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :

Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu le : 15 MAI 2007

Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adair B.M. and Mc Nulty M.S.

Effect of "in vitro" exposure of bovine alveolar macrophages to different strains of bovine respiratory syncytial virus.

Vet Immunol Immunopathol, 1992, **30**, 193-206.

Ahluwalia G.S. and Hammond G.W.

Comparison of cell culture and three enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirate and tracheal secretion specimens.

Diagn Microbiol Infect Dis, 1988, **9**, 187-192.

Alwan W.H., Record F.M., and Openshaw, P.J.

Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins.

J Immunol, 1993, **150**, 5211-5218.

Anderson M.L., Moore P.F., Hyde D.M. and Dungworth D.L.

Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle : relationship to age.

Res Vet Sci, 1986, **41**, 211-220.

Anderson L.J., Hendry R.M., Pierik L.T., Tsou C. and Mc Intosh K.

Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus.

J Infect Dis, 1991, **163**, 687-692.

Antonis A.F., Schrijver R.S., Daus F., Steverink P.J., Stockhofe N., Hensen E.J., Langedijk J.P., and Van Der Most R.G.

Vaccine-induced immunopathology during bovine respiratory syncytial virus infection: exploring the parameters of pathogenesis.

J Virol, 2003, **77**, 12067-12073.

Baker J.C. and Frey M.L.

Bovine respiratory syncytial virus.

Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1985, **1**, 259-275.

Baker J.C., Ames T.R. and Markham R.J.

Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd.

Am J Vet Res, 1986 a, **47**, 240-245.

Baker J.C., Ames T.R. and Werdin R.E.

Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a beef herd.

Am J Vet Res, 1986 b, **47**, 246-253.

Becker S., Soukup J. and Yankaskas J.R.

Respiratory syncytial virus infection of human primary nasal and bronchial epithelial cell cultures and bronchoalveolar macrophages.

Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, **6**, 369-374.

Beem M.

Repeated infections with respiratory syncytial virus.
J Immunol, 1987, **98**, 1115-1122.

Belanger F., Berthiaume L., Alain R., Lussier G. and Trudel M.

Electron microscopic evidence for bridges between bovine respiratory syncytial virus particles.
J Gen Virol, 1988, **69**, 1421-1424.

Belknap E.B., Baker J.C., Patterson J.S., Walker R.D., Haines D.M. and Clark E.G.

The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves.
J Infect Dis, 1991, **163**, 470-476.

Belknap E.B.

Recognizing the clinical signs of BRSV infection.
Vet Med, 1993, 886-887.

Belknap E.B., Ciszewski D.K. and Baker J.C.

Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs.
J Vet Diagn Invest, 1995, **7**, 285-298.

Bishnu P., Banerjee D. and Banerjee A.K.

Role of host proteins in gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses.
Adv. in virus research, 1997, **48**, 169-204.

Bohlender R.E.

Fields trials of a bovine respiratory syncytial virus vaccine.
Mod Vet Pract, 1984, **65**, 606-609.

Bossert B., Marozin S. and Conzelmann K.K.

Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3.
J Virol, 2003, **77**, 8661-8668.

Boxus M., Letellier C. and Kerkhofs P.

Real time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus.
J Virol Methods, 2005, **125**, 125-130.

Boxus M., Tignon M., Roels S., Toussaint J.F., Walvarens K., Benoit M.A., Coppe P., Letesson J.J., Letellier C. and Kherkhofs P.

DNA immunization with plasmids encoding fusion and nucleocapsid proteins of BRSV induces a strong cell-mediated immunity and protects calves against challenge.
J Virol Methods, 2007, accept of print in april 2007.

Braciale T.J.

Respiratory syncytial virus and T cells : interplay between the virus and the host adaptive immune system.

Proc Am Thorac Soc, 2005, **2**, 141-146.

Brandt C., Power U.F., Plotnicky-Gilquin H., Nguyen T., Lambert P.H., Binz H. and Siegrist C.A.

Protective immunity against respiratory syncytial virus in early life after murine maternal or neonatal vaccination with the recombinant G Fusion protein BBG2Na.

J Inf Dis, 1997, **176**, 884-891.

Brun A., Peretz F., Languet B., Barral D., Lacoste F. and Lechenet J.

Evaluation of bovine respiratory syncytial virus inactivated vaccine.

Proc 18th World Buiatrics Congress, Bologna, Italy, 1994, 1383-1386.

Bryson D.G., Mc Ferran J.B., Hall H.J. and Neill S.D.

Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves (2) : Pathological and microbiological findings.

Vet Rec, 1978, **103**, 503-509.

Bryson D.G., Mc Nulty M.S., Logan E.F. and Cush P.F.

Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves : clinical and pathologic findings.

Am J Vet Res, 1983, **44**, 1648-1655.

Bryson D.G., Mc Connell S., Mc Aliskey M. and Mc Nulty M.S.

Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves.

Vet Pathol, 1991, **28**, 286-292.

Caldow G.L., Edwards S., Nixon P. and Peters A.R.

Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls.

Vet Rec, 1988, **122**, 529-531.

Caldow G.L., Edwards S., Peters A.R., Nixon P., Ibata G. and Sayers R.

Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves.

Vet Rec, 1993, **133**, 85-89.

Castleman W.L., Chandler S.K. and Slauson D.O.

Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves : ultrastructural respiratory lesions.

Am J Vet Res, 1985 a, **46**, 554-560.

Castleman W.L., Lay, J.C., Dubovi, E.J. and Slauson D.O.

Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves : light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells.

Am J Vet Res, 1985 b, **46**, 547-553.

Chen W., Alley M.R. and Manktelow B.W.

Respiratory tract-associated lymphoid tissue in conventionally raised sheep.
J Comp Pathol, 1989, **101**, 327-340.

Ciszewski D.K., Baker J.C., Slocombe R.F., Reindel J.F., Haines D.M. and Clark E.G.

Experimental reproduction of respiratory tract disease with bovine respiratory syncytial virus.
Vet Microbiol, 1991, **28**, 1, 39-60.

Collins P.L., Olmsted R.A., Spriggs M.K., Johnson P.R. and Buckler-White A.J.

Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus.
Proc Natl Acad Sci USA, 1987, **84**, 5134-5138.

Collins P. L.

The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of genus pneumovirus
In: D. W. Kingsbury. The paramyxoviruses. New York. Plenum Press. 1991. 103-162.

Collins P.L., Hill M.G., Cristina J. and Grosfeld H.

Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus.
Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**, 81-85.

Collins P.L., Chanock R.M. and Murphy B.R.

Respiratory syncytial virus
In: Knipe D.M. and Howley P.M. Fields Virology. 4th Edition. Philadelphia : Lippincott Williams et Wilkins. 2001. 1443-1485.

Corvaisier C., Guillemin G., Bourgeois, Bour J.B., Kohli E. and Pothier P.

Identification of T-cell epitopes adjacent to neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus.
Res Virol, 1993, **144**, 141-150.

Debouk P., Thomas S. and Joris E.

The effect of vaccination with Rispoval RS in young with maternal antibodies to bovine respiratory syncytial virus.
Proc 18th World Buiatric Congress, Bologna, Italy, 1994, 737-739.

Deplanche M., Lemaire M., Mirandette C., Bonnet M., Schelcher F. and Meyer G.

In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome.
J Gen Virol, 2007, **88**, 1260-1265.

Domingo E.

Vers une compréhension des virus comme systèmes complexes et dynamiques.
Ann Med Vet, 1999, **143**, 225-235.

Dudas R.A. and Karron R.A.

Respiratory syncytial virus vaccines.
Clin Microbiol Rev, 1998, **11**, 430-439.

Duncan R.B. and Potgieter L.N.

Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunoprophylaxis in ruminants.
Vet Microbiol, 1993, **37**, 319-341.

Eigen M. and Schuster P.

The hypercycle – A Principle of Natural Self-Organization.
In : Springer-Verlag. New York, 1979.

Elazhary M.A., Galina M., Roy R.S., Fontaine M. and Lamothe P.

Experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus (Quebec strain).
Can J Comp Med, 1980, **44**, 390-395.

Elazhary M.A., Silim A. and Roy R.S.

Interferon, fluorescent antibody, and neutralizing antibody responses in sera of calves inoculated with bovine respiratory syncytial virus.
Am J Vet Res, 1981, **42**, 1378-1382.

Ellis J.A., Belden E.L., Haven T.R. and Cavender J.

Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of proliferation and secretion of lymphokines by leukocytes in vitro.
Vet Immunol Immunopathol, 1992 a, **34**, 21-34.

Ellis J. A., Russel H., Cavender J. and Haven T. R.

Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of the specificity and activity of serum antibodies.
Vet Immunol Immunopathol, 1992 b, **34**, 35-45.

Ellis J. A., Hassard L. E. and Morley P.S.

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., Hassard L. E., Cortese V.S. and Morley P.S.

Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves.
J Am Vet Med Assoc, 1996 a, **208**, 393-400.

Ellis J. A., Philibert H., West K., Clark E., Martin K. and Haines D.

Fatal pneumonia in adult dairy cattle associated with active infection with bovine respiratory syncytial virus.
Can Vet J, 1996 b, **37**, 103-105.

Ellis J., West K., Konoby C., Leard T., Gallo G., Conlon J. and Fitzgerald N.
Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves.
J Am Vet Med Assoc, 2001, **218**, 1973-1980.

Elvander M.

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

Elvander M., Vilcek S., Baule C., Uttenthal A., Ballagi-Pordany A. and Belak S.
Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains.
J Gen Virol, 1998, **79**, 2939-2946.

Freymuth F., Petitjean J., Pothier P., Brouard J. and Norrby E.

Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990.
J Clin Microbiol, 1991, **29**, 653-655.

Furze J., Wertz G., Lerch R. and Taylor G.

Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1994, **75**, 363-370.

Furze J.M., Roberts S.R., Wertz G.W. and Taylor G.

Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity.
Virology, 1997, **231**, 48-58.

Gaddum R.M., Cook R.S., Thomas L.H. and Taylor G.

Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves.
Immunology, 1996, **88**, 421-427.

Gaddum R.M., Cook R.S., Furze J.M., Ellis S.A. and Taylor G.

Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes.
Immunology, 2003, **108**, 220-229.

Gershwin L.J., Giri S.N., Stewart R.S. and Chen J.

Prostaglandin and thromboxane concentrations in plasma and lung lavage fluids during sequential infection of vaccinated and nonvaccinated calves with bovine respiratory syncytial virus.
Am J Vet Res, 1989, **50**, 1254-1262.

Gershwin L.J., Schelegle E.S., Gunther R.A., Anderson M.L., Woolums A.R., Larochelle D.R., Boyle G.A., Friebertshauser K.E. and Singer R.S.

A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology.
Vaccine, 1998, **16**, 1225-1236.

Gould E.A., Alan G.M., Logan E.F. and Mc Ferran J.B.

Detection of antibody to bovine syncytial virus and respiratory syncytial virus in bovine fetal serum.

J Clin Microbiol, 1978, **8**, 233-237.

Graham B.S., Johnson T.R. and Peebles R.S.

Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection.

Immunopharmacology, 2000, **48**, 237-247.

Hall C.B., Powell K.R., Mac Donald N.E., Gala C.L., Menegus M.E., Suffin S.C. and Cohen H.J.

Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function.

N Engl J Med, 1986, **315**, 77-81.

Hancock G.E., Speelman D.J., Heers K., Bortell E., Smith J. and Cosco C.

Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus.

J Virol, 1996, **70**, 7783-7791.

Harrington R.D., Hooton T.M., Hackman R.C., Storch G.A., Osborne B., Gleaves C.A. and Meyers J.D.

An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center.

J Infect Dis, 1992, **165**, 987-993.

Hemingway B.R., Yu Y., Tanaka Y., Perrine K.G., Gustafson E., Bernstein J.M. and Galinski M.S.

Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion.

Virology, 1994, **200**, 801-805.

Hemming V.G., Prince G.A., Groothuis J.R. and Siber G.R.

Hyperimmune globulins in prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections.

Clin Microbiol, 1995, **8**, 22-33.

Hendricks D.A., Baradaran K., Mc Intosh K. and Patterson J.L.

Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells.

J Gen Virol, 1987, **68**, 1705-1714.

Herout C.

Prophylaxie de l'affection due au virus respiratoire syncytial bovin (VRSB).

Rev Med Vet, 1985, **161**, 1267-1270.

Hoffman S.J., Laham F.R. and Polack F.P.

Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection : the lungs, the virus in fluids of infected cells.

Microbes Infect, 2004, **6**, 767-772.

Horzinek M.C.

Bovine Respiratory Syncytial Virus

In : Virus Infections of Ruminants. Amsterdam. Elsevier Science Publisher. 1990. 363-375.

Howard C.J., Stott E.J., Thomas L.H., Gourlay R.N. and Taylor G.

Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parainfluenza type 3 virus, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar*.

Vet Rec, 1987, **121**, 372-376.

Inaba Y., Tanaka Y., Omori T. and Matsumoto M.

Physicochemical properties of bovine respiratory syncytial virus.

Jpn J Microbiol, 1973, **17**, 211-216.

Jacobs J.W. and Edington N.

Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus.

Res Vet Sci, 1975, **18**, 299-306.

Johnson J.L., Pommer J.L., Hudson D.B. and Doster A.R.

Pulmonary emphysema in weaned calves : Laboratory diagnosis.

Bovine Proceedings, 1982, **14**, 122-126.

Key D.W. and Derbyshire J.B.

Serological studies of parainfluenza type 3 virus, bovine adenovirus type 3 and bovine respiratory syncytial virus infection in beef calves.

Vet Microbiol, 1984, **9**, 587-592.

Kim H.W., Canchola J.G., Brandt C.D., Pyles G., Chanock R.M., Jensen K. and Parrott R.H.

Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine.

Am J Epidemiol, 1969, **89**, 422-434.

Kimman T.G., Zimmer G.M., Straver P.J. and De Leeuw P.W.

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., Westenbrink F., Schreuder B.E. and Straver P.J.

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., Zimmer G.M., Westenbrink F., Mars J. and Van Leeuwen E.

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., Straver P.J. and Zimmer G.M.

Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves : morphologic and serologic findings.

Am J Vet Res, 1989 a, **50**, 5, 684-693.

Kimman T.G., Westenbrink F. and Straver P.J.

Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies.

Vet Immunol Immunopathol, 1989 b, **22**, 145-160.

Kimman T.G., Sol J., Westenbrink F. and Straver P.J.

A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine.

Vet Quart, 1989 c, **11**, 250-253.

Kimman T.G., Daha M.R., Brinkhof J.M. and Westenbrink F.

Activation of complement by bovine respiratory syncytial virus-infected cells.

Vet Immunol Immunopathol, 1989 d, **21**, 311-325.

Kimman T.G. and Westenbrink F.

Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus.

Arch Virol, 1990, **112**, 1-25.

Knott I., Weynants V., Walravens K., Van Der Poel W.H., Kramps J.A. and Letesson J.J.

Immune response of calves experimentally infected with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus.

Arch Virol, 1998, **143**, 1119-1128.

Kubota M., Fukuyama S., Kodoma K. and Sasaki N.

Establishment of an attenuated strain bovine respiratory syncytial virus for live virus vaccine.

Jpn J Vet Sci, 1990, **52**, 695-703.

Langedijk J.P., Middel W.G., Schaaper W.M., Meloen R.H., Kramps J.A., Brandenburg A.H. and Van Oirschot J.T.

Type-specific serologic diagnosis of respiratory syncytial virus infection, based on a synthetic peptide of the attachment protein G.

J Immunol Methods, 1996, **193**, 157-166.

Langedijk J.P., Meloen R.H., Taylor G., Furze J.M. and Van Oirschot J.T.

Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus.

J Virol, 1997, **71**, 4055-4061.

Larsen L. E., Uttenthal A., Arctander P., Tjørnehoj K., Viuff B., Rontved C., O Ronsholt L., Alexandersen S. and Blixenkrone-Møller M.

Serological and genetic characterisation of bovine respiratory virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup : no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaption and passages in cell cultures or calves.

Vet Microbiol, 1998 a, **62**, 265-279.

Larsen L.E., Jensen N.E., Tjørnehoj K., Viuff B., Nielsen T.K. and Uttenthal A.
Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle : application of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle.

Proc 20th World Buiatrics Congress, Sydney, Australia, 1998 b, 707-709.

Larsen L.E., Tjørnehoj K., Viuff B., Jensen N.E. and Uttenthal A.

Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle : reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected cattle.

J Vet Diagn Invest, 1999, **11**, 416-422.

Larsen L.E.

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) : a review.

Acta Vet Scand, 2000, **41**, 1-24.

Le Mercier P.

Infection expérimentale par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) : étude des interactions entre adaptation et pouvoir pathogène

In : Th Med Vet : Toulouse, ENVT : 2005 ; 2005-TOU 3-4124 : 105 pages.

Levine S., Klaiber-Franco R. and Paradiso P.R.

Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus.

J Gen Virol, 1987, **68**, 2521-2524.

Mahin L. and Shimi A.

Weather and BRSV infection.

Vet Rec, 1982, **111**, 4, 87.

Mallipeddi S.K. and Samal S.K.

Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus.

J Gen Virol, 1993, **74**, 2001-2004.

Mallipeddi S.K., Lupiani B. and Samal S.K.

Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system.

J Gen Virol, 1996, **77**, 1019-1023.

Masson C., Delverdier M. and al.

Mise en évidence immunopéroxydasique du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) sur coupes en paraffine de tissu pulmonaire bovin.
Rev Med Vet, 1993, **144**, 99-104.

Mc Innes E., Collins R.A. and Taylor G.

Cytokine expression in pulmonary and peripheral blood mononuclear cells from calves infected with bovine respiratory syncytial virus.
Res Vet Sci, 1998, **64**, 163-166.

Mc Nulty M.S., Bryson D.G. and Allan G.M.

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

Miao C Woolums A.R., Zarlenga D.S., Brown C.C., Brown J.C. Jr, William S.M. and Scott M.A.

Effects of a single intranasal dose of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccine on cytokine messenger RNA expression following viral challenge in calves.
Am J Vet Res, 2004, **65**, 725-733.

Mink M.A., Stec D.S. and Collins P.L.

Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA.
Virology, 1991, **185**, 615-624.

Mohanty S.B., Ingling A.L. and Lillie M.G.

Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves.
Am J Vet Res, 1975, **36**, 417-419.

Moteane M. and al.

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

Mufson M. A., Orvell C., Rafnar B. and Norrby E.

Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1985, **66**, 2111-2124.

Norrby E., Mufson M. A. and Sheshberadaran H.

Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1986, **67**, 2721-2729.

Olszewska-Pazdrak B., Pazdrak K., Ogra P.L. and Garofalo R.P.

Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism.
J Immunol, 1998, **160**, 4889-4895.

Osorio F.A., Anderson G.A., Sanders J. and Grotelueshschen D.

Detection of bovine respiratory syncytial virus using a heterologous antigen-capture enzyme immunoassay.

J Vet Diagn Invest, 1989, **1**, 210-214.

Otto P., Elschner M., Reinhold P., Kohler H., Streckert H.J., Philippou S., Werchau H. and Morgenroth K.

A model for respiratory syncytial virus (RSV) infection based on experimental aerosol exposure with bovine RSV in calves.

Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1996, **19**, 85-97.

Paccaud M.F. and Jacquier C.

A respiratory syncytial virus of bovine origin.

Arch Gesamte Virusforsch, 1970, **30**, 327-342.

Perino L.J. and Hunsacker B.D.

A review of bovine respiratory disease vaccine field efficacy.

Bov Pract, 1997, **31**, 59-66.

Perrin B., Dannacher G. and Solsona M.

Mise en évidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français.

Rev Med Vet, 1979, **155**, 465-471.

Petit J.L.

Communication personnelle de Vétérinaire.

Polack F.P., Teng M.N., Collins P.L., Prince G.A., Exner M., Regele H., Lirman D.D., Rabold R., Hoffman S.J., Karp C.L., Kleeberger S.R., Wills-Karp M. and Karron R.A.

A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease.

J Exp Med, 2002, **196**, 859-865.

Prozzi D., Walravens K., Langedijk J.P., Daus F., Kramps J.A. and Letesson J.J.

Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein.

J Gen Virol, 1997, **78**, 359-366.

Randall R.E. and Russel W.C.

Paramyxovirus persistence. Consequences for host and virus.

In: Kingsbury D.W. The paramyxovirus. New York. Plenum Press. 1991. 299-231.

Rodgers S.J. and Baldwin C.A.

The rapid detection of bovine respiratory syncytial virus antigens by use a commercial enzyme immunoassay.

Bov Pract, 1990, **25**, 76-81.

Samal S.K., Pastey M.K., Mc Phillips T.H. and Mohanty S.B.

Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein expressed in insect cells specifically interacts with the phosphoprotein and the M2 protein.

Virology, 1993, **1**, 470-473.

Schelcher F., Salat O., Bezille P. and Espinasse J.

Approche séroépidémiologique des troubles respiratoires épizootiques des veaux d'Aveyron : rôle du virus respiratoire syncytial.

Rev Med Vet, 1990, **141**, 117-123.

Schlender J., Bossert B., Buchholz U. and Conzelmann K.K.

Bovine respiratory syncytial virus non structural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon induced antiviral response.

J Virol, 2000, **74**, 8234-8242.

Schmidt U., Beyer J., Polster U., Gershwin L.J. and Buchholz U.J.

Mucosal immunization with live recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and recombinant BRSV lacking the envelope glycoprotein G protects against challenge with wild-type BRSV.

J Virol, 2002, **76**, 12355-12359.

Schrijver R.S., Daus F., Kramps J.A., Langedijk J.P., Buijs R., Middel W.G., Taylor G., Furze J., Huyben M.W. and Van Oirschot J.T.

Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue.

Vet Microbiol, 1996 a, **53**, 253-260.

Schrijver R.S., Langedijk J.P., Van Der Poel W.H., Middel W.G., Kramps J.A. and Van Oirschot J.T.

Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections.

Clin Diagn Lab Immunol, 1996 b, **3**, 500-506.

Schrijver R.S., Langedijk J.P.M., Keil G.M., Middel W.G.J., Maris-Veldhuis M., Van Oirschot J.T. and Rijsewijk F.A.M.

Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV.

Vaccine, 1998, **15**, 1908-1916.

Schuh J.C. and Oliphant L.W.

Development and immunophenotyping of the pharyngeal tonsil (adenoid) in cattle.

J Comp Pathol, 1992, **106**, 229-241.

Sharma A.K. and Woldehiwet Z.

Replication of bovine respiratory syncytial virus in ovine peripheral blood lymphocytes and monocytes *in vitro*.

Vet Microbiol, 1996, **48**, 125-134.

Smith M.H., Frey M.L. and Dierk R.E.

Isolation, characterization, pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus.

Arch Virol, 1975, **47**, 237-247.

Srikiatkhachorn A. and Braciale T.J.

Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection.

J Virol, 1997 a, **71**, 678-685.

Srikiatkhachorn A. and Braciale T.J.

Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection.

J Exp Med, 1997 b, **3**, 421-432.

Srikiatkhachorn A., Chang W. and Braciale T.J.

Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent.

J Virol, 1999, **73**, 6590-6597.

Stine L.C., Hoppe D.K. and Kelling C.L.

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., Crouch S., Jebbett J., Smith G.S., Luther P.D. and Caswell R.

A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease.

J Hyg (Lond), 1980, **85**, 257-270.

Stott E.J., Thomas L.H., Taylor G., Collins A.P., Jebbett J. and Crouch S.

A comparison of three vaccines against respiratory syncytial virus in calves.

J Hyg (Lond), 1984, **93**, 251-261.

Stott E.J., Thomas L.H. and Taylor G.

Development of a potent inactivated vaccine against respiratory syncytial virus infection of calves.

Proc 14th World Buiatrics Congress, Dublin, Ireland, 1986, 669-674.

Stott E.J., Thomas L.H., Howard C.J. and Gourlay R.N.

Field trial of a quadrivalent vaccine against calf respiratory infection of calves.

Vet Rec, 1987, **121**, 342-347.

Taylor G., Thomas L.H., Wyld S.G., Furze J., Sopp P. and Howard C.J.

Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus in calves.

J Gen Virol, 1995, **69**, 6658-6664.

Taylor G., Bruce C., Barbet A.F., Wyld S.G. and Thomas L.H.
DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves.
Vaccine, 2005, **23**, 1242-1250.

Thiry E.

Le virus respiratoire syncytial bovin.

In : *Maladies virales des ruminants*. Maisons-Alfort. Editions du Point Vétérinaire. 2000. 33-42.

Thomas L.H., Stott E.J., Collins A.P. and Jebbett J.

Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus.

Br J Exp Pathol, 1984 a, **65**, 19-28.

Thomas L.H., Stott E.J., Collins A.P., Crouch S. and Jebbett J.

Infection of gnotobiotic calves with a bovine and human isolate of respiratory syncytial virus. Modification of the response by dexamethasone.

Arch Virol, 1984 b, **79**, 67-77.

Thomas E., Margach M.J., Orvell C., Morrison B. and Wilson E.

Respiratory syncytial virus subgroup B dominance during one winter season between 1987 and 1992 in Vancouver, Canada.

J Clin Microbiol, 1994, **32**, 238-242.

Thomas L.H., Furze J.M. and Taylor G. a ou b

Determination of the protective proteins of bovine respiratory syncytial virus using vaccine recombinants and monoclonal antibodies.

Proc 18th World Buiatric Congress, Bologna, Italy, 1994, 781-784.

Thomas L.H., Cook R.S., Howard C.J., Gaddum R.M. and Taylor G.

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.

Thomas L.H., Bruce C.J., Barbet A.R., Gaddum R.M., Wyld S.G., Cook R.S. and Taylor G.

DNA vaccination in cattle, a novel method of protection against bovine respiratory syncytial virus infection.

Proc 20th World Buiatric Congress, Sydney, Australia, 1998, 717-719.

Tjernehoj K., Uttenthal A., Viuff B., Larsen L.E., Rontved C. and Ronsholt L.

An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves.

Res Vet Sci, 2003, **74**, 55-65.

Tripp R.A., Oshansky C. and Alvarez R.

Cytokines and respiratory syncytial virus infection.

Proc Am Thorac Soc, 2005, **2**, 147-149.

Ulloa L., Serra R., Asenjo A. and Villanueva N.

Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus (HRSV).
Virus Res, 1998, **53**, 13-25.

Uttenthal A., Jensen N.P. and Blom J.Y.

Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds : diagnostic tools and epidemiology.
Vet Rec, 1996, **139**, 114-117.

Valarcher J.F., Bourhy H., Gelfi J. and Schelcher F.

Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections.
J Clin Microbiol, 1999 a, **37**, 1858-1862.

Valarcher J.F., Foucras G., Meyer G. and Schelcher F.

Pathogénie de l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB).
Bulletin des GTV, 1999 b, **5**, 329-333.

Valarcher J.F., Schelcher F. and Bourhy H.

Evolution of bovine respiratory syncytial virus.
J Virol, 2000, **74**, 10714-10728.

Valarcher J.F., Bourhy H., Lavenu A., Bourges-Abella N., Roth M., Andreoletti O., Ave P. and Schelcher F.

Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus.
Virology, 2001, **291**, 55-67.

Valarcher J.F., Furze J., Wyld S., Cook R., Conzelmann K.K. and Taylor G.

Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins.
J Virol, 2003, **77**, 8426-8439.

Van Der Poel V.H., Kramps J.A., Middel W.G.J., Van Oirschot J.T. and Brand A.

Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections, a longitudinal epidemiological study in dairy herds.
Arch Virol, 1993, **133**, 309-321.

Van Der Poel V.H., Brand A., Kramps J.A. and Van Oirschot J.T.

Respiratory syncytial virus infections in human being and cattle.
J Inf, 1994, **29**, 215-228.

Van Der Poel V.H., Langedijk J.P., Kramps J.A., Middel W.G., Brand A. and Van Oirschot J.T.

Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species.
Arch Virol, 1995, **140**, 1549-1555.

Van Der Poel W.H., Schrijver R.S., Middel W.G., Kramps J.A., Brand A. and Van Oirschot J.T.

Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus.

Vet Q, 1996, **18**, 81-86.

Van Donkersgoed J., Janzen E.D., Townsend H.G. and Durham P.J.

Five field trials on the efficacy of a bovine respiratory syncytial virus vaccine.

Can Vet J, 1990, **31**, 93-100.

Vangeel I.

Efficacy of a modified live intranasal bovine respiratory syncytial virus vaccine in three week old calves experimentally challenged with BRSV.

Cattle Practic, 2005, **3**, 263-271.

Verhoeff J. and Van Nieuwstadt A.P.K.M.I.

BRS virus, PI3 virus, and BHV1 infections of young stock on self contained dairy farms : epidemiological and clinical findings.

Vet Rec, 1984 a, **114**, 288-293.

Verhoeff J. and Van Nieuwstadt A.P.K.M.I.

Prevention of bovine respiratory syncytial virus infection and clinical disease by vaccination.

Vet Rec, 1984 b, **115**, 488-492.

Viuff B., Uttenthal A., Tetgtmeier C. and Alexandersen S.

Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization.

Vet Pathol, 1996, **33**, 383-390.

Wellemans G., Leunen J. and Luchsinger E.

Isolement d'un virus (220/69) sérologiquement semblable au virus respiratoire syncytial (RS) humain.

Ann Med Vet, 1970, **114**, 89-93.

Wellemans G. and Leunen J.

Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins.

Ann Med Vet, 1975, **119**, 359-369.

Welliver R.C., Tristram D.A., Batt K., Sun M., Hogerman D. and Hildreth S.

Respiratory syncytial virus-specific cell-mediated immune responses after vaccination with apurified fusion protein subunit vaccine.

J Infect Dis, 1994, **170**, 425-428.

West K., Bogdan J., Hamel A., Nayar G., Morley P.S., Haines D.M. and Ellis J.A.

A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens.

Can J Vet Res, 1998, **62**, 245-250.

West K., Petrie L., Haines D.M., Konoby C., Clark E.G., Martin K. and Ellis J.A.
The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves.
Vaccine, 1999 a, **17**, 809-820.

West K., Petrie L., Konoby C., Haines D.M., Cortese V. and Ellis J.A.
The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves.
Vaccine, 1999 b, **18**, 907-919.

Westenbrink F., Kimman T.G. and Brinkhof J.M.
Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves.
J Gen Virol, 1989, **70**, 591-601.

Woolums A.R., Brown C.C., Brown J.C. Jr, Cole D.J., Scott M.A., Williams S.M. and Miao C.
Effects of a single intranasal dose of modified-live bovine respiratory syncytialvirus vaccine on resistance to subsequent viral challenge in calves.
Am J Vet Res, 2004, **65**, 363-372.

Young D.F., Didcock L., Goodbourn S. and Randall R.E.
Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanism to circumvent the interferon response.
Virology, 2000, **269**, 383-390.

Yu Q., Hardy R.W. and Wertz G.W.
Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication.
J Virol, 1995, **69**, 2412-2419.

Yunus A.S., Collins P.L. and Samal S.K.
Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication.
J Gen Virol, 1998, **79**, 2231-2238.

Zamora M. and Samal S.K.
Gene junction sequences of bovine respiratory syncytial virus.
Virus Res, 1992, **24**, 115-121.

Zygraich N.
Vaccination against RS virus : a five year with Rispoval RS.
Proc 12th World Congress Disease Cattle, Amsterdam, Pays-Bas, 1982, 189-195.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'évaluation clinique biquotidienne

INRA - ENVT
UMR 1225 IHAP

Code: ACI 2003

Fiche clinique

Veau :
Groupe :
N° d'identification :

Race :
Sexe :
Date de naissance :

Semaine n° :

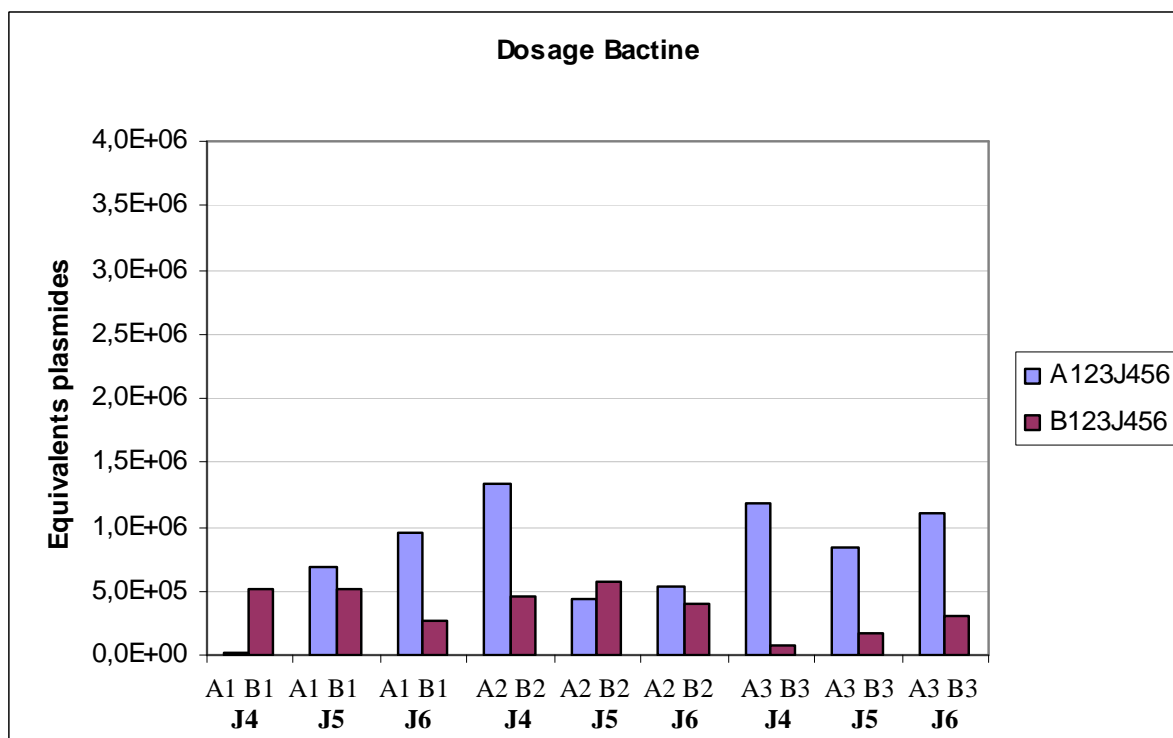
Date :		
Jour :		
Heure :		
Température rectale :		
Fréquence respiratoire :		
Toux : 0 = nulle 1 = modérée 2 = forte		
Jetage : 0 = absent 1 = partiel 2 = total		
Dyspnée abdominale : 0 = absente 1 = modérée 2 = forte		
Refus alimentaire : 0 = absent 1 = 0 à 30 % 2 = 30 à 60 % 3 = plus de 60 %		
Comportement : 0 = normal 1 = triste 2 = abattu		
Prélèvements : EN : PS : Autre :		
Remarques :		
Paraphe :		

Annexe 2 : Mode de calcul du score clinique

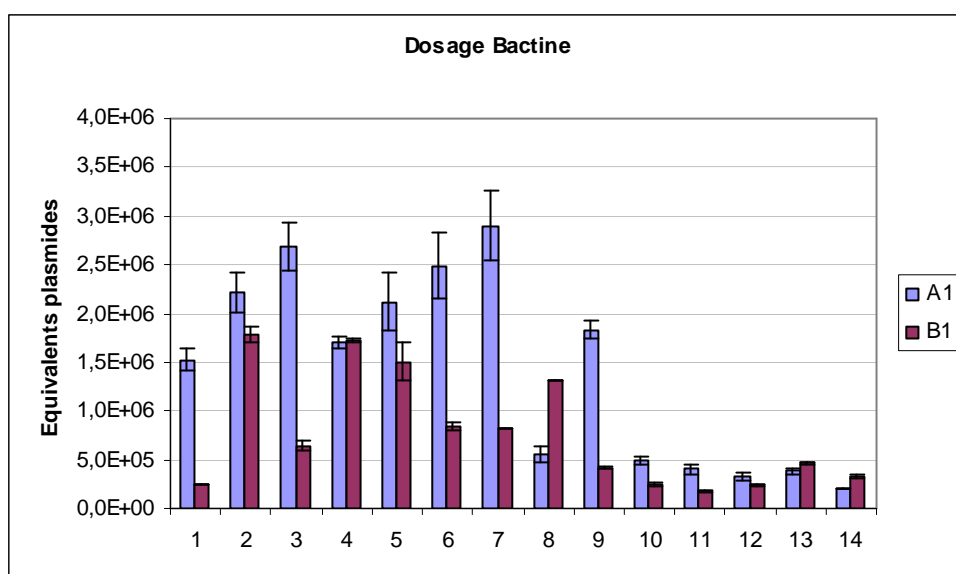
Signes	Note	Coefficient
Température rectale		
< 39,5 °C	0	
39,5 °C ≤ < 40 °C	1	1
40 °C ≤ < 40,5 °C	2	
≥ 40,5 °C	3	
Fréquence respiratoire		
< 30 mvts / min	0	
30 mvts / min ≤ < 40 mvts / min	1	3
40 mvts / min ≤ < 60 mvts / min	2	
≥ 60 mvts / min	3	
Refus de concentrés (lait)		
0	0	
0 % < < 30 %	1	3
30 % ≤ < 60 %	2	
≥ 60 %	3	
Comportement général		
Normal	0	
Moyennement altéré	1	3
Très altéré	2	
Ecoulement nasal		
Nul	0	
Modéré	1	2
Fort	2	
Toux		
Nulle	0	
Modérée	1	3
Forte	2	
Dyspnée		
Absente	0	
Abdominale modérée	1	3
Abdominale forte	2	

	Firme	Souche virale	Sous groupe antigénique	Sous groupe génétique	Dose en virus	Adjuvant
Vaccins vivants						
Bayovac® BRSV	BAYER (actuellement plus commercialisé)	Lehmkuhl 375	A	III	10^4 DICC ₅₀	-
Rispoval® RS	PFIZER	RB 94 = 220/69	AB	II	$\geq 10^{5,5}$ DICC ₅₀	-
Rispoval® RSBVD	PFIZER	RB 94 = 220/69	AB	II	$\geq 10^{5,5}$ DICC ₅₀	-
Rispoval® 3 (BRSV-Pi3-BVD)	PFIZER	Lehmkuhl 375 like	A	III	$\geq 10^5$ DICC ₅₀	-
Rispoval® RS+Pi3 IntraNasal	PFIZER	Lehmkuhl 375 like	A	III	$\geq 10^5$ DICC ₅₀	-
Vaccins inactivés						
BarVac® RS	BOEHRINGER INGELHEIM (actuellement plus commercialisé)	Tennessee	inconnu	inconnu	$1,5 \times 10^6$ DICT ₅₀ avant inactivation	alun + saponine
Bovilis® Bovigrip	INTERVET	EV 908	inconnu	inconnu	1,98 - 4,16 unités VN	hydroxyde d'aluminium + saponine
Vacores®	MERIAL (actuellement plus commercialisé)	220/69	AB	II	0,80 USN	aluminium + saponine

Annexe 3 : Récapitulatif des vaccins disponibles et des vaccins ayant été commercialisés en France.



Annexe 4 : dosages des équivalents plasmides de β actine sur les EN des veaux du groupe vacciné et du groupe non vacciné aux jours J 4, J 5 et J 6



Annexe 5 : dosages des équivalents plasmides de β actine sur les EN des veaux A1 (du groupe vacciné) et B1 (du groupe non vacciné) des jours J 1 à J 14

TOULOUSE, 2007

NOM : DEUTSCHER

PRENOM : MATHIEU

TITRE : INFECTION EXPERIMENTALE PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN : ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA VACCINATION ET L'EVOLUTION DU VIRUS

RESUME :

Le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) est une cause majeure de maladie respiratoire chez les bovins. La vaccination représente actuellement le seul moyen de lutte contre l'infection par le VRSB. Elle se heurte tout de même à différents obstacles : immunisation en présence d'anticorps maternels, réaction immunopathologique possible et variabilité antigénique pour le VRSB et le VRSB. En effet, ces virus, étant à ARN, ont la capacité de muter à chaque cycle de réplication virale et de donner des souches virales mutées. Cette capacité adaptative peut donc poser des problèmes variés en matière de réponse à la vaccination. Dans cette étude, après avoir rassemblé des données sur les caractéristiques virales du VRSB, l'infection par ce virus et la vaccination contre celui-ci, nous présentons l'évaluation *in vivo* d'une technique de RT-PCR en temps réel permettant de différencier deux souches de VRSB (220/69 et 3761) et nous montrons que l'utilisation d'un vaccin entier élaboré à partir d'une souche ancienne (220/69) protège partiellement d'une infection vis-à-vis d'une souche récente (3761) sur le plan clinique, mais pas sur le plan virologique.

MOTS CLES : BOVINS / VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN / INFECTION EXPERIMENTALE / VACCINATION / EVOLUTION VIRALE / SOUCHES MUTEES.

TITLE : BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV) : STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN VACCINATION AND EVOLUTION OF THE VIRUS

ABSTRACT :

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) is a major respiratory condition in cattle. Vaccination remains the only preventive tool against BRSV infection. However vaccination encounter different issues like colostral immunity (maternal antibodies), potential immunopathologic adverse reaction and antigenic variability of HRSV and BRSV. Indeed, these RNA viruses harbor a high genomic mutation rate which promote emergence of mutants. Such 'evolution' ability is the most prominent problem for vaccination. In this study, we first evaluated a real-time RT-PCR assay which allows the *in vivo* discrimination of two BRSV strains. We then demonstrated, in experimentally challenged calves that a vaccine, elaborated from an historic BRSV strain (220/69), only induces (i) a partial clinical protection and (ii) no virological protection, against an infection with a currently circulating strain (3761).

KEYWORDS : BOVINE / BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS / EXPERIMENTAL INFECTION / VACCINATION / VIRAL EVOLUTION / MUTANT VIRAL STRAINS.