

# SOMMAIRE

<b><u>1<sup>ÈRE</sup> PARTIE : Synthèse bibliographique</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>I. LE CONTEXTE DE LA PRODUCTION D'OIES A GAVER.</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>I.1. Contexte économique.</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>I.2. Organisation de la filière et itinéraires techniques.</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>II. LA NHEO : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.</u></b> .....	<b>9</b>
<b><u>II.1. Historique et répartition de la maladie.</u></b> .....	<b>9</b>
<b><u>II.2. Symptômes et lésions.</u></b> .....	<b>9</b>
<u>II.2.1. Symptomatologie.</u> .....	9
<u>II.2.2. Tableau lésionnel.</u> .....	10
<b><u>II.3. Epidémiologie.</u></b> .....	<b>12</b>
<u>II.3.1. Épidémiologie descriptive.</u> .....	12
<u>II.3.2. Epidémiologie analytique.</u> .....	12
<b><u>II.4. Etiologie : le <i>Goose hemorrhagic polyomavirus</i> (GHPV).</u></b> .....	<b>13</b>
<u>II.4.1 La découverte du virus.</u> .....	13
<u>II.4.2. Les polyomavirus.</u> .....	16
<u>II.4.3. Génétique virale.</u> .....	18
<u>II.4.4. Cycle de réplication virale.</u> .....	19
<u>II.4.5. Particularités des deux polyomavirus aviaires, le BFDV et le GHPV.</u> .....	20
<b><u>III. BASES RATIONNELLES DE LA VACCINATION CONTRE LA NHEO.</u></b> .....	<b>21</b>
<b><u>III.1. Principes en immunologie et vaccinologie aviaires.</u></b> .....	<b>21</b>
<u>III .1.1. L'immunologie des palmipèdes, cette inconnue...</u> .....	21
<u>III.1.2. Les types de vaccins utilisables en aviculture.</u> .....	23
<u>III.1.3. Modes d'administration des vaccins aviaires.</u> .....	24
<b><u>III.2. Vaccins et polyomavirus.</u></b> .....	<b>25</b>
<u>III.2.1. Polyomavirus et immunité.</u> .....	25
<u>III.2.2. Le vaccin BFDV, premier vaccin contre un polyomavirus.</u> .....	27
<u>III.2.3. Le candidat-vaccin et son évaluation.</u> .....	28

<b><u>2<sup>ÈME</sup> PARTIE : Etude expérimentale</u></b> .....	<b>30</b>
<b><u>I. MATERIELS ET METHODES.</u></b> .....	<b>32</b>
<b><u>I.1. Système de production de l'antigène viral : culture cellulaire et virale.</u></b> .....	<b>32</b>
<u>I.1.1. Les conditions de milieu.</u> .....	32
<u>I.1.2. Les conditions de température d'incubation après infection.</u> .....	32
<u>I.1.3. Le délai post-infection (PI) avant récolte du virus.</u> .....	32
<u>I.1.4. Les conditions de récupération du virus.</u> .....	33
<b><u>I.2. Méthodes de quantification de l'antigène viral.</u></b> .....	<b>33</b>
<u>I.2.1. PCR quantitative en temps réel.</u> .....	33
<u>I.2.2. Mesure de la densité optique.</u> .....	35
<b><u>I.3. Obtention du virus et purification.</u></b> .....	<b>35</b>
<u>I.3.1. Antigène viral pour le vaccin.</u> .....	35
<u>I.3.2. Antigène viral pour le test ELISA.</u> .....	35
<b><u>I.4. Protocole d'inactivation.</u></b> .....	<b>36</b>
<b><u>I.5. Mélange de l'adjuvant.</u></b> .....	<b>37</b>
<b><u>I.6. Méthode d'évaluation : le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).</u></b> .....	<b>37</b>
<u>I.6.1. Principe.</u> .....	37
<u>I.6.2. Réalisation.</u> .....	38
<b><u>II. RESULTATS.</u></b> .....	<b>40</b>
<b><u>II.1. Production de l'antigène viral.</u></b> .....	<b>40</b>
<u>II.1.1. Méthodes de quantification de l'antigène viral.</u> .....	40
<u>II.1.2. Optimisation des conditions de production.</u> .....	41
<b><u>II.2. Préparation du candidat-vaccin.</u></b> .....	<b>42</b>
<u>II.2.1. Inactivation à la <math>\beta</math>-propiolactone.</u> .....	42
<u>II.2.2. Ajout de l'adjuvant.</u> .....	42
<u>II.2.3. Doses vaccinales.</u> .....	42
<b><u>II.3. Mise au point d'un test sérologique ELISA.</u></b> .....	<b>42</b>
<b><u>II.4. Validation du test ELISA.</u></b> .....	<b>47</b>
<b><u>III. DISCUSSION.</u></b> .....	<b>49</b>
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>52</b>
<b><u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u></b> .....	<b>54</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> .....	<b>55</b>

## **INTRODUCTION**

La Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oison (NHEO), encore appelée « maladie tardive » ou « maladie des jeunes oies en croissance », a été décrite pour la première fois en France en 1977. Cette maladie affecte les oies en élevage et depuis peu en gavage. Elle est très ancienne puisque la première description de cette entité pathologique remonte à 1970, en Hongrie.

Actuellement on peut affirmer qu'elle touche environ 20% de la production. Outre les pertes directes liées à la mortalité (10 à 80% des bandes d'animaux), la NHEO constitue actuellement un frein au développement de la production, dans un contexte de demande croissante de produits d'origine française. C'est pourquoi les acteurs de la filière : le CIFOG, l'OFIVAL, les vétérinaires et les éleveurs ainsi que les Conseils Régionaux de Midi-Pyrénées et d'Aquitaine se sont mobilisés dans le but d'éradiquer la NHEO et de prévenir sa réapparition. Une série de travaux de recherche sur la NHEO débute alors au sein du groupe de virologie moléculaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, et conduit à l'isolement et l'identification du virus responsable, le GHPV (Dubois, 2002;Guerin *et al.*, 2000).

Sur le terrain, l'application de mesures défensives uniquement sanitaires se révèle insuffisante pour lutter efficacement contre la NHEO et une prophylaxie médicale s'avère rapidement indispensable. Un programme de développement d'un vaccin à agent inactivé est alors mis en place à l'Ecole Vétérinaire et un candidat-vaccin est proposé. Dans une première partie, nous proposerons une synthèse des données bibliographiques relatives à la maladie : épidémiologie, symptomatologie, lésions caractéristiques, étiologie. Nous dresserons le bilan des connaissances en immunologie et vaccinologie aviaire dans le cas particulier des palmipèdes.

La deuxième partie sera consacrée à la production du vaccin contre la NHEO : culture, quantification et inactivation du GHPV seront détaillées. L'élaboration d'une méthode d'évaluation de ce vaccin par le développement d'un test ELISA sera ensuite évoquée.

La mise en œuvre de plusieurs essais de vaccination, en laboratoire et dans les conditions d'élevage, a permis d'évaluer l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de ce vaccin (Pappalardo, 2002).

1<sup>ère</sup> partie :

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. LE CONTEXTE DE LA PRODUCTION D'OIES A GAVER.

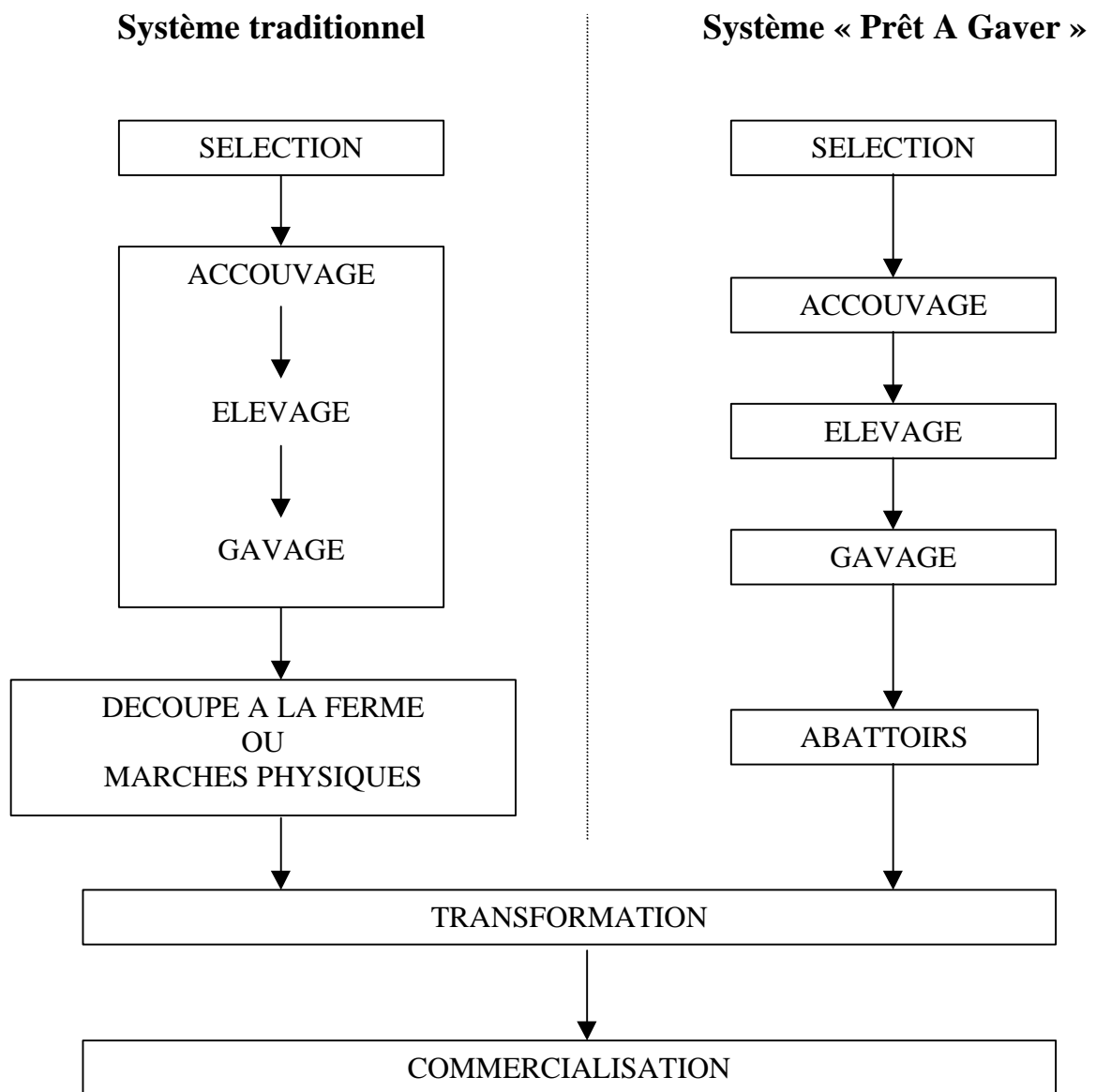
## I.1. Contexte économique.

La filière « oies à gaver » représente actuellement une production « niche » parmi les palmipèdes à foie gras. En 2000, le cheptel français avoisinait les 900 000 têtes (*versus* environ 38 millions de canards mulards). Après une augmentation significative pendant deux ans (+24% de mise en place d'oisons d'un jour en 1999, +20% en 2000), un repli a été enregistré en 2001. Il est en partie lié à la reprise des importations de foie gras d'oie (augmentation de 17,5 % avec 954 tonnes, la Hongrie étant le principal fournisseur). L'espoir de relance de la production d'oie française repose pour l'essentiel sur la pression des opérateurs, désireux de s'approvisionner en produits d'origine française tracée et d'un plan de relance initié par le CIFOG, portant notamment sur la sélection, la reproduction et les itinéraires techniques. La pérennité de la production est contrariée depuis 5 ans par la ré-émergence d'une affection, la Néphrite Hémorragique Entérique de l'Oison (NHEO), à l'origine d'épisodes de mortalité redoutables. Actuellement on peut considérer cette maladie comme LA contrainte sanitaire majeure qui amène des producteurs à se détourner de l'oie au profit du canard mulard.

## I.2. Organisation de la filière et itinéraires techniques.

Deux systèmes de production peuvent être distingués (Figure 1) :

- **La filière courte ou traditionnelle**, fondée sur la commercialisation directe des produits sur l'exploitation ou sur des marchés physiques. L'éleveur cumule toutes les tâches : il s'auto-approvisionne en oisons, les élève jusqu'à la fin du gavage ; l'abattage se réalise aussi à la ferme sous autorisation.
- **Le système « Prêt-à-gaver » (PAG)**, où chaque éleveur occupe une fonction à un stade précis de la production : l'accoureur fournit les oisons à l'éleveur, qui amène les animaux jusqu'à l'entrée en gavage ; le gaveur les engraisse. Dans ce schéma, l'éleveur fournit donc des animaux prêts à gaver.



**Figure 1** : Comparaison du système Prêt A Gaver (PAG) et du système traditionnel.

Le système traditionnel encore représenté dans le Sud-Ouest tend à disparaître au profit du système PAG. En effet, la possibilité d'investissements plus importants concernant un atelier spécialisé permet d'augmenter la taille des bandes (bande unique de 1200 oies), ce qui a pour effet d'accroître la rentabilité et la maîtrise des risques sanitaires.

En ce qui concerne la production d'oies « prêtes à gaver », c'est toute une filière qu'il faut mettre en place : élevages de reproducteurs, couvoirs, élevages dits de « prêts à gaver » et

enfin gaveurs spécialisés. Pour chaque maillon de la filière, nous pouvons observer des contraintes distinctives par rapport à la production du canard mulard :

- Sélection :

Comparée au canard mulard, qui bénéficie de la sélection du mâle Barbarie pour la chair et de la cane Pékin, l'oie à gaver a fait l'objet d'une sélection extrêmement limitée, entreprise à la station INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) d'Artiguères, puis reprise par la SEPALM à Souprosse. Très peu de sélectionneurs poursuivent actuellement cette activité. En particulier, l'absence de sélection sur le développement des masses musculaires est à l'origine de la mauvaise qualité des carcasses d'oie. Le ratio 600 000 canes reproductrices / 6000 oies en 2000 permet d'imaginer l'énorme distorsion des efforts de sélection entre ces deux espèces.

- Multiplication :

Les ateliers de reproducteurs comptent quelques centaines à quelques milliers de reproductrices (à raison d'un mâle pour 3-4 femelles).

Une première difficulté est liée à l'irrégularité d'approvisionnement en oisons sur le marché, en raison du caractère saisonnier de la ponte (au printemps). Le désaisonnement de la ponte, grâce à l'élevage en semi-claustration et l'application d'un programme lumineux (9 à 14 h d'éclairage journalier), occasionne un coût supplémentaire dans la production de l'oison par rapport au caneton (2 fois plus cher).

De plus, la mise au point de l'insémination artificielle du canard a permis d'augmenter le pourcentage d'œufs fécondés, réduisant considérablement le coût du caneton (11F en 2002). L'oie est une mauvaise pondeuse (35 œufs environ, soit 30 oisons par ponte), très sensible aux variations de l'intensité et de la durée de l'éclairage. La ponte est maximale à 2 ans puis décroît très rapidement. A l'opposé la cane pékin pond 210 à 230 œufs sur une période de 40 à 45 semaines. Des essais sont engagés pour allonger la période de ponte et permettre ainsi la planification des troupeaux sur la base de cycles annuels.

- Elevage :

Il dure de 12 semaines en système PAG à 16 semaines dans le schéma traditionnel. Pour l'essentiel, l'itinéraire technique est comparable à celui du canard.

L'oie est un animal fragile en cours d'élevage, ceci étant surtout vrai pendant la phase de démarrage (fragilité en milieu de croissance, autour de 6 semaines). Les contraintes

d'ambiance au démarrage sont donc plus strictes que pour le canard. Un parcours extérieur sur herbe est indispensable vers la 6<sup>ème</sup> semaine d'élevage.

- Gavage :

Le gavage de l'oie est manifestement beaucoup plus contraignant et plus délicat que celui du canard. Ainsi, une oie doit être gavée pendant 16 ou 17 jours à raison de 3 repas, ou 2 repas avec « repasses » par jour, contre 12 jours et 2 rations quotidiennes pour le canard. De même, les oies ne peuvent pas être contenues en cages individuelles, comme c'est largement le cas pour les ateliers de gavage de mulards. Ainsi, si un gaveur prend en charge jusqu'à 1000 canards, pour une salle de gavage d'oie le maximum se situe aujourd'hui à 500 têtes. Notons qu'à terme, l'interdiction probable de la contention en cages individuelles pour le gavage des palmipèdes fera disparaître cette disparité.

En conclusion le foie gras d'oie ne représente que 6 à 8 % du marché total du foie gras. L'oie représente donc une espèce mineure dont l'avenir devient de plus en plus inquiétant avec l'émergence de la NHEO. L'importance économique de la NHEO est liée au fait que les oies meurent à l'âge où elles sont prêtes à gaver, c'est-à-dire où le coût de production est déjà élevé.



## **II. LA NHEO : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.**

### **II.1. Historique et répartition de la maladie.**

La première description de la NHEO remonte à 1970, en Hongrie (Bernath *et al.*, 2001; Bernath and Szalai, 1970). Elle a été rapportée pour la première fois dans le Sud-Ouest de la France en 1977 (Schettler, 1977). Depuis, la NHEO a touché les élevages de manière sporadique, avec des épisodes particulièrement meurtriers entre 1988 et 1991 (Sans, 1992). Les travaux de Pierre Sans et d'Aimé Vuillaume s'étaient alors arrêtés, faute de financement. Depuis l'hiver 1996-1997, de nombreux épisodes furent constatés : la majorité des cas récents rapportés concerne le bassin de production « traditionnel » : Landes, Gers, Lot et Dordogne. Cependant, des cas isolés ont été décrits en Charente, Haute Vienne, Sarthe et Haut-Rhin (production d'oies blanches à rôtir).

Actuellement, sur le plan international, peu de données permettent d'affirmer l'existence de foyers dans les autres bassins de production en Europe ou en Asie du Sud-Est : un cas a été récemment décrit en Allemagne (Miksch *et al.*, 2002).

### **II.2. Symptômes et lésions.**

#### **II.2.1. Symptomatologie.**

Dans les conditions de terrain, la mort est le plus souvent précédée d'un état comateux des animaux, qui s'isolent, ne consomment ni ne boivent plus. On observe régulièrement une diarrhée discrète.

Dans les formes suraiguës (rencontrées lors de l'inoculation expérimentale d'oisons d'un jour avec de fortes doses de virus), on note souvent des troubles nerveux (pédalage, opisthotonos) qui conduisent à 100 % de mortalité (Figure 2). Dans les formes plus tardives, des troubles locomoteurs sont fréquents, reliés à des dépôts d'urates dans les articulations (Guerin *et al.*, 1999).

Les oies qui survivent sont supposées être infectées de manière persistante (Schettler, 1980).

## II.2.2. Tableau lésionnel.

### - *Lésions macroscopiques :*

Les lésions observées à l'autopsie sont caractéristiques (Schettler, 1980) : une ascite gélatineuse et un œdème gélatineux sous-cutané sont constamment observés (Figure 3).

Une néphrite, souvent hémorragique est également régulièrement relevée (présence parfois de dépôts d'urates dans les reins), avec pour les formes d'évolution tardive, des lésions de goutte viscérale associées. Ces dépôts d'urates s'observent aussi dans les articulations. On note également, de manière moins régulière, une entéro-typhlite mucoïde, souvent hémorragique, voire nécrotique (Figure 4) (Kisary, 1993).

D'un animal à l'autre, une grande variabilité lésionnelle peut être observée, en fonction notamment de la rapidité de l'évolution vers la mort.

### - *Lésions microscopiques :*

A l'examen histologique, on observe régulièrement des lésions de nécrose de la muqueuse intestinale ainsi qu'une inflammation de l'interstitium rénal (Kisary, 1993). La bourse de Fabricius présente des lésions de lympholyse folliculaire, vraisemblablement associée à une déplétion des populations de lymphocytes B (Guerin *et al.*, 2000). Cette déplétion est certainement associée à une immunodépression chez le sujet infecté, même de manière inapparente. Dans une problématique vaccinale, cela pourrait donc signifier qu'un sujet porteur du virus est susceptible de présenter une réponse vaccinale dégradée. Les lésions d'entérite sont également associées à une nécrose de l'épithélium intestinal. Des foyers hémorragiques sont observés dans de nombreux tissus, en particulier dans les formes suraiguës.

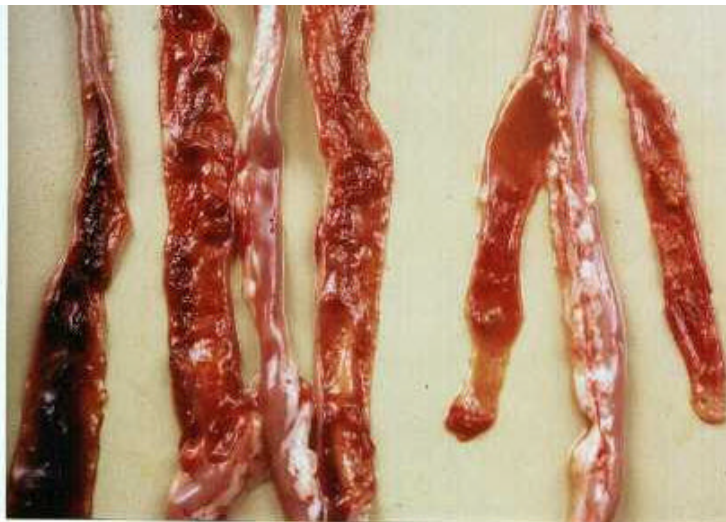
Aucune inclusion nucléaire basophile, élément histopathologique majeur de l'infection d'une cellule par un polyomavirus, n'a jamais été observée dans les cellules infectées par le virus de la NHEO. Seules quelques modifications cellulaires et nucléaires non spécifiques sont notées, comme une caryomégalie, une margination de la chromatine ou des cellules picnotiques (Guérin, communication personnelle).



**Figure 2 :** Signes nerveux (pédalage, opisthotonos) observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO (8 jours post-inoculation).



**Figure 3 :** Ascite et œdème gélatineux observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO.



**Figure 4 :** Entérite hémorragique avec foyers de nécrose observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO.

## II.3. Épidémiologie.

### II.3.1. Épidémiologie descriptive.

La NHEO apparaît au mois d'avril avec un pic d'incidence de cas déclarés entre mi-mai et mi-juin (Sans, 1992). On ne rencontre cette maladie que chez l'oie ; aucun cas n'a été décrit chez les autres palmipèdes. On admet que le virus de la NHEO peut présenter une longue persistance chez les animaux infectés, des animaux apparemment sains pouvant être porteurs de la maladie.

Sévissant tout d'abord sous forme sporadique, la NHEO se répand ensuite de manière épizootique (Sans, 1992). Elle frappe classiquement les animaux entre 5 et 10 semaines, avec un taux de mortalité de 20 à 80 % sur les lots atteints. Au delà de la 12<sup>ème</sup> semaine, les oies semblent réfractaires à la maladie. Les épisodes récents sont caractérisés par des manifestations cliniques tardives : il n'est pas rare d'observer des cas en gavage, ce qui était exceptionnel dans les cas apparus entre 1988 et 1991. Aucune thérapeutique n'est efficace.

Il n'y a pas de corrélation entre la taille des bandes ou l'état sanitaire des élevages avec les épisodes de NHEO, bien que les pourcentages de mortalités sont plus importants dans les élevages où la pression parasitaire est élevée.

Les résultats techniques en gavage des animaux rescapés de la NHEO sont comparables à ceux obtenus avec une bande saine (Sans, 1992).

### II.3.2. Épidémiologie analytique.

Le virus, étroitement spécifique de l'oie, semble être faiblement contagieux. La période d'incubation constatée sur le terrain est longue (de 3 semaines à 2 mois); elle est beaucoup plus courte par inoculation expérimentale (5 à 10 jours).

Les voies de transmission de l'agent sont encore mal connues ; la résistance du virus favorise vraisemblablement la contamination des animaux démarrés dans un bâtiment contaminé. Il apparaît qu'expérimentalement, la sensibilité des animaux à l'infection se limite aux 3 à 4 premières semaines de vie, ce qui met en exergue l'importance de la maîtrise sanitaire au démarrage. Les données les plus récentes résultent de l'étude épidémiologique entreprise par Léon (Léon, 2002). Grâce à un test de diagnostic fondé sur la détection du génome viral, la prévalence d'infection des parquets d'un groupement producteur d'oisons d'un jour du Sud-

Ouest a été estimée : il a été montré l'existence de porteurs sains cloacaux, et ce même dans des parquets constitués d'oies n'ayant jamais présenté de NHEO clinique pendant leur élevage. A l'abattoir, une proportion significative de porteurs sains virémiques a été détectée. Le portage à long terme est en tout cas clairement montré chez l'oie infectée ; il est cohérent avec la biologie des autres polyomavirus (Ritchie, 1991 ; Shah, 1996) et avec les observations de terrain concernant la NHEO (Kisary, 1993 ; Sans, 1992 ; Schettler, 1977). En élevage d'oies « prêtes-à-gaver », on note une saisonnalité marquée, ainsi qu'un pic d'occurrence clinique sur les individus de plus de six semaines. Enfin, la présence du virus dans les populations d'oies cendrées sauvages semble possible. Lorsqu'un élevage est infecté, il semble que le nombre d'individus porteurs sains et excréteurs soit peu élevé. La question de la transmission verticale du virus n'en prend que plus d'importance ; cependant, à ce jour nous n'avons pas pu détecter de séquence virale chez les oisons d'un jour issus d'oies infectées. La détection de virus chez des oies sauvages migratrices devra quant à elle se prolonger par des travaux de caractérisation virale avant de tirer des conclusions quant aux interactions épidémiologiques avec les oies d'élevage.

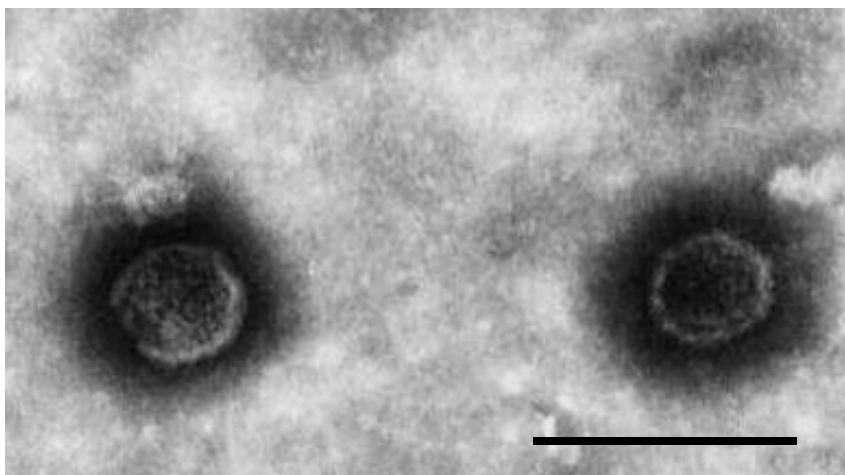
## **II.4. Etiologie : le *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV).**

### II.4.1 La découverte du virus.

Depuis la première description de la maladie, la plupart des auteurs suspectaient la nature virale de l'agent étiologique de la NHEO (Bernath and Szalai, 1970 ; Sans, 1992 ; Schettler, 1977 ; Vuillaume, 1993). Guérin et coll. (2000) ont reproduit la maladie expérimentalement en inoculant à des oisons d'un jour un broyat de foie et de rate prélevés sur des animaux morts de NHEO en élevage. L'inoculation de fractions purifiées sur gradient de saccharose a permis elle aussi de reproduire la maladie. Les auteurs ont adapté le virus à la culture cellulaire sur cellules épithéliales de rein d'oison, permettant ainsi d'obtenir une solution de virus purifié à partir de lysats de ces cultures. La présence d'antigènes viraux a été détectée par immunofluorescence, en utilisant du sérum d'oies reproductrices ayant subi un épisode de NHEO dans leur phase d'élevage. Le virus a été observé en microscopie électronique soit à partir des fractions purifiées à partir d'organes infectés, soit directement dans les cellules infectées. Des particules sphériques de 45 à 50 nm de diamètre, peu denses et non enveloppées, évoquant un virus de type "papova-like", ont ainsi été observées (Figure 5). Les

particules sont localisées dans le noyau des cellules infectées, ce qui est compatible avec la biologie de nombreux virus à ADN. L'analyse génétique par amplification aléatoire (PCR à faible stringence, *ie* à faible température d'hybridation) a permis de séquencer un fragment de 1175 paires de bases (pb), présentant une similarité (homologie de séquence) avec le fragment codant pour la protéine VP1 de plusieurs polyomavirus.

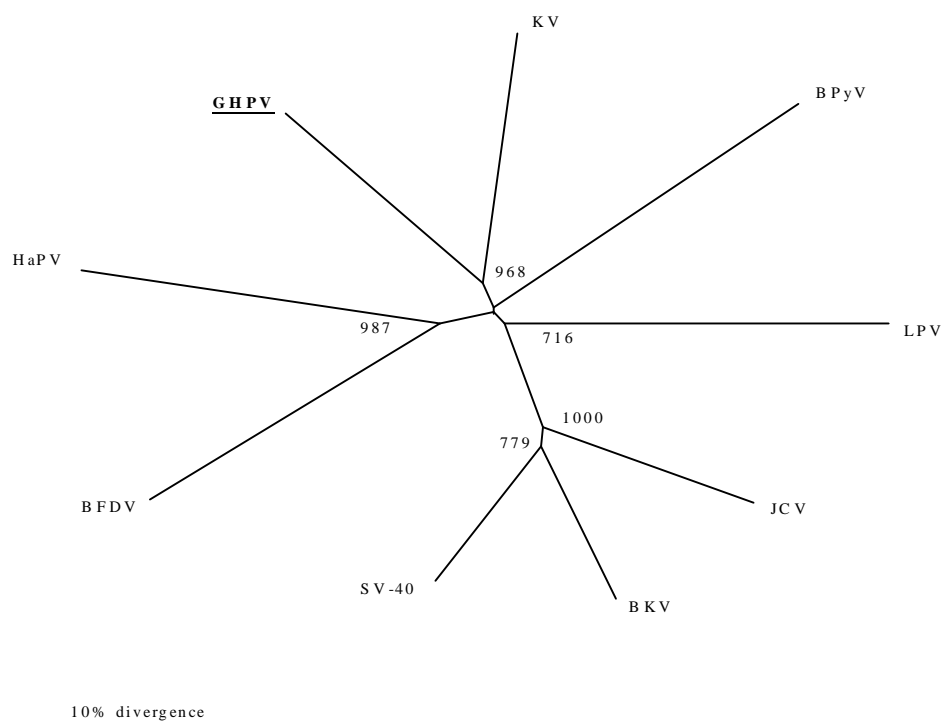
L'élaboration d'amorces spécifiques de ce fragment (VP1F et VP1R) a permis, par PCR à haute stringence, la visualisation d'un produit de 144 pb. Ce même produit se retrouve lorsque l'on teste différents tissus issus soit de cas cliniques de NHEO en élevage ou lors d'infection expérimentale, soit d'extraits de culture cellulaire. Les auteurs, suite à la synthèse des caractéristiques génétiques, physico-chimiques et biologiques du virus, ont conclu à la présence d'un virus de la famille des *Polyomaviridae*. L'analyse phylogénétique du fragment de 1175 pb (Guérin *et al.*, 2000) montre une similarité nucléotidique variant de 50 à 72% avec d'autres polyomavirus (Tableau 1). L'arbre phylogénétique (Figure 6) déduit de l'analyse de la séquence de VP1 montre que le polyomavirus impliqué est original, et il est donc nommé *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV) par les auteurs. Il nous paraît nécessaire de faire un bref rappel sur les polyomavirus, en développant rapidement leurs principales caractéristiques morphologiques, puis en insistant sur leur biologie.



**Figure 5** : Particules virales nues de 45 nm de diamètre (échelle=100 nm). Fraction purifiée par gradient de saccharose en ultra-centrifugation isopycnique, observée au microscope électronique à transmission.

**Tableau 1** : Comparaison de la séquence d'acides aminés de la protéine VP1 du GHPV et de 7 autres polyomavirus. L'identité représente le pourcentage d'acides aminés identiques, la similarité se fonde sur les acides aminés aux caractéristiques chimiques proches. Légende : JCV : virus JC (homme) ; BKV : virus BK (homme) ; LPV : *Lymphotropic papovavirus* (singe) ; SV40 : *Simian virus 40* (singe) ; BFDV : *Budgerigar fledgling disease virus* (Psittacides principalement, décrit chez les falconiformes, les passériformes...). D'après Dubois, 2002.

Virus	% d'identité	% de similarité
JCV	54	70
BKV	53	73
LPV	55	69
SV40	57	72
Hamster Polyomavirus	54	69
Mouse Polyomavirus	52	69
BFDV	56	71



**Figure 6** : Arbre phylogénétique fondé sur la séquence nucléotidique de la VP1. L'arbre a été construit en utilisant la méthode des plus proches voisins. Les nombres aux intersections traduisent la fiabilité de l'embranchement : plus ce nombre est proche de 1000, plus l'embranchement est fiable. Légende : HaPV : hamster polyomavirus, ByPV : bovine polyomavirus, KV : murine polyomavirus kilham strain. D'après Guérin *et al.*, 2000.

## II.4.2. Les polyomavirus.

### - Structure :

Les polyomavirus sont des virus à ADN double brin circulaire de 5 kpb en moyenne, non enveloppés, donc résistants à la chaleur et aux solvants, de 40 à 50 nm de diamètre, à symétrie icosaédrique.

La capside contient 3 protéines virales, VP1, VP2 et VP3. La protéine principale VP1 est organisée en 72 pentamères, chacun étant associé à une protéine VP2 ou une protéine VP3. Des ions calcium stabilisent les interactions pentamère-pentamère. Seule la protéine VP1 est exposée au milieu extérieur, assurant l'interaction avec les récepteurs cellulaires spécifiques. La VP1 des polyomavirus, produite en système recombinant (*Escherichia coli* ou baculovirus), a la capacité de s'auto-assembler pour former des capsides vides, appelées pseudo-particules ou VLP (Virus-Like Particles), dont l'aspect en microscopie électronique est très proche des virions infectieux. Cette production de VLP est exploitable à des fins vaccinales ou pour vectoriser des gènes étrangers, en vue de thérapie génique ou de vaccination à ADN (Goldmann *et al.*, 1999 ; Rodgers *et al.*, 1994).

### - Taxonomie :

Historiquement, les polyomavirus faisaient partie de la sous-famille des *Polyomavirinae*, qui constituait avec la sous-famille des *Papillomavirinae* la famille des *Papovaviridae*. A l'heure actuelle, les *Polyomaviridae* sont une famille à part entière, contenant 13 membres (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Les polyomavirus ont été décrits chez les mammifères et chez les oiseaux. Le tableau 2 reprend les hôtes, le ou les virus associés et leurs principales caractéristiques.

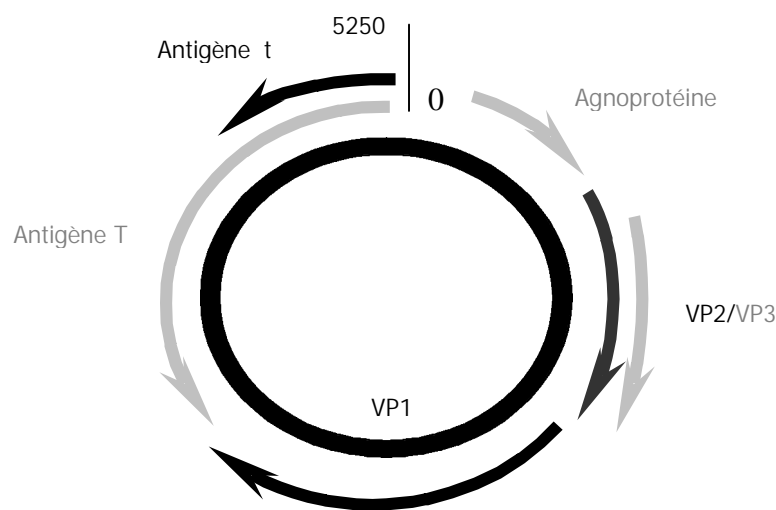


**Tableau 2** : Les différentes espèces de polyomavirus, d'après Shah, 1996 ; Guérin *et al.*, 2000. On entend par « infection classique », une infection latente, persistante, ciblée dans un tissu ou un organe déterminé. Cette infection s'observe chez les mammifères.

Hôte	Virus	Caractéristiques
Homme	<i>BK</i>	Infection classique de la petite enfance. Persistance rénale. Cystites hémorragiques chez les individus immunodéprimés.
	<i>JC</i>	Infection classique vers 10-11 ans. Persistance rénale, cérébrale, épithéliale. Leucoencéphalopathie progressive multifocale (LPM) chez les individus immunodéprimés.
Singe	<i>Simian virus 40 (SV40)</i>	Infection classique de macaques asiatiques. Persistance rénale. LPM chez les macaques immunodéprimés.
	<i>Simian Agent 12 (SA12)</i>	Infection classique des babouins d'Afrique.
	<i>Lymphotropic papovavirus (LPV)</i>	Virus des singes verts Africains. Persistance dans les lymphoblastes B.
Ruminants	<i>Bovine polyomavirus</i>	Infection classique. Persistance probablement rénale.
Lapin	<i>Rabbit kidney vacuolating virus (RKV)</i>	Infection des lapins de garenne.
Souris	<i>Mouse polyomavirus (MPV)</i>	Infection classique des souris sauvages, parfois rencontrée chez les souris de laboratoire. Persistance rénale.
	<i>K virus</i>	Infection classique de l'épithélium pulmonaire.
Hamster	<i>Hamster papovavirus (HaPV)</i>	Entraîne des tumeurs cutanées.
Rat	<i>Rat polyomavirus</i>	Infecte les glandes salivaires parotidiennes.
Perruche, psittacidés (également falconiformes, passériformes)	<i>Budgerigar fledgling disease virus (BFDV)</i>	Maladie aiguë à suraiguë chez les oisillons. Portage chronique chez les adultes, anomalies de plumage, persistance probablement rénale et épithéliale.
Oie	<i>Goose hemorrhagic polyomavirus (GHPV)</i>	Episodes de mortalité aiguë chez les oies âgées de 4 à 10 semaines.

### II.4.3. Génétique virale.

Le génome des polyomavirus est circulaire. Chaque brin contient la moitié de l'information génétique (Shah, 1996). Il est subdivisé en une région précoce et une région tardive, nommées ainsi en fonction de la chronologie de leur expression dans le cycle viral. La région précoce est exprimée rapidement après l'entrée du virus dans la cellule, et la région tardive est exprimée une fois que la réplication virale a commencé. Il existe également une région non codante. La figure 7 présente l'organisation schématique du génome du BFDV (Shah, 1996).



**Figure 7 :** Organisation simplifiée du génome du GHPV (Pingret et Guérin, résultats non publiés). L'antigène t et l'antigène T sont des protéines fonctionnelles précoces exprimées dans les premières phases du cycle de réplication, permettant la synthèse des protéines structurales tardives VP1, VP2 et VP3.

La région précoce code pour les antigènes T, nommés large T antigen (LTA) et small T antigen (STA). Le LTA est une protéine multifonctionnelle, permettant, entre autres, de moduler les transcriptions précoces et tardives de l'ADN viral, de stimuler la machinerie transcriptionnelle enzymatique cellulaire et d'initier la réplication virale. Le STA a un rôle obscur, surtout pour les polyomavirus aviaires. Pour le SV40, il activerait l'entrée en phase G1 de la cellule infectée, et faciliterait sa transformation. Il existe aussi un middle T antigen, qui n'existe pas chez les polyomavirus des primates, et forme des complexes avec certaines protéines kinases cellulaires impliquées dans les signaux de transduction régulateurs de

croissance. C'est un antigène important pour la transformation de la cellule, mais son rôle dans une infection cytopathogène est inconnu.

La région tardive code pour les protéines de capsid VP1, VP2, VP3, ainsi que pour les Agnoprotéines. Les VP sont des protéines dites structurales formant la capsid protéique qui protège le matériel génétique du virus et permet l'interaction avec les récepteurs cellulaires, via la VP1, à l'origine de son internalisation. Les Agnoprotéines du BFDV auraient un rôle pro-apoptotique et structurel, d'où leur dénomination VP4.

#### II.4.4. Cycle de réplication virale.

Une infection est productive lorsque l'ADN viral est transcrit, répliqué, et aboutit à la formation de virions dont l'exocytose aboutit à la mort cellulaire. L'infection productive d'une cellule par un polyomavirus se divise en phase précoce et phase tardive.

La phase précoce débute dès l'attachement du virus à la cellule, via l'interaction VP1-récepteur cellulaire. Elle se poursuit par l'endocytose puis la migration jusqu'au noyau où l'ADN viral est libéré et disponible pour la transcription. La phase précoce permet la production du LTA et du STA, à l'origine d'une stimulation de la réplication cellulaire, préparant *de facto* la réplication virale. Ces antigènes précoces sont également capables de "réveiller" les cellules en phase de repos.

La phase tardive débute dès le début de la réplication du génome viral, et se poursuit jusqu'à la fin de l'infection de la cellule, matérialisée par la sortie des virions dans le milieu extracellulaire. C'est pendant la phase tardive que les gènes tardifs, à l'origine de la synthèse des protéines structurales, sont exprimés. Pour les polyomavirus de mammifères, SV40 et MPV, le cycle est d'autant plus rapide que la quantité de virus est importante et que la cellule est active.

Au sein d'une même espèce, il apparaît aussi que la variation génétique entre les différents isolats est très faible. Dix-huit isolats du BFDV (*Budgerigar fledgling disease virus*) ont été recueillis à divers endroits, à des dates différentes, sur plusieurs espèces aviaires. Pour chacun, des séquences partielles d'ADN ont été déterminées et comparées à 3 séquences du BFDV déjà connues et publiées. Les résultats montrent une faible variabilité des isolats, puisque l'ensemble des génotypes présentent plus de 99% d'identité nucléotidique (Phalen *et al.*, 1999).

#### II.4.5. Particularités des deux polyomavirus aviaires, le BFDV et le GHPV.

Seul polyomavirus aviaire connu jusqu'en 2000, le BFDV présente un génome de 4980 pb (et 4 agnoprotéines), plus petit que celui des polyomavirus de mammifères (SV40 : 5243 pb et une seule agnoprotéine). En outre, le BFDV, agent d'un syndrome fulgurant chez les jeunes perruches, présente un pouvoir pathogène reconnu, y compris chez les sujets immunocompétents (Bozeman *et al.*, 1981 ; Muller and Nitschke, 1986 ; Ritchie, 1991). Ceci contraste fortement avec la biologie des polyomavirus des mammifères, le plus souvent associés à un portage asymptomatique qui peut être très long (Shah, 1996 ; zur Hausen H. and Gissmann, 1979), et qui n'entraînent de maladie clinique que chez les sujets immunodéprimés (Shah, 1998). La forte divergence génétique entre le GHPV et le BFDV (identité nucléotidique de 59%, similarité de 72%) montre que le GHPV est bien une espèce à part entière et non un variant du BFDV (Dubois, 2002). La taille et la structure de son génome (5250 pb et une agnoprotéine) le rapprochent des polyomavirus de mammifères. Un point commun entre ces deux polyomavirus aviaires est leur pouvoir pathogène intrinsèque : cette propriété contraste fortement avec la biologie des polyomavirus de mammifères. De plus, le GHPV présente des propriétés biologiques originales, en particulier l'absence d'inclusions basophiles intranucléaires typiquement associées à la réplication des polyomavirus (Dubois, 2002) : ceci pourrait expliquer en partie que l'identification de ce virus ne soit intervenue que 30 ans après la première description de la maladie.

Ainsi, l'impact sanitaire du GHPV, comme pour le BFDV, est associé à des épisodes cliniques meurtriers, mais aussi à la réplication inapparente du virus : les porteurs sains excrètent un virus très résistant dans le milieu extérieur, et la lymphopénie associée à sa multiplication entraîne une immunodépression qui fait le lit d'autres infections. Par conséquent, si la lutte contre la NHEO passe par le respect des règles d'hygiène et la connaissance du statut des animaux, il est à craindre qu'une prophylaxie uniquement sanitaire n'ait qu'une efficacité limitée. La vaccination doit faire partie de la palette d'outils de lutte chez des animaux à forte valeur économique individuelle comme les oies reproductrices, éventuellement associée à un relais chez les oisons à gaver.

### **III. BASES RATIONNELLES DE LA VACCINATION CONTRE LA NHEO.**

La définition d'un candidat vaccin et d'un schéma approprié de vaccination fait appel à la connaissance de données afférentes d'une part à l'immunologie de l'espèce cible et d'autre part aux propriétés de l'agent pathogène. Dans les deux cas, faute de données concernant directement l'oie ou le GHPV, nous envisagerons les caractéristiques des familles biologiques de l'espèce hôte et du virus. Nous en déduisons une première approche de vaccination, qui sera mise en œuvre dans notre partie expérimentale.

#### **III.1. Principes en immunologie et vaccinologie aviaires.**

##### **III .1.1. L'immunologie des palmipèdes, cette inconnue...**

La connaissance des mécanismes de la réponse immunitaire de la population concernée par la vaccination est un élément essentiel pour définir le meilleur candidat-vaccin et affiner le schéma de vaccination. Au delà des mécanismes généraux de la réponse immunitaire, nous nous sommes attachés à identifier les particularités concernant l'oie. En l'absence de données spécifiques à cette espèce, nous tenterons une extrapolation à partir des oiseaux, en particulier du canard.

On distingue l'immunité active, que chaque oiseau développe tout au long de sa vie, de l'immunité passive, transmise de la mère au jeune. L'immunité active se développe soit pour contrer les agents pathogènes rencontrés, soit en réponse à une vaccination. Lors du premier contact se met en place la réponse primaire qui, d'un point de vue sérologique, se traduit par une augmentation rapide mais de courte durée des immunoglobulines M (Ig M), suivi d'un accroissement plus lent mais durable des IgY. En cas de contact ultérieur, la réponse secondaire induit directement une production d'IgY plus rapide, intense et durable. L'immunité active se scinde en deux composantes : l'immunité humorale qui fait intervenir des anticorps neutralisants et l'immunité à médiation cellulaire (phénomènes de cytotoxicité, phagocytose, etc...).

L'immunité passive provient exclusivement des anticorps d'origine maternelle transmis au poussin par le jaune de l'œuf. Elle se développe, chez la mère, en réponse au contact avec un agent pathogène ou une vaccination. C'est une immunité principalement humorale basée sur les IgY. Le niveau d'anticorps maternels du poussin est directement corrélé au niveau d'anticorps de la mère et décroît progressivement pendant la croissance de l'animal. En général, l'immunité passive est protectrice uniquement durant les premières semaines de vie du jeune.

Dans une première approximation, nous pourrions considérer que les connaissances accumulées sur le modèle *Gallus* peuvent être transposées aux différents ordres aviaires et en l'occurrence aux palmipèdes. Peu d'équipes ont sérieusement travaillé sur l'immunologie des palmipèdes, mais les quelques données fiables évoquent des particularités majeures. Les palmipèdes correspondent à une forme « primitive » d'oiseaux, dont le système immunitaire semble moins évolué que les galliformes (Higgins, 1996). L'organisation du tissu lymphoïde des palmipèdes se singularise notamment par l'existence de nœuds lymphatiques cervico-thoraciques et lombo-sacrés, dont la structure histologique diffère des nœuds lymphatiques des mammifères et dont la fonction exacte reste à préciser. On sait par ailleurs que la réponse humorale est plus faible et surtout plus fugace que chez le poulet. A cet égard, les palmipèdes sont de mauvais « répondeurs » à une stimulation antigénique. On retrouve chez le canard les 3 formes classiques d'immunoglobulines, IgM, IgA et IgY. Ces dernières correspondent à la forme aviaire des IgG : leurs chaînes lourdes se distinguent par un 5<sup>ème</sup> domaine ( $V_H$ , Cv1 à Cv4), contre 4 domaines pour les IgG ( $V_H$ , C $\gamma$ 1 à C $\gamma$ 3). Chez le canard, les IgY peuvent être purifiées sous une forme complète ou sous la forme déléetée de l'extrémité Fc (domaines Cv3 et Cv4) : les IgY( $\Delta$ Fc). Cette dernière forme semble être le support de fonctions dégradées, en ce qui concerne notamment l'opsonisation et l'activation du complément ; l'efficacité des fonctions de neutralisation par cet isoforme est mal connue (Higgins, 1996). Dans le cadre de la réponse humorale systémique, les 2 formes d'IgY sont synthétisées, avec une nette majorité de formes  $\Delta$ Fc, qui peuvent représenter jusqu'à 90% du total des IgY (Higgins, 1996). Il faut noter que les 2 formes d'IgY présentent également de mauvaises aptitudes à l'agglutination et à la précipitation, ce qui complique le diagnostic sérologique chez les palmipèdes lorsque seuls des tests faisant appel à ces propriétés sont disponibles (Warr *et al.*, 1995). L'existence de ces 2 isoformes d'IgY a également des conséquences sur la transmission d'anticorps d'origine maternelle (AOM) *via* le vitellus. Cette transmission implique le transfert et la concentration d'Ig dans le vitellus, puis l'absorption par l'oison, dans les 2 à 3 premiers jours

de vie : cette dernière propriété ne concerne que les molécules glycosylées au niveau de leur fraction Fc : on comprend donc que les AOM correspondent aux seules IgY complètes, à l'exclusion des formes  $\Delta$ Fc et que le titrage des AOM dans le cadre de l'évaluation d'une vaccination de reproductrices est donc plus représentatif de la réponse sérologique efficace que lors de la réponse immunitaire active (Liu and Higgins, 1990).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est beaucoup moins connue : même les données de bases, telles que le phénotypage des lymphocytes B ou T, ne sont pas encore validées à ce jour. L'évaluation de la réponse cellulaire dans le contexte de l'infection ou de la vaccination est donc impossible, faute de connaissances et d'outils spécifiques. On voit donc que les particularités de l'espèce cible sont réelles et doivent inciter à une grande prudence dans la définition d'un vaccin, d'un schéma de vaccination et l'évaluation de la réponse vaccinale.

### III.1.2. Les types de vaccins utilisables en aviculture.

Les vaccins utilisables en élevage avicole doivent répondre à des exigences d'efficacité et d'innocuité, mais aussi de praticité d'emploi pour vacciner des populations de plusieurs milliers de sujets. La plupart des vaccins utilisés en élevage aviaire appartiennent à l'une de ces deux catégories (Borne and Comte, 2001) :

- Les vaccins atténués contiennent un virus ou un micro-organisme vivant dont la pathogénicité a été fortement réduite, soit naturellement (isolement de souches peu pathogènes), soit artificiellement (passages multiples en milieu de culture, délétions...). Ce type de vaccin a été développé pour infecter l'oiseau de manière similaire à l'agent pathogène sauvage, afin de provoquer une forte réponse immunitaire, sans pour autant induire les symptômes de la maladie. Après administration, le virus vaccinal se multiplie tout d'abord localement avant de se répandre dans l'organisme pendant la phase de virémie ; il atteint et infecte finalement les organes-cibles correspondant à son tropisme.

Ce processus infectieux stimule très rapidement l'immunité de l'animal et l'on constate que la protection recherchée apparaît très tôt après l'administration. Pourtant, en général, il faut au moins 10 à 15 jours avant de pouvoir détecter la présence d'anticorps circulants. En fait, ce développement très rapide de l'immunité et la protection qui en découle reposent essentiellement sur l'immunité locale : anticorps (IgA sécrétées) et lymphocytes dans les larmes, les muqueuses orales, respiratoires et digestives. Dans les conditions de terrain, on estime selon le vaccin que la protection devient efficace entre 2 et 8 jours après

administration, parfois même après quelques heures. Cependant, son efficacité est généralement assez courte et dépasse rarement les 10 semaines. Passée cette période, une vaccination de rappel devient nécessaire, à la fois pour prolonger et renforcer la protection. L'inconvénient majeur de ces vaccins est le risque de réversion vers la virulence de la souche vaccinale et de « maladie vaccinale » consécutive. Il arrive en outre de constater une diminution temporaire de l'état général des animaux après vaccination (lésions au point d'injection, fatigue, anorexie, dépression immunitaire...).

- Les vaccins inactivés contiennent des micro-organismes ou des particules d'origine bactérienne ou virale qui ont perdu leur capacité à se multiplier et se propager dans l'organisme de l'hôte. On leur associe le plus souvent un adjuvant dont le rôle est de stimuler de manière non spécifique la réaction immunitaire humorale. On arrive alors à établir chez l'oiseau une immunité spécifique des antigènes contenus dans le vaccin.

La mise en place de la réponse humorale prend du temps et la protection n'est complètement efficace qu'après deux ou trois semaines. De plus, une deuxième injection est souvent nécessaire afin d'induire la réponse secondaire. La protection obtenue est essentiellement basée sur la présence d'anticorps circulants, dans le sang ou les sécrétions ; elle est efficace longtemps, au moins pendant plusieurs mois et peut être prolongée par des vaccinations de rappel régulières. De plus ces vaccins garantissent une bonne innocuité et l'absence de risque de retour de virulence, sous réserve que l'inactivation soit totale...

### III.1.3. Modes d'administration des vaccins aviaires.

En élevage aviaire, la qualité de l'administration du vaccin et le schéma de vaccination sont des éléments fondamentaux de la vaccination. Plusieurs techniques existent afin de s'adapter à la fois aux exigences intrinsèques du vaccin, au type d'élevage dans lequel la vaccination est réalisée (effectif plus ou moins important, animaux de plus ou moins grande valeur économique) et au confort de travail de l'éleveur. Les différents moyens de vaccination se scindent en deux grands groupes : la vaccination de masse et la vaccination individuelle.

- La vaccination de masse regroupe trois techniques distinctes : la vaccination *via* l'eau de boisson, la vaccination par spray et la vaccination par aérosol. Ces trois modalités ne peuvent s'appliquer qu'aux vaccins vivants atténués ; elles reposent en effet sur la capacité de ce type de vaccin à infecter l'animal par les voies d'entrées naturelles d'un virus, à savoir les



muqueuses digestive, respiratoire et oculaire. Cela privilégie de fait la mise en place d'une protection mucosale, due principalement à une immunité à médiation cellulaire et à la synthèse d'IgA sécrétaires. L'avantage majeur de ces techniques est évidemment leur rapidité et facilité d'utilisation, ainsi que le fait de n'avoir à vacciner qu'une seule fois. Elles sont donc particulièrement adaptées aux élevages de volailles de chair à très gros effectif et s'utilisent dès le premier jour de vie.

- La vaccination individuelle peut s'effectuer elle-aussi de différentes manières, qui dépendent quasi-exclusivement du type de vaccin employé.

Pour un vaccin vivant atténué, le principe est exactement le même que pour la vaccination de masse. On utilise des techniques d'instillation oculaire, de trempage de bec, de transfixion de la membrane alaire et éventuellement d'injection parentérale pour assurer l'infection et provoquer en premier lieu une réaction locale et mucosale. Comme pour la vaccination de masse, une seule administration suffit. Cependant le fait d'avoir à manipuler chaque animal individuellement limite leur utilisation dans les très gros élevages.

A l'inverse, en ce qui concerne les vaccins inactivés, seule l'administration par injection, par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, permet à ce jour de garantir une efficacité suffisante. En effet ces vaccins ne possèdent pas la capacité d'infection des vaccins atténués et ne peuvent franchir les muqueuses. D'autre part leur efficacité repose sur une réaction maximale de l'immunité à médiation humorale et seule la voie parentérale assure un contact antigène-système immunitaire optimal pour stimuler la production d'anticorps neutralisants. Il est évident que cette technique est de loin la plus contraignante en élevage aviaire, nécessitant beaucoup de temps, de main d'œuvre et de savoir-faire. Cependant c'est aussi la plus sûre pour garantir la fiabilité et la régularité de la prise vaccinale. Elle est donc réservée aux animaux à forte valeur économique (reproducteurs, palmipèdes gras) ou utilisée par défaut quand, pour une maladie donnée, aucun autre type de vaccin n'est disponible.

## **III.2. Vaccins et polyomavirus.**

### **III.2.1. Polyomavirus et immunité.**

On sait que, lors de la production d'anticorps, sont produites en premier lieu les IgM : ces immunoglobulines présentent une faible affinité pour l'antigène et sont donc peu protectrices.

L'intervention des lymphocytes T auprès des lymphocytes B entraîne le phénomène de "switch" et permet la synthèse d'IgY à haute affinité : c'est la réponse "T-dépendante". Certains antigènes à structure très répétitive déclenchent toutefois une réponse "T-indépendante" produisant uniquement des IgM. Les polyomavirus semblent appartenir à cette catégorie. Cependant, des études sur le polyomavirus de la souris ont montré que, malgré la réponse "T-indépendante" qu'il engendre, le phénomène de "switch" se produit et des IgG protectrices sont générées. Le rôle de promoteur du "switch" incomberait à l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) synthétisé par les cellules NK (Natural Killer). D'autres travaux sur le même virus suggèrent que la réponse précoce humorale "T-indépendante" pourrait éliminer le virus pendant la phase primaire de virémie ; l'induction des lymphocytes  $T_{CD4}^+$  helpers demandant en général 4 à 6 jours, cette réponse précoce pourrait même être cruciale pour la survie de l'animal (Moser and Luckacher, 2001). Les mêmes auteurs reconnaissent que chez la souris, si l'immunité humorale peut aider à contrôler l'extension d'une infection persistante, elle contribue peu à la lutte contre la tumorigénèse une fois que le virus s'est disséminé.

En effet, une fois l'infection bien établie, l'immunité cellulaire devient le principal moyen de lutte. Il a été montré que les macrophages comme les cellules dendritiques étaient permissifs vis-à-vis du polyomavirus de la souris. Par contre, seules les cellules dendritiques peuvent ensuite déclencher une réponse des lymphocytes  $T_{CD8}^+$  spécifique de l'antigène. Ces mêmes  $T_{CD8}^+$  activés en lymphocytes T cytotoxiques deviennent alors le principal support de la prévention de la croissance de tumeurs induites par le polyomavirus chez la souris. L'efficacité de cette prévention explique que, chez des individus immunocompétents, les infections par les polyomavirus demeurent silencieuses.

En conséquence, on constate concrètement que la plupart des polyomavirus connus sont portés de façon asymptomatique à l'état latent par leur hôte. Parmi eux, les virus JC et BK, chez l'homme, peuvent néanmoins se réactiver à la suite d'une immunodépression et engendrer des syndromes graves. La population à risque comprend les sujets ayant subi une greffe d'organe, un traitement immunosuppresseur, ou infectés par le VIH et, moins fréquemment, les personnes âgées et les femmes enceintes (Shah, 1998). Ce contexte de maladie clinique liée à une immunodépression rend de toute évidence toute vaccination contre ces polyomavirus sans objet, c'est pourquoi aucune recherche n'a été sérieusement entreprise à ce sujet.

### III.2.2. Le vaccin BFDV, premier vaccin contre un polyomavirus.

Le BFDV (*Budgerigar fledgling disease virus*) tranche avec les polyomavirus de mammifères, car il peut engendrer des signes cliniques chez des individus pleinement immunocompétents au sein de la population des psittacidés. La maladie apparaît le plus souvent chez les jeunes, mais touche aussi les adultes. Les symptômes peuvent être très variés et dépendent de l'espèce touchée : anorexie, fatigue, signes digestifs, locomoteurs, parfois même une mort soudaine sans aucun signe prémonitoire (Ritchie, 1991).

Depuis le début des années 90, l'équipe de Ritchie a entrepris une série de travaux afin de mettre au point un vaccin inactivé contre le BFDV. Le virus cultivé et inactivé est couplé à divers adjuvants. Des essais de vaccination sont entrepris au laboratoire, puis dans les conditions de terrain (Ritchie *et al.*, 1993). L'évaluation de l'efficacité de ce vaccin a reposé sur un suivi sérologique des animaux. Il a été montré qu'en suivant un protocole classique d'administration (2 ou 3 injections à 3 semaines d'intervalle), on induisait une production significative d'anticorps, ceci quel que soit le statut virologique de l'animal vis-à-vis du BFDV avant vaccination. Cette remarque prend toute son importance quand on sait combien les infections subcliniques latentes sont fréquentes avec les polyomavirus (Ritchie *et al.*, 1996). L'efficacité même du vaccin a ensuite été éprouvée par des challenges viraux : des oiseaux préalablement vaccinés et inoculés avec le virus BFDV restent stables sur le plan clinique comme sur les plans sérologique et virologique. L'innocuité du vaccin se révèle tout à fait acceptable au cours de l'étude.

Ces travaux ont donc établi qu'un vaccin inactivé contre un polyomavirus aviaire peut induire une production d'anticorps qui confère une protection certaine contre la maladie. Le travail de Ritchie montre, avec le recul et l'expérience acquise grâce à l'utilisation à grande échelle du vaccin, qu'une immunité purement humorale suffit pour protéger les oiseaux des effets cliniques de l'infection (Ritchie *et al.*, 1996). Le statut virologique des animaux reste quant à lui incertain. Il est vrai que les essais en laboratoire montrent qu'aucune analyse PCR sur sang ou écouvillon cloacal n'a permis de détecter d'ADN viral chez des oiseaux vaccinés puis éprouvés. Toutefois, il est très fréquent de vacciner des oiseaux déjà infectés, porteurs du virus à l'état latent, protégé par les cellules-hôtes ; la possibilité qu'une simple augmentation du taux d'anticorps circulants puisse alors éliminer le virus paraît assez improbable. Ce vaccin protège les animaux des effets délétères de l'infection, mais ne peut en aucun cas garantir l'éradication du virus chez l'animal vacciné (Phalen, 2000).

### III.2.3. Le candidat-vaccin et son évaluation.

A la lumière des informations fournies par les travaux sur le vaccin BFDV, tout en s'appuyant sur les bases de la vaccination en élevage aviaire, nous pouvons établir le profil théorique d'un candidat-vaccin contre la NHEO et son protocole d'utilisation.

Le but premier de cette vaccination est la protection de l'oison pendant la période de sensibilité maximale, c'est-à-dire pendant les toutes premières semaines de vie. La vaccination des reproductrices avant l'entrée en ponte nous semble un bon moyen d'y parvenir : nous espérons que l'administration d'un vaccin inactivé, par voie injectable, 2 fois à 3 ou 4 semaines d'intervalle induira une production conséquente d'anticorps anti-GHPV chez les mères. Les oisons seraient ainsi protégés dès la naissance par un pool d'anticorps d'origine maternelle transmis *via* l'œuf.

Dans un deuxième temps, il sera peut-être nécessaire d'envisager la vaccination directe des jeunes dès l'âge de 2 à 3 semaines, selon le même protocole vaccinal. En effet, dans le cas d'élevages fortement contaminés par le GHPV – épisodes de NHEO sur la bande précédente par exemple – l'immunité passive des oisons d'un jour issus de mères vaccinées pourrait s'avérer insuffisante. L'association de la vaccination des reproductrices à celle des oisons issus de leur ponte permettra alors d'assurer une protection assez longue dans le temps pour couvrir la totalité de la période sensible.

La mise en place et l'évaluation de ce schéma de vaccination nécessite bien sûr la mise au point du vaccin inactivé. Celle-ci comprend globalement trois étapes :

- la production du GHPV sur une lignée cellulaire adaptée et sa **quantification**.
- une inactivation **complète** du virus suivie d'une vérification de l'absence de virulence résiduelle.
- l'association avec un **adjuvant** qui combine efficacité et innocuité, l'oie étant un animal particulièrement fragile.

Ensuite, afin d'évaluer le candidat-vaccin et ses effets chez l'espèce cible, la mise au point de tests sérologiques et virologiques est nécessaire : ils sont indispensables pour évaluer l'immunogénicité et l'efficacité du vaccin. Le suivi sérologique des reproductrices vaccinées sera alors mis en oeuvre au cours de leur cycle de ponte ; nous mettrons aussi en place une

épreuve de virulence chez les oisons d'un jour porteurs d'anticorps d'origine maternelle, comme chez les jeunes oies vaccinées 2 semaines après la naissance. Nous évaluerons ainsi concrètement la protection apportée par le vaccin, en vue de valider son efficacité.

2<sup>ème</sup> partie :

**ETUDE EXPERIMENTALE**

Après l'isolement et l'identification du virus de la NHEO, un des objectifs prioritaires était la mise au point d'un candidat-vaccin. A partir d'un travail bibliographique et des enseignements tirés de précédents travaux sur les polyomavirus, nous avons pu déterminer une ligne conductrice sur laquelle nous nous sommes appuyé pour mettre au point un vaccin à agent inactivé contre la NHEO.

Notre travail de thèse a consisté tout d'abord à standardiser les conditions de culture du GHPV sur cellules de rein d'oison. Une méthode de quantification du virus par PCR quantitative a été utilisée pour obtenir une approximation du titre viral. Différentes conditions de récupération du virus ont alors été testées. Un protocole d'inactivation à la  $\beta$ -propiolactone a ensuite été mis en place, et le virus une fois inactivé a dû être adjuvé. Le problème du choix d'un adjuvant conjuguant à la fois efficacité et innocuité s'est alors posé : nous avons testé deux adjuvants différents, l'hydroxyde d'aluminium et un polymère anionique, le Carbopol™. Par la suite, il a fallu développer une méthode fiable d'évaluation du vaccin. Un test ELISA a donc été mis au point. Pour ce faire, nous avons dû fixer plusieurs paramètres : la méthode de purification de l'antigène viral, la dilution à laquelle il devait être utilisé, ainsi que la dilution de l'anticorps secondaire anti-espèce. Enfin, la durée de la réaction enzymatique finale a été déterminée.

La validation de ce test ELISA et la vérification de l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité du candidat-vaccin ont fait l'objet du travail de thèse de Michaël PAPPALARDO, jumelé avec celui-ci.

## **I. MATERIELS ET METHODES.**

### **I.1. Système de production de l'antigène viral : culture cellulaire et virale.**

Le virus est adapté sur cellules épithéliales de rein d'oison (souche GKT, pour Goose Kidney Toulouse), préparées à partir d'un oison d'un jour conventionnel. Ces cellules sont initialement cultivées en milieu essentiel minimum de Eagle (MEME) (Gibco) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Valbiotech), supplémenté en antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 µg/mL), à 37 °C.

A la confluence des cellules, le tapis cellulaire est infecté avec du virus NHEO purifié à partir d'un broyat d'organes ou d'un extrait de culture infectée (Dubois, 2002). La phase d'adsorption virale dure 90 minutes à 37 °C, puis l'inoculum est enlevé et remplacé par du milieu de maintien : MEME avec 10% SVF, supplémenté de la même façon en antibiotiques. Quotidiennement, l'effet cytopathogène est observé au microscope et le virus est récolté à la destruction du tapis cellulaire, soit environ 8 à 10 jours post-infection.

Afin de déterminer les conditions optimales de culture, différents paramètres ont été testés :

#### **I.1.1. Les conditions de milieu.**

Deux milieux différents, plus ou moins riches, ont été testés : MEME ou DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (ICN). Ces deux types de milieux ont été complémentés avec 2, 5, ou 10 % de SVF.

#### **I.1.2. Les conditions de température d'incubation après infection.**

La température de l'étuve est fixée à 37,5 °C ou à 38,5 °C. Cette seconde température, plus élevée, permet de se rapprocher de la température centrale des Oiseaux.

#### **I.1.3. Le délai post-infection (PI) avant récolte du virus.**

La récolte du virus est réalisée à 6, 9 ou 10 jours PI.



Ces conditions ont été testées pour essayer d'obtenir le meilleur compromis entre la production du virus et la stabilité des particules déjà produites.

#### I.1.4. Les conditions de récupération du virus.

Des cellules à un même stade de croissance ont été infectées avec un même aliquot de virus NHEO. Trois conditions de récupération ont été testées à 6 jours PI :

- La première boîte a été congelée telle quelle à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Pour la deuxième boîte, le surnageant a été récupéré et clarifié d'une part (10 minutes à 1500 g), et d'autre part le tapis cellulaire a été mis en contact durant 30 minutes avec du tampon TNE (NaCl 100mM, Tris 10 mM, EDTA 1mM ; pH 8) à température ambiante. Le culot cellulaire issu de la centrifugation a été repris dans du tampon TNE et mélangé au tapis. Tout est ensuite congelé à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Le tapis cellulaire de la troisième boîte a été traité de la même façon, en ajoutant au tampon TNE 1% de NP 40, un détergent non-ionique.

Après trois cycles de congélation-décongélation pour les trois boîtes en parallèle, la suspension a été passée à l'homogénéisateur de Dounce 40 fois sur de la glace, puis clarifiée 10 minutes à 1500 g. Des aliquots de 1 mL ont par la suite été testés en PCR quantitative.

## I.2. Méthodes de quantification de l'antigène viral.

### I.2.1. PCR quantitative en temps réel.

Cette méthode est réalisée par le laboratoire Scanélis®. C'est en fait une méthode dérivée de la technique classique de PCR (Polymerase Chain Reaction), qui exploite le fait que, durant les 20 à 30 premiers cycles de la réaction d'amplification de l'ADN, l'on observe une phase exponentielle où la quantité d'ADN présent double à chaque cycle. C'est donc au cours de cette phase que se fera la quantification.

- Principe de la PCR :

C'est une technique *in vitro* d'amplification spécifique d'un segment d'ADN, basée sur le fonctionnement de l'ADN polymérase. Après dénaturation thermique d'une matrice d'ADN

double brin pour la transformer en ADN simple brin, un brin d'ADN complémentaire va être synthétisé à partir d'amorces (*primers*) spécifiques de la partie à amplifier.

Théoriquement, on a donc à la fin de la réaction d'amplification, au bout de  $n$  cycles,  $2^n$  molécules d'ADN. Cette équation ne se vérifie pourtant pas en pratique, car dès qu'un réactif manque dans le mélange réactionnel, il devient un facteur limitant pour la réaction. C'est pourquoi la quantification se fera au cours des 20 à 30 premiers cycles quand tous les éléments nécessaires sont présents.

- La PCR en temps réel (système TaqMan™, Roche Molecular System) :

C'est la méthode utilisée par le laboratoire prestataire, méthode de choix puisqu'elle utilise une sonde interne pour la quantification, ce qui permet une grande spécificité.

Cette sonde interne, ou *reporter*, va s'hybrider spécifiquement dans une région de la séquence nucléotidique comprise entre les primers, tout en ne pouvant être elle-même amplifiée (par ajout d'un groupe phosphorylé à son extrémité 3'). Cette sonde comporte à son extrémité 5' un fluorophore et à son extrémité 3' un *quencher*, molécule absorbant l'intensité lumineuse émise par le fluorophore si celui-ci est suffisamment proche dans l'espace. On va alors utiliser la propriété 5' => 3' exonucléase de la Taq polymérase qui, en clivant et libérant le reporter lors de sa progression, va permettre une émission de fluorescence détectable. L'intensité de la fluorescence produite est alors proportionnelle à la quantité de produits PCR formés, ce qui permet d'obtenir un résultat quantitatif. Cette fluorescence est donc proportionnelle au nombre de molécules cibles de départ.

- La quantification :

On utilise un standard externe constitué d'une gamme de solutions au nombre connu de copies d'ADN de séquence identique à la cible. Cette série de dilutions est amplifiée dans des conditions optimales de rendement, de manière à établir une courbe étalon à partir de laquelle on pourra extrapoler la quantité d'échantillon initialement présent.

Le seuil de détection (plus petite quantité d'ADN qui puisse être détectée) varie avec le système TaqMan entre 1 et 10 copies par réaction.

## I.2.2. Mesure de la densité optique.

Nous avons relevé la densité optique (DO) d'échantillons de virus purifié au spectrophotomètre (Jenway IC 6405), à 260 nm et 280 nm.

Par ailleurs, la DO de 5 échantillons quantifiés de virus purifié a été mesurée, de manière à pouvoir effectuer un calcul de corrélation entre la DO et la quantification en PCR. Ceci nous évitera par la suite d'utiliser la PCR quantitative, méthode plus fiable mais plus onéreuse.

## I.3. Obtention du virus et purification.

### I.3.1. Antigène viral pour le vaccin.

Des cellules GKT sont infectées avec un inoculum de virus NHEO selon la méthode décrite au paragraphe **I.1.** et un effet cytopathique total est observé une douzaine de jours post-inoculation. Les cellules sont alors congelées-décongelées trois fois et la suspension virale totale (surnageant + cellules) est récupérée. Cette suspension est centrifugée durant 15 minutes à 5000 g. Le surnageant est récupéré, alors que le culot est repris dans du tampon TNE et passé 40 fois à l'homogénéiseur de Dounce sur glace, puis centrifugé à nouveau 10 minutes à 1500 g. Le surnageant ainsi obtenu est récupéré à son tour et mélangé avec le premier.

Ce mélange de surnageants sera soumis par la suite à une inactivation à la  $\beta$ -propiolactone.

### I.3.2. Antigène viral pour le test ELISA.

Trois modes de purification de l'antigène viral ont été testés :

- Récupération du surnageant de culture : il va être clarifié une première fois par centrifugation 15 minutes à 5000 g. Le surnageant issu de cette centrifugation va quant à lui être soumis à une ultra-centrifugation (centrifugeuse Centrikon T-2070, rotor TFT 4594) durant 2 heures à 25 000 rpm. Le culot contenant le virus sera alors repris dans de l'eau nanopure avec des inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail, Roche), aliquoté et conservé à  $-80$  °C. L'aliquot testé en PCR est noté S.

- Récupération du tapis cellulaire : une fois le surnageant enlevé, du TL 10 (Tris 1 M, NaCl 3 M, EDTA 0,5 M) avec inhibiteurs de protéases est ajouté sur le tapis cellulaire ; le tampon est laissé en contact 30 minutes à température ambiante, puis les boîtes sont congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Après trois cycles successifs de congélation-décongélation, les cellules sont récupérées et les boîtes rincées au TL 10. Les cellules sont passées 40 fois à l'homogénéiseur de Dounce sur glace. On clarifie 15 minutes à 5000 g puis le surnageant est récupéré et soumis à une ultracentrifugation sur coussin de saccharose 30% pendant 2 heures à 25 000 rpm. Le culot viral est alors récupéré de la même façon que précédemment. L'aliquot testé en PCR est noté **C**.
- Nous avons enfin essayé de passer le virus semi-purifié obtenu à partir de l'ultracentrifugation du surnageant sur un coussin de saccharose 30% : 200  $\mu\text{L}$  de virus ont été dilués dans du TL 10 et le mélange a été ultracentrifugé à nouveau 2 heures à 25 000 rpm. Le culot a ensuite été repris toujours de la même façon. L'aliquot testé en PCR est noté **S/coussin**.

#### **I.4. Protocole d'inactivation.**

Le protocole d'inactivation a été établi d'après les travaux de Ritchie sur le BFDV (Ritchie *et al.* 1996) : nous avons donc choisi la  $\beta$ -propiolactone comme agent inactivant.

L'inactivation se fait en deux étapes. On ajoute tout d'abord au mélange de surnageants 0,2% final de  $\beta$ -propiolactone. Une heure après, le pH est ajusté à 7,5 avec de la soude (NaOH 1N). L'incubation dure 12 heures à température ambiante. A ce moment, on rajoute 0,1% final de  $\beta$ -propiolactone et le pH est ensuite ajusté à 7. L'ensemble est agité 2 heures à température ambiante.

La neutralisation de la  $\beta$ -propiolactone se fait par adjonction de thiosulfate de sodium 1M, pour arriver à 40 mM au final.

La vérification de l'inactivation se fait par détection des antigènes viraux par immunofluorescence indirecte : des cellules sont infectées en parallèle avec du virus soit avant inactivation, soit après. Deux jours après infection, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4% en PBS (Phosphate-Buffered Saline : NaCl 137 mM, KCl

2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM), puis perméabilisées au Triton X-100 à 0,1% en PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Elles sont alors incubées avec le sérum primaire à 37 °C. Après 4 rinçages en PBS, les cellules sont incubées avec un sérum anti-duck / FITC (isothiocyanate de fluorescéine) (Tebu RADU) dilué au 1/150°. Les préparations sont alors rincées en PBS-Tween 0,05%, montées sous lamelle et observées au microscope à fluorescence.

### **I.5. Mélange de l'adjuvant.**

Avant utilisation du vaccin, un adjuvant est ajouté, que l'on mélange à l'antigène viral inactivé durant 12 heures sous agitation à température ambiante.

Dans le cadre de « l'essai-dose », de l'hydroxyde d'aluminium a été utilisé à la dose de 12,5 mg/mL final (Alhydrogel 2%™, Superfos). Par la suite, le candidat vaccin testé dans le cadre des essais sur les oisons en croissance et les reproductrices a été adjuvé avec un polymère anionique, le Carbopol 934™ (Noveon Pharma), à hauteur de 2mg par dose vaccinale.

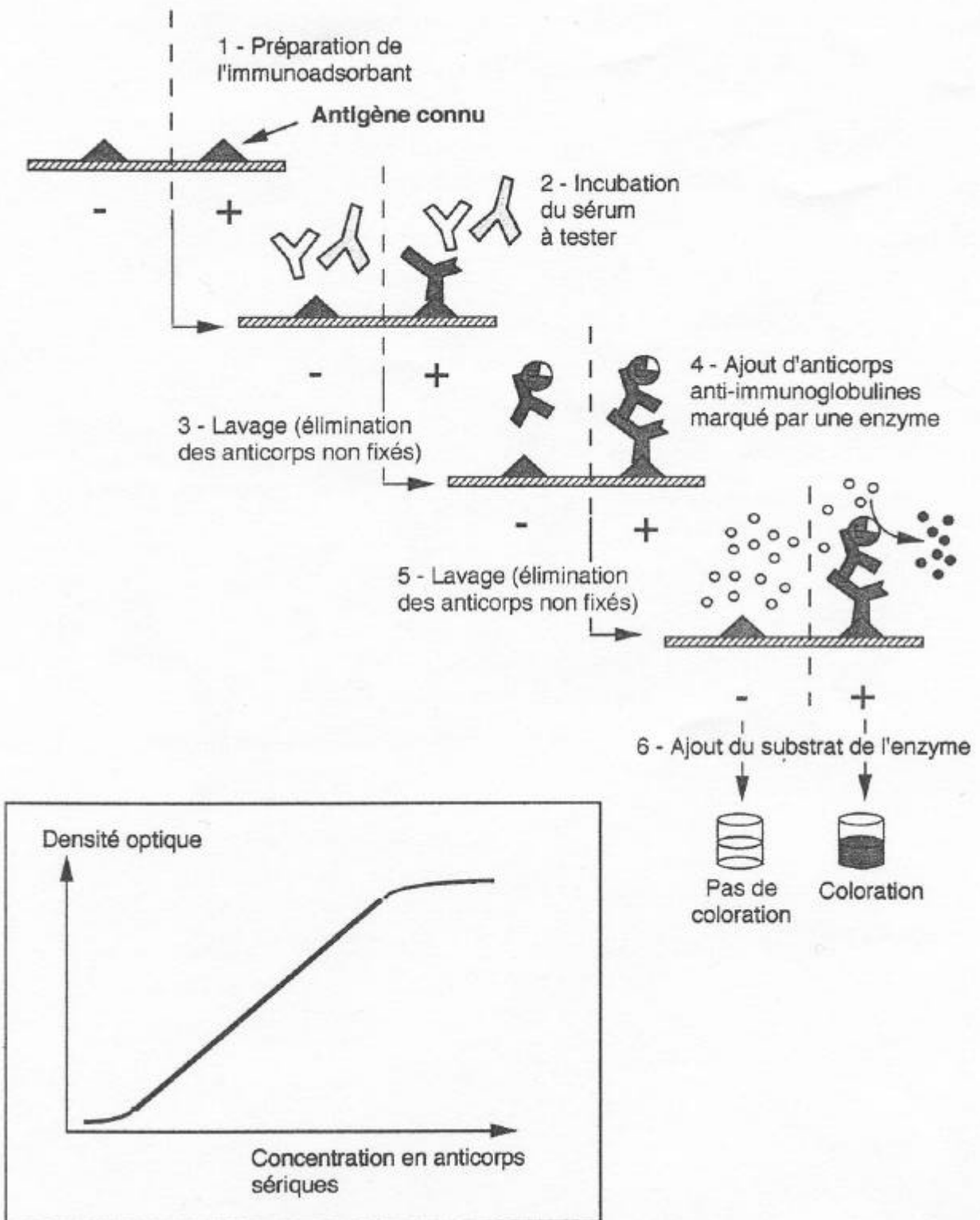
### **I.6. Méthode d'évaluation : le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).**

#### **I.6.1. Principe.**

Un antigène spécifique de l'anticorps à doser est fixé sur un support. Le sérum à tester est mis en contact avec cet antigène, puis rincé afin d'éliminer toute possibilité de réaction non-spécifique ; si ce sérum contenait des anticorps, ils seront fixés à l'antigène. Un anticorps secondaire spécifique de l'espèce animale étudiée et de l'isotype de l'anticorps primaire est alors ajouté. Cet anticorps est couplé à une enzyme capable de dégrader un substrat spécifique donnant une réaction colorée. Quand on ajoute enfin le substrat de cette enzyme, cela induit un changement de couleur du milieu uniquement si la molécule à doser était initialement présente. La réaction colorée est donc quantitative et la lecture se fait sous la forme d'une densité optique par un spectrophotomètre (Figure 8).

### I.6.2. Réalisation.

- La veille au soir, les 96 puits d'une microplaque ELISA (« Pro-bind », Falcon) sont tapissés par du virus NHEO semi-purifié dilué dans du PBS, à raison de 100  $\mu$ L par cupule. L'incubation se fait toute la nuit dans une étuve à CO<sub>2</sub>.
- Afin d'éliminer l'antigène non fixé, la plaque est rincée 3 fois en PBS, puis saturée par une solution de gélatine dans du PBS (15 mg/mL) à raison de 100  $\mu$ L par cupule. La plaque est incubée 1 heure à 37°C.
- La plaque est rincée 3 fois en PBS-0,1% Tween, puis les échantillons de sérum d'oie (anticorps primaires) à tester sont déposés. Des dilutions de demi en demi à partir de la dilution initiale au 1/20<sup>e</sup> sont effectuées en PBS-Tween, et l'incubation dure 1 heure à 37 °C.
- La plaque est rincée 4 fois en PBS-Tween de manière à éliminer les anticorps primaires non fixés spécifiquement aux antigènes, puis un anticorps secondaire anti-canard (KPL 05-25-06) couplé à de la phosphatase alcaline est déposé, toujours à raison de 100  $\mu$ L par cupule. Cet anticorps est aussi dilué dans du PBS-Tween. La plaque est incubée 1 heure à 37 °C.
- La plaque est rincée 4 fois en PBS-Tween plus une fois en PBS, et le substrat PNPP (Para NitroPhényl Phosphate) préparé dans du tampon diéthanolamine à pH 9,8 est déposé. La réaction se fait à température ambiante à l'abri de la lumière, puis elle est stoppée par ajout de soude 2 N à raison de 50  $\mu$ L par cupule.
- La lecture des plaques se fait au spectrophotomètre (DO = 405 nm).



**Figure 8 :** Principe de la technique ELISA.

## II. RESULTATS.

### II.1. Production de l'antigène viral.

#### II.1.1. Méthodes de quantification de l'antigène viral.

- La PCR quantitative est une méthode indirecte de quantification du virus. En effet, la technique de dilution limite utilisée habituellement est rendue impossible du fait de la cinétique de culture trop lente du GHPV, et du fait qu'il ne produise pas de plages de lyse cellulaire nettes.

Des aliquots de virus semi-purifié ont donc été quantifiés par PCR quantitative en temps réel, ce qui nous a permis de définir le nombre de génomes par millilitre de suspension virale.

- La mesure de la densité optique des aliquots de virus semi-purifié a été faite à deux longueurs d'ondes : 260 et 280 nm. Le rapport 260/280 se rapprochant de 1,2 indique la pureté de l'échantillon testé.

La mesure de la densité optique à 280 nm (longueur d'onde à laquelle on mesure les protéines) de cinq échantillons de virus testés en PCR quantitative (Tableau 3) a permis d'établir un calcul de corrélation entre la DO et la quantification PCR.

**Tableau 3** : Quantification PCR et densité optique.

Aliquot	DO à 280 nm (dilution au 1/20 <sup>e</sup> )	Quantification PCR (au 1/20 <sup>e</sup> )	Nombre de génomes par DO
<b>C 11.10.01</b>	0,149	2,2.10 <sup>9</sup> génome/mL	1,47.10 <sup>10</sup> génome/mL
<b>S 11.10.01</b>	1,422	7,6.10 <sup>10</sup>	5,34.10 <sup>10</sup>
<b>C 19.10.01</b>	0,498	2,3.10 <sup>10</sup>	4,61.10 <sup>10</sup>
<b>S 19.10.01</b>	6,205	1,7.10 <sup>11</sup>	2,74.10 <sup>10</sup>
<b>S/coussin 19.10.01</b>	0,113	1,2.10 <sup>9</sup>	1,06.10 <sup>10</sup>

En moyenne sur ces 5 mesures, 1 DO à 280 nm correspond donc à 3.10<sup>10</sup> génomes /mL au 1/20<sup>e</sup>.



Cette approximation sera utilisée par la suite pour éviter de recourir à la PCR quantitative pour quantifier l'antigène viral destiné à la réalisation de test ELISA. Cette méthode n'est utilisable que sur les échantillons de virus purifié.

## II.1.2. Optimisation des conditions de production.

Les tableaux 4, 5, et 6 présentent les résultats des différents paramètres testés : conditions de milieu, de température, le délai post-infection et les conditions de récupération du virus.

**Tableau 4 :** Conditions de milieu.

	<b>SVF</b>		
	<b>2 %</b>	<b>5 %</b>	<b>10 %</b>
<b>MEME</b>	8,1.10 <sup>9</sup> génome/mL	1,15.10 <sup>10</sup>	2,28.10 <sup>10</sup>
<b>DMEM</b>	4.10 <sup>10</sup>	4,92.10 <sup>10</sup>	4,97.10 <sup>10</sup>

**Tableau 5 :** Conditions de température et délai post-infection. Le milieu est fixé : DMEM 10% SVF.

	<b>Délai PI</b>		
	<b>6 jours</b>	<b>9 jours</b>	<b>10 jours</b>
<b>37,5 °C</b>	2,18.10 <sup>11</sup> génome/mL	4,15.10 <sup>11</sup>	4,44.10 <sup>11</sup>
<b>38,5 °C</b>	4,33.10 <sup>11</sup>	6,15.10 <sup>11</sup>	5,8.10 <sup>11</sup>

**Tableau 6 :** Conditions de récupération du virus.

<b>Jus de culture clarifié</b>	1,85.10 <sup>11</sup> génome/mL
<b>Surnageant de culture clarifié</b>	1,38.10 <sup>11</sup>
<b>Cellules + tampon TNE clarifiées</b>	3,06.10 <sup>10</sup>
<b>Cellules + tampon TNE-1% NP 40 clarifiées</b>	4,84.10 <sup>10</sup>

Ces tableaux montrent qu'il est préférable de cultiver le GHPV sur des cellules GKT en milieu DMEM avec 10% de SVF.

L'incubation en étuve à 38,5 °C est préférable car elle active la réplication du virus. On peut supposer qu'elle permet de se rapprocher au plus près de la température interne des Oiseaux, et le virus se réplique plus activement. L'effet cytopathogène induit par le virus est en général maximal au bout de 8 à 10 jours suivant les productions.

Pour ce qui est des conditions de récupération du virus ayant pour but la production de vaccin, la récupération du jus de culture total suivi d'une clarification semble être la méthode la plus efficace.

## **II.2. Préparation du candidat-vaccin.**

### **II.2.1. Inactivation à la $\beta$ -propiolactone.**

L'application du protocole d'inactivation de Ritchie aboutit à une inactivation totale du virus, montrée à la fois en immunofluorescence (Figure 9) et par PCR quantitative (résultat non montré).

### **II.2.2. Ajout de l'adjuvant.**

L'ajout d'hydroxyde d'aluminium a pour effet la formation d'une suspension relativement instable qu'il faut homogénéiser souvent en agitant le flacon. Au contraire, le Carbopol™ permet l'obtention d'un produit plus homogène, c'est en effet un gel de faible viscosité qui est facile d'utilisation à la seringue.

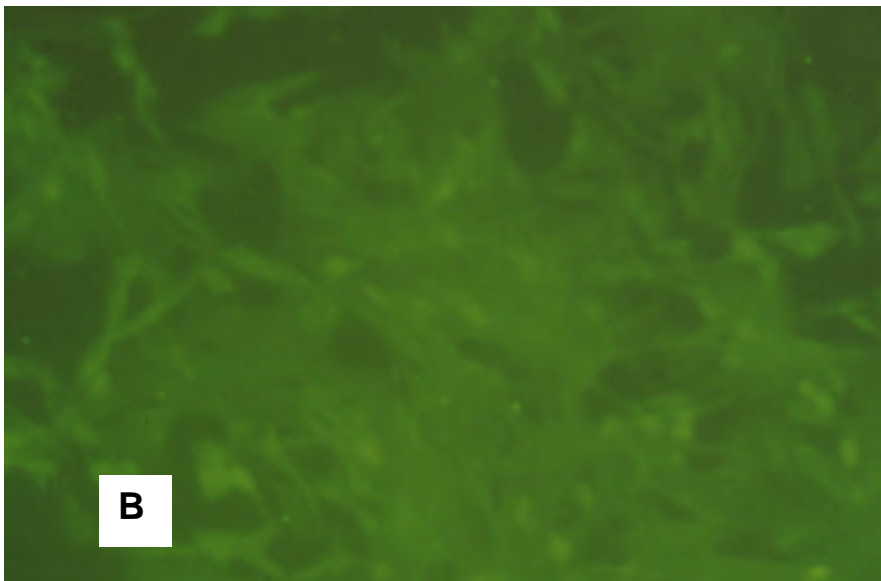
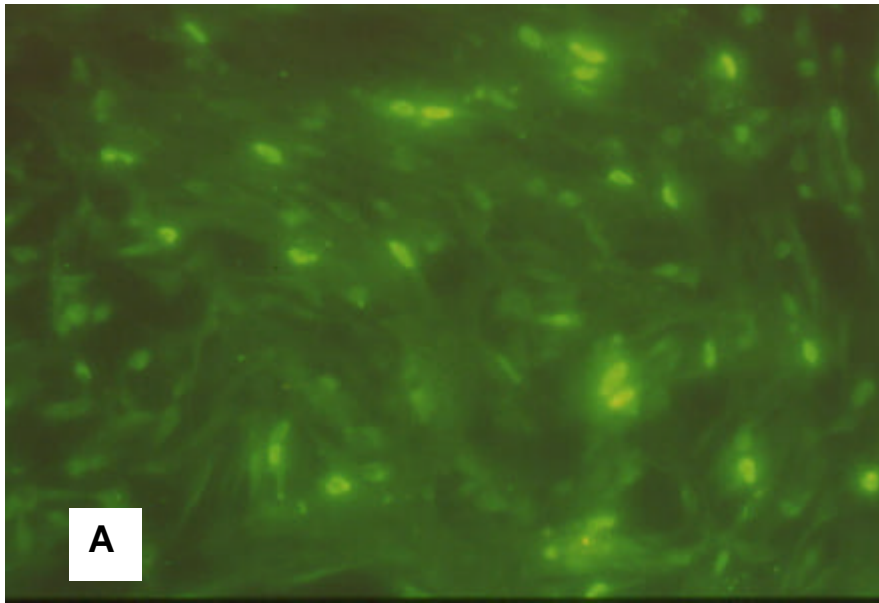
### **II.2.3. Doses vaccinales.**

Les doses finales flaconnées sont de 0,5 mL par animal. Elles contiennent suivant le candidat vaccin pour l'essai-dose  $10^9$ ,  $10^{10}$  ou  $10^{11}$  génomes par dose.

## **II.3. Mise au point d'un test sérologique ELISA.**

Il a fallu quantifier divers paramètres :

- La méthode de purification de l'antigène viral.



**Figure 9 :** Observation au microscope à immunofluorescence (grossissement x25) d'un tapis de cellules de rein d'oison (GKT), 48 heures après infection avec un inoculum de GHPV, avant inactivation (A), ou après inactivation à la  $\beta$ -propiolactone (B). Les antigènes viraux sont détectés dans le noyau des cellules infectées.

- La dilution de l'antigène.
- La dilution de l'anticorps secondaire.
- Le temps de révélation de la réaction colorée finale.

Il a aussi été nécessaire de constituer un mélange de sérums pouvant servir de témoins internes positifs et négatifs.

Des aliquots de virus purifié ont été testés en PCR quantitative : les résultats montrent que le surnageant de culture contient plus de virus que les tapis cellulaires, et il est en outre plus facile à récupérer. Le passage sur coussin de saccharose du virus obtenu après ultracentrifugation du surnageant entraîne par contre une perte de particules virales (Tableau 3). Les trois méthodes de purification de l'antigène ont ensuite été testées en ELISA : les résultats sont montrés dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Test de différentes procédures de préparation d'antigène, à partir de surnageants (S) ou de tapis cellulaires (C).

DO du « blanc moyen » = 0,060		<b>S 11.10.01</b> <b>1/500<sup>e</sup></b>	<b>S 19.10.01</b> <b>1/500<sup>e</sup></b>	<b>C 11.10.01</b> <b>1/200<sup>e</sup></b>	<b>C 19.10.01</b> <b>1/500<sup>e</sup></b>	<b>S/coussin</b> <b>1/200<sup>e</sup></b>
<b>Témoin positif</b>	<b>1/20<sup>e</sup></b>	0,527	0,466	0,243	0,289	0,208
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,368	0,303	0,168	0,206	0,166
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,214	0,135	0,099	0,122	0,111
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,123	0,091	0,062	0,079	0,059
<b>Témoin négatif</b>	<b>1/20<sup>e</sup></b>	0,042	0,013	0,039	0,050	0,030
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,035	0,008	0,043	0,036	0,022
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,047	0,007	0,035	0,025	0,029
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,058	0,005	0,019	0,015	0,014

Nous avons fixé le seuil de positivité à trois fois la valeur de la DO du sérum négatif au 1/20<sup>e</sup>.

Les rapports Positif / Seuil de positivité (P/S) montrent que les antigènes issus des surnageants sont plus purs que ceux issus des tapis cellulaires. De plus, le surnageant passé sur coussin de saccharose présente un rapport P/S beaucoup plus faible que le surnageant seul. Ces résultats ELISA confirment donc les résultats obtenus en PCR quantitative.

Nous récupérerons donc par la suite uniquement le surnageant de culture clarifié par centrifugation 15 minutes à 5000 g, et ultracentrifugé 2 heures à 35 000 rpm : c'est la méthode la plus simple en terme de manipulation et qui présente le meilleur compromis entre la pureté de l'antigène et son efficacité, à un moindre coût de production.

Le sérum utilisé comme témoin positif est constitué d'un pool de sérums d'oisons d'un jour naturellement immunisés, car issus de mères ayant subi un épisode de NHEO au cours de leur période d'élevage. Le sérum utilisé en tant que témoin négatif est quant à lui un pool de sérums d'oies du Nord, région indemne de NHEO (la DO moyenne de ces sérums est équivalente à la valeur du bruit de fond, voire plus faible).

Il a fallu tester en même temps à la fois la dilution de l'antigène et celle de l'anticorps secondaire. La première production de virus purifié a donc été testée sur une même plaque aux dilutions suivantes : 1/50<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>, 1/200<sup>e</sup>, 1/500<sup>e</sup> et 1/1000<sup>e</sup>. Deux plaques identiques au niveau des dilutions de l'antigène ont été réalisées, de manière à pouvoir tester l'anticorps secondaire anti-canard à deux dilutions : 1/100<sup>e</sup> et 1/400<sup>e</sup>.

Des résultats partiels de la plaque avec l'anticorps secondaire au 1/100<sup>e</sup> sont montrés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : Test de différentes dilutions de l'antigène et de l'anticorps secondaire.

		DO du « blanc moyen » = 0,082		Anticorps dilué 1/100 <sup>e</sup>		Anticorps dilué 1/400 <sup>e</sup>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif		
<b>Antigène dilué</b> <b>1/100<sup>e</sup></b>	<b>Sérum 1/20<sup>e</sup></b>	0,777	-0,001	0,233	0,031		
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,676	-0,007	0,168	0,022		
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,436	-0,020	0,127	0,022		
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,228	-0,017	0,085	0,019		
<b>Antigène dilué</b> <b>1/200<sup>e</sup></b>	<b>1/20<sup>e</sup></b>	0,524	-0,002	0,269	0,024		
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,575	-0,013	0,154	0,012		
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,358	-0,019	0,130	0,024		
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,222	-0,024	0,076	0,021		

Les résultats obtenus sur ces premières plaques montrent que l'anticorps secondaire dilué au 1/400<sup>e</sup> n'est pas utilisable car il baisse considérablement le niveau des DO obtenues et donc diminue le rapport P/S.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'antigène au 1/1000<sup>e</sup> est trop dilué et nivelle de la même façon les résultats. Les résultats de l'antigène au 1/500<sup>e</sup> ne sont pas interprétables suite certainement à un erreur de manipulation. L'antigène au 1/50<sup>e</sup> quant à lui donne des résultats corrects mais le rapport P/S est plus faible que pour les antigènes utilisés à des dilutions plus importantes, ce qui laisse à penser que les impuretés présentes augmentent aussi avec la concentration de l'antigène.

La réaction enzymatique avec le substrat de la première plaque a été stoppée au bout de 6 minutes, alors que celle de la deuxième a été poursuivie sur 12 minutes. Les résultats montrent que pour avoir le plus grand écart possible entre les valeurs positives et négatives, c'est-à-dire pour se situer à l'optimum de la réaction enzymatique, il faut stopper cette réaction au bout de 6 minutes.

Au vu des résultats précédents, nous avons donc décidé de tester l'anticorps secondaire dilué au 1/200<sup>e</sup> et de tester à nouveau les dilutions 1/200<sup>e</sup> et 1/500<sup>e</sup> pour l'antigène, afin de les valider. L'utilisation de l'anticorps secondaire au 1/200<sup>e</sup> serait en effet plus avantageuse qu'au 1/100<sup>e</sup> car moins coûteuse.

Le test de l'anticorps secondaire au 1/200<sup>e</sup> n'étant pas satisfaisant, les résultats ne sont pas montrés ici. A cette dilution, l'anticorps ne permet pas une bonne distinction entre les sérums, ceci pouvant être dû au fait que ce n'est pas un anticorps anti-oie mais un anti-canard, moins spécifique. Malgré le coût plus élevé, il nous faudra donc l'utiliser à la dilution 1/100<sup>e</sup>.

**Tableau 9** : Test de différentes dilutions (1/200<sup>e</sup> et 1/500<sup>e</sup>) de 2 préparations d'antigène.

		Antigène dilué 1/200 <sup>e</sup>		Atigène dilué 1/500 <sup>e</sup>	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
<b>Antigène du 11.10.01</b>	<b>Sérum 1/20<sup>e</sup></b>	0,490	0,065	0,503	0,063
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,333	0,065	0,388	0,081
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,227	0,075	0,274	0,073
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,135	0,065	0,171	0,084
<b>Antigène du 19.10.01</b>	<b>1/20<sup>e</sup></b>	0,391	0,015	0,446	0,034
	<b>1/40<sup>e</sup></b>	0,211	0,006	0,318	0,020
	<b>1/80<sup>e</sup></b>	0,131	-0,003	0,230	0,011
	<b>1/160<sup>e</sup></b>	0,063	0,006	0,128	0,010

L'antigène quant à lui sera finalement utilisé au 1/500<sup>e</sup>. En effet, cette dilution permet d'obtenir des résultats stables tout en nous autorisant un coût de production moins élevé que dans le cadre d'une utilisation au 1/200<sup>e</sup>.

**Au final, nous avons donc décidé d'utiliser l'antigène dilué au 1/500<sup>e</sup> et l'anticorps secondaire anti-canard au 1/100<sup>e</sup>. La réaction colorée est arrêtée au bout de 6 minutes. Tous les tests ELISA utilisés dans les expériences de validation du vaccin se feront dans ces conditions standardisées.**

#### **II.4. Validation du test ELISA.**

L'objectif de l'expérience « essai-dose » réalisée par Pappalardon (Pappalardo, 2002) était de vacciner plusieurs lots d'oies avec des doses croissantes d'antigène, afin de choisir la plus faible dose permettant d'obtenir une réponse sérologique satisfaisante. En conséquence, trois lots de 5 oies ont été constitués et vaccinés respectivement avec des doses de  $10^9$ ,  $10^{10}$  et  $10^{11}$  génomes/dose. Une série de 3 prises de sang a été réalisée à compter du jour de la première vaccination. La synthèse des résultats est présentée dans la figure 10. Il apparaît qu'une synthèse d'anticorps anti-NHEO n'est observée dès la première injection qu'à partir d'une dose vaccinale de  $10^{10}$  génomes/dose. Les oies vaccinées avec la dose «  $10^{11}$  » présentent une réponse plus importante après la première vaccination mais le titre ( $\log_2$ ) moyen obtenu à J41 est voisin de 7, quelle que soit la dose testée. D'autre part, les contraintes de volume à injecter ainsi que les coûts de production du virus nous ont fait arrêter la dose finale à  $10^{10}$  génomes par dose.

Les résultats présentés dans la figure 11 sont la synthèse de deux expériences réalisées dans des conditions identiques par Petitalardo (Pappalardo, 2002). Deux lots d'oies ont été vaccinés avec un vaccin adjuvé soit à l'hydroxyde d'aluminium, soit au Carbopol™. Les courbes montrent que la réponse sérologique obtenue est plus importante avec le vaccin adjuvé au Carbopol, et ce dès la première injection. L'écart des titres atteint  $2 \log_2$  à J 49.

Au final, le candidat vaccin se compose donc de  $10^{10}$  génomes par dose vaccinale. Le virus est inactivé à la  $\beta$ -propiolactone puis adjuvé au Carbopol™ à raison de 2 mg par dose. La dose injectée est de 0,5 mL, ce qui correspond à un volume standard en aviaire.

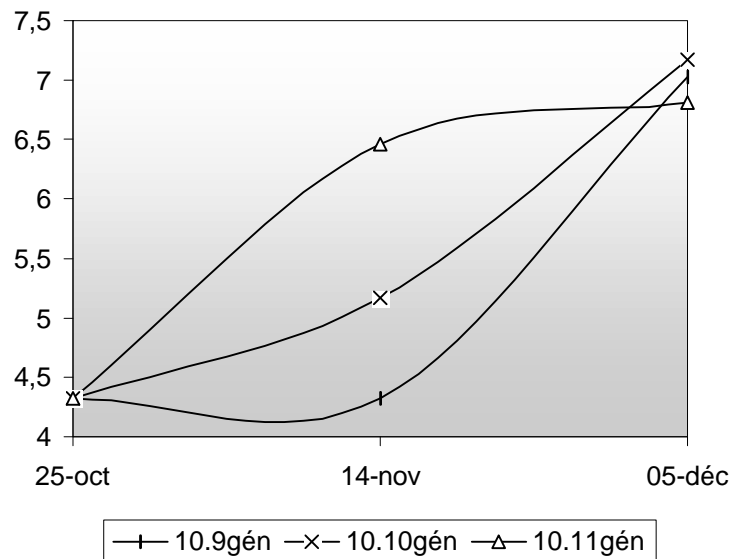


Figure 10 : Réponses sérologiques obtenues avec trois doses vaccinales.

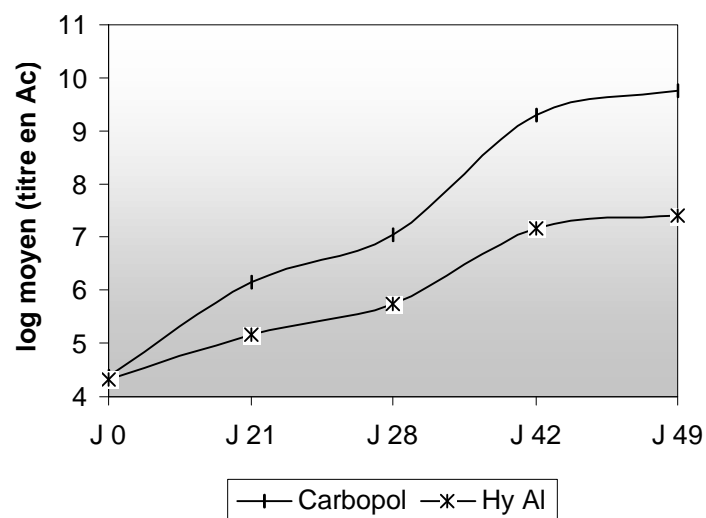


Figure 11 : Comparaison de la réponse sérologique obtenue avec deux adjuvants : Carbopol et hydroxyde d'aluminium.



### III. DISCUSSION.

Notre choix de départ était de développer un vaccin à agent inactivé contre la NHEO. Pour cela, il nous fallait réussir à standardiser le système de production du virus, ainsi que sa méthode de quantification. Par ailleurs, il fallait aussi développer une méthode fiable d'évaluation du vaccin obtenu.

Les conditions retenues finalement pour la culture cellulaire et virale sont assez standardisées, et nous obtenons en fait un titre stable d'au moins  $10^{11}$  génomes/mL. Cette stabilité nous évitera donc à terme de recourir à la quantification systématique de la production virale.

La technique de PCR quantitative que nous avons utilisée est en fait une méthode indirecte de quantification de l'antigène viral. En effet, la quantification du virus avant inactivation n'est pas réalisable par la technique de dilution-limite, du fait de la cinétique de culture trop lente du GHPV, et du fait de l'absence de plage de lyse nette. Nous quantifions donc les génomes viraux, ce qui est une approximation du titre viral. Cette approximation peut être considérée comme faite par excès : en effet, il peut exister des acides nucléiques non encapsidés au moment de la lyse de la cellule. De la même façon, on peut imaginer que l'approximation est faite par défaut : des capsides vides s'assemblent parfois, c'est un modèle connu chez les polyomavirus. Nous obtenons donc en fait une quantification relative qui nous permet d'établir un référentiel propre à notre système de culture, ceci si nous considérons que le rapport nombre de génomes / nombre de capsides reste constant.

Un des principaux choix à effectuer était celui de l'agent inactivant :  $\beta$ -propiolactone ou formol ? La  $\beta$ -propiolactone est un agent inactivant alkylant qui se fixe aux acides nucléiques et les dénature en réalisant des micro-coupures de l'ADN, ce qui est un avantage dans notre cas puisque le génome nu des polyomavirus présente un pouvoir infectieux (Shah, 1996). C'est pourquoi la  $\beta$ -propiolactone a été choisie de préférence au formol qui agit sur les protéines en les réticulant (Desmettre and Martinod, 1997). Nous ne pouvions pas prendre le risque que le formol dégrade ainsi les protéines de surface de la capsid, qui sont en fait les

antigènes vaccinaux. L'application de ce protocole aboutit à une inactivation totale du virus montrée à la fois en immunofluorescence et en PCR quantitative.

Il a ensuite fallu choisir un adjuvant. Historiquement, l'hydroxyde d'aluminium est un adjuvant très bien toléré, et de plus Ritchie l'avait utilisé pour la production du vaccin contre le BFDV. Le tout premier vaccin expérimental a donc été adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium. Ce n'est malheureusement pas un adjuvant optimal au niveau de la réponse immunitaire en anticorps chez les Oiseaux. Nous avons quand même fait ce choix par rapport à un adjuvant huileux qui aurait été plus efficace, mais qui présente une mauvaise innocuité ainsi qu'une réaction locale et générale, en particulier chez l'oie qui est très sensible par rapport aux autres Oiseaux.

Nous avons finalement fait un compromis entre efficacité et innocuité en choisissant un adjuvant aqueux de préférence à un adjuvant huileux, tout en trouvant un adjuvant plus efficace que l'hydroxyde d'aluminium : un polymère anionique, le Carbopol™ (Hilgers *et al.*, 1998 ; Mumford *et al.*, 1994). Cette efficacité n'est pourtant pas du même ordre que les adjuvants huileux de type « eau dans l'huile ».

L'avantage majeur de cet adjuvant est donc sa totale innocuité, montrée par les premiers essais cliniques réalisés : il n'y a aucune trace de réaction locale ou générale. De plus, cette innocuité par rapport aux adjuvants huileux est aussi valable pour l'utilisateur (on sait en effet que les injections accidentelles d'émulsions vaccinales sont redoutables). Quant à la réponse sérologique obtenue, on ne sait pas si elle est optimale car nous n'avons pour l'instant aucun élément de comparaison. Le recul de l'utilisation sur le terrain permettra d'évaluer son efficacité réelle.

La mise au point du test ELISA a suivi une démarche classique. Les titres en anticorps obtenus en ELISA sont le reflet de la réponse sérologique globale. Ils sont donc corrélés avec les titres en anticorps neutralisants. Ceci nous permet d'évaluer la réponse immunitaire, étant donné que la technique de séroneutralisation ne peut être mise en œuvre ici du fait de la difficulté de la culture du GHPV.

Le problème majeur rencontré a été le fait que l'anticorps secondaire est un anticorps anti-canard, car il n'existe aucun anticorps anti-oie sur le marché. Nous sommes donc pour l'instant tributaires d'un organisme qui a une situation de monopole au niveau de la distribution des anticorps anti-canard.

Cet anticorps présente du coup un problème d'affinité non optimale pour l'antigène. Ce manque d'affinité entraîne une diminution de la sensibilité du test ELISA, sensibilité qui était

déjà diminuée du fait d'un seuil de positivité élevé. En effet, ceci peut entraîner la non-détection des animaux faiblement positifs. Par contre, le test est très spécifique, car tous les animaux que nous trouvons positifs le sont effectivement. Etant donné que nous avons réalisé ce test afin de valider la production de vaccin, l'essentiel était donc de développer une bonne spécificité.

Il a aussi été difficile de trouver des sérums négatifs pouvant servir de témoins. En effet, les premiers sérums utilisés provenant de cheptels du Sud-Ouest *a priori* indemnes se sont révélés avoir une DO trop élevée pour être utilisables aux conditions que nous nous étions fixées. Il a finalement été décidé d'utiliser des sérums d'oies du Nord, région encore épargnée par les épisodes de NHEO.

Le test ELISA, s'il a été développé dans une problématique vaccinale, pourra trouver d'autres applications, notamment pour éclairer la physiopathologie de la maladie. Il sera par exemple intéressant de suivre les statuts sérologique et virologique des animaux porteurs sains.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le candidat-vaccin retenu est satisfaisant en terme de production et de sécurité (innocuité totale). On peut toutefois se demander si ce vaccin possède une immunogénicité optimale. En terme de dose vaccinale, la dose de  $10^{10}$  génomes semble être idéale. Un nouvel adjuvant, huileux notamment, pourrait être envisagé si nécessaire, au risque de diminuer l'innocuité. En pratique, cette possibilité sera envisagée uniquement si, dans les conditions normales d'utilisation en élevage, l'expérience montre que le vaccin n'est pas protecteur.

Le mode de production actuel est très lourd car il est basé sur la culture cellulaire. A plus long terme, l'objectif du groupe de virologie moléculaire de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse est de s'affranchir de la culture cellulaire du virus en grande quantité. Les espoirs reposent en particulier sur la production de protéines VP1 recombinantes s'associant en pseudo-particules ou VLP (Virus-Like Particles). Cette technique n'a pas été envisagée de prime abord car il est question de biotechnologie et donc d'une procédure européenne centralisée impossible à mettre en place pour un autovaccin tel que celui-ci. Cette technique pourrait cependant être utilisée pour l'obtention d'antigène pour le test ELISA. Cette approche présente de plus l'avantage de permettre l'association du vaccin à d'autres valences (VP1 chimères ou particules hétérologues), sur le modèle de ce qui a été fait pour d'autres virus proches.

D'autre part, l'absence d'outils propres à l'espèce cible, notamment au niveau de l'anticorps secondaire, est un problème qui peut être résolu. La production d'anticorps secondaires anti-oie peut être réalisée à l'échelle du laboratoire : elle peut être mise en place sur lapins ou sur chèvres. A partir de cette production, deux approches peuvent être envisagées :

- Soit l'anticorps secondaire est purifié et couplé à un chromophore (vraisemblablement une phosphatase-alcaline). Il est alors utilisable directement à la place de l'anticorps anti-canard actuel.
- Soit l'anticorps secondaire est utilisé sans marquage, et il faudra alors rajouter un troisième anticorps anti espèce (lapin ou chèvre) couplé qui réagira avec le substrat.

Cette dernière technique présente l'inconvénient de rajouter une étape supplémentaire à la réalisation du test ELISA, ce qui peut entraîner un problème de manque de spécificité, ainsi qu'une augmentation du bruit de fond.

Ce travail a été l'occasion de constater combien les connaissances sur l'immunologie des Palmipèdes étaient minces. L'immunité à médiation cellulaire notamment est très mal connue, et parmi tous les moyens existant pour en mesurer l'efficacité, comme l'évaluation de l'activation des lymphocytes ou de l'expression des cytokines, aucun n'est disponible chez l'Oie. Sans ces outils de travail, il devient très difficile d'apprécier l'efficacité d'un vaccin : sur ce plan, tout reste à faire.

Par conséquent, si le but premier de ce travail était d'aboutir à un outil permettant de contrôler concrètement une maladie majeure chez l'oie, au delà de cet objectif pratique, il pourrait susciter des travaux plus fondamentaux sur l'immunologie des Palmipèdes.

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

<a href="#"><u>Figure 1 : Comparaison du système Prêt A Gaver (PAG) et du système traditionnel.</u></a>	6
<a href="#"><u>Figure 2 : Signes nerveux (pédalage, opisthotonos) observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO (8 jours post-inoculation).</u></a>	11
<a href="#"><u>Figure 3 : Ascite et œdème gélatineux observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO.</u></a>	11
<a href="#"><u>Figure 4 : Entérite hémorragique avec foyers de nécrose observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO.</u></a>	11
<a href="#"><u>Figure 5 : Particules virales nues de 45 nm de diamètre (échelle=100 nm).</u></a>	14
<a href="#"><u>Figure 6 : Arbre phylogénétique fondé sur la séquence nucléotidique de la VP1.</u></a>	15
<a href="#"><u>Figure 7 : Organisation simplifiée du génome du GHPV.</u></a>	18
<a href="#"><u>Figure 8 : Principe de la technique ELISA.</u></a>	39
<a href="#"><u>Figure 9 : Observation au microscope à immunofluorescence (grossissement x25) d'un tapis de cellules de rein d'oison (GKT).</u></a>	43
<a href="#"><u>Figure 10 : Réponses sérologiques obtenues avec trois doses vaccinales.</u></a>	48
<a href="#"><u>Figure 11 : Comparaison de la réponse sérologique obtenue avec deux adjuvants : Carbopol et hydroxyde d'aluminium.</u></a>	48
<a href="#"><u>Tableau 1 : Comparaison de la séquence d'acides aminés de la protéine VP1 du GHPV et de 7 autres polyomavirus.</u></a>	15
<a href="#"><u>Tableau 2 : Les différentes espèces de polyomavirus.</u></a>	17
<a href="#"><u>Tableau 3 : Quantification PCR et densité optique.</u></a>	40
<a href="#"><u>Tableau 4 : Conditions de milieu.</u></a>	41
<a href="#"><u>Tableau 5 : Conditions de température et délai post-infection.</u></a>	41
<a href="#"><u>Tableau 6 : Conditions de récupération du virus.</u></a>	41
<a href="#"><u>Tableau 7 : Test de différentes procédures de préparation d'antigène, à partir de surnageants (S) ou de tapis cellulaires (C).</u></a>	44
<a href="#"><u>Tableau 8 : Test de différentes dilutions de l'antigène et de l'anticorps secondaire.</u></a>	45
<a href="#"><u>Tableau 9 : Test de différentes dilutions (1/200<sup>e</sup> et 1/500<sup>e</sup>) de 2 préparations d'antigène.</u></a>	46

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Bernath, S., Horvath, E., Kovacs, A., Nagy, E., Dobos-Kovacs, M., Szalai, F., and Farsang, A. (2001) Etiology and epidemiological significance of the hemorrhagic nephritis and enteritis of geese. *Magyar Allatorvosok Lapja* **123**: 522-525.
- Bernath, S., Szalai, F. (1970) Investigations for clearing the etiology of the disease appeared among goslings in 1969. *Magyar Allatorvosok Lapja* **25**: 531-536.
- Borne, P.M., Comte, S. (2001) Vaccines and vaccination in poultry production. CEVA santé animale (ed).
- Bozeman, L.H., Davis, R.B., Gaudry, D., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., and Dykstra, M.J. (1981) Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.* **25**: 972-980.
- Desmettre, Ph., Martinod, S. (1997) Research and development. *In* Veterinary vaccinology. Pastoret, P.-P., Blancou, J., Vannier, P., and Verschuere, C. (eds). Elsevier science, pp. 175-194.
- Dubois, L. (2002) Isolement et identification du polyomavirus agent de la néphrite hémorragique entérite de l'oie (NHEO). Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.
- Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K.D., Kaup, F.J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T., and Luke, W. (1999) Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* **73**: 4465-4469.
- Guerin, J.L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C., and Pingret, J.L. (2000) A novel polyomavirus (*Goose hemorrhagic polyomavirus*) is the agent of Hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *J. Virol.* **74**: 4523-4529.
- Guerin, J.L., Pingret, J.L., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C., and Sans, P. (1999) La Néphrite Hémorragique-Entérite de l'Oison (N.H.E.O.). *Bulletin des GTV* **2**: 9-10.
- Higgins, D.A. (1996) Comparative immunology of avian species. *In* Poultry Immunology. Davidson, T.F., Morris, T.R., and Payne, L.N. (eds). Carfax, Abingdon: pp. 149-205.
- Hilgers, L.A., Nicolas, I., Lejeune, G., Dewil, E., Strebelle, M., and Boon, B. (1998) Alkyl-esters of polyacrylic acid as vaccine adjuvants. *Vaccine* **16**: 1575-1581.
- Kisary, J. (1993) Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese. *In* Virus infections of birds. Mc Ferran, J.-B., Mc Nulty, M.S. (eds). London: Elsevier editions, pp. 513-514.
- Léon, O. (2002) Epidémiologie descriptive de la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO). Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.

- Liu, S.S., Higgins, D.A. (1990) Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **97B**: 637-644.
- Miksch, K., Grossmann, E., Köhler, K., and Johne, R. (2002) [Detection of *Goose haemorrhagic polyomavirus* (GHPV) in flocks with haemorrhagic nephritis and enteritis of geese in Southern Germany]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **115**: 390-394.
- Moser, J.M., Luckacher, A.E. (2001) Immunity to polyomavirus infection and tumorigenesis. *Viral Immunol.* **14**: 199-216.
- Muller, H., Nitschke, R. (1986) A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **175**: 1-13.
- Mumford, J.A., Wilson, H., Hannant, D., and Jessett, D.M. (1994) Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol. Infect.* **112**: 421-437.
- Pappalardo, M. (2002) Evaluation de l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité d'un vaccin inactivé contre la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie. Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.
- Phalen, D.N. Avian polyomavirus: my thoughts. (21-9-2000) In : <http://www.crystal-parrot.com/polyom.html> .
- Phalen, D.N., Wilson, V.G., Gaskin, J.M., Derr, J.N., and Graham, D.L. (1999) Genetic diversity in twenty variants of the avian polyomavirus. *Avian Dis.* **43**: 207-218.
- Ritchie, B.W. (1991) Avian polyomavirus: an overview. *J. Am. Avian Vet.* **3**: 147-153.
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Latimer, K.S., Pritchard, N., Campagnoli, R.P., and Lukert, P.D. (1996) An inactivated avian polyomavirus vaccine is safe and immunogenic in various Psittaciformes. *Vaccine* **14**: 1103-1107.
- Ritchie, B.W., Pritchard, N., Pesti, D., Niagro, F.D., Latimer, K.S., and Lukert, P.D. (1993) Susceptibility of avian polyomavirus to inactivation. *J. Assoc. Avian Vet.* **7**: 193-195.
- Rodgers, R.E., Chang, D., Cai, X., and Consigli, R.A. (1994) Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *J. Virol.* **68**: 3386-3390.
- Sans, P. (1992) Contribution à l'étude de la maladie des jeunes oies. Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.
- Schettler, C.H. (1977) Détection en France de la néphrite hémorragique et entérite de l'oie. *Rec. Med. Vet.* **153**: 353-355.
- Schettler, C.H. (1980) [Clinical aspect and pathology of hemorrhagic nephritis and enteritis in geese]. *Tierärztl. Prax.* **8**: 313-320.
- Shah, K.V. (1996) Polyomaviruses. In *Fields Virology Third Edition*. Fields, B.N.e.al. (ed). Philadelphia: Lippincott-Ravett Publishers, pp. 2027-2043.



Shah, K.V. (1998) Polyomavirus, infection and immunity. *In* Encyclopedia of immunology. Delves, P.J., Roitt, I.M. (eds). Harcourt Brace & Company Publishers, pp. 1988-1990.

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., and Bishop, D.H.L. (2000) Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic press.

Vuillaume, A. La maladie des jeunes oies destinées au gavage : le point sur l'avancement des travaux de recherche. (1993) *In* : Premières journées de la recherche sur les Palmipèdes à foie gras. Bordeaux. 141-150.

Warr, G.W., Magor, K.E., and Higgins, D.A. (1995) Ig Y: clues to the origins of moderns antibodies. *Immunology today* **16**: 392-398.

zur Hausen H., Gissmann, L. (1979) Lymphotropic papovaviruses isolated from African green monkey and human cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **167**: 137-153.

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES