

TABLE DES MATIERES

| | |
|-------------------|---|
| INTRODUCTION..... | 3 |
|-------------------|---|

1^{ère} partie

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|-----------|
| I. LE CONTEXTE DE LA PRODUCTION D'OIES A GAVER | 5 |
| I.1. CONTEXTE ECONOMIQUE | 5 |
| I.2. ORGANISATION DE LA FILIERE ET ITINERAIRES TECHNIQUES..... | 5 |
| II. LA NHEO : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 9 |
| II.1. HISTORIQUE ET REPARTITION DE LA MALADIE | 9 |
| II.2. SYMPTOMES ET LESIONS | 9 |
| II.2.1. <i>Symptomatologie</i> | 9 |
| II.2.2. <i>Tableau lésionnel</i> | 10 |
| II.3. EPIDEMIOLOGIE | 12 |
| II.3.1. <i>Épidémiologie descriptive</i> | 12 |
| II.3.2. <i>Epidémiologie analytique</i> | 12 |
| II.4. ETIOLOGIE : LE GOOSE HEMORRHAGIC POLYOMAVIRUS (GHPV) | 13 |
| II.4.1 <i>La découverte du virus</i> | 13 |
| II.4.2. <i>Les polyomavirus</i> | 15 |
| II.4.3. <i>Génétique virale</i> | 18 |
| II.4.4. <i>Cycle de réplication virale</i> | 19 |
| II.4.5. <i>Particularités des deux polyomavirus aviaires, le BFDV et le GHPV</i> | 20 |
| III. BASES RATIONNELLES DE LA VACCINATION CONTRE LA NHEO | 21 |
| III.1. PRINCIPES EN IMMUNOLOGIE ET VACCINOLOGIE AVIAIRES..... | 21 |
| III.1.1. <i>L'immunologie des palmipèdes, cette inconnue</i> | 21 |
| III.1.2. <i>Les types de vaccins utilisables en aviculture</i> | 23 |
| III.1.3. <i>modes d'administration des vaccins aviaires</i> | 24 |
| III.2. VACCINS ET POLYOMAVIRUS..... | 25 |
| III.2.1. <i>polyomavirus et immunité</i> | 25 |
| III.2.2. <i>le vaccin BFDV, premier vaccin contre un polyomavirus</i> :..... | 26 |
| III.2.3. <i>Le candidat vaccin et son évaluation</i> :..... | 28 |

ETUDE EXPERIMENTALE

| | |
|--|-----------|
| I. MATERIEL ET METHODES | 32 |
| I.1. PREPARATION D'UN VACCIN INACTIVE CONTRE LE GHPV | 32 |
| I.1.1. <i>Production du virus</i> | 32 |
| I.1.2. <i>Protocole d'inactivation</i> | 32 |
| I.1.3. <i>Ajout de l'adjuvant</i> | 32 |
| I.1.4. <i>Doses vaccinales utilisées</i> | 33 |
| I.2. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX SUR LES ANIMAUX | 33 |
| I.2.1. <i>Essai de détermination de la dose vaccinale</i> | 33 |
| I.2.2. <i>Vaccination de jeunes oies en croissance et suivi sérologique</i> | 33 |
| I.2.3. <i>Vaccination d'oies reproductrices et suivi sérologique</i> | 34 |
| I.2.4. <i>Suivi sérologique sur oisons d'un jour issus de reproductrices vaccinées</i> | 34 |
| I.2.5. <i>Epreuve virulente sur oisons d'un jour issus de reproductrices vaccinées</i> | 35 |
| I.3. RECHERCHE DE L'ADN DU GHPV PAR PCR | 35 |
| I.4. DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-GHPV PAR TECHNIQUE ELISA | 37 |
| I.4.1. <i>Principe</i> | 37 |
| I.4.2. <i>Réalisation</i> | 38 |
| I.4.3. <i>Cas particulier des anticorps vitellins</i> | 39 |
| | |
| II. RESULTATS | 40 |
| II.1. INNOCUITE DU VACCIN INACTIVE ET ADJUVE | 40 |
| II.2. DETERMINATION DE LA DOSE VACCINALE | 40 |
| II.2.1. <i>Doses vaccinales testées</i> | 40 |
| II.2.2. <i>Suivi sérologique des oies vaccinées</i> | 40 |
| II.3. VACCINATION D'OISONS EN CROISSANCE | 42 |
| II.4. VACCINATION D'OIES REPRODUCTRICES..... | 43 |
| II.5. MESURE DU TITRE EN ANTICORPS SUR DES ŒUFS D'OIES VACCINEES..... | 44 |
| II.6. SUIVI SEROLOGIQUE SUR DES OISONS ISSUS D'OIES VACCINEES | 45 |
| II.7. EPREUVE VIRULENTE SUR OISONS ISSUS D'OIES VACCINEES..... | 46 |
| | |
| III. DISCUSSION..... | 47 |
| | |
| CONCLUSION - PERSPECTIVES | 51 |
| | |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS..... | 53 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 54 |

INTRODUCTION

La NHEO (Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oison), 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 (Comité Interprofessionnel des palmipèdes à Foie Gras), l'OFIVAL (Office Interprofessionnel des Viandes, de l'Elevage et de l'Aviculture), vétérinaires et 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 Vétérinaire de Toulouse, et conduit à l'isolement et l'identification du virus responsable, le GHPV (Guérin *et al.*, 2000 ; Dubois, 2002).

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 est alors mis en place à l'Ecole Vétérinaire et un candidat-vaccin inactivé et adjuvé est proposé (Claverys, 2002). En mettant en œuvre plusieurs essais de vaccination en laboratoire et dans les conditions d'élevage, nous avons pu évaluer l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de ce vaccin.

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 l'évaluation du candidat-vaccin. Nous validerons l'innocuité et l'immunogénicité de ce vaccin, ainsi que l'efficacité du transfert d'anticorps de l'oie reproductrice à l'oison de 1 jour *via* le vitellus de l'œuf. Nous envisagerons enfin la protection conférée à l'oison par ces anticorps d'origine maternelle.

1^{ère} 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 NHEO (Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oison), 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 »**, 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 Prêt A Gaver (PAG).

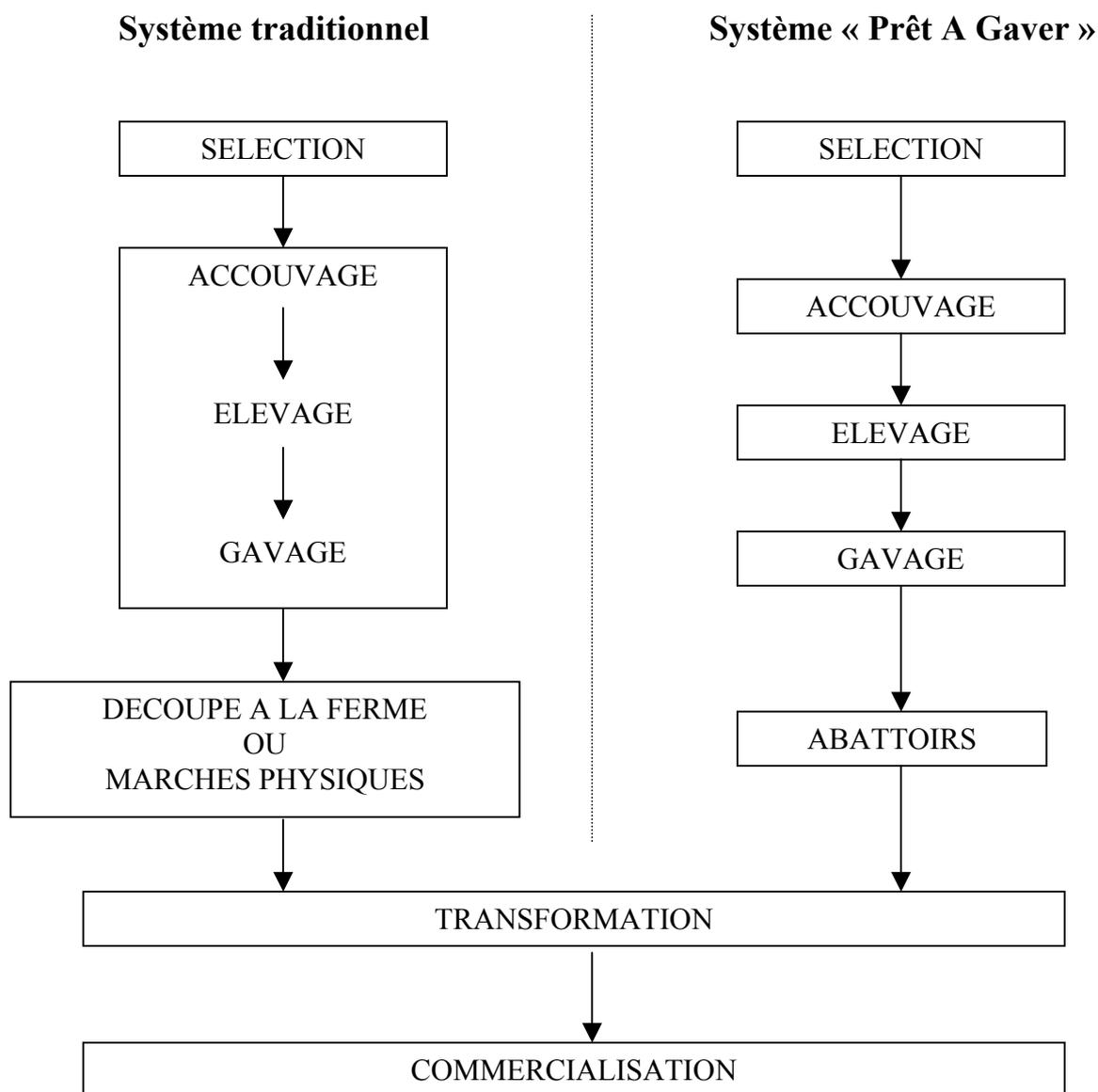


Figure 1 : comparaison du système Prêt A Gaver (PAG) et du système traditionnel

Le système traditionnel encore représenté dans le Sud-Ouest tend à disparaître au profit du système « Prêt-à-Gaver ». 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 « prêt 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'ARTIGUERES, 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 « Prêt-à-Gaver » 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 est 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^{ème} semaine d'élevage.

- Gavage

Le gavage de l'oie est manifestement beaucoup plus contraignant et plus délicat que pour le 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 Szalai, 1970 ; Bernath *et al.*, 2001). 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 et 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. (Guérin *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 (Guérin *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^{ème} 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 (Schettler, 1977; Sans, 1992 ; Kisary, 1993). 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 l'intervention d'un agent infectieux de nature virale comme agent étiologique de la NHEO (Bernath *et al.*, 1970 ; Schettler, 1977 ; Sans, 1992 ; Vuillaume, 1993). Guérin *et al.* (2000) ont reproduit la maladie expérimentalement en inoculant à des oisons de un jour un broyât 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 des 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 45-50 nm de diamètre, peu denses et non enveloppées, évoquant un virus de type "papova-like", ont ainsi été

observées (Fig. 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 (fig. 6) déduit de l'analyse de la séquence de VP1 montre que le polyomavirus impliqué est original, et 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.

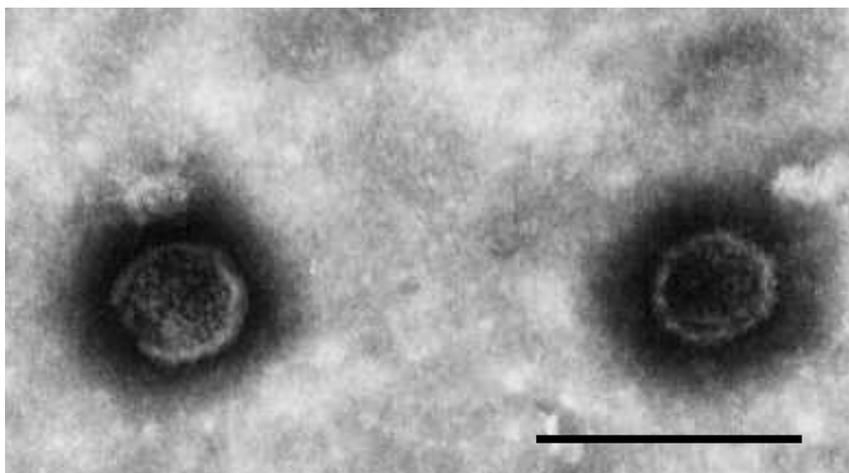


Figure 5 : Particules virales nues de 45 nm de diamètre (échelle=100 nm). Fraction purifiée par gradient de saccharose en ultra-centrifugation isopycnique, observée au microscope électronique à transmission.

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* (Psittacidés 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 |

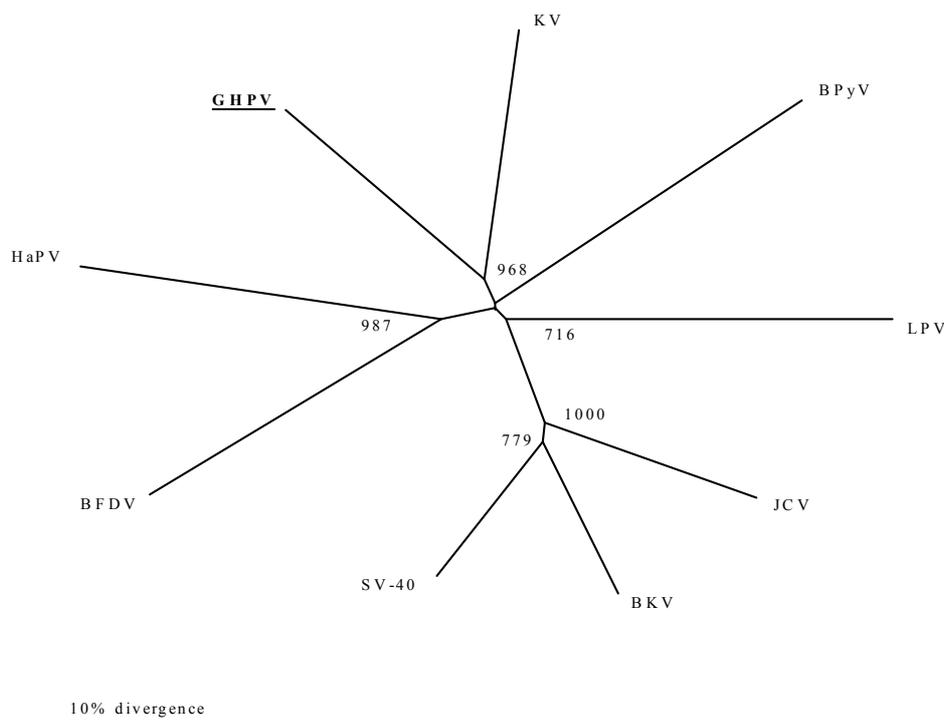


Figure 6 : Arbre phylogénétique fondé sur la séquence nucléotidique de la VP1. L'arbre a été construit en utilisant la méthode des plus proches voisins. Les nombres aux intersections traduisent la fiabilité de l'embranchement : plus ce nombre est proche de 1000, plus l'embranchement est fiable. Légende : 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 5kpb 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 principale protéine VP1 est organisée en 72 pentamères, chacun étant associé à une protéine VP2 ou une protéine VP3. Les 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 (Rodgers *et al.*, 1994 ; Goldmann *et al.*, 1999).

- Taxonomie

Historiquement, les polyomavirus faisaient partie de la sous-famille des *Polyomavirinae*, qui constituait, avec la sous famille de *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, 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).

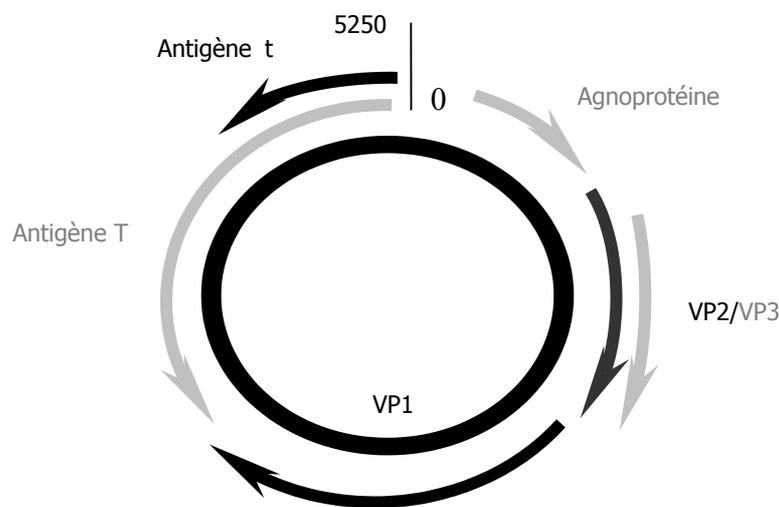


Figure 7 : Organisation simplifiée du génome du GHPV (Pingret et Guérin, résultats non publiés). L'antigène t et l'antigène T sont des protéines fonctionnelles précoces exprimées dans les premières phases du cycle de réplication, permettant la synthèse des protéines structurales tardives VP1, VP2 et 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 et 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, 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 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 et en particulier le 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 lombosacrés, 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^{ème} domaine (V_H , C ν 1 à C ν 4), contre 4 domaines pour les IgG (V_H , C γ 1 à C γ 3). Chez le canard, les IgY peuvent être purifiées sous une forme complète ou sous la forme déléetée de l'extrémité Fc (domaines C ν 3 et C ν 4) : les IgY(Δ Fc). Cette dernière forme semble 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 Δ 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 Δ 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 efficiente que lors de la réponse immunitaire active (Liu et Higgins, 1990).

La réponse immune 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 et 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 sécrétaires) 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 ce fait la mise en place d'une protection mucosale, due principalement à une immunité à médiation cellulaire et à la synthèse d'IgA sécrétoires. 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 Ig M : ces Ig 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 γ (IFN- γ) 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 et Lukacher, 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 LT_{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 ce virus 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 de 1 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 de 1 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^{ème} partie :

ETUDE EXPERIMENTALE

Après l'identification et la caractérisation 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, un vaccin inactivé et adjuvé a été préparé à partir d'extraits de cellules de reins d'oisons infectées. Notre travail de thèse a alors consisté à évaluer dans sa globalité l'efficacité de ce vaccin. Plus précisément notre but était de s'assurer :

- de l'innocuité de la préparation vaccinale, en vérifiant tout au long des manipulations l'éventuelle apparition de lésions locales au point d'injection, la dégradation de l'état général des animaux ou de leurs performances zootechniques.
- de son immunogénicité, soit sa capacité à induire chez l'espèce cible une production significative d'anticorps anti-GHPV.
- de son efficacité *sensu stricto*, soit sa capacité à prévenir l'infection chez des animaux vaccinés.

Nous avons été amené à tester le candidat-vaccin dans deux contextes différents, relatifs aux deux stratégies de vaccination, à savoir :

- l'immunisation passive de l'oison en début de vie, grâce à la vaccination des oies reproductrices et au transfert d'anticorps maternels *via* le vitellus.
- L'immunisation active de l'oison en le vaccinant directement dès l'âge de 2 semaines.

Une fois les objectifs bien définis, nous avons dû mettre en place des protocoles d'expérimentation adaptés à la fois à l'espèce cible et au virus étudié. Nous avons alors été confrontés à deux contraintes similaires, à savoir le manque d'informations et de travaux de recherche en vaccinologie disponibles sur l'oie comme sur les polyomavirus. A l'heure actuelle, le seul vaccin utilisé chez l'oie reproductrice afin de protéger passivement les oisons à leur naissance est un vaccin atténué contre le parvovirus de la maladie de Derszy (PalmivaxND). Bien que datant de 1978, l'évaluation de ce vaccin nous a fourni les bases de la mise en place des essais en élevage et en animalerie (Kisary *et al.*, 1978). Les travaux de Ritchie sur le GHPV ont, quant à eux, donné des indications précieuses sur l'ordre de grandeur de la dose vaccinale, comme sur les tests sérologiques et virologiques les plus appropriés (Ritchie *et al.* 1996).

Sur la base de ces informations, nous avons finalement opté pour un projet comprenant cinq parties :

- un essai préliminaire ayant pour but de déterminer une dose antigénique optimale.

- Un essai de vaccination d'oisons en croissance dans les conditions d'élevage comportant un suivi sérologique afin d'évaluer l'immunogénicité du candidat-vaccin.
- Un essai de vaccination d'oies reproductrices accompagné d'un suivi sérologique et du titrage des Anticorps anti-GHPV dans le vitellus d'œufs pondus par les oies.
- Cet essai sera complété par un suivi sérologique des oisons de 1 jour issus de la ponte des reproductrices vaccinées et l'étude de la décroissance du titre des anticorps d'origine maternelle.
- Enfin, une épreuve virulente sera menée sur des oisons de 1 jour issus d'oies vaccinées et sur des oisons témoins afin de tester la protection procurée par la vaccination.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Préparation d'un vaccin inactivé contre le GHPV

I.1.1. Production du virus

Un vaccin inactivé et adjuvé a été préparé à partir d'extraits de cellules de rein d'oison infectées : des cellules dérivées d'un rein d'oison et entretenues en milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal (Roche) sont infectées avec un inoculum de référence de GHPV. Sous 5 à 7 jours, lorsque l'ensemble du tapis a été lysé, le milieu est récolté et clarifié par centrifugation à basse vitesse (5min x 1500 rpm). Le virus est titré avant inactivation par quantification des génomes viraux en PCR quantitative.

I.1.2. Protocole d'inactivation

L'inactivation est réalisée par incubation à température ambiante pendant 12 heures avec 0,3% final de β -propiolactone (Sigma), puis neutralisation par 40 mM de thiosulfate de sodium, selon un protocole établi par Ritchie (Ritchie *et al.*, 1996). L'inactivation est vérifiée par inoculation d'un tapis de cellules de reins d'oison et détection des antigènes viraux par immunofluorescence, 48h post-infection (Guérin *et al.*, 2000).

I.1.3. Ajout de l'adjuvant

L'adjuvant est ajouté avant administration du vaccin : dans le cadre de « l'essai-dose », l'hydroxyde d'aluminium a été utilisé à la dose de 12,5 mg/ml final (Alhydrogel 2%™, Superfos). Le candidat vaccin testé dans le cadre des essais sur les oisons en croissance et les reproductrices a été adjuvé avec un polymère Carbopol™ (Noveon Pharma) à hauteur de 2mg par dose vaccinale.

I.1.4. Doses vaccinales utilisées

Dans le cadre de « l'essai-dose », trois aliquots de vaccin de concentration en virus croissante sont préparés à partir d'une solution mère. Les concentrations obtenues sont respectivement de $2 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^{10}$ et $2 \cdot 10^{11}$ génomes/ml, afin d'obtenir un volume injectable de 500 μ l correspondant respectivement à 10^9 , 10^{10} et 10^{11} génomes par dose. Dans les essais ultérieurs de vaccination, la dose retenue est de 10^{10} génomes pour une dose de 500 μ l, ce qui équivaut à une solution vaccinale titrant à $2 \cdot 10^{10}$ génomes/ml.

I.2. Protocoles expérimentaux sur les animaux

I.2.1. Essai de détermination de la dose vaccinale

20 oisons conventionnels sont livrés par le couvoir à l'âge de 1 jour et logés sous lampe chauffante, avec aliment de démarrage et eau à volonté. Des écouvillons cloacaux sont réalisés le jour même pour vérifier le statut viral des animaux et chaque oison est identifié individuellement par fixation d'une bague numérotée à l'aile. Quatre lots de 5 oisons sont constitués, les animaux identifiés n'étant pas séparés physiquement. Le vaccin inactivé utilisé est adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium. Trois lots sont vaccinés à J21 puis J41 avec des doses vaccinales de 10^9 , 10^{10} et 10^{11} génomes / dose, respectivement. Le vaccin est administré individuellement, par injection sous-cutanée d'une dose de 500 μ l à la base du cou. Le quatrième lot fait office de témoin. Une éventuelle réaction locale au point d'injection est recherchée à J41 et J62 et l'état général des animaux est surveillé dans les jours qui suivent chaque vaccination. Une prise de sang et un écouvillonnage cloacal est pratiqué sur chaque oison à J21, J41 et J62.

I.2.2. Vaccination de jeunes oies en croissance et suivi sérologique

650 oisons sont vaccinés à J0 à l'âge de deux semaines avec un vaccin NHEO inactivé adjuvé par du CarbopolTM. Le vaccin est administré individuellement par injection sous-cutanée d'une dose de 500 μ l soit 10^{10} génomes. Parmi eux, 20 oisons témoins sont bagués et non vaccinés. Les animaux reçoivent une injection de rappel à J28 et l'absence de réaction locale au point d'injection est vérifiée. Le comportement des animaux, leur consommation d'aliment sont surveillés tout au long de l'essai. Des prises de sang sont réalisées au hasard sur 15 oisons

vaccinés et 15 oisons témoins à J0, J28, J49 et J89. Elles s'accompagnent d'écouvillons cloacaux à J0 et J49.

Les essais de vaccination sont menés sur des oies conventionnelles et sont réalisés dans les conditions d'élevage proche de celles rencontrées sur le terrain.

I.2.3. Vaccination d'oies reproductrices et suivi sérologique

300 oies femelles futures reproductrices sont vaccinées quelques semaines avant leur première entrée en ponte, à J0 et J25, avec un vaccin NHEO inactivé adjuvé par du CarbopolTM. Le vaccin est administré individuellement par injection sous-cutanée à la base du cou d'une dose de 500 µl, soit 10^{10} génomes. L'absence de réaction locale au point d'injection est vérifiée. Le comportement des animaux, leur consommation d'aliment et l'évolution et la qualité de leur ponte sont surveillés tout au long de l'essai. 10 femelles témoins sont baguées et non vaccinées. Aucun mâle - environ 1 animal sur 4 - n'est vacciné : les 10 oies baguées et les mâles constituent donc le groupe témoin. Des prises de sang sont réalisées sur 20 oies vaccinées, sur 5 femelles et sur 5 mâles témoins à J0, J25 et J56. Elles s'accompagnent d'écouvillons cloacaux à J0.

I.2.4. Suivi sérologique sur oisons d'un jour issus de reproductrices vaccinées

17 oisons conventionnels de 1 jour sont livrés à l'âge de un jour. Parmi eux, 12 sont issus de mères vaccinées avec un vaccin NHEO inactivé et adjuvé par du CarbopolTM juste avant l'entrée en ponte; les 5 autres sont issus d'oies non vaccinées. Chaque oison est identifié individuellement par bague. Deux lots sont alors constitués, le premier constitué des 12 oisons issus de mères vaccinées, le deuxième des 5 oisons témoins restants. Les deux lots sont logés séparément, en cages grillagées. Des prises de sang sont réalisées sur chaque oison « vacciné » à J0, J5, J10 et J15, à J0 et J5 pour les témoins. Les « vaccinés » sont pesés individuellement à J0, J5 et J10.

I.2.5. Epreuve virulente sur oisons d'un jour issus de reproductrices vaccinées

24 oisons conventionnels de 1 jour sont livrés à J0. Parmi eux, 12 sont issus de mères vaccinées avec un vaccin NHEO inactivé et adjuvé par du Carbopol™ juste avant l'entrée en ponte ; les 12 autres sont issus de mères non vaccinées. Chaque oison est identifié individuellement par bague et les deux lots « vaccinés » et « témoins » sont logés séparément, en cages grillagées. Une solution virale est préparée à partir d'un extrait de culture du GHPV. Sa concentration finale est de 2.10^8 génomes/ml. A J0, une prise de sang pratiquée sur chaque oison et tous reçoivent 500µl de la solution *per os*, soit une dose de 10^8 génomes de virus vivant. Des buvards sanguins sont réalisés sur tous les oisons à J8 en vue d'analyses par PCR. Les oisons sont tous euthanasiés à J11 et un échantillon de rein est alors prélevé sur chaque animal.

I.3. Recherche de l'ADN du GHPV par PCR

Les acides nucléiques viraux sont extraits d'écouvillons cloacaux ou de tissus infectés, à l'aide du kit commercial *high pure PCR template preparation kit* (Roche Diagnostics). L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) est effectuée avec un couple d'amorces spécifiques choisi au sein du gène VP1 afin d'obtenir un amplicon de 144 paires de bases.

Couples d'amorces spécifiques

| | |
|------|----------------------------------|
| VP1F | 5'__GAGGTTGTTGGAGTCACCACAATG__3' |
| VP1R | 5'__ACAACCCTGCAATTCCAAGGGTTC__3' |

La température d'hybridation est de 58°C et le temps d'élongation de 40 secondes. Les réactions de 30 µl décrites ci-dessous (tableau 3) sont placées dans un thermocycleur (Gene Amp PCR System 2400 ; Perkin Elmer). 38 cycles d'amplification génomique sont effectués (figure 8).

Tableau 3 : Composition d'un échantillon de 30 µl

| | Concentration initiale | Concentration finale | Volume par Echantillon |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Amorces | 12µM | 1,2µM | 3 µl |
| dNTP | 10mM | 0,2mM | 0,6 µl |
| MgCl₂ | 50mM | 1.67mM | 1 µl |
| Tampon | 10X | 1X | 3 µl |
| Taq polymérase | 5U/µl | 1U/réaction | 0,2 µl |
| ADN extrait | - | - | 1,5 µl |
| Eau nano-pure | - | - | qsp 30 µl |

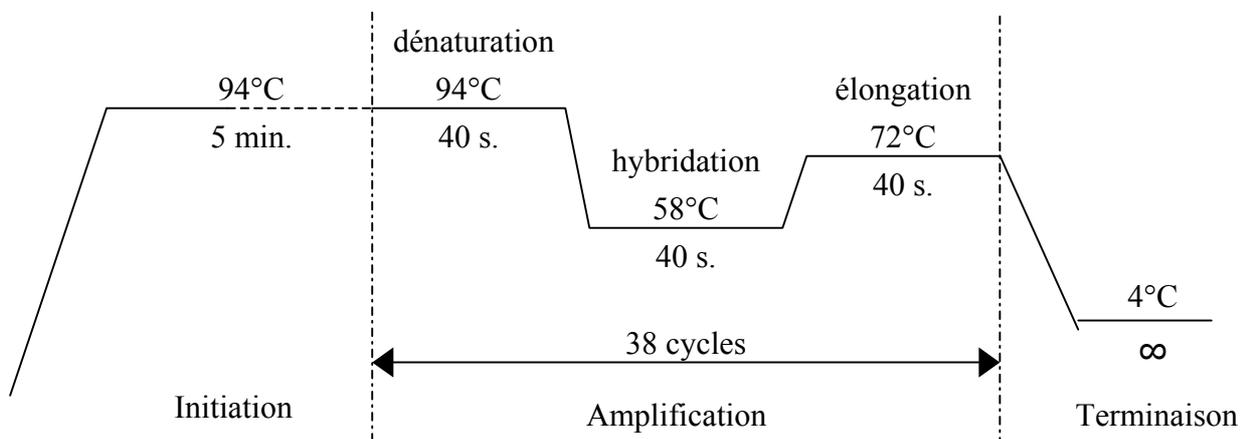


Figure 8 : Programmation du thermocycleur

Un aliquote du produit d'amplification par PCR est déposé sur gel. Après migration, on visualise un fragment de 144 pb sur les échantillons positifs.

I.4. Dosage des anticorps anti-GHPV par technique ELISA

I.4.1. 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 (cf. figure 9).

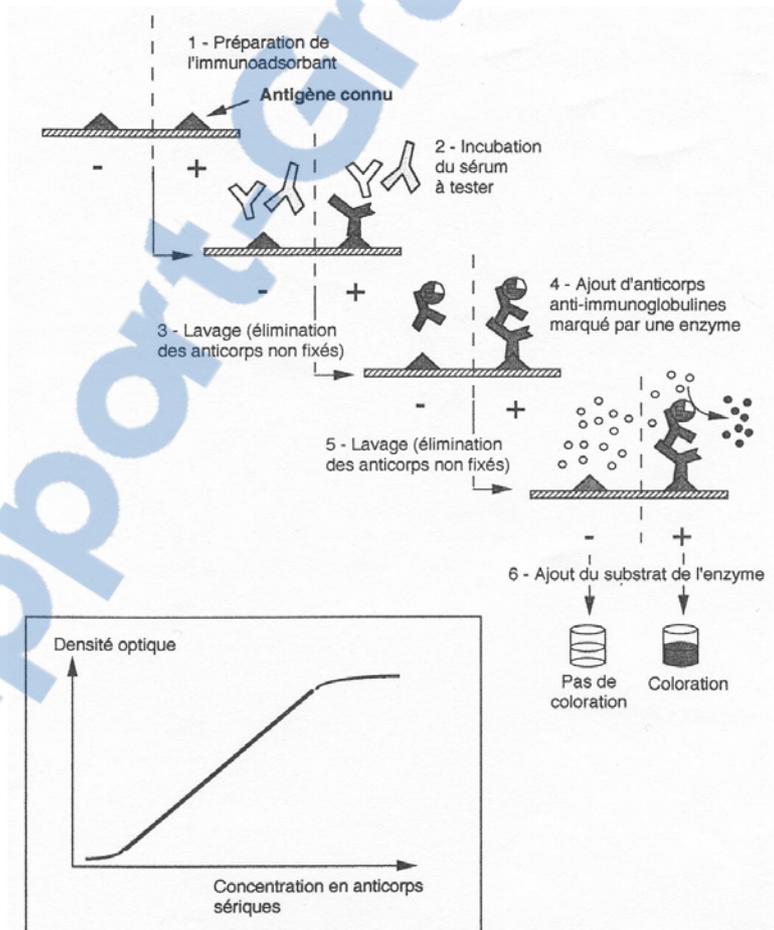


Figure 9 : Principe de la technique ELISA

I.4.2. Réalisation

- La veille au soir, les 96 puits d'une microplaque ELISA (« Pro-bind » de Falcon) sont tapissés par du virus NHEO semi-purifié dilué dans du PBS (Phosphate Buffer Saline), à raison de 100 µl par cupule. L'incubation se fait toute la nuit dans une étuve à CO₂.
- 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 µl 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^e 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 µl 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 µl par cupule.
- La lecture des plaques se fait au spectrophotomètre (DO = 405 nm).
- Le seuil de positivité est égal à trois fois la valeur de la DO mesurée pour le témoin négatif à la dilution 1/40. Pour un sérum donné, le titre correspondant est l'inverse de la plus forte dilution pour laquelle la DO mesurée est supérieure à ce seuil.

I.4.3. Cas particulier des anticorps vitellins

Le dosage des Anticorps d'origine maternelle (AOM) fait appel à l'extraction des immunoglobulines à partir du vitellus : des oeufs non incubables (oeufs « doubles, souillés ou fêlés), sont récoltés et conservés à +4°C pendant quelques jours jusqu'à l'extraction. Cette extraction est effectuée à l'aide d'un kit commercial (Pierce, Rockford, Illinois, USA) :

Etape 1 : séparer le jaune du blanc d'œuf.

Etape 2 : mélanger 1 volume de jaune d'œuf avec 5 volumes de réactif délipidant *EggcellentTM* et incuber 2 heures à 4°C.

Etape 3 : centrifuger à 10 000 tours par minute à 4°C pendant 15 minutes.

Etape 4 : récupérer le surnageant et l'utiliser pour le dosage des anticorps par technique ELISA. Le titre obtenu est multiplié par 6 pour aboutir au titre des Anticorps vitellins.

II. RESULTATS

II.1. Innocuité du vaccin inactivé et adjuvé

Aucune réaction locale au point d'injection n'a été constatée au cours des différents essais de vaccination, que ce soit avec le vaccin adjuvé avec l'hydroxyde d'aluminium ou le CarbopolTM. Lors des essais de vaccination sur jeunes oies comme sur les reproductrices, l'état général des animaux n'a jamais été altéré et la consommation d'aliment est restée conforme aux normes zootechniques de référence. La vaccination des reproductrices n'a pas eu d'influence néfaste sur la qualité de leur ponte : la courbe de ponte et l'éclosabilité des œufs sont restées conformes aux performances attendues.

II.2. Détermination de la dose vaccinale

L'objectif de cet essai était de vacciner plusieurs lots d'oies avec des doses croissantes de vaccin inactivé, afin de choisir la plus faible dose permettant d'obtenir une réponse sérologique satisfaisante.

II.2.1. Doses vaccinales testées

Après culture du GHPV, la suspension virale obtenue atteint des concentrations avoisinant 3.10^{11} génomes/ml. 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, les 5 oies restantes constituant un lot témoin. Le vaccin utilisé était adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium.

II.2.2. Suivi sérologique des oies vaccinées

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.

Tous les écouvillons cloacaux réalisés au cours de l'essai se sont révélés négatifs vis-à-vis du GHPV lors d'analyses PCR. L'aspect de la courbe "témoins" suggère néanmoins une possible contamination entre la première et la deuxième injection de vaccin.

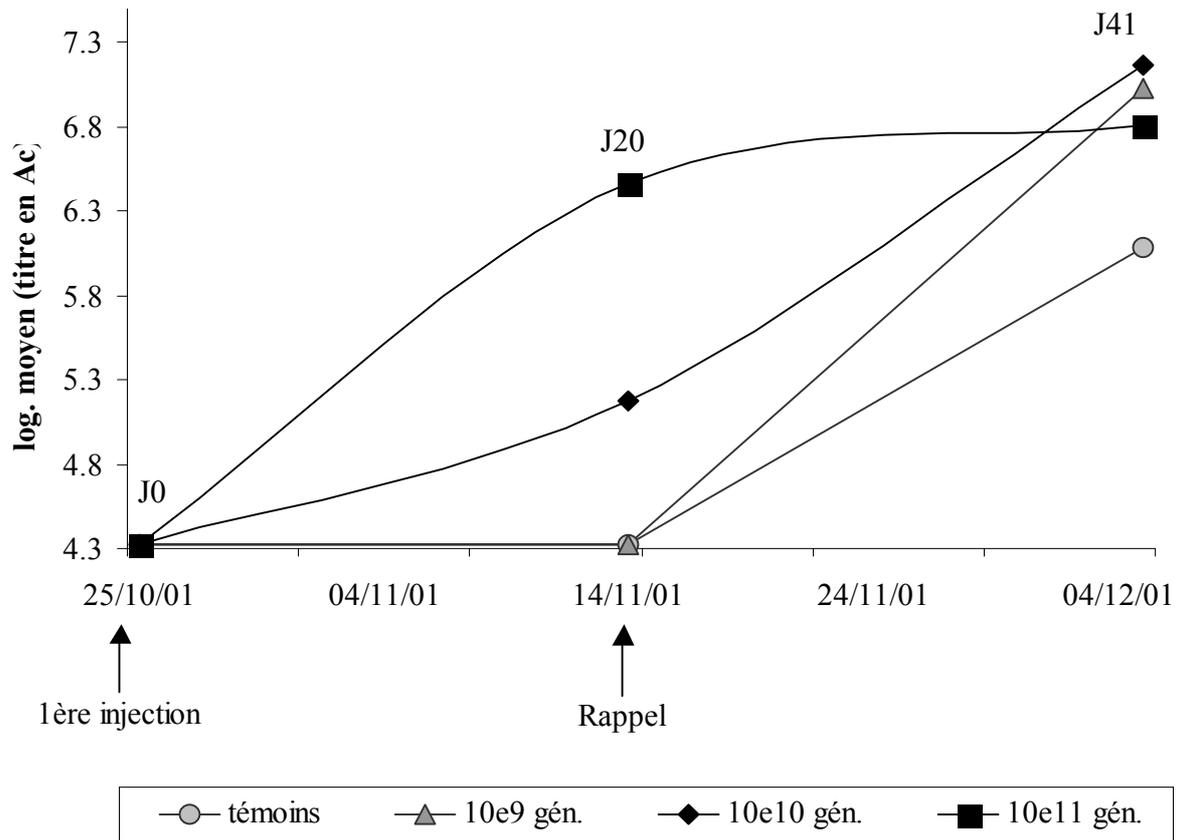


Figure 10 : comparaison de la réponse sérologique d'oisons ayant reçu trois doses différentes de vaccin.

II.3. Vaccination d'oisons en croissance

Cet essai de vaccination constitue la première évaluation de l'immunogénicité du vaccin sur des effectifs conséquents. La vaccination est réalisée sur de jeunes oies, à 2 et 6 semaines d'âge : les résultats du suivi sérologique sont présentés sur la figure 11.

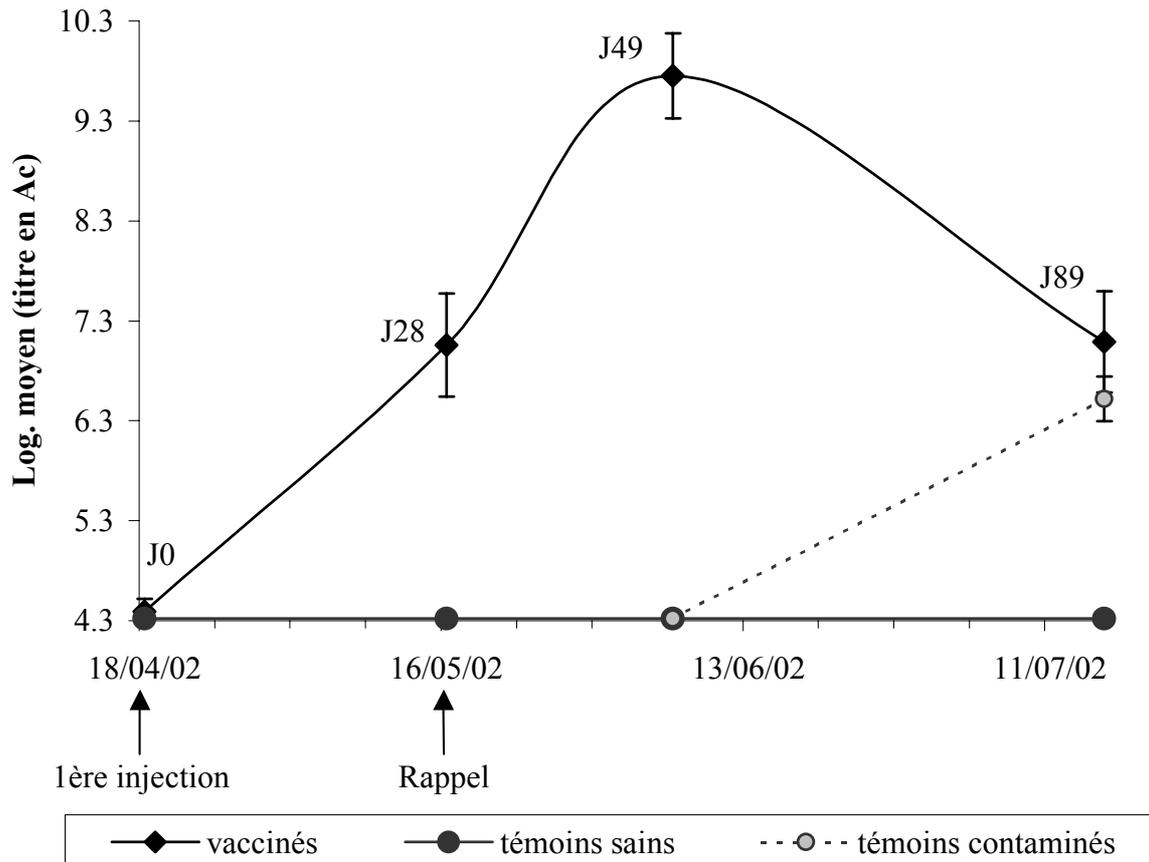


Figure 11 : vaccination d'oisons en croissance – suivi sérologique

La synthèse d'anticorps est induite dès la première injection : le titre (log2) en anticorps atteint 7.1 le jour du rappel et 9.8 trois semaines plus tard, contre 5.1 et 7.1 aux mêmes temps de l'essai de validation de la dose vaccinale.

Sur les 15 écouvillons cloacaux réalisés sur les deux groupes à J0, J49 et J89, 2 se sont révélés positifs chez les témoins et 5 chez les vaccinés, tous à J49. Il est clair que certains animaux ont rencontré le virus au cours de l'essai. Ce constat peut expliquer la séroconversion de 5 témoins sur 12 testés à J89 (courbe en pointillés sur le graphique).

II.4. Vaccination d'oies reproductrices

La vaccination est effectuée dans les conditions proches du terrain sur des oies futures reproductrices. La première injection vaccinale a lieu peu de temps avant la première entrée en ponte des oies, celles-ci démarrent alors un cycle de ponte qui dure environ 6 mois. Le graphique de synthèse des résultats est présenté ci-dessous (figure 12) :

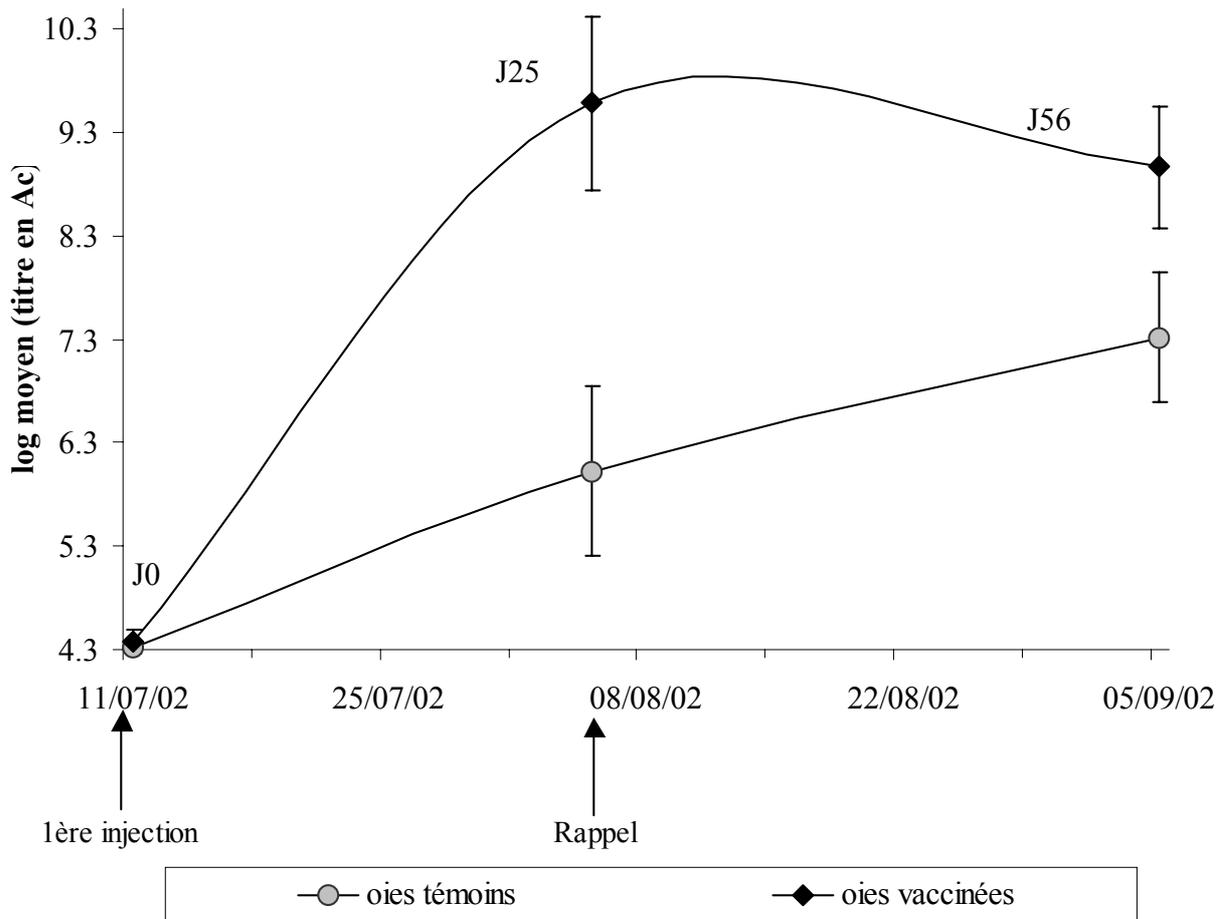


Figure 12 : vaccination d'oies adultes – suivi sérologique

La réponse sérologique à la première injection est plus élevée chez les oies adultes que chez les oisons de 2 semaines : le log. moyen des titres mesurés lors du rappel est de 9,6 contre 7,1 chez les jeunes oies.

Les écouvillons réalisés à J0 se sont tous avérés négatifs en PCR de détection du GHPV, traduisant un statut virologique sain vis-à-vis de la NHEO. Une infection du lot a sûrement eu lieu par la suite et, bien que sans conséquence sur le plan clinique, a contaminé les oies témoins, expliquant la présence d'anticorps chez celles-ci.

II.5. mesure du titre en anticorps sur des œufs d'oies vaccinées

A l'occasion des derniers prélèvements de sang sur le lot d'oies reproductrices vaccinées, à J56 (voir figure 12), 10 œufs non incubables (œufs à deux vitelli, à coquille fêlée ou souillée) pondus le jour-même sont récupérés. Après extraction du vitellus de l'œuf et délipidation, les anticorps anti-NHEO présents dans le vitellus sont dosés. Les résultats obtenus pour chaque œuf ainsi que leur valeur moyenne en log. sont exposés ci-après (figure 13). Les log. individuels sont compris entre 8,9 et 11,9 et le log moyen calculé est de 10,61.

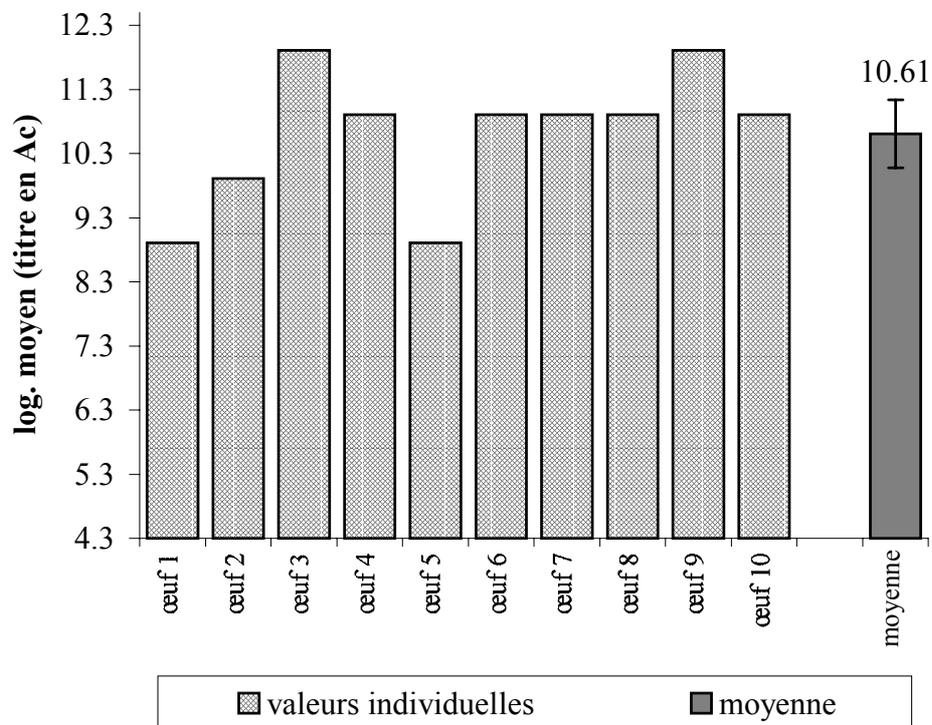


Figure 13 : titres en anticorps d'œufs d'oies vaccinées

II.6. Suivi sérologique sur des oisons issus d'oies vaccinées

Cet essai se propose d'évaluer l'objectif ultime du schéma de vaccination des reproductrices, à savoir le transfert passif d'anticorps d'origine maternelle (AOM), de l'oie vaccinée à l'oison, *via* le vitellus. Pour ce faire, 12 oisons issus des oies reproductrices vaccinées dans le cadre de l'essai précédent ont été suivis pendant 15 jours. Les œufs correspondant à ces poussins ont été pondus en début de ponte, à J56 environ après la première vaccination des oies (voir figure 12). Le titre moyen mesuré à J0 sur les oisons est de 7.7. Il décroît rapidement pour arriver au niveau des témoins après 15 jours (figure 14). Entre J0 et J10 le poids moyen des oisons est multiplié par 4 et passe de 116 à 533 g, illustrant la croissance spectaculaire de l'oison au début de sa vie.

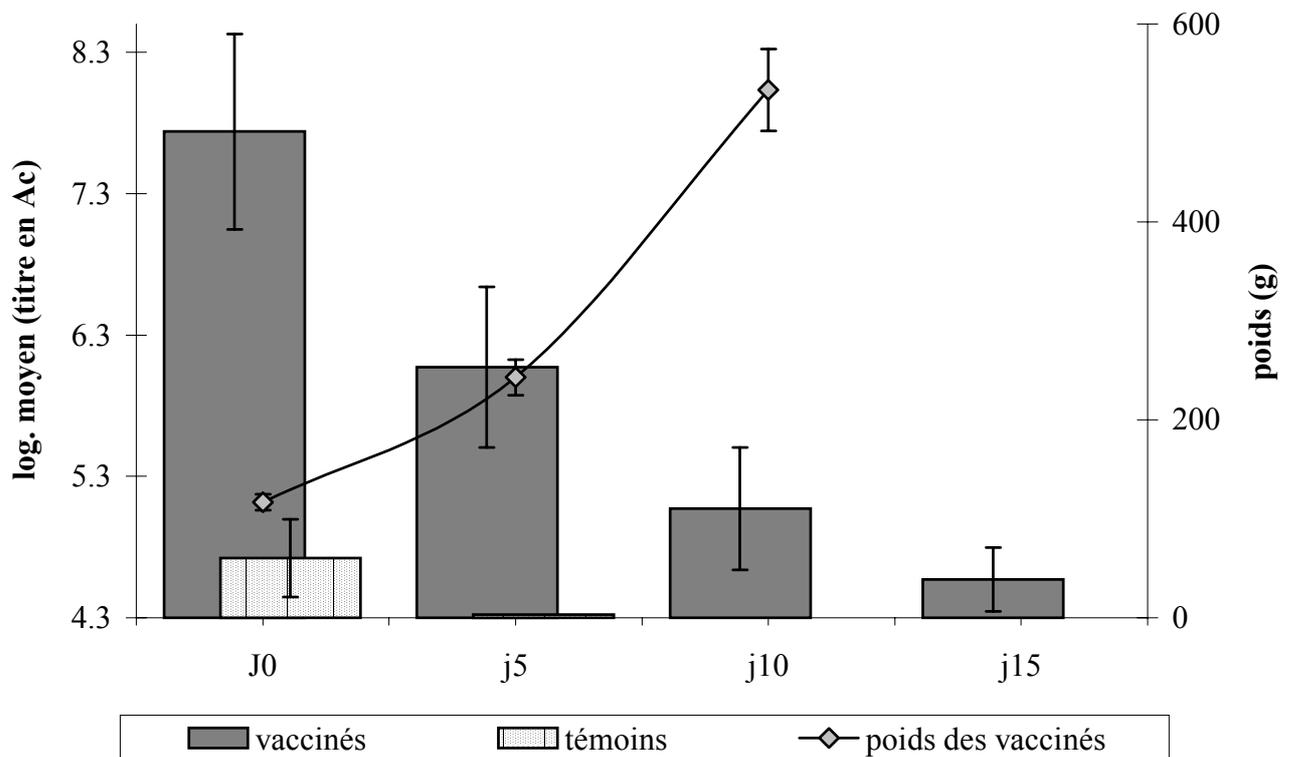


Figure 14 : Cinétique de décroissance des anticorps d'origine maternelle dans les 15 premiers jours.

II.7. épreuve virulente sur oisons issus d'oies vaccinées

L'épreuve virulente subie par deux lots d'oisons « témoins » et « vaccinés » a pour objectif de d'évaluer la protection passive conférée par la vaccination des oies reproductrices. Pour cela, le critère témoin est le statut virologique des animaux lors d'analyse PCR sur sang à 8 jours post-inoculation, puis sur rein 11 jours post-inoculation. Le tableau 4 synthétise les résultats :

Tableau 4 : épreuve virulente sur oisons de 1 jour – résultats

| | oisons "vaccinés" | oisons témoins |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| titre moyen en anticorps à J0 | 260 | 50 |
| statut PCR sur sang à J8 | 0 positif / 12 | 5 positifs / 12 |
| statut PCR sur rein à J11 | 5 positifs / 12 | 11 positifs / 12 |
| mortalité à J11 | 0/12 | 1/12 |

III. DISCUSSION

Ce travail de thèse s'inscrit dans la lignée d'une série de travaux de recherche sur la NHEO engagés par le groupe de virologie moléculaire de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, et qui ont conduit à l'isolement et l'identification du GHPV (Guérin *et al.*, 2000 ; Dubois, 2002). Par la suite, la mise au point d'un vaccin inactivé et adjuvé ainsi que celle d'un test sérologique ELISA ont fait l'objet du travail de thèse de Carine Claverys (Claverys, 2002). Du fruit récent de ces recherches découle l'ensemble des travaux présentés ici. Leur objectif général est l'évaluation du vaccin inactivé, tout d'abord dans un contexte de validation de la dose vaccinale, avant de passer à des essais d'efficacité élargis, sur deux populations cibles.

Les résultats de l'« essai-dose » montrent que l'on obtient une séroconversion pour une dose vaccinale de 10^{10} génomes par dose et plus. Les titres en anticorps obtenus avec les doses « 10^{10} » et « 10^{11} » sont comparables, mais l'effet rappel observé trois semaines après injection n'est effectif que pour la dose « 10^{10} ». L'augmentation de la dose au delà de 10^{10} génomes n'apporte donc aucun bénéfice. D'autre part, les extraits de jus de culture obtenus après production du virus titrent au maximum 3.10^{11} génomes/ml. Au vu du nombre d'animaux à vacciner à terme, la fabrication en quantités importantes d'un vaccin renfermant 10^{11} génomes/dose est quasiment irréaliste en pratique. La dose 10^{10} apparaît donc comme un bon compromis entre qualité de réponse sérologique et faisabilité en matière de production.

Force est de constater que les concentrations atteintes après deux injections sont décevantes et la réponse immunitaire obtenue n'est pas optimale. Deux possibilités se présentent classiquement dans ce cas : on peut premièrement augmenter la dose, ce qui n'est pas possible ici ; la deuxième solution réside dans le changement d'adjuvant. En production avicole et particulièrement chez l'espèce *Gallus*, une pratique courante consiste à utiliser des adjuvants de type huileux, généralement très satisfaisants en matière de stimulation de la réponse immunitaire. Ces adjuvants ont cependant un défaut majeur, à savoir une innocuité médiocre. Les réactions locales et générales après administration sont souvent très sévères et limitent l'usage de ces vaccins, du fait de la mortalité ou de la morbidité chez l'animal et...de la réticence des éleveurs. Si cet inconvénient est tolérable chez la poule, il n'en est pas de même chez l'oie, animal naturellement plus fragile et de plus grande valeur individuelle. Un compromis envisagé dans ce projet a donc consisté en l'essai d'un adjuvant « alternatif », polymère de type CarbopolTM. Il n'existe aucune référence concernant l'usage de cet adjuvant chez les palmipèdes, mais il a été utilisé de manière satisfaisante chez d'autres espèces de

volailles ou de mammifères (Mumford *et al.*, 1994). Il possède en particulier une bonne innocuité et apparaît déjà dans la composition de quelques vaccins aviaires commerciaux. En conséquence, le candidat-vaccin retenu après cet essai est un vaccin inactivé, dont la dose de 500 µl contient 10^{10} génomes, adjuvé avec du CarbopolTM à raison de 2 mg/dose.

Le schéma de vaccination utilisé sur les oisons et les oies reproductrices est classique pour un vaccin inactivé, avec deux injections à 1 mois d'intervalle. Une séroconversion apparaît rapidement après la première injection vaccinale et l'effet rappel permet le maintien de titres élevés plusieurs semaines après la dernière injection. Dans le cas des jeunes oies, la concentration en immunoglobulines est importante jusqu'à l'âge de 10 semaines et au delà, c'est à dire durant toute la période de sensibilité de l'oison.

L'effet rappel de la deuxième injection est bon chez les oisons en croissance. A l'inverse, il n'apparaît pas chez les reproductrices. On peut supposer que le laps de temps entre la deuxième vaccination (J25) et les derniers prélèvements (J56) ait masqué la montée puis la décroissance des titres après le rappel. Mais l'effet rappel peut aussi avoir été réellement limité, si bien que les concentrations en anticorps n'ont que très peu augmenté suite à l'injection de rappel. Cette deuxième explication peut se justifier par la très bonne réponse sérologique à la première injection vaccinale : on peut supposer que le rappel ait été fait trop tôt, pendant la phase de forte production d'immunoglobulines, alors qu'il est recommandé de le réaliser en début de phase de décroissance des anticorps pour obtenir une bonne réponse secondaire.

Globalement, les valeurs des titres obtenues sont bien supérieures à celles mesurées lors de l'essai « dose vaccinale » : l'écart observé trois semaines après rappel est de plus de 2.5 log. On peut raisonnablement penser que l'augmentation des titres en anticorps est liée au remplacement de l'hydroxyde d'aluminium par le CarbopolTM et à la meilleure efficacité de cet adjuvant.

L'apparition d'anticorps chez les témoins au cours des deux essais suggère une possible infection des lots par le GHPV. Les connaissances très récentes en épidémiologie de la NHEO montrent la forte prévalence du portage asymptomatique chez les oisons en croissance, comme chez les reproductrices (Léon, 2002). De plus, il n'existe pas d'oies Exemptes d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS), ce qui nous a obligé à travailler sur des oies conventionnelles. Très peu de parquets d'oies reproductrices ou d'oisons en croissance sont exempts du GHPV, il n'est donc pas surprenant d'observer des séroconversions sur des lots utilisés dans les deux essais. Le statut individuel des animaux est cependant très hétérogène au sein d'un parquet non vacciné, ce qui induit une grande variabilité des titres en anticorps. La vaccination permet de gagner en homogénéité et de niveler les titres par le haut.

Les œufs sur lesquels ont été titrés les anticorps anti-NHEO ont été pondus à J56 par rapport à la vaccination des reproductrices (Figure 12). Nous connaissons donc le titre moyen des pondeuses et celui des œufs à ce moment précis, ce qui permet de comparer les résultats afin d'évaluer le passage des anticorps dans le vitellus. Globalement, les titres obtenus sur les dix œufs testés sont homogènes et surtout très élevés, à 1,5 log. au dessus de la valeur moyenne, mesurée à la même date chez les reproductrices. De ce constat découlent deux observations :

- de par l'homogénéité des résultats obtenus, le titrage des anticorps directement dans le vitellus peut devenir un bon moyen non invasif de suivre la réponse vaccinale chez les reproductrices, en prélevant les œufs non incubables.
- le passage d'anticorps dans l'œuf est réel et efficace ; il semble même qu'un véritable effet « concentration » des anticorps se produise pendant la genèse de l'œuf. Cette constatation est assez originale par rapport aux connaissances acquises chez d'autres espèces, notamment chez *Gallus*. Dans la plupart des cas, le transfert d'immunoglobulines est de l'ordre de 90 % (Gardin, 1994). Dans le cas particulier de la NHEO, des essais plus précis de quantification du transfert d'AOM, lors de la transmission des anticorps de l'oie au vitellus, puis lors de l'absorption du vitellus par l'oison, pourront apporter des réponses plus précises.

Le suivi sérologique d'oisons de 1 jour avait pour objet deux questions : y-a-t'il transfert d'anticorps anti-GHPV de la mère au jeune ? Si oui, quelle est l'ampleur de ce transfert d'immunité ? Pour y répondre de manière précise, nous avons choisi de travailler sur des oisons issus d'une ponte proche de J56 après vaccination des reproductrices : nous pouvions ainsi établir une véritable « photographie » de la transmission d'anticorps, en titrant au même moment les anticorps sériques chez les oies, les anticorps vitellins et les AOM sériques chez les oisons issus. La synthèse de ces trois résultats donne des valeurs en log. de 9.0 pour les mères, 10.6 dans les œufs et 7.7 chez les oisons terminaux : le transfert d'anticorps est effectif et efficace, vu le faible écart constaté entre les titres moyens des mères et des oisons. Si l'on ajoute le fait qu'un phénomène de sélection des Ig Y complètes existe lors de la constitution du pool d'anticorps du vitellus (Cf. introduction bibliographique § III.1.1), nous pouvons alors raisonnablement penser que l'immunité conférée à l'oison est réelle et *devrait être* protectrice.

Comme prévu, la décroissance des titres est très rapide. La croissance des jeunes oies dans les premiers jours de vie peut être qualifiée de fulgurante. Des pesées individuelles à J0,

J5 et J10 montrent qu'en moyenne, le poids des oisons a été multiplié par 4 en moins de 10 jours. Entre J0 et J5, comme entre J5 et J10, le poids des oisons double et le titre moyen en anticorps diminue de moitié. Ce phénomène physique d'augmentation de la masse corporelle a pour conséquence une véritable « dilution » du pool maternel d'immunoglobulines qui, associée au catabolisme très important des protéines en début de vie, explique la rapide décroissance des titres au cours de l'essai.

L'épreuve virulente réalisée sur oisons issus de reproductrices vaccinées nous a d'emblée posé un problème majeur : la quasi-impossibilité d'être représentatifs des conditions naturelles de challenge rencontrées sur le terrain. En effet, d'une part la dose infectieuse minimale pour déclencher un épisode clinique en élevage n'est pas véritablement connue, d'autre part de nombreux facteurs déclenchants ou favorisants semblent intervenir et ne sont évidemment pas maîtrisés au laboratoire. Nous avons décidé de réaliser une épreuve volontairement très sévère, dans la période de sensibilité et fragilité maximale des oisons, afin d'être sûrs de pouvoir constater des effets visibles (mortalité) ou détectables (statut PCR positif). La protection relative observée est donc fortement dépendante des conditions de l'épreuve. L'inoculation par voie orale nous a semblé pertinente, car c'est de toute évidence la voie de contamination naturelle première, au vu de l'excrétion fécale constatée chez les animaux, infectés ou porteurs sains. Les résultats sont mitigés mais globalement satisfaisants : la quasi-totalité des oisons témoins sont positifs à J11, contre la moitié des « vaccinés » seulement ; les témoins se positivent plus tôt que les oisons protégés. Notons que le titre moyen des oisons utilisés comme témoins n'était pas nul le jour de l'inoculation. De toute évidence, la dose d'inoculation de 10^8 génomes / oison s'est avérée trop forte pour ce type d'épreuve : il sera intéressant de la renouveler à des doses infectieuses inférieures.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Parmi toutes les interrogations qui sont nées de l'élaboration d'un vaccin contre la NHEO, ce travail de thèse répond de manière certaine à trois d'entre elles. Tout d'abord, le vaccin inactivé adjuvé par le CarbopolTM possède une parfaite innocuité chez l'espèce-cible, puisque aucune réaction n'a jamais été remarquée tout au long des essais de vaccination. Ensuite, nous sommes sûrs que l'administration du vaccin provoque une importante synthèse d'anticorps anti-NHEO chez les jeunes oies comme chez les oies adultes. Enfin, les anticorps produits par les reproductrices sont susceptibles d'être transmis de manière efficace aux oisons de 1 jour.

Une question majeure reste toutefois en suspens : quel est le niveau de la protection apportée ? Les résultats de l'épreuve virulente apportent certes un début de réponse, malgré un challenge vraisemblablement trop sévère, et tout porte à croire que ce vaccin est protecteur. En conséquence, il reste à trouver un protocole adéquat pour mettre en évidence la protection conférée par le vaccin, afin de valider son efficacité dans les conditions expérimentales. Par la suite, il faudra s'assurer de la réelle efficacité du vaccin sur le terrain, face à un challenge naturel : cette confirmation viendra à plus long terme, avec le recul découlant de l'expérience de son utilisation en élevage.

De la synthèse des résultats exprimée ci-dessus naissent évidemment de nouvelles perspectives, à court et à long terme. Dans un souci d'amélioration globale du candidat-vaccin, on peut se demander si dans sa configuration actuelle, 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 d'obtenir de moins bons résultats en terme d'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 assez efficace.

Un même schéma de vaccination, assez lourd – 2 injections à 3-4 semaines d'intervalle, a été appliqué lors des essais de vaccination sur les oies adultes et les oisons en croissance. Chez les reproductrices, ce schéma semble nécessaire puisque le but est d'induire une réponse sérologique la plus forte et la plus longue possible, afin d'assurer un transfert d'AOM optimal. A l'inverse, sur des oisons en croissance dans un système « PAG », ce protocole peut être remis en cause. En effet, la période de sensibilité maximale allant jusqu'à 10 semaines d'âge, il sera

intéressant de savoir si une seule injection suffit pour assurer une protection sur cette durée ; des essais allant dans ce sens sont en cours.

A plus long terme, l'objectif du groupe de virologie moléculaire de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse est de travailler sur le produit vaccin en lui-même, afin de s'affranchir de la culture cellulaire du virus en grande quantité. Leurs espoirs reposent en particulier sur la production de protéines VP1 recombinantes s'associant en pseudo-particules ou VLP (Virus-Like Particles). Cette approche présente 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.

Ce travail a été l'occasion de constater combien les connaissances sur l'immunologie des palmipèdes étaient peu documentées. L'immunité à médiation cellulaire est notamment 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 sur ce plan l'efficacité d'un vaccin : dans ce domaine, tout reste à faire.

Finalement, 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

| | |
|--|----|
| Figure 1 : comparaison du système Prêt A Gaver (PAG) et du système traditionnel | 6 |
| Figure 2 : Signes nerveux (pédalage, opisthotonos) observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO (8 jours post-inoculation)..... | 11 |
| Figure 3 : ascite et œdème gélatineux observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO..... | 11 |
| Figure 4 : entérite hémorragique avec foyers de nécrose observés à l'issue d'une reproduction expérimentale de la NHEO | 11 |
| Figure 5 : particules virales observées au microscope électronique à transmission. | 14 |
| Figure 6 : arbre phylogénétique fondé sur la séquence nucléotidique de la VP1. | 15 |
| Figure 7 : organisation simplifiée du génome du GHPV | 18 |
| Figure 8 : amplification de l'ADN viral : programmation du thermocycleur | 36 |
| Figure 9 : principe de la technique ELISA..... | 37 |
| Figure 10 : comparaison de la réponse sérologique d'oisons ayant reçu trois doses différentes de vaccin..... | 41 |
| Figure 11 : vaccination d'oisons en croissance –résultats du suivi sérologique | 42 |
| Figure 12 : vaccination d'oies adultes –résultats du suivi sérologique | 43 |
| Figure 13 : titres en anticorps d'œufs d'oies vaccinées | 44 |
| Figure 14 : cinétique de décroissance des anticorps d'origine maternelle..... | 45 |
| | |
| Tableau 1 : comparaison de la séquence d'acides aminés de la protéine VP1 du GHPV et de 7 autres polyomavirus. | 15 |
| Tableau 2 : les différentes espèces de polyomavirus | 17 |
| Tableau 3 : composition d'un mélange réactionnel PCR de 30 µl | 36 |
| Tableau 4 : épreuve virulente sur oisons de 1 jour - résultats | 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. Vaccines and vaccination in poultry production. CEVA santé animale. 2001. 139 pages.
- 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.
- Claverys, C. (2002) Mise au point et validation d'un vaccin inactivé contre la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO). Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.
- Dubois, L. (2002) Isolement et identification du polyomavirus agent de la néphrite hémorragique entérite de l'oie (NHEO). Toulouse, France: Thèse de doctorat vétérinaire.
- Gardin, Y. La qualité immunitaire du poussin. In: Classeur gamme aviaire Intervet. réunion technique S.A.S.S.O., Niort, France, 1994.
- 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.
- 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.
- Kisary, J., Derzsy, D., and Meszaros, J. (1978) Attenuation of the goose parvovirus strain B. Laboratory and field trials of the attenuated mutant for vaccination against Derzsy's disease. *Avian Pathology* **7**: 397-406.
- 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 polyoma virus infection and tumorigenesis. *Viral Immunol.* **14**(3):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.
- 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. (1998) Polyomavirus, infection and immunity. In *Encyclopedia of immunology*. Delves, P.J., Roitt, I.M. (eds). Harcourt Brace & Company Publishers, pp. 1988-1990.
- Shah, K.V. (1996) Polyomaviruses. In *Fields Virology Third Edition*. Fields, B.N.e.al. (ed). Philadelphia: Lippincott-Ravett Publishers, pp. 2027-2043.

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M. and Bishop D.H.L. (ed.). 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.

Toulouse, 2002

NOM : PAPPALARDO

PRENOM : MICHAEL

TITRE : EVALUATION DE L'INNOCUITE, L'IMMUNOGENICITE ET DE L'EFFICACITE D'UN VACCIN INACTIVE CONTRE LA NEPHRITE HEMORRHAGIQUE ENTERITE DE L'OIE (NHEO).

RESUME :

L'agent de la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO) est un polyomavirus, le GHPV (*Goose hemorrhagic polyomavirus*), qui sévit de manière épizootique dans les élevages d'oies. Un vaccin expérimental inactivé et adjuvé contre la NHEO a été testé sur des lots d'oies reproductrices à l'entrée en ponte et sur des oisons en croissance. Dans les 2 cas, une séroconversion est observée dès la première injection et les titres en anticorps se maintiennent plusieurs semaines après le rappel. Les anticorps d'origine maternelle (AOM) chez les oisons de 1 jour issus de mères vaccinées présentent un titre moyen élevé, confirmant l'efficacité du passage des anticorps de l'oie au jeune *via* le vitellus. Ce titre diminue cependant rapidement et devient nul après deux semaines. Les oisons issus d'oies vaccinées présentent une protection significative contre une épreuve virulente. Aucune réaction post-vaccinale localisée ou générale n'a été observée à l'occasion des différents essais. Nous proposons donc de conjuguer la vaccination des reproductrices à celle des oisons issus en début de vie.

MOTS-CLES :

OIE / POLYOMAVIRUS / VACCIN / EFFICACITE / ESSAI CLINIQUE

ENGLISH TITLE:

ASSESSMENT OF THE INNOCUITY, IMMUNOGENICITY AND EFFICACY OF AN INACTIVATED VACCINE AGAINST HEMORRHAGIC NEPHRITIS ENTERITIS OF GEESE (HNEG) IN BREEDERS AND GOSLINGS

ABSTRACT:

The agent of Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese (HNEG) is a polyomavirus, GHPV (Goose Hemorrhagic Polyomavirus), which is rife in an epizootic way in geese flocks. An inactivated vaccine with adjuvant against HNEG was tested in breeders at the beginning of laying and in goslings. In both cases, serological conversion was observed after the very first injection and antibody titres remained several weeks after booster. Maternally Derived Antibodies (MDA) in 1-day-old goslings from vaccinated breeders had a high average titre, that confirms the efficacy of antibody transfer from breeders to goslings via egg yolk. However, this titre quickly reduced and became nil after two weeks. Goslings from vaccinated breeders were significantly protected from live virus challenge. No localised or general post-vaccine reaction was noticed during the different assays. Thus we propose to couple vaccination of breeders with their new-born goslings'.

KEY WORDS:

GOOSE / POLYOMAVIRUS / VACCINE / EFFICACY / CLINICAL TRIAL