

EVALUATION DU VIRUS MYXOMATEUX EN TANT QUE VECTEUR VACCINAL CHEZ LES VOLAILLES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2007
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Nicolas, Jean-Pierre PERRENOT
Né le 20 Août 1981, à REIMS

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Jean-Luc GUERIN
Mlle Séverine BOULLIER

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

A notre Président de Thèse

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Virologie

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

A notre Jury de Thèse

Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles

**Qui nous a guidé au cours de ce travail
Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance**

Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Immunologie générale et médicale

**Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse
Qu'elle trouve ici la marque de toute notre considération**

A mes parents

Sans qui je ne serai pas là...

Au reste de ma famille

Pour leur soutien apporté, malgré la distance, pendant toute ma scolarité et particulièrement au cours de ce travail.

A Emilie

Pour les moments de plaisir passés depuis plus de 4 ans déjà et à venir (*à Voillans je l'espère*)...

A Brigitte, Jacqueline et toute l'équipe du laboratoire

Pour l'ambiance de travail conviviale dans laquelle se sont déroulées toutes les manipulations.

A toute la bande d'amis

Avec laquelle j'ai passé des moments mémorables durant toutes ces années à l'Ecole, autant dans les études que dans les loisirs.

<i>SOMMAIRE</i>	<i>1</i>
<i>Table des illustrations</i>	<i>3</i>
<i>Introduction</i>	<i>4</i>
<i>Partie 1 : Etude Bibliographique</i>	<i>5</i>
Les poxvirus : des pathogènes aux vaccins recombinants	6
Généralités sur les poxvirus	6
Construction d'un poxvirus recombinant	9
Utilisations des poxvirus recombinants en tant que vecteurs vaccinaux	11
La vaccination des volailles	13
Bases de la vaccination aviaire	13
Le système immunitaire	13
Les types de vaccins utilisables	15
Pratiques de la vaccination	16
La vaccination individuelle	16
La vaccination de masse	17
Cas de la vaccination in ovo	17
Evaluation de la qualité de la vaccination	18
Les adjuvants : compléments indispensables pour une meilleure réponse	18
Les adjuvants minéraux	19
Les copolymères synthétiques (« Non-ionic Block Polymers »)	19
Carbohydrates	19
Les adjuvants huileux (« oil-based adjuvants »)	20
Les constituants bactériens	20
Les toxines bactériennes	21
Les oligodésoxynucléotides CpG	21
Les cytokines	21
Les saponines et les «ImmunoStimulating COMplexes »	22
Les adjuvants vésiculaires	22
Les amines lipophiles	23
Les imidazoquinolones	23
Les polysaccharides	23

<i>Partie 2 : Etude expérimentale</i>	24
<i>Matériel et méthodes</i>	25
Virus	25
Poulets	25
Essai de différentes voies d'inoculation	25
Essai de différents adjuvants et évaluation de l'effet rappel	26
Dosage des immunoglobulines par ELISA	27
<i>Résultats</i>	28
Etudes préliminaires concernant les ELISA	28
Dilution des anticorps anti-immunoglobulines de type Y chez le poulet	28
Durée d'incubation du substrat PNPP	29
Evaluation de la réponse immunitaire locale	29
Evaluation de la réponse humorale systémique	30
Réponse dirigée contre le vecteur	30
Réponse dirigée contre le transgène	30
<i>Discussion</i>	33
<i>Conclusion</i>	36
<i>Références</i>	37
<i>Annexes</i>	42

<i>Annexe 1 : Protocole ELISA (dosage d'immunoglobulines)</i>	<i>43</i>
<i>Annexe 2 et 2bis : Résultats ELISA de l'essai des différentes voies d'inoculation :</i>	
<i> Analyse des sérums</i>	<i>45</i>
<i>Annexe 3 : Résultats ELISA de l'essai des différentes voies d'inoculation :</i>	
<i> Analyse des larmes</i>	<i>47</i>
<i>Annexe 4 et 4bis : Résultats ELISA de l'essai de différents adjuvants et de l'évaluation de l'effet rappel</i>	<i>48</i>

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Génome des Poxvirus ; vue schématisée du génome du virus de la vaccine (proportions non respectées).

Figure 2 : Principales étapes de la réplication des poxvirus, dans l'ordre chronologique de 1 à 9.

Figure 3 : Principales étapes de l'assemblage des poxvirus de la transformation des croissants membranaires en particules virales immatures (VI) dans le viroplasma à l'obtention des différentes particules infectieuses

Figure 4 : Schématisation des trois méthodes de construction de poxvirus recombinants.

Figure 5 : Sensibilité des dosages ELISA, estimée par l'évolution des rapports entre les témoins positif et négatif lapin, d'une part, et les témoins positif et négatif poulet, d'autre part, en fonction du temps.

Figure 6 : Evolution des titres moyens en anticorps anti-VP60 en fonction du temps, réparties par lot ; chaque lot étant caractérisé, d'une part, par l'adjuvant utilisé et, d'autre part, par la présence ou l'absence d'une injection de rappel.

Tableaux

Tableau 1 : Principaux poxvirus utilisés comme vecteurs vaccinaux chez l'homme et les animaux.

Tableau 2 : Avantages, inconvénients et indications des vaccins vivants atténués et des vaccins inactivés.

Tableau 3 : Rapport entre les densités optiques des témoins positif et négatif poulet pour les différentes dilutions des sérums et pour chacune des dilutions des anticorps anti-immunoglobulines de type Y du poulet.

Introduction

Le virus myxomateux, un poxvirus du genre des *Leporipoxvirus*, figure parmi les plus gros virus animaux. Son génome de grande taille est capable de coder pour plus de 150 protéines, parmi lesquelles de nombreux facteurs de pathogénicité, qui font du virus myxomateux un ennemi redoutable du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*. Il s'agit d'ailleurs du premier agent viral utilisé comme arme biologique par le gouvernement australien en 1950, pour contrer la prolifération excessive des lapins sur le continent. Les débuts du programme d'éradication sont probants, puisque le virus myxomateux provoque rapidement la mort de plusieurs millions de lapins. Excédé par les ravages provoqués par les lapins dans sa propriété d'Eure-et-Loir, Louis-Armand Delille introduit volontairement une souche virulente du virus sur le continent européen. Cependant, il n'a pu contenir le virus et cette introduction est responsable de l'implantation durable du virus en Europe. Dès lors, des études ont été menées sur le virus pour tenter de créer des souches atténuées, permettant de protéger les lapins domestiques et d'élevage. L'amélioration des techniques de manipulation du génome a permis par la suite la construction de virus recombinants à base de poxvirus. Ces virus recombinants permettent la production d'anticorps dirigée contre le produit du transgène, chez les espèces cibles mais également chez les espèces non cibles. Le virus myxomateux fait l'objet de nombreuses études pour connaître notamment les mécanismes de son pouvoir pathogène et son spectre d'hôtes. En effet, son utilisation comme vecteur d'antigène protecteur du RHDV, laisse entrevoir la possibilité de l'utiliser comme vecteur d'antigène protecteur d'autres maladies, y compris dans d'autres espèces.

La présente étude propose, dans un premier temps, de faire le point sur les poxvirus et leur utilisation en tant que vecteurs vaccinaux chez des espèces non cibles, ainsi que les modalités de vaccination des volailles. Dans un deuxième temps elle propose d'évaluer un poxvirus spécifique, le virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez le poulet, une espèce non cible.

Partie 1 : Etude bibliographique

Les poxvirus : des pathogènes aux vaccins recombinants

Généralités sur les poxvirus

Les poxvirus constituent une famille de virus importante, car elle contient un grand nombre de virus responsables de maladies chez l'Homme (Variole,...) et chez les animaux (Myxomatose, Variole ovine, Variole aviaire, Ecthyma contagieux,...).

Les virions sont des particules enveloppées, à symétrie complexe (parallélépipédiques ; ovoïdes), et de très grande taille (300×240×100 nm). En contraste négatif, on peut observer un core biconcave et un ou deux corps latéraux dans la concavité. On distingue deux formes libres :

- Les virions intracellulaires matures (IMV en anglais), qui ne possèdent qu'une enveloppe externe et peuvent être libérés directement dans le milieu extracellulaire.
- Les virions enveloppés extracellulaires (EEV en anglais), qui possèdent deux enveloppes externes.

Le génome des poxvirus (Fig. 1) est une molécule d'ADN bicaténaire aux extrémités liées de façon covalente, de grande taille (130 à 375 kpb). Pour le virus myxomateux, le génome compte 162 kpb, codant pour plus de 150 protéines.

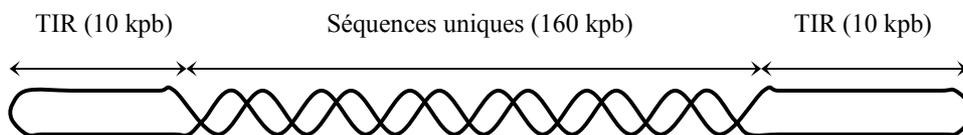


Fig. 1 : Génome des Poxvirus ; vue schématisée du génome du virus de la vaccine (proportions non respectées). TIR = régions terminales répétées inversées.

Les poxvirus sont des virus à réplication intracytoplasmique, c'est-à-dire que l'ADN ne pénètre jamais dans le noyau de la cellule infectée. C'est pourquoi, on a longtemps pensé qu'ils avaient assez de protéines codées par leur propre génome pour se passer des facteurs nucléaires de la cellule hôte, mais on sait maintenant que ces facteurs sont nécessaires pour permettre la phase intermédiaire [Rosales et al. 1994] et la phase tardive [Broyles et al. 1999 ; Wright et al. 2001] de la transcription.

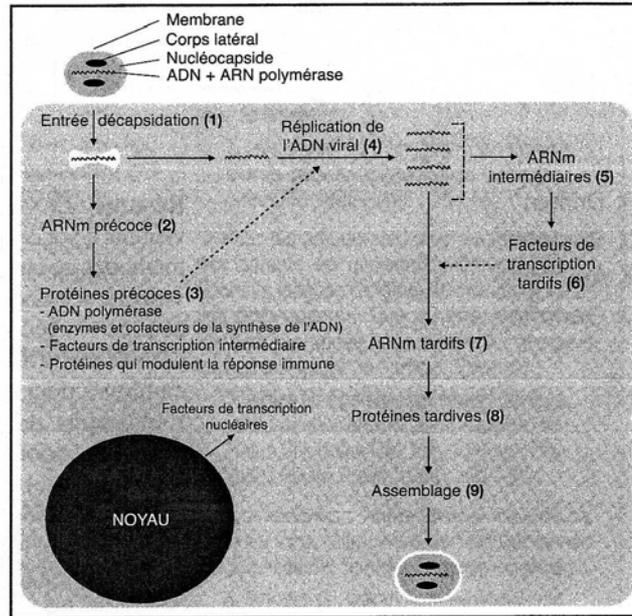


Fig. 2 [Drillien *et al.* 2003] : Principales étapes de la réplication des poxvirus, dans l'ordre chronologique de 1 à 9.

Les poxvirus présentent un mode de réplication spécifique (Fig. 2).

L'entrée dans la cellule (1) se fait de façon différente selon que le virion possède ou non une enveloppe supplémentaire [Vanderplasschen *et al.* 1998]. Dans les cas des virions simplement enveloppés, la pénétration se fait par fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. Pour les formes doublement enveloppées, elle se passe par endocytose : l'enveloppe externe est désagrégée par le pH acide de la vésicule d'endocytose, ce qui permet secondairement une fusion entre la membrane virale et la membrane de la vésicule. Dans les deux cas, le core se retrouve libre dans le cytoplasme et le cycle de réplication, constitué de deux phases, peut commencer.

La phase précoce (avant la réplication de l'ADN viral) consiste en la synthèse d'ARNm précoce (2), codant pour des protéines précoces (3) : des protéines modulant la réponse immunitaire, des enzymes et des cofacteurs nécessaires au processus de réplication de l'ADN et au métabolisme des nucléotides (ADN polymérase) et des facteurs nécessaires au déroulement de la phase de transcription intermédiaire, qui a lieu sur l'ADN nouvellement synthétisé.

La réplication de cet ADN (4) est catalysé par une ADN polymérase codée par le virus et fait intervenir plusieurs protéines virales. Les liaisons covalentes présentes aux extrémités du génome, ainsi que les régions terminales répétées inversées imposent un mode de réplication particulier, ayant pour intermédiaire des molécules concatémériques. Ces dernières sont fractionnées par des enzymes virales, en molécules unitaires pouvant être encapsidées.

Les ARNm (5), issus de la transcription intermédiaire, codent à leur tour pour des facteurs nécessaires à la phase de transcription tardive (6), ainsi que pour les protéines de structure. Les derniers ARNm synthétisés (7) codent pour d'autres protéines (8) de structures et les enzymes permettant leur assemblage (9), ainsi que pour des facteurs de transcription précoces, qui, intégrés aux nouveaux virions, permettront la première transcription de ces particules virales.

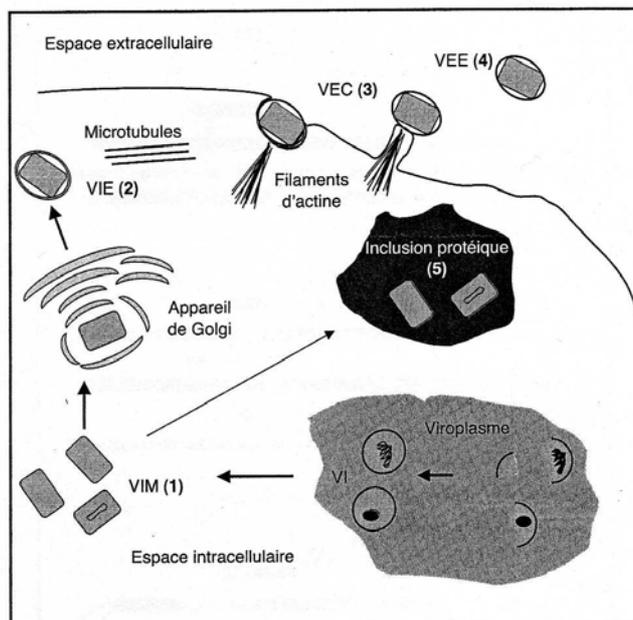


Fig. 3 [Drillien *et al.* 2003] : Principales étapes de l'assemblage des poxvirus de la transformation des croissants membranaires en particules virales immatures (VI) dans le viroplasma à l'obtention des différentes particules infectieuses, numérotées de 1 à 5. 1. VIM (IMV en anglais) : virion intracellulaire mature ; 2. VIE (IEV en anglais) : virus intracellulaire enveloppé ; 3. VEC (CEV en anglais) : virus extracellulaire attaché aux cellules ; 4. VEE (EEV en anglais) : virus extracellulaire enveloppé ; 5. Les IMV au sein d'une inclusion protéique.

L'assemblage des poxvirus (Fig. 3) est complexe et débute par l'assemblage des protéines dans le viroplasma, zone du cytoplasme consacrée à cette tâche. Cette zone ne contient pas d'organe cellulaire et est seulement entourée par une membrane de réticulum endoplasmique. Des croissants membranaires, dans lesquels le matériel viroplasmique se condense, apparaissent puis fusionnent pour donner les premières particules virales non infectieuses. Par la suite, une série de remaniements permet la formation de la première particule virale infectieuse : le virion intracellulaire mature (=VIM) (1). Cette forme, qu'elle soit isolée ou présente au sein d'un corps d'inclusion protéique (5), constitue la majorité des particules virales et est la forme responsable de la propagation d'organisme à organisme. Une partie des virions intracellulaires matures migrent vers l'appareil de Golgi où ils sont entourés de vésicules golgiennes, ce qui leur confère deux membranes supplémentaires ; on parle alors de virus intracellulaire enveloppé (=VIE) (2). Ce ne sont que des intermédiaires, qui migrent le long des microtubules vers la membrane de la cellule hôte avec laquelle la membrane externe fusionne pour donner des virus enveloppés associés aux cellules (=VEC) (3). Ces derniers peuvent, soit rester attachés à la membrane plasmique et être propulsé jusqu'aux cellules adjacentes par les filaments d'actine, soit se détacher pour donner des virions enveloppés extracellulaires (=VEE) (4), qui permettent la dissémination à distance au sein d'un même organisme.

Construction d'un poxvirus recombinant

Les trois méthodes de construction disponibles sont schématisées sur la figure 4.

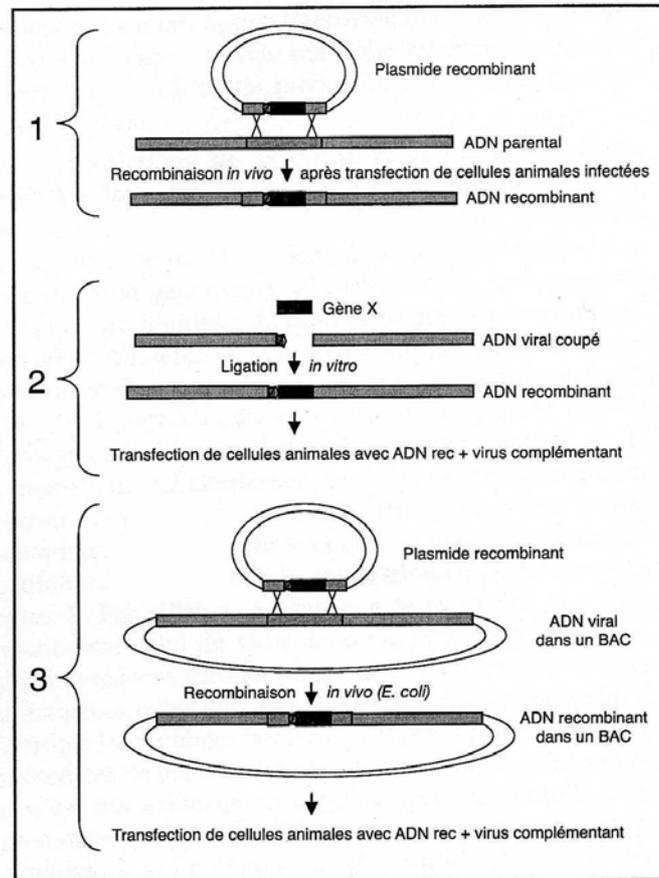


Fig. 4 [Drillien *et al.* 2003] : Schématisation des trois méthodes de construction de poxvirus recombinants. 1. La première méthode, la plus ancienne et la plus utilisée, fait appel à un plasmide recombinant permettant le transfert *in vivo*. 2. La seconde est une ligation *in vitro*. 3. La troisième est pour l'instant théorique et consiste en la réalisation d'un clone du génome entier dans un chromosome bactérien artificiel.

Dans la méthode la plus fréquemment utilisée (1), l'ADN complémentaire est placé en aval d'un promoteur isolé à partir du génome viral. L'ensemble est inséré dans le fragment cloné du génome du poxvirus que l'on souhaite interrompre. Le tout est placé dans un plasmide bactérien, qui est ensuite isolé puis amplifié dans *Escherichia coli*, avant d'être transfecté dans les cellules animales préalablement infectés avec le poxvirus choisi. Lors du cycle viral, une recombinaison *in vivo* est alors possible entre l'ADN parental et l'ADN inclus dans le plasmide, pour permettre la formation d'un ADN recombinant ayant intégré l'ADN étranger. Le principal risque est l'intégration de l'ensemble du plasmide dans le génome viral, qui conduit à une molécule d'ADN instable. Cette dernière peut se stabiliser en redonnant un ADN parental (le plasmide est exclu lors d'un cycle ultérieur) ou en donnant l'ADN recombinant souhaité. Lors d'utilisation de poxvirus recombinant réalisé avec cette technique, on doit s'assurer que l'on possède un virus stable ayant intégré le gène souhaité au site souhaité.

La deuxième méthode (2) consiste en une ligation *in vitro* entre l'ADN viral coupé à un site de restriction unique et le gène à introduire flanqué de sites de restrictions compatibles à ses deux extrémités. Afin de permettre la transcription de ce nouvel ADN, ce dernier est transfecté dans des cellules infectées par un autre poxvirus (virus complémentant), qui apportent l'ensemble des enzymes nécessaires à la formation du nouveau virus à partir de

l'ADN recombinant. Cette méthode n'a été appliquée qu'au virus de la vaccine et les virus complémentant étaient soit une souche thermosensible du virus de la vaccine [Merchlinsky et Moss 1992], soit le virus de la variole aviaire [Merchlinsky *et al.* 1997 ; Scheiflinger *et al.* 1992] ; ce dernier présente le double intérêt d'avoir un génome assez éloigné de celui de la vaccine, ce qui limite les possibilités de recombinaison, et de ne pas se multiplier sur les cellules de mammifères, ce qui facilite la sélection des recombinants.

La dernière méthode (3) est fondée sur la possibilité de cloner la totalité du génome viral dans un chromosome bactérien artificiel (BAC) et de récupérer le virus à partir du clone génomique.

Le choix de site d'insertion est un élément important dans la réalisation du poxvirus recombinant. Plusieurs sites sont disponibles, il s'agit en général de régions génomiques codant pour des protéines intervenant dans le pouvoir pathogène du virus (gènes de spectre, d'hôte, gènes codant pour des protéines, qui modulent la réponse immunitaire,...), ou de régions intergéniques ce qui permet de ne pas perturber les propriétés du vecteur. Le génome des poxvirus possède une plasticité suffisamment importante pour pouvoir insérer plusieurs gènes dans le même virus. Le meilleur exemple est l'insertion de sept gènes différents de *Plasmodium falciparum* dans le virus de la vaccine ; l'intérêt est d'induire une réponse immunitaire plus large contre ce parasite [Tine *et al.* 1996].

La technique d'isolement du recombinant la plus fréquemment utilisée est l'ajout à l'insert d'un gène marqueur, qui confère une résistance au virus créé (résistance à l'acide mycophénolique, à la généticine par exemple). D'autres gènes peuvent permettre la visualisation des plages de lyse grâce à la transformation d'un substrat chromogène (β -galactosidase, β -glucuronidase). De nombreux autres gènes marqueurs existent, mais lorsque l'on souhaite utiliser un virus recombinant, on recherche souvent un virus le plus proche possible du virus parental, ce qui implique notamment qu'il ne doit pas contenir de gènes additionnels, inutiles pour les manipulations envisagées. Depuis 1982, une recherche des virus recombinants dans les plages de lyse par hybridation a donc été développée [Panicali et Paoletti 1982]. L'autre technique utilisable est l'emploi d'anticorps spécifiques, qui permettent d'identifier les virus exprimant le gène d'intérêt par une technique d'immunofluorescence indirecte des plages de lyse.

Utilisations des poxvirus recombinants en tant que vecteurs vaccinaux

Les poxvirus recombinants sont utilisés dans de nombreux domaines de recherche, car ils permettent :

- L'expression de gènes en grande quantité (soit en insérant ces derniers dans le génome du poxvirus, soit en le plaçant en aval d'un promoteur de bactériophage [Fuerst *et al.* 1986]),
- La réactivation du génome des virus à ARN de polarité négative, comme le virus de la rage [Schnell *et al.* 1994],
- Ou encore l'établissement de banques d'ADNc, permettant d'identifier des antigènes tumoraux [Smith *et al.* 2001].

Mais le principal domaine d'application reste leur usage en tant que vecteur vaccinal, notamment le virus de la vaccine, dans le génome duquel de nombreux gènes issus de micro-organismes variés (virus de l'hépatite B, de la rage, de la fièvre aphteuse, de la grippe, du sida...) ont été introduits à des fins vaccinales [Cox *et al.* 1992]. Beaucoup d'autres poxvirus (Tab. 1) sont également utilisés comme vecteurs vaccinaux, dans de nombreuses espèces animales.

Genre	Espèce
Orthopoxvirus	Virus de la vaccine [Gherardi et Esteban 1999] Poxvirus du raton laveur [Hu <i>et al.</i> 1997]
Avipoxvirus	Virus de la variole aviaire [Taylor <i>et al.</i> 1988] Poxvirus du canari [Taylor <i>et al.</i> 1991] et du pigeon [Letellier <i>et al.</i> 1991]
Capripoxvirus	Poxvirus du mouton et de la chèvre [Romero <i>et al.</i> 1993]
Leporipoxvirus	Virus de la myxomatose [Bertagnoli <i>et al.</i> 1996]
Suipoxvirus	Poxvirus du porc [Van der Leek <i>et al.</i> 1994]

Tab. 1 : Principaux poxvirus utilisés comme vecteurs vaccinaux chez l'homme et les animaux.

De part leurs caractéristiques intrinsèques, les poxvirus présentent de nombreux avantages en tant que vecteurs viraux vaccinaux. En effet, la réplication étant cytoplasmique, l'introduction de gènes étrangers, ainsi que la détection et la purification des protéines produites présentent moins de difficultés que pour les virus ayant une réplication nucléaire. De plus, l'intégration du génome virale dans celui de la cellule hôte est très improbable. La taille importante du génome permet d'intégrer des fragments de taille conséquente sans influencer sur la réplication et de supprimer des fragments non essentiels.

La transcription, spécifique et autonome, permet la synthèse d'ARNm, à partir de gènes étrangers, dès lors qu'ils sont sous la dépendance d'un promoteur poxviral. Les protéines issues de ces ARNm possèdent une conformation et une activité très proche de la protéine d'origine [Hruby 1990], ce qui n'est pas le cas avec d'autres vecteurs encore à l'étude (levures...).

Les poxvirus sont des vecteurs quasiment apathogènes pour l'homme ; le virus de la vaccine par exemple est un des plus sûrs et a déjà permis l'éradication mondiale de la variole, mais d'autres poxvirus sont encore plus sûrs, car non répliquatifs chez l'homme [Perkus *et al.* 1995].

Le coût de production faible (surtout pour le virus de la vaccine), la stabilité importante (résistance à la congélation, à la lyophilisation et à la réhydratation) et la facilité d'administration (par voie intradermique, voire par voie orale) des poxvirus font de ces vecteurs des produits adaptés à la vaccination de masse.

Malgré tout, l'utilisation des poxvirus recombinants comme vecteurs vaccinaux possède encore quelques limites, et notamment la cytotoxicité associée à l'infection. Une solution réside en l'utilisation de poxvirus à cycle plus lent, comme les avipoxvirus. La délétion des gènes responsables de cette cytotoxicité est à l'étude, mais il est probable que la conversion des poxvirus en agents totalement neutres vis-à-vis de la cellule ne se fera jamais. La pathogénicité résiduelle s'avère également être un problème de plus en plus préoccupant, du fait de son effet accru chez les individus immunodéprimés (personnes âgées, sidéens...), qui représente une part de moins en moins négligeable de la population humaine. Cependant, la maîtrise de facteurs de pathogénicité et l'exploitation de nouvelles souches totalement apathogènes du virus de la vaccine ou d'autres poxvirus à spectre d'hôte plus étroit [Hu *et al.* 1997] devrait permettre de réduire l'impact de cet inconvénient.

Enfin, les poxvirus possèdent des gènes permettant d'inhiber partiellement la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui limite leur efficacité en tant que vecteur vaccinal.

Ces quelques caractéristiques restrictives n'ont cependant qu'un faible poids à côté des nombreux avantages que présentent les poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux. Cela explique l'intérêt croissant pour cette famille dans la recherche de nouvelles approches vaccinales.

La vaccination des volailles

Bases de la vaccination aviaire

Le système immunitaire

Le système immunitaire a pour fonction primaire de défendre l'organisme contre les infections ; pour ce faire, il fait intervenir les trois caractères qui définissent la réponse immunitaire, à savoir sa capacité à reconnaître les antigènes comme corps étrangers, sa spécificité et sa faculté de mémorisation. Lors d'un premier contact avec les antigènes d'un agent infectieux, l'organisme le mémorise afin de pouvoir repousser une nouvelle agression par le même antigène. Cette mémoire est mise à profit par la vaccination : en provoquant le premier contact (par l'introduction d'antigènes inoffensifs), le vaccin permet à l'organisme d'être préparé contre les attaques des pathogènes sauvages.

La réponse immunitaire fait intervenir de nombreux types de cellules, ayant chacune une action spécifique dans la défense contre les agents infectieux.

Les premières cellules à intervenir sont les macrophages, qui phagocytent les substances étrangères (bactéries, virus...), les détruisent en partie et présentent à leur surface certains antigènes. Les lymphocytes T auxiliaires (ou « helper ») vont ensuite reconnaître ces antigènes et stimuler une autre catégorie de lymphocytes, les lymphocytes T cytotoxiques. Ces derniers vont identifier les antigènes à la surface des cellules infectées et les détruire.

Les lymphocytes B sont également capables de reconnaître les antigènes présentés par les cellules infectées. Après cette identification, ils peuvent se multiplier et se transformer en plasmocytes, qui vont sécréter des anticorps spécifiques de l'agent pathogène. Ces anticorps sont capables de se lier aux agents infectieux (via les antigènes de surface), les empêchant ainsi de se fixer sur les cellules cibles. Une fois les anticorps fixés, la partie commune est reconnue par les cellules tueuses qui détruisent les cellules sur lesquelles les anticorps sont fixés (qu'il s'agisse de la cellule cible déjà infectée ou de l'agent infectieux).

Les dernières cellules ayant une action primordiale dans la réponse immunitaire sont les cellules mémoires, capables de garder une trace du premier contact avec un antigène. Elles permettent au système immunitaire de réagir plus rapidement lors d'un nouveau contact.

Toutes ces cellules interviennent dans deux grandes voies de réponse immunitaire, d'une part la réponse immunitaire à médiation cellulaire (type Th1), qui fait intervenir les lymphocytes T, les macrophages et les cellules tueuses (Natural Killer Cells), d'autre part la réponse immunitaire à médiation humorale sérique et sécrétoire (type Th2), qui correspond à la production d'anticorps par les plasmocytes, issus des lymphocytes B.

Cette division est surtout théorique, car une immunité efficace repose sur la coopération entre les cellules des deux types. On peut citer par exemple l'action des lymphocytes T auxiliaires, qui stimulent non seulement les lymphocytes T cytotoxiques (Th1), mais aussi les lymphocytes B (Th2). Ou encore l'action des lymphocytes T cytotoxiques (Th1), qui inhibe celle des lymphocytes B (Th2).

Il existe cependant un cas particulier où la protection est uniquement liée à la présence d'anticorps, c'est l'immunité d'origine maternelle ; en effet, seuls les anticorps sont transmis via le vitellus. Cette immunité, qui dépend uniquement du programme de vaccination ou d'infections spontanées des parents, reste transitoire (elle a presque

totalement disparue à l'âge de trois semaines) et est rapidement suppléée par une immunité mixte, cellulaire et humorale.

L'ensemble de la réponse immunitaire se déroule dans le tissu lymphoïde, qui possède chez les oiseaux un certain nombre de particularités anatomiques :

- Il est basé sur deux organes lymphoïdes primaires que sont :
 - Le thymus, organe de maturation des lymphocytes T. Cet organe plurilobé, réparti le long des veines jugulaires, est fonctionnel à l'éclosion et évolue avec l'âge en organe lymphoïde secondaire.
 - La Bourse de Fabricius, actrice principale dans la maturation des lymphocytes B. Issu de la paroi dorsale du cloaque, il est également fonctionnel à l'éclosion et continue de se développer jusqu'à l'âge de 10 semaines, période où débute son involution, qui aboutit à l'âge de 22 semaines à la disparition complète de ce tissu chez le poulet.
- Durant ces 22 semaines, une migration des lymphocytes B émanant de cette bourse, permet de peupler les organes lymphoïdes périphériques, qui deviendront des réservoirs de lymphocytes B. Cette migration permet d'expliquer la présence de lymphocytes B, chez des individus ne possédant plus de bourse de Fabricius.
- Il ne possède pas de nœuds lymphatiques, sauf chez les palmipèdes (= ansériformes) qui présentent quelques rares paires de nœuds lymphatiques, dont la structure est cependant très différente de celle des mammifères.
- Le reste est un tissu lymphoïde diffus abondant, associé principalement aux muqueuses respiratoires et digestives, mais présent dans presque tous les organes, y compris les nerfs.

Au niveau digestif, on trouve quelques structures moins diffuses : les tonsilles à la jonction œsophage-proventricule, les plaques de Peyer le long de l'intestin, le diverticule de Meckel (ou diverticule vitellin) et les amygdales caecales à la jonction iléo-caecale.

Au niveau respiratoire, on trouve des BALT (Bronchus Associated Lymphoid Tissue).

Enfin, il faut citer la glande de Harder, qui est située en arrière de la membrane nictitante et qui joue un rôle majeur dans l'activation de la réponse mucoale notamment via la synthèse d'IgA sécrétoires [Davelaar *et al.* 1982]. Chez la poule, les larmes sont la seule sécrétion pour laquelle une production locale d'immunoglobulines a été mise en évidence ; dans les autres tissus, il semble que les IgA présentes soient arrivées par voie systémique [Dhinakar et Jones 1996].

Les types de vaccins utilisables

Deux grands types de vaccins sont utilisés : les vaccins vivants atténués et les vaccins inactivés ; chacun d'eux présente des avantages et des inconvénients (tab. 3) et possède par conséquent des indications différentes.

	Vaccins vivants atténués	Vaccins inactivés
<i>Avantages</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Peu onéreux - Permettent la vaccination de masse, par voie mucoale 	<ul style="list-style-type: none"> - Inoffensifs - Pas de réactions vaccinales (sauf adjuvants) - Pas de diffusion de souches vaccinales

	<ul style="list-style-type: none"> - Grand nombre de dose dans volume faible - Immunité d'apparition rapide - Immunité locale précoce possible 	<ul style="list-style-type: none"> - Protection élevée - Durée d'immunité longue - Association de valences possible
<i>Inconvénients</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Risque de réactions vaccinales - Diffusion de certaines souches - Durée d'immunité courte - Interférence avec anticorps maternels - Interférence entre virus à même tropisme 	<ul style="list-style-type: none"> - Prix plus élevé - Manipulation individuelle obligatoire - Volume important de stockage - Immunité d'apparition plus lente
<i>Indications</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Vaccinations économiques appliquées en masse - Vaccination précoce pour obtenir une immunité locale et générale rapide - Primo-vaccination 	<ul style="list-style-type: none"> - Essentiellement vaccinations de rappel chez les oiseaux de valeur économique importante (reproducteurs, poules pondeuses)

Tab. 2 : Avantages, inconvénients et indications des vaccins vivants atténués et des vaccins inactivés.

Les vaccins vivants sont pratiquement les seuls employés pour l'immunisation des volailles de chair, car il permettent une protection précoce et rapide des poussins (parfois moins de 15 jours pour la Bronchite Infectieuse aviaire par exemple) et offrent la possibilité de vacciner des effectifs importants en peu de temps.

Cependant, l'usage des vaccins vivants n'est pas possible pour certaines valences, à cause de la pathogénicité résiduelle des souches vivantes ; en effet, certains vaccins vivants provoquent une légère immunodépression qui peut interférer avec une autre prise vaccinale. Le meilleur exemple est l'utilisation de souches chaudes de vaccin Gumboro, qui empêchent la vaccination contre la maladie de Newcastle dans les jours qui suivent.

Pratiques de la vaccination

L'objectif premier de la vaccination est de développer une protection suffisante avant que les individus n'entrent en contact avec l'agent pathogène sauvage. Pour ce faire, il faudrait idéalement administrer une dose vaccinale à tous les individus d'un effectif ; cependant l'objectif de 100% n'est pas réalisable en pratique. En effet, sur des effectifs de plusieurs milliers d'animaux et ce quelque soit la méthode utilisée, certains individus ne seront pas correctement immunisés, soit parce qu'ils s'immuniseront mal (malgré une dose vaccinale correcte), soit parce qu'il n'auront pas reçu le dose complète. Pour atteindre un taux d'animaux vaccinés suffisant, estimé à 90% de l'effectif total, deux choix de pratique sont envisageables, la vaccination individuelle ou la vaccination de masse.

La vaccination individuelle

Cette pratique consiste en un traitement de tous les animaux un par un, soit par une injection (intramusculaire, sous-cutanée), soit par instillation (nasale ou oculaire). Elle permet de s'assurer que tous les individus reçoivent bien la dose vaccinale, mais est plus coûteuse en temps et en argent.

L'injection intramusculaire (*voie intramusculaire*) est réalisée dans les muscles de part et d'autres du bréchet et est utilisée principalement chez les reproducteurs et les poules pondeuses, chez qui la réaction fibreuse locale n'entraîne pas de dépréciation. Cette voie est la meilleure pour induire une réponse humorale et cellulaire

systémique, mais l'immunité locale, qu'elle provoque est moindre que celle obtenue par la voie nasale [Eo *et al.* 2001].

Chez les volailles de chair, l'injection sous-cutanée (*voie sous-cutanée*) est préconisée, car elle ne provoque pas de réaction locale. De plus, effectuée à la base du cou, elle présente une simplicité et une rapidité d'exécution indispensables pour la vaccination de plusieurs centaines d'animaux.

L'instillation nasale et le trempage de bec (*voie nasale*) sont encore très utilisés dans certains pays, notamment pour la vaccination contre la maladie de Gumboro. En effet, pour cette maladie comme pour toutes celles où une immunité locale et systémique est importante, il s'agit d'une voie permettant la stimulation de l'ensemble du système immunitaire, humorale et cellulaire, aussi bien au niveau local qu'au niveau systémique [Eo *et al.* 2001]. L'administration de poxvirus recombinant par cette voie permet par exemple une protection complète lors d'épreuve vaccinale avec un aérosol de *Mycobacterium tuberculosis* [Goonetilleke *et al.* 2003].

Enfin l'instillation oculaire ou goutte dans l'œil (*voie oculaire*) est une méthode de choix en matière d'intervention individuelle ; il s'agit même de la seule autorisée pour certains vaccins comme le vaccin contre la Laryngotrachéite Infectieuse ou le vaccin TS11 contre la mycoplasmosse. Grâce à la présence de la glande de Harder, elle permet de développer une immunité à la fois locale et systémique [Davelaar *et al.* 1982].

La vaccination de masse

Elle consiste à mettre en contact l'ensemble de l'effectif avec une source unique de vaccin, contenant la totalité des doses nécessaires pour traiter tous les individus. Les deux méthodes employées (vaccination par l'eau de boisson et vaccination par nébulisation) permettent de traiter la quasi-totalité d'un effectif en un temps réduit. De plus, l'administration par voie orale de poxvirus recombinant génère une réponse immunitaire mucoale (IgA) et systémique spécifique (IgG) contre les antigènes du vecteur et ceux du produits introduits dans le vecteur [Gherardi et Esteban 1999].

Cas de la vaccination in ovo

La vaccination *in ovo* est la dernière technique de vaccination développée, à mi-chemin entre la vaccination individuelle et la vaccination de masse. Elle est de plus en plus utilisée car elle bénéficie des avantages de la vaccination individuelle (principalement le fait que tous les œufs sont inoculés) et de certains avantages de la vaccination de masse (les œufs sont vaccinés par lots de plusieurs dizaines de milliers, ce qui permet un gain de temps considérable).

Cette technique est bénéfique pour les animaux, car elle permet d'induire une immunité plus précoce et de réduire le stress des oiseaux, mais elle l'est aussi pour le manipulateur, car le coût de la vaccination est réduit, les injections sont précises et uniformes et les contaminations sont réduites [Ricks *et al.* 1999].

Evaluation de la qualité de la vaccination

La première étape dans l'évaluation de la qualité de la vaccination est l'évaluation de la prise vaccinale. En pratique, elle passe par un contrôle sérologique, car c'est un moyen simple de savoir si l'individu a été en contact avec le vaccin ou pas. Mais ce contrôle a une limite : l'absence de relation directe entre niveau d'anticorps et protection, et donc il ne permet pas à lui seul de savoir si un individu est correctement protégé ou pas. Pour ce faire, le seul moyen parfaitement fiable est l'épreuve virulente, mise en œuvre pendant le développement d'un vaccin, pour

l'obtention de l'Autorisation de Mise sur le Marché (A.M.M.). Une fois le vaccin autorisé et utilisé sur le terrain, si la prise vaccinale est confirmée (c'est-à-dire si le taux d'anticorps est conforme aux valeurs annoncées par le fabricant du vaccin comme suffisante pour apporter une protection efficace), on considèrera que l'animal est protégé. Rappelons que l'analyse sérologique n'est pas pertinente pour certaines maladies, pour lesquelles la protection est essentiellement cellulaire (herpesviroses notamment).

Le titrage sérologique peut être réalisé à deux niveaux, local et systémique. Dans les deux cas, la technique la plus utilisée pour le dosage des anticorps est l'ELISA (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay). Les premiers dosages d'immunoglobulines sériques datent du début des années 90 [Schreiber *et al.* 1992] ; pour les dosages dans les sécrétions, il faut attendre la fin des années 90 [German *et al.* 1998]. Ce titrage peut également s'effectuer sur le vitellus, pour évaluer la transmission d'anticorps d'origine maternelle.

Les adjuvants : compléments indispensables pour une meilleure réponse

Le terme « adjuvant » dérive du latin *adjuvare* qui signifie aider, assister. Il désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément. Un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immunitaire, mais il doit l'orienter en fonction de l'infection contre laquelle il est employé. Ainsi chaque adjuvant est capable d'activer sélectivement les lymphocytes T de type Th2 ou les lymphocytes T de type Th1, qui correspondent aux deux grandes voies que la réponse immunitaire peut emprunter, à savoir respectivement la voie humorale et la voie cellulaire.

Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine diverses. Il est impossible d'en dresser une liste exhaustive, mais on peut cependant classer les adjuvants selon différents critères. Bien qu'il soit possible de les répartir en fonction de leur mode d'action, cette classification s'avère compliquée ; en effet, de nombreux d'adjuvants possèdent plusieurs propriétés et celles de chaque adjuvant sont loin d'être toutes connues. Il est donc plus simple de classer les adjuvants sur la base de leur nature chimique et/ou de leur origine [Horzinek *et al.* 1997].

Les adjuvants minéraux

Les principaux représentants de cette catégorie sont les sels (hydroxyde et phosphate) d'aluminium. Ce sont des précipités insolubles sur lesquels les antigènes sont adsorbés. Il existe des préparations standardisées, notamment pour l'hydroxyde d'aluminium, telles l'Alhydrogel® (Superfos, Danemark).

Ces sels stimulent la production d'anticorps via l'induction d'une réponse de type Th2 [Nicklas 1992]. Par ailleurs, ces adjuvants favorisent la captation par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en formant localement des agrégats multimoléculaires, stimulent les cellules non spécifiques (macrophages (Th1), ...) et activent le complément.

Les plus utilisés restent les sels d'aluminium. Ce sont d'ailleurs les seuls autorisés en médecine humaine, du fait principalement de leur grande sécurité (faible réaction locale uniquement).

Les copolymères synthétiques (« Non-ionic Block Polymers »)

Ces polymères amphipathiques sont le plus souvent composés de chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène (POE), et de chaînes hydrophobes de polyoxypropylène (POP). Ils sont surtout utilisés en tant qu'agents de surface au sein d'émulsions huile dans eau, où ils permettent la présentation de l'immunogène à la surface des gouttelettes huileuses, à la fois par l'établissement de ponts hydrogènes avec le POE et par des interactions hydrophobes avec le

POP. En faisant varier la longueur relative et l'agencement des « blocs » de POP et de POE, il est possible de générer toute une série de composés et de retenir ceux qui ont les meilleures propriétés tensioactives [Hunter 2002]

Ainsi les carbomères, comme le Carbopol, permettent d'obtenir des titres en anticorps plus élevés et plus durables (Th2) que les adjuvants minéraux, lors de vaccination contre la grippe équine [Mumford *et al.* 1994].

Carbohydrates

Les carbohydrates sont des polymères de mannose et/ou de β 1-3 glucose. L'acemannan, par exemple, est un polymère de mannose acétylé, extrait de l'*Aloe vera*. Il augmente la production des cytokines (TNF- α , INF- γ et interleukines 1 et 6), en stimulant notamment les macrophages (Th 1) [Ryan, 1998].

Les adjuvants huileux (« oil-based adjuvants »)

Cette catégorie regroupe les différents types d'émulsions.

Les adjuvants huileux classiques sont les émulsions « eau dans huile », où des gouttes de solution aqueuse d'antigènes sont dispersées dans une phase lipophile. Ces émulsions agissent par « effet dépôt » : ce terme regroupe différentes actions que sont la libération progressive de l'antigène au niveau du site d'injection, la protection contre les dégradations par l'organisme et l'effet corps étrangers, qui attire les cellules non spécifiques et active le complément. L'exemple type est l'AIF (Adjuvant Incomplet de Freund), une émulsion d'huile de paraffine contenant comme émulsifiant du mannide monooleate. Il peut induire une meilleure réponse en anticorps (Th2) que l'hydroxyde l'aluminium, mais est incapable de stimuler les types de réponses cellulaires (Th1) efficaces contre les tumeurs et contre beaucoup d'infections virales [Jensen *et al.* 1998].

Il existe également des émulsions « huile dans l'eau », comme la SAF (Syntex Adjuvant Formulation), qui est composé de squalane (forme saturée du squalène), dispersé par un copolymère synthétique (le Pluronic L121), et de Thréonyl-MDP. Le principal intérêt de cette préparation, par ailleurs très performante, est son innocuité. La structure particulière de ces préparations est la base de leur efficacité, car elle favorise, d'une part, la captation par les CPA et fixe, d'autre part, le composant C3b du complément [Allison et Byars 1992]. Lors de l'administration, la phase aqueuse se disperse rapidement et les gouttelettes lipidiques transportent l'antigène jusque dans les formations lymphoïdes, permettant ainsi d'exercer un effet ciblage (ou « targeting ») au niveau local et au sein du tissu lymphoïde. La stimulation des lymphocytes T de type Th1 par la SAF favorise la production d'IFN γ , ce qui entraîne une importante production d'anticorps de type IgG2a chez la souris [Allison et Byars 1992].

Les constituants bactériens

Ce sont, à l'origine, uniquement des bactéries entières inactivées (par exemple différentes espèces de *Salmonella*). L'ACF (Adjuvant Complet de Freund) associe une mycobactérie inactivée par la chaleur, *Mycobacterium tuberculosis*, à l'émulsion huileuse citée ci-dessus (AIF).

L'ACF, bien qu'encore utilisé en expérimentation, présente des effets secondaires sévères, liés à la présence de fragments de mycobactéries. Cela explique que les nouveaux adjuvants sont formés à partir de sous-unités bactériennes, comme les antigènes de paroi (MDP = Muramyl dipeptide, ou N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) ou les endotoxines (LPS = lipopolysaccharide). Le LPS n'est utilisable que pour les études *in vitro*, du fait de ses effets toxiques marqués. Par contre, le MPL (monophosphoryl lipide), obtenu par traitement du LPS à l'acide chlorhydrique, est beaucoup moins toxique et conserve son efficacité en tant qu'adjuvant.

Tous ces adjuvants présentent des motifs moléculaires propres aux bactéries et sont capables d'activer les mécanismes de défenses non spécifiques [O'Hagan 2001]. On peut noter cependant que tous les constituants bactériens n'ont pas la même action sur le système immunitaire, puisque le MDP, administré en solution aqueuse, privilégie la réponse de type Th2, alors que le MPL favorise une réponse de type Th1 [Cox et Coulter 1997].

L'ACF pourrait être un excellent adjuvant, puisqu'il est un puissant activateur non seulement de la réponse humorale (Th2), par l'effet dépôt de l'émulsion, mais aussi de la réponse cellulaire (Th1), suite à l'activation de l'immunité non spécifique par les extraits mycobactériens [Billiau et Matthys 2001]. Cependant, il présente de nombreux inconvénients qui en limitent l'utilisation, autant pour l'animal (abcès, granulomes, nécrose cutanée, polyarthrite, réaction anaphylactique lors d'utilisation multiple...) que pour le manipulateur (viscosité extrême rendant l'injection difficile, lésions douloureuses difficiles à traiter en cas de piqûre accidentelle, qui peuvent conduire à la nécrose et l'amputation d'un doigt...).

Les toxines bactériennes

Elles sont utilisables sous forme entière (toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, chez les animaux), sous-unitaire (sous unité B de la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, chez l'homme), inactivée (toxine pertussique de *Bordetella pertussis*) ou encore mutée (« labile toxin », toxine thermolabile d' *E. coli*). Elles induisent une réponse de type Th2, ainsi qu'une production d'IgA sécrétoires au niveau des muqueuses [Horzinek *et al.* 1997 ; Moingeon *et al.* 2001].

Les oligodésoxynucléotides CpG

Ils sont formés par le regroupement de plusieurs « motifs CpG ». Ces motifs sont des dinucléotides propres au génome des procaryotes, reconnus de manière non spécifique par le système immunitaire et de plus en plus utilisés comme adjuvants [Zimmerman *et al.* 2003]. Ils permettent d'induire une réponse très fortement orientée Th1, et permettent même d'inhiber une réponse Th2 déjà en place et de la réorienter en Th1 [Chu *et al.* 1997].

Les cytokines

Ces protéines de faible poids moléculaire agissent directement en leur qualité de médiateurs de la réponse immune, et à ce titre pourraient permettre d'orienter cette réponse de façon très précise. C'est par leur intermédiaire qu'agissent tous les autres immunostimulants.

De nombreuses recherches concernant les cytokines se focalisent actuellement sur la cible importante que constituent les cellules dendritiques. Ce sont elles qui *in fine* font le lien entre l'immunité innée et la réponse spécifique. Les interférons de type I, parmi lesquels l'IFN α , activent les cellules dendritiques et leur permettent d'activer à leur tour les cellules T. Ils induisent à la fois une réponse de type CTL (Th1) et une réponse humorale (Th2), et constituent des adjuvants potentiellement efficaces contre les infections virales [Rizza *et al.* 2002]

Les saponines et les «ImmunoStimulating COMplexes »

Les saponines, substances d'origine essentiellement végétale, sont des agents tensioactifs amphipathiques utilisés dans divers secteurs industriels comme détergents et émulsifiants. Les extraits bruts hétérogènes et aux effets peu prévisibles ont aujourd'hui fait place à des préparations standardisées telles que le Quil-A[®] (Superfos, Danemark), ainsi qu'à des saponines pures (QS-7, QS-21,...). Les saponines sont capables d'interagir avec le

cholestérol pour former des pores dans les membranes cellulaires. Cette propriété leur confère des effets toxiques, mais elle est aussi à la base de la mise au point des ISCOMs («ImmunoStimulating COMplexes»). Il s'agit de structures vésiculaires d'environ 35 nm de diamètre, ayant l'aspect d'une cage, et facilement préparées en mélangeant du Quil-A[®], du cholestérol et de la phosphatidylcholine. Le Quil-A[®] et le cholestérol forment la structure du complexe, et la phosphatidylcholine, moins rigide, permet l'incorporation d'un antigène amphipathique par son domaine hydrophobe.

Les préparations de saponines les plus utilisées sont le QS-21 et le Quil-A[®]. Elles induisent une réponse de type CTL (Th1) et une importante production d'IgG2a (Th2). Les autres sous-classes d'anticorps sont toutefois elles aussi significativement augmentées.

Les ISCOMs induisent également une réponse mixte Th1/Th2, par ciblage des CPA, et sont capables en particulier de stimuler la présentation des antigènes en association avec le CMH I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I) aux lymphocytes T cytotoxiques.

Les adjuvants vésiculaires

La structure de base de ces adjuvants est une bicouche lipidique de composition variable, délimitant une microsphère aqueuse, et dont les propriétés physicochimiques peuvent être modifiées par l'ajout d'agents tensioactifs. Ils comprennent surtout les liposomes et les enveloppes virales reconstituées ou virosomes. Selon son caractère plus ou moins hydrophobe ou hydrophile, l'agent immunogène peut être adsorbé à leur surface, inséré dans leur membrane, ou contenu dans leur phase aqueuse. Le résultat est une réponse mixte caractérisée par des taux en anticorps élevé (Th2) et une activité CTL (Th1) [Vermout *et al.* 2003].

Les amines lipophiles

Ces composés portent d'une part un ou plusieurs groupements aminés, chargés positivement, et de l'autre de longues chaînes hydrocarbonées de dix atomes de carbone ou plus. Cette structure permet la formation de micelles en solution aqueuse. Deux molécules de ce type sont actuellement utilisées en tant qu'adjuvants. Il s'agit principalement du DDA (dimethyl-dioctadecyl-ammonium bromide ou chloride, une amine quaternaire), qui apparaît comme le plus actif, et d'un composé analogue, l'avridine.

Le DDA s'avère être un puissant activateur de l'immunité à médiation cellulaire (Th1) [Hilgers et Snippe 1992], mais il est peu efficace pour stimuler la production d'anticorps (Th2). Les effets secondaires réduits du DDA en font un candidat valable pour des vaccins vétérinaires.

Les imidazoquinolones

L'imiquimod, ainsi que d'autres membres de cette famille, sont de petites molécules capables d'agir sur certains récepteurs membranaires des macrophages et d'autres cellules immunitaires, modulant ainsi la synthèse de cytokines par ces cellules.

L'imiquimod et le resiquimod augmentent de façon considérable la sécrétion d'IFN α , de TNF α et d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques ; cela a pour effet d'orienter la réponse immune dans la direction Th1, et de générer des cellules cytotoxiques [Dockrell et Kinghorn 2001 ; Stanley 2002].

Les polysaccharides

Les dextrans, mannanes, glucanes, ... ont été utilisés en tant qu'adjuvants. Les chitosans, polymères obtenus par désacétylation de la chitine, semblent constituer des véhicules efficaces au niveau des muqueuses, en raison notamment de leur capacité à perméabiliser les muqueuses vis-à-vis des antigènes [Van der Lubben 2001].

Dans le contexte actuel, la recherche de nouvelles approches vaccinales chez les volailles fait l'objet de nombreuses études. Nous venons de voir l'intérêt croissant des poxvirus dans cette recherche, ainsi que les différents paramètres pouvant faire varier la réponse vaccinale chez les volailles. Nous nous proposons donc, dans la suite de cette étude, d'évaluer le virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez les volailles.

Partie 2 : Etude expérimentale

Dans cette étude, le virus myxomateux a été évalué en tant que vecteur vaccinal chez le poulet. Pour ce faire, deux études successives ont été réalisées pour comparer différents protocoles vaccinaux. Dans la première étude, une souche atténuée recombinante du virus myxomateux a été inoculée par différentes voies d'inoculation. La seconde étude a permis d'observer l'influence de l'adjuvant utilisé, ainsi que l'effet apporté par une inoculation de rappel.

Matériel et méthodes

Virus

La souche vaccinale utilisée est un vaccin recombinant, ayant pour base une souche atténuée du virus myxomateux (SG 33) dans le génome duquel a été introduit le gène codant pour la protéine VP60 du virus de la maladie hémorragique du lapin.

Pour la première manipulation, la souche Rec 26b P18, titrée à $3,9 \cdot 10^6$ pfu/ml le 17.03.2004 a été employée ; pour la seconde manipulation, il s'agit de la souche Rec 26b P19, titrée le 01.02.2006 à $7,5 \cdot 10^7$ pfu/ml.

Poulets

Les prélèvements de sérum et de larmes ont été réalisés sur 21 poulets âgés de 6 semaines (lors de l'inoculation), dans la première manipulation, et sur 29 poulets de 25 jours (lors de la primo-vaccination), dans la seconde.

L'eau et la nourriture ont été fournies à volonté.

Essai de différentes voies d'inoculation

Les 21 poulets ont été identifiés par bagues, puis répartis aléatoirement dans 5 groupes : A (4 individus), B (4 individus), C (4 individus), D (5 individus) et T (4 individus).

Les individus du groupe A ont reçu une injection sous-cutanée (SC) de 500 μ l de virus SG33-VP60 (souche Rec 26b P18) ; ceux du groupe B ont reçu la même dose de la même souche par voie intra-musculaire (IM).

Les individus du groupe C ont reçu 50 μ l (sous forme de gouttes) dans chaque œil du même inoculum.

Les individus du groupe D ont reçu une dose de vaccin adjuvé, composée de 500 μ l de la même souche adjuvé de 25 μ l d'hydroxyde d'aluminium (ALHYDROGEL[®]).

Les individus du groupe T sont les individus témoins, ils n'ont pas été inoculés.

Le suivi post vaccinal a été effectué pendant 30 jours.

Pour le suivi sérologique systémique (IgY), 2 à 3 ml de sang ont été prélevés par ponction de la veine alaire à J0, J10, J20 et J30 post-inoculation, et placés au réfrigérateur (+4°C) pendant une nuit. Le lendemain, les caillots ont été fragmentés et laissés à exsuder à température ambiante (+20°C) pendant 2 heures. Les sérums ont été récoltés, centrifugés à 2000 g pendant une minute, afin de récolter 200 μ l de sérum purifié, placés au congélateur (-25°C) en attendant l'analyse par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Pour le suivi sérologique (IgA et IgY) dans les sécrétions lacrymales, environ 5 mg de cristaux de chlorure de sodium [Dhinakar Raj et Jones 1996] ont été placés dans chaque œil afin d'accroître les sécrétions lacrymales puis 50 à 100 μ l de larmes ont été récoltés à l'aide d'une micropipette et placés au congélateur (-25°C) en attendant

l'analyse par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Ces manipulations ont été effectuées à J20 et J30 post-inoculation.

Essai de différents adjuvants et évaluation de l'effet rappel

Les 29 poulets ont été identifiés par bagues, puis répartis aléatoirement dans 7 groupes : A, B, C, D, E et F (4 individus par groupe) et T (5 individus).

Les individus des groupes A à F ont reçu une injection intramusculaire (IM) de 500 μ l de virus SG33-VP60 (souche Rec 26b P19). Les individus du groupe T sont les témoins, ils n'ont pas été inoculés.

Les lots A et B ont reçu des vaccins non adjuvés.

Les lots C et D ont reçu des vaccins adjuvé Carbopol, préparés comme suit : 22 mg de Carbopol sont mis en solution dans 5,5 ml de DMEM. De la soude 2N est ajouté jusqu'au changement de coloration du DMEM ; enfin 4,5 ml de cette préparation sont mélangés à 4,5 ml de virus, afin d'obtenir une concentration de 2 mg/ml de Carbopol par dose vaccinale.

Les lots E et F ont reçu des vaccins adjuvés FIA (Adjuvant Incomplet de Freund), l'émulsion est préparée extemporanément en mélangeant 4,5 ml de virus à 4,5 ml d'adjuvant.

21 jours après la primo-vaccination, les individus des lots A, C et E ont reçu un injection de rappel, préparée avec la même souche, le même adjuvant et le même protocole que pour la primo-vaccination.

Le suivi post vaccinal a été effectué pendant 40 jours.

Pour le suivi sérologique systémique (IgY), des prélèvements à J0, J21, J30 et J40 ont été réalisés et analysés comme pour l'essai des différentes voies d'inoculation (cf. ci-dessus).

Dosage des immunoglobulines par ELISA

Le protocole ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) est décrit dans l'annexe 1 ; les éléments en italique représentent les étapes qui varient d'un dosage à l'autre, en fonction de la nature du prélèvement analysé et du type d'immunoglobulines recherché.

Résultats

Etudes préliminaires concernant les ELISA

Pour chaque échantillon, le titre en anticorps correspond à la plus faible dilution pour laquelle la densité optique de l'échantillon est supérieure ou égale à 1,5 fois celle du témoin négatif poulet. Lorsqu'un échantillon a été analysé à plusieurs reprises, son titre correspond à la moyenne de tous les titres obtenus.

Dilution des anticorps anti-immunoglobulines de type Y de poulet

Pour déterminer la dilution finale à utiliser pour les anticorps anti-immunoglobulines de type Y de poulet, une première manipulation a été effectuée avec deux dilutions différentes : 1/5000^{ème} et 1/10000^{ème}. Pour chacune de ces deux dilutions, le rapport entre la densité optique du témoin positif poulet (individu D5 ; J10) et celle du témoin négatif poulet a été reporté dans le tableau 3.

Dilution Ac anti-IgY \ Dilution sérums	1/20 ^{ème}	1/40 ^{ème}	1/80 ^{ème}	1/160 ^{ème}
1/5000 ^{ème}	1,20	1,14	1,53	1,46
1/10000 ^{ème}	1,64	1,78	1,73	1,89

Tab. 3 : Rapport entre les densités optiques des témoins positif et négatif poulet pour les différentes dilutions des sérums et pour chacune des dilutions des anticorps anti-immunoglobulines de type Y du poulet.

On note que, quelque soit la dilution des sérums, le rapport des densités optiques est plus élevé au 1/10000^{ème}. C'est pourquoi la dilution au 1/10000^{ème} des anticorps anti-immunoglobulines de type Y de poulet a été privilégiée et utilisée pour la suite des dosages.

Durée d'incubation du substrat PNPP

Cette durée d'incubation est le temps nécessaire et suffisant pour obtenir l'hydrolyse par toutes les enzymes présentes (alcaline phosphatase) du substrat PNPP en un produit de couleur jaune (PNP). La densité optique varie donc en fonction de la quantité d'enzymes présentes.

La manipulation a consisté en la mesure des densités optiques toutes les deux minutes pendant 31 minutes. Les rapports entre les densités optiques des témoins positif et négatif lapin d'une part, et des témoins positifs et négatifs poulet d'autre part, a été calculé pour chaque mesure.

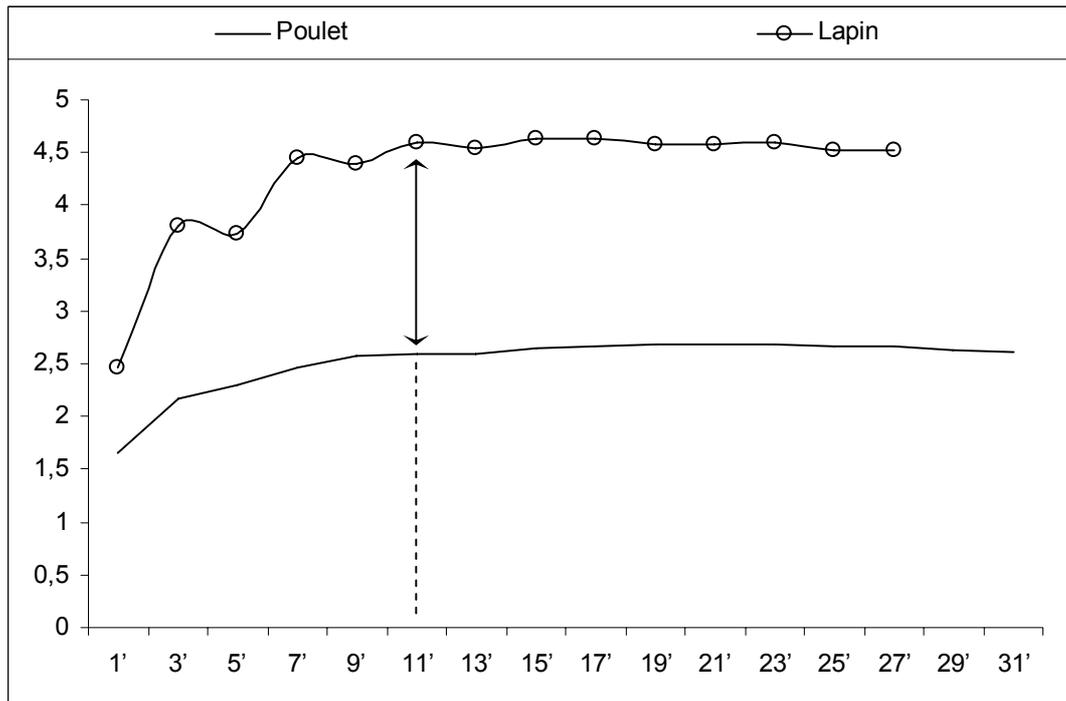


Fig. 5 : Sensibilité des dosages ELISA, estimée par l'évolution des rapports entre les témoins positif et négatif lapin, d'une part, et les témoins positif et négatif poulet, d'autre part, en fonction du temps.

Sur la figure 5, on note que pour les deux rapports un plateau est observé à partir de la 11^{ème} minute (flèche). Il a donc été décidé d'effectuer les lectures de densités optiques 12 minutes après l'addition du substrat chromogène.

Evaluation de la réponse immunitaire locale

Cette évaluation est basée sur le dosage des immunoglobulines de type Y et de type A dans les sécrétions lacrymales et a été effectuée uniquement sur les 4 individus ayant reçu l'inoculum par voie locale (gouttes dans l'œil).

Seuls 2 individus présentent une légère réponse immunitaire dans les sécrétions lacrymales, à J20 avec des titres en immunoglobulines de type Y égaux à 40, mais cette réponse est de courte durée, puisqu'à J30 les titres des 4 individus sont inférieurs à 40.

En ce qui concerne les immunoglobulines de type A, aucune réponse n'a été observée.

Evaluation de la réponse humorale systémique

Elle a été réalisée par dosage dans les sérums des immunoglobulines de type Y dirigées contre le vecteur (virus myxomateux) et le produit du transgène (VP60).

Réponse dirigée contre le vecteur

En ce qui concerne les anticorps dirigés contre le vecteur, la seule réponse humorale observée est faible et de courte durée ; en effet, seul un individu, inoculé d'un vaccin adjuvé avec de l'hydroxyde d'aluminium, présente un titre moyen de 53 (40, 40 et 80) à J10 et ce titre chute à moins de 20 dès J20.

Etant donnée l'absence de réponse immunitaire décelée vis-à-vis du vecteur (virus myxomateux) dans tous les autres prélèvements (la totalité des titres en anticorps anti-myxomatose, hormis celui cité ci-dessus, sont inférieurs à 20), l'évaluation de la réponse systémique est réalisée sur la réponse dirigée contre le produit du transgène.

Réponse dirigée contre le transgène

Influence de la voie d'inoculation :

Pour les individus inoculés par voie oculaire, compte tenu de la faible réponse locale, la recherche d'anticorps anti-myxomatose n'est effectuée que sur les sérums correspondant aux deux prélèvements ayant présenté une légère réponse locale. Les titres en anticorps sont inférieurs à 20. La recherche des anticorps anti-VP60 révèle également des titres inférieurs à 20.

Pour les individus inoculés par voie sous-cutanée, un seul individu présente une réponse faible, précoce et de courte durée vis-à-vis du transgène VP60, caractérisée par un titre en anticorps égal à 40 à J10, qui chute et devient inférieur à 20 dès J20.

Enfin, en ce qui concerne l'inoculation par voie intramusculaire, deux individus présentent une réponse tardive et faible vis-à-vis du transgène, avec des titres en anticorps égal à 40 à J40.

En conclusion, aucune voie ne semble conférer une immunité plus importante que les autres. Cependant, pour évaluer l'effet des différents adjuvants ainsi que l'effet d'une injection de rappel, la voie intramusculaire est privilégiée car il s'agit de la voie d'inoculation individuelle qui permet d'induire la meilleure réponse humorale [Eo *et al.* 2001].

Influence de la nature de l'adjuvant :

Pour les différents lots et les différentes dates, les moyennes des titres en anticorps anti-VP60 ont été calculées et reportées dans la figure 6.

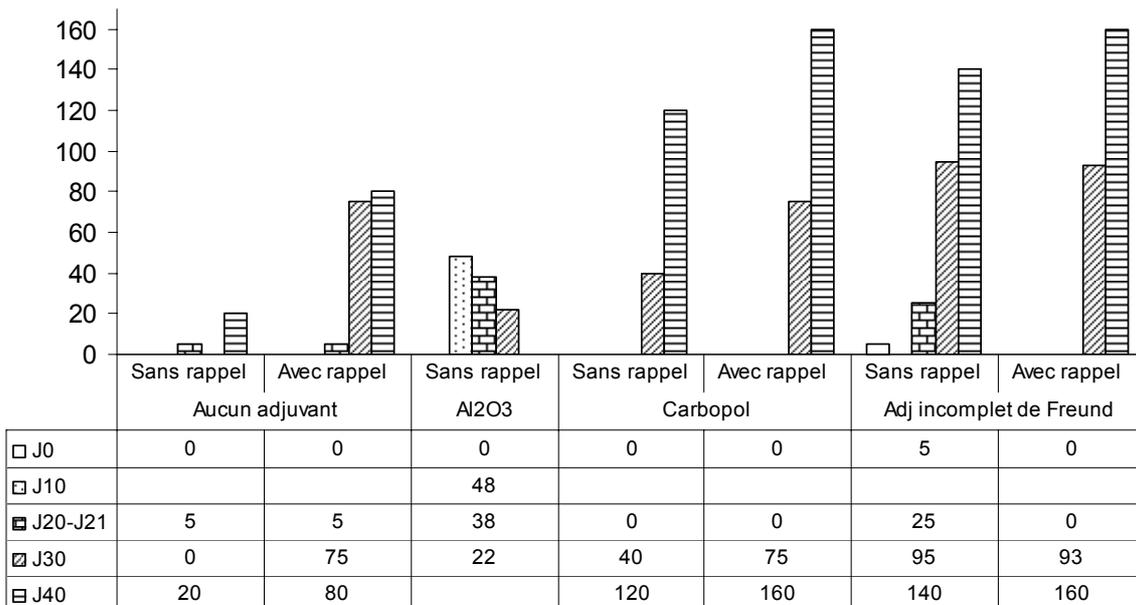


Fig. 6 : Evolution des titres moyens en anticorps anti-VP60 en fonction du temps, réparties par lot ; chaque lot étant caractérisé, d'une part, par l'adjuvant utilisé et, d'autre part, par la réalisation ou non d'une injection de rappel.

Remarque 1 : Afin de permettre le calcul, les titres inférieurs au seuil (20) ont été considérés comme égaux à 0 et les titres supérieurs à 160 comme égaux à 160.

Remarque 2 : Pour la série « adjuvant incomplet de Freund (FIA), sans rappel », la moyenne à J0 n'est pas égale à 0, car un des 4 individus présente un titre égale à 20.

L'hydroxyde d'aluminium (Al_2O_3) permet uniquement l'obtention d'une réponse faible et transitoire envers le produit du transgène. En effet, la réponse est maximale à J10 (titre moyen = 48) et diminue progressivement jusqu'à J30.

En l'absence de rappel, le carbopol et l'adjuvant incomplet de Freund entraînent des titres moyens plus élevés que l'hydroxyde d'alumine. En moyenne, l'adjuvant incomplet de Freund permet une meilleure réponse que le carbopol.

Pour les lots ayant reçu deux injections vaccinales, la réponse immunitaire obtenue avec le carbopol est similaire à celle obtenue avec l'adjuvant incomplet de Freund.

Evaluation de l'effet rappel :

En l'absence d'adjuvant, l'injection de rappel permet d'obtenir des titres en anticorps, dirigés contre le produit du transgène, significativement plus élevés. En effet, alors qu'en l'absence de rappel, seuls deux individus présentent une réponse immunitaire modérée (titres égaux à 40 à J40), trois des quatre individus ayant reçu une seconde injection présentent des titres supérieurs ou égaux à 80 à J40. L'inoculation de rappel permet également d'obtenir une immunité plus précoce ; dans le lot avec rappel, le titre moyen en anticorps anti-VP60 à J30 est égal à 75, alors qu'en l'absence de rappel, aucune réponse n'est décelée (titre moyen inférieur à 20).

Pour les lots ayant reçu des vaccins adjuvés carbopol, les titres moyens en anticorps sont plus élevés dans le lot ayant eu une injection de rappel.

Pour les lots ayant reçu des vaccins adjuvés FIA, les titres en anticorps sont similaires dans les deux lots, avec et sans rappel.

Discussion

A l'heure actuelle, des vaccins à base de poxvirus sont déjà utilisés en aviculture, notamment le vaccin recombinant Fowlpox-H5, commercialisé aux USA puis en Asie pour lutter contre les infections à virus influenza aviaire de sous-type H5 (Provac[®], Merial[®]). Le principal problème lié à l'utilisation de vecteur homologue comme le Fowlpox est la présence possible d'une immunité prévacinale dirigée contre le vecteur, qui limite l'efficacité du vaccin. Cette immunité est observée dans deux cas : suite à une vaccination contre la variole aviaire ou après le passage d'une souche sauvage. Ce dernier cas est le plus difficile à identifier car il arrive que le passage du virus se fasse à bas bruit et provoque une immunité, sans pour autant occasionner de cas cliniques. Cet inconvénient majeur justifie les recherches actuelles sur l'utilisation de vecteurs non homologues, c'est-à-dire dont l'espèce cible n'est pas l'espèce à laquelle le vaccin est destiné. Dans cette optique, le virus myxomateux présente l'avantage d'avoir montré sa capacité à se répliquer *in vitro* sur des cultures cellulaires aviaires. Malgré tout, pour ces vaccins hétérologues, aucune diffusion n'a à ce jour été mise en évidence *in vivo* et le virus pourrait rester localisé au site d'injection. L'efficacité du vaccin repose donc uniquement sur la faculté de réplication du virus au site d'inoculation. C'est pour cette raison que les recherches pour améliorer l'efficacité du vaccin passent par l'étude de différentes modalités d'inoculation et de l'utilisation d'adjuvant permettant un recrutement maximal de cellules immunitaires au point d'injection.

Les résultats de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence la supériorité d'une voie d'inoculation par rapport aux autres. Ainsi, pour obtenir une meilleure réponse, d'autres modalités d'inoculation, et notamment l'administration *in ovo*, sont à envisager. Par ce mode d'inoculation, la vaccination d'un grand nombre d'individus est rendue plus simple et plus rapide et la réponse immunitaire, obtenue vis-à-vis d'un vaccin recombinant, est similaire à celle obtenue lors d'inoculation intramusculaire [Kapczynski DR *et al.* 2003]. De plus, l'administration dans le liquide embryonnaire pourrait permettre d'augmenter le nombre de cellules en contact avec le virus et ainsi contrer l'absence de diffusion des vaccins non homologues. Elle présente cependant un inconvénient pour les études expérimentales : l'âge des individus ; en effet, il n'est pas évident de réaliser un suivi sérologique sur des animaux très jeunes, du fait du faible volume sanguin et de la taille réduite des veines de ces animaux.

En ce qui concerne l'influence du protocole vaccinal, il semble clair que la réalisation d'une injection de rappel permet d'obtenir des titres en anticorps plus élevés, puisque, même si les différences ne sont pas toujours significatives, les titres moyens des lots, inoculés à deux reprises sont plus élevés que ceux des lots n'ayant reçu qu'une injection. Cependant, il a été montré que l'effet rappel est optimal si la seconde injection est effectuée lorsque la réponse immunitaire provoquée par la première inoculation a dépassé son apogée et commence à décroître. Or on note dans cette étude qu'en l'absence de rappel, les titres en anticorps sont croissants jusqu'à J40 pour la majorité des individus. Il est donc possible que la réalisation d'un rappel à 3 semaines soit un peu précoce et qu'une étude, dans laquelle différentes durées entre la primo-vaccination et le rappel seraient comparées, permettrait d'optimiser l'efficacité de la seconde injection.

Un autre point à aborder est la qualité de l'évaluation de la réponse immunitaire. Dans cette étude, seule la réponse humorale a été testée, or il a été démontré que la réponse cellulaire jouait un rôle crucial dans l'immunité,

notamment lorsqu'il s'agit de pathogènes intracellulaires, comme c'est le cas pour les poxvirus. Des vaccins, issus de ces derniers, ont d'ailleurs été utilisés récemment, pour induire une réponse cellulaire, complémentaire de la réponse humorale, provoquée par un vaccin à base de protéines sous-unitaires [Moore et Hutchings 2007]. De plus des études sur le vaccin recombinant Fowlpox-H5 ont montré que cette souche permettait, lors d'épreuve virulente, d'obtenir une protection correcte chez des individus ne possédant pas d'anticorps. Ces deux exemples prouvent que la réponse cellulaire a une place importante dans la réponse immunitaire vis-à-vis du vaccin. C'est pourquoi, le dosage des cytokines, en parallèle des sérologies, permettrait peut-être d'obtenir un meilleur aperçu de la réponse induite par l'utilisation de poxvirus en tant que vecteur vaccinal.

Cependant, les outils disponibles actuellement pour ces dosages sont encore à l'étude. Ces études portent sur deux grands axes :

- D'une part la quantification par RT-PCR quantitative des ARN messagers des cytokines spécifiques des voies Th1, Th2 ou inflammatoire.
- D'autre part l'utilisation de test de cytotoxicité ou de prolifération lymphoblastiques, qui permettent d'analyser la capacité des lymphocytes à s'activer lorsqu'ils sont mis en contact avec l'antigène.

Le dernier paramètre étudié est la nature de l'adjuvant utilisé. Les adjuvants sont un élément clé des études vaccinales car ils peuvent agir sur l'ensemble des étapes de la réponse immunitaire : ils attirent les cellules immunitaires vers le site d'injection, stimulent la réponse et l'orientent vers une réponse de type cellulaire, humorale ou mixte et enfin permettent un relargage prolongé du virus. L'un des critères de choix des adjuvants dans notre étude, a été la capacité à induire une réponse de type Th2 optimale. Dans l'optique où la réponse de type Th1 serait prise en compte, l'utilisation d'adjuvants induisant des réponses mixtes (Th1 et Th2) (exemple : ISCOMs), voire une réponse uniquement cellulaire (exemple : Carbohydrates, tels que l'Acemannan), doit être envisagée. Parmi les adjuvants induisant une réponse cellulaire, il est possible d'affiner encore le choix car ils n'attirent pas tous les mêmes types cellulaires. L'objectif est donc de trouver l'adjuvant permettant d'attirer les cellules les plus pertinentes pour le vaccin utilisé. Ainsi, l'Acemannan permet par exemple de stimuler l'activité des cellules dendritiques.

Conclusion

Cette étude avait pour but d'évaluer le virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez les volailles. Les différentes analyses réalisées ont mis en évidence une réponse immunitaire variable selon la voie d'inoculation, la nature de l'adjuvant utilisé et le protocole vaccinal (essais avec ou sans rappel de vaccination) et dans la plupart des cas, les effectifs réduits et la variabilité individuelle n'ont pas permis de conclure à un effet significatif de telle ou telle variable (voie, adjuvant ou protocole).

Malgré tout, la présence d'une réponse modérée dirigée contre le produit du transgène dans certaines conditions permet d'envisager d'autres études incluant de nouvelles variables. En utilisant un vecteur non homologue, l'efficacité du vaccin repose principalement sur sa capacité à engendrer une réponse immunitaire la plus forte possible au site d'injection. C'est pour cette raison que les études à venir doivent porter d'autres modalités d'inoculation telles que l'administration *in ovo*, et surtout, sur l'utilisation d'adjuvants permettant d'optimiser la réponse immunitaire.

Cependant, l'évaluation de la réponse de l'organisme infecté par le dosage des anticorps ou l'étude des cytokines, n'est qu'une étape dans l'évaluation de l'efficacité du vaccin. En effet, le seul test réellement probant est l'épreuve virulente, car il se peut qu'une réponse immunitaire faible soit suffisante pour offrir une protection efficace, ou à l'inverse qu'une réponse même élevée ne permette pas de protéger correctement les individus vaccinés. Ainsi, l'évaluation du virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez les volailles devra passer par la construction de nouveau virus recombinant incluant des transgènes, issus de virus aviaire, permettant d'envisager la réalisation d'épreuve virulente. De telles constructions sont en cours au laboratoire et permettront de conclure quant à la faisabilité de l'utilisation du virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez les volailles.

Références

-	Allison AC, Byars NE. Syntex Adjuvant Formulation. <i>Res. Immunol.</i> 1992 ; 143 : 475-582.
-	Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, <i>et al.</i> Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. <i>J. Virol.</i> 1996 ; 70 : 5061-5066.
-	Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. <i>J. Leukoc. Biol.</i> 2001 ; 70 : 849-860.
-	Broyles SS, Liu X, Zhu M, Kremer M. Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promoter activator. <i>J. Biol. Chem.</i> 1999 ; 274 : 35662-35667.
-	Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. <i>J. Exp. Med.</i> 1997 ; 186 : 1623-1631.
-	Cox JC, Coulter AR. Adjuvants : a classification and review of their mode of action. <i>Vaccine</i> 1997 ; 15 : 248-256.
-	Cox Wi, Tartaglia J, Paoletti E. Recombinant poxviruses. <i>Ed. Press C. Binns MM and Smith GL</i> , Boca Raton, 1992 : 123-162.
-	Davelaar FG, Noordzij A, Van der Donk JA. A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the Harderian Gland of the Fowl after eye drop vaccination against infectious bronchitis at 1-day-old. <i>Avian Path.</i> 1982 ; 11 : 63-79.
-	Dhinakar Raj, Jones RC. Local antibody production in the oviduct and gut of hens infected with a variant strain of infectious bronchitis virus. <i>Vet. Immunol. Immunopathol.</i> 1996 ; 53 : 147-161.
-	Dockrell DH, Kinghorn GR. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. <i>J. Antimicrob. Chemother.</i> 2001 ; 48 : 751-755.
-	Drillien R, Spehner D, Autran B, Garin D. Les poxvirus: une famille de vecteurs. <i>Virologie</i> 2003 ; 7 : 243-253.
-	Eo SK, Gierynska M, Kamar AA, Rouse BT. Prime-boost immunization with DNA vaccine : mucosal route of administration changes the rules. <i>J. Immunol.</i> 2001 ; 166 : 5473-5479.
-	Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1986 ; 83 : 8122-8126.
-	German AJ, Hall Ej, Day MJ. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. <i>Vet. Immunol. Immunopathol.</i> 1998 ; 64 : 107-121.
-	Gherardi MM, Esteban M. Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. <i>Vaccine</i> 1999 ; 17 : 1074-1083.
-	Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM , Anderson RJ, Brookes Rh, Hill AV. Enhanced immunogenicity

	and protective efficacy against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> of bacilli Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. <i>J. Immunol.</i> 2003 ; 171 : 1602-1609.
-	Hilgers LAT, Snippe H. DDA as an immunological adjuvant. <i>Res. Immunol.</i> , 1992 ; 143 : 494-501.
-	Horzinek MC, Schijns V.E.C.J., Denis M, Desmettre P, Babiuk LA. Adjuvants and vehicles. In : Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P., Verschueren C. (Eds.), <i>Vet. Vacc.</i> Elsevier : Amsterdam, 1997, 140-148.
-	Hruby DE. Vaccinia virus vectors : news strategies for producing recombinant vaccines. <i>Clin. Microbiol. Rev.</i> 1990 ; 3 : 153-170.
-	Hu L, Ngichabe C, Trimarchi CV, Esposito JJ, Scott FW. Raccoon poxvirus live recombinant feline panleukopenia virus VP2 and rabies virus glycoprotein bivalent vaccine. <i>Vaccine</i> 1997 ; 15 : 1466-1472.
-	Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants : present and future. <i>Vaccine</i> 2002 ; 20 : Suppl 3, S7-12.
-	Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 1998 ; 32 : 173-186.
-	Kapczynski DR, Hilt DA, Shapiro D, Sellers HS, Jackwood MW. Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. <i>Avian Dis.</i> 2003 ; 47(2) : 272-85.
-	Letellier C, Burny A, Meulemans G. Construction of a pigeonpox virus recombinant : expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. <i>Arch. Virol.</i> 1991 ; 118 : 43-56.
-	Merchlinsky M, Eckert D, Smith E, Zauderer M. Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. <i>Virology</i> 1997 ; 238 : 444-451.
-	Merchlinsky M, Moss B. introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by <i>in vitro</i> ligation : recombination-independent selectable cloning vectors. <i>Virology</i> 1992 ; 190 : 522-526.
-	Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. <i>Vaccine</i> 2001 ; 19 : 4363-4372.
-	Moore AC, Hutchings CL. Combination vaccines: synergistic simultaneous induction of antibody and T-cell immunity. <i>Expert Rev Vaccines.</i> 2007 Feb ; 6(1) : 111-21.
-	Mumford JA, Wilson H, Hannant D, Jessett DM. Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. <i>Epidemiol. Infect.</i> 1994 ; 112 : 421-437.
-	Nicklas W. Aluminium salts. <i>Res. Immunol.</i> 1992 ; 143 : 489-494.
-	O'Hagan DT. Recent developments in vaccine delivery. <i>Curr. Drug. Targets Infect. Disord.</i> 2001 ; 1 : 273-286.
-	Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors : insertion of thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1982 ; 79 : 4927-4931.

-	Perkus M E, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus-bases vaccine candidates for cancer, AIDS, and others infectious diseases. <i>J. Leukoc. Biol.</i> 1995 ; 58 : 1-13.
-	Ricks CA, <i>et al.</i> In Ovo Vaccination Technology. <i>Advances in Vet. Med.</i> 1999 ; 41 : 495-515.
-	Rizza P, Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Cytokines as natural adjuvants for vaccines : where are we now? <i>Trends Immunol.</i> 2002 ; 23 : 381-383.
-	Romero CH, Barrett T, Evans SA, <i>et al.</i> Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. <i>Vaccine</i> 1993 ; 11 : 737-742.
-	Rosales R, Sutter G, Moss B. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1994 ; 91 : 3794-3798.
-	Ryan S. Sarcome félin associé á la vaccination. <i>Singapore Vet. J.</i> 1998 ; 22 : 65-73.
-	Scheifflinger F, Dorner F, Falkener FG. Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1992 ; 89 : 9977-9981.
-	Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. <i>EMBO J.</i> 1994 ; 13 : 4195-4203.
-	Schreiber M, Kantimm D, Kirchoff D, Heimann G, Bhargava AS. Concentrations in serums of IgG, IgM and IgA and their age-dependence in beagle dogs as determined by a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). <i>Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.</i> 1992 ; 30 : 775-778.
-	Smith ES, Mandokhot A, Evans EE, <i>et al.</i> Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells : application to identifying tumor antigens. <i>Nature Med.</i> 2001 ; 7 : 967-972.
-	Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones : mechanism of action and therapeutic potential. <i>Clin. Exp. Dermatol.</i> 2002 ; 27 : 571-577.
-	Taylor J, Trimachi C, Weinberg R, <i>et al.</i> Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. <i>Vaccine</i> 1991 ; 9 : 190-193.
-	Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmettre P, Paoletti E. recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. <i>Vaccine</i> 1988 ; 6 : 497-503.
-	Tine JA, Lanar DE, Smith DM, <i>et al.</i> NYVAC-Pf7 : a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for <i>Plasmodium falciparum</i> malaria. <i>Infect. Immun.</i> 1996 ; 64 : 3833-3844.
-	Van der Leek ML, Feller JA, Sorensen G, <i>et al.</i> Evaluation of swinepox virus as a vaccine vector in pigs using an Aujeszky's disease (pseudorabies) virus insert coding for glycoproteins gp50 and gp63. <i>Vet. Rec.</i> 1994 ; 134 : 13-18.
-	Van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 2001 ; 52 : 139-144.
-	Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith GL. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. <i>J. Gen. Virol.</i> 1998 ; 79(Pt 4) : 877-887.
-	Vermout S, Denis M, Losson B, Mignon B. Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. <i>Ann. Méd. Vét.</i> ,

	2003 ; 147 : 393-401.
-	Wright CF, Oswald BW, Dellis S. Vaccinia virus late transcription is activated <i>in vitro</i> by cellular heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. <i>J. Biol. Chem.</i> 2001 ; 276 : 40680-40686.
-	Zimmerman S, Heeg K, Dalpke A. Immunostimulatory DNA as adjuvant : efficacy of phosphodiester CpG oligonucleotides is enhanced by 3' sequence modifications. <i>Vaccine</i> 2003 ; 21 : 990-995.

Annexes

Annexe 1 : Protocole ELISA (dosage d'immunoglobulines)

Préparation du PBS (Phosphate Buffer Saline) 10X :

40g de NaCl + 1g de KCl + 1,2g de KH₂PO₄ + 7g de Na₂HPO₄ dans H₂O (QSP 500ml).

Préparation du PBS 1X (pH 7,4) : 100ml de PBS 10X dans 900ml de H₂O.

Coating :

Les cupules de microplaques ELISA (Probind B.D-falcon ref 3915) sont saturées d'antigènes, sauf celles de la colonne réservée aux « blancs », qui contiennent 100µl de solvant pur.

Lors du coating pour le dosage des immunoglobulines anti-myxomatose, les cupules sont saturées avec du virus myxomateux semi-purifié (souche MyxoT1B9 du 27/10/05) à raison de 1µg par cupules. Pour ce faire, le virus est dilué au 1/1000^{ème}, soit 10µl de virus dans 10ml de PBS 1X, et 100µl de cette dilution sont déposés dans chaque cupule.

Lors du coating pour le dosage des immunoglobulines anti-VHD (viral hemorrhagic disease ou maladie hémorragique du lapin), les cupules sont saturées avec de la protéine VP60 purifiée, diluée au 1/750^{ème}, soit 15µl de protéines dans 10ml de NaCl pipés (pH = 6,4), et 100µl de cette dilution sont déposés dans chaque cupule.

Les plaques sont incubées à 37°C pendant une nuit.

Saturation avec la gélatine :

Préparation de la gélatine : 150mg de gélatine poudre (SIGMA G2500) dans 10ml de PBS 1X.

Les cupules sont lavées trois fois au PBS 1X, puis 100µl de gélatine solution sont placées dans chaque cupule, avant de replacer la plaque dans l'incubateur à 37°C pendant 1h.

Saturation avec le PBS-Tween :

Préparation du PBS-T : 8 ml de Tween 20% dans QSP 800 ml de PBS 1X

Les cupules sont lavées trois fois au PBS-T, puis 100µl de PBS-T sont placés dans les cupules, sauf celles où seront déposés les sérums et les témoins. Pour ces dernières, la quantité de PBS-T déposée dépend de la dilution initiale souhaitée (cf. ci-dessous).

Dépôt des sérums, larmes et témoins (t. négatif lapin, t. positif lapin, t. négatif poulet) :

Préparation des témoins :

- Le pool témoin négatif IgY poulet contient 10µl de chacun des 21 sérums J0 et est dilué au 1/20^{ème}, soit 10µl de pool dans 190µl de PBS-T.

- Le pool témoin négatif IgA poulet contient 5µl des 8 prélèvements de larmes effectués sur les témoins (4 à J20 et 4 à J30) et est dilué au 1/40^{ème} (5µl dans 195µl de PBS-T).

- Les témoins positifs et négatifs lapin sont internes à la manipulation. Ils sont dilués au 1/100^{ème} ; pour ce faire, une prédilution au 1/10^{ème} est réalisée (5µl dans 45µl de PBS-T), puis 20µl de cette prédilution sont déposés dans les 180µl de PBS-T préalablement déposés.

Pour les prélèvements de sérum, la dilution initiale est faite au 1/20^{ème}, soit 10µl de sérum dans 190µl de PBS-T ; pour les larmes, elle est réalisée au 1/40^{ème} en raison de la faible quantité récoltée, soit 5µl dans 195µl de PBS-T. Ensuite des dilutions successives de raison 2 sont effectuées, avant de replacer la plaque dans l'incubateur à 37°C pendant 1h.

Dépôt des conjugués :

Préparation des anticorps secondaires (= conjugués) :

- Pour obtenir la dilution finale au $1/3000^{\text{ème}}$ des anticorps anti-immunoglobulines de type Y de lapin AP (Alcaline Phosphatase), on effectue une prédilution au $1/100^{\text{ème}}$ ($5\mu\text{l}$ dans $495\mu\text{l}$ de PBS-T), puis une dilution au $1/30^{\text{ème}}$ ($100\mu\text{l}$ de prédilution dans $2,9\text{ ml}$ de PBS-T).

- Pour obtenir la dilution finale au $1/10000^{\text{ème}}$ des anticorps anti-immunoglobulines de type Y de poulet AP, une prédilution au $1/100^{\text{ème}}$ ($5\mu\text{l}$ dans $495\mu\text{l}$ de PBS-T), suivie d'une seconde dilution au $1/100^{\text{ème}}$ ($100\mu\text{l}$ de prédilution dans $9,9\text{ ml}$ de PBS-T) est effectuée.

- Pour obtenir la dilution au $1/500^{\text{ème}}$ des anticorps anti-immunoglobulines de type A de poulet AP, $20\mu\text{l}$ sont dilués dans QSP 10 ml de PBS-T.

Les cupules sont lavées quatre fois au PBS-T, puis $100\mu\text{l}$ de conjugués dilués sont déposés (conjugué anti-lapin dans les cupules des témoins négatif lapin et positif lapin et dans 4 cupules « blancs » ; conjugué anti-poulet dans toutes les autres cupules).

La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 1h.

Addition du substrat chromogène :

Préparation du substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate) : 1 tablette de 15mg (SIGMA N) dans 15ml de tampon diéthanolamine (pH 9,4), soit une solution à 1mg/ml.

Les cupules sont lavées quatre fois au PBST, puis $100\mu\text{l}$ de substrat par cupules sont déposés.

La coloration est obtenue par incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 12 minutes, puis fixée par de la soude 2N, à raison de $50\mu\text{l}$ par cupules.

Lecture : Elle est effectuée sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

Annexe 2 : Résultats ELISA de l'essai des différentes voies d'inoculation :

Evaluation des titres en anticorps dirigés contre le vecteur, dans les sérums

Voie	Indiv.	J0	J10	J20	J30
Sous-cutané	A1	<20	<20	<20	
	A2	<20	<20	<20	
	A3	<20	<20	<20	
	A4	<20	<20	<20	
Intramusculaire	B1	<20	<20	<20	<20
	B2	<20	<20	<20	<20
	B3	<20			
	B4	<20			
Oculaire	C1	<20			
	C2	<20		<20	
	C3	<20			
	C4	<20		<20	
Intramusculaire +adjuvant = Al ₂ O ₃	D1	<20	<20	<20	<20
	D2	<20	<20	<20	<20
	D3	<20	20	<20	<20
	D4	<20	<20	<20	<20
	D5	<20	40 40 80	<20	<20
Témoins	T1	<20	<20	<20	<20
	T2	<20	<20	<20	<20
	T3	<20	<20	<20	<20
	T4	<20	<20	<20	<20

Annexe 2 bis : Résultats ELISA de l'essai des différentes voies d'inoculation :

Evaluation des titres en anticorps dirigés contre le produit du transgène, dans les sérums

Voie	Indiv.	J0	J10	J20	J30
Sous-cutané	A1	<20	<20		
	A2	<20	<20		
	A3	<20		<20	
	A4	<20	<20	<20	
Intramusculaire	B1	<20			
	B2	<20			
	B3	<20			
	B4	<20			
Oculaire	C1	<20	<20	<20	<20
	C2	<20	<20	<20	<20
	C3	<20	<20	<20	<20
	C4	<20	<20	<20	<20
Intramusculaire +adjuvant = Al ₂ O ₃	D1	<20	40 80	40	<20
	D2	<20	40	40	40
	D3	<20	80	20	20
	D4	<20	<20	<20	<20
	D5	<20	40 80	80	40
Témoins	T1	20	<20	<20	<20
	T2	<20	<20	<20	<20
	T3	20	<20	<20	<20
	T4	<20	<20	<20	<20

Annexe 3 : Résultats ELISA de l'essai des différentes voies d'inoculation :

Evaluation des titres en anticorps dirigés contre le vecteur et contre le produit du transgène, dans les larmes

Voie	Indiv.	J20		J30	
		IgY	IgA	IgY	IgA
Oculaire	C1	<40	<40	<40	<40
	C2	40	<40	<40	<40
	C3	<40	<40	<40	<40
	C4	40	<40	<40	<40

Evolution des titres en anticorps dirigés contre le vecteur, dans les larmes

Voie	Indiv.	J20		J30	
		IgY	IgA	IgY	IgA
Oculaire	C1	<40	<40	<40	<40
	C2	40	<40	<40	<40
	C3	<40	<40	<40	<40
	C4	40	40	<40	<40

Evolution des titres en anticorps dirigés contre le produit du transgène, dans les larmes

Annexe 4 : Résultats ELISA de l'essai de différents adjuvants et de l'évaluation de l'effet rappel :

Evaluation des titres en anticorps dirigés contre le vecteur

Adjuvant	Rappel	Indiv.	J0	J21	J30	J40
Aucun adjuvant	Oui	A1	<20	<20	40	20
		A2	<20	<20	20	<20
		A3	<20	<20	40	<20
		A4	<20	<20	<20	<20
	Non	B1	<20		<20	<20
		B2	<20		<20	<20
		B3	<20		<20	<20
		B4	<20		<20	<20
Carbopol	Oui	C1	<20	<20	<20	<20
		C2	<20	<20	20	<20
		C3	<20	<20	<20	<20
		C4	<20	<20	<20	<20
	Non	D1	<20		ND	ND
		D2	<20	ND	ND	ND
		D3	<20		<20	ND
		D4	<20		<20	<20
		D5	<20	<20	<20	<20
Adjuvant incomplet de Freund	Oui	E1	<20	ND	ND	ND
		E2	<20	<20	<20	<20
		E3	<20	<20	<20	<20
		E4	<20	<20	<20	<20
	Non	F1	<20		<20	<20
		F2	<20		<20	<20
		F3	<20		20	<20
		F4	<20	<20	<20	<20
Témoins		T1	<20		<20	<20
		T2	<20		<20	<20
		T3	<20		<20	<20
		T4	<20		<20	<20
		T5	<20		<20	<20

Annexe 4 bis : Résultats ELISA de l'essai de différents adjuvants et de l'évaluation de l'effet rappel :

Evaluation des titres en anticorps dirigés contre le produit du transgène

Adjuvant	Rappel	Indiv.	J0	J21	J30	J40
Aucun adjuvant	Oui	A1	<20	<20	40	80
		A2	<20	20	20	80
		A3	<20	<20	80	<20
		A4	<20	<20	160	160
	Non	B1	<20	<20	<20	<20
		B2	<20	<20	<20	40
		B3	<20	<20	<20	<20
		B4		20	<20	40
Carbopol	Oui	C1	<20	<20	>160	160
		C2	<20	<20	80	160
		C3	<20	<20	20	160
		C4	ND	ND	ND	ND
	Non	D1	<20	<20	ND	ND
		D2	<20	ND	ND	ND
		D3	<20	<20	<20	ND
		D4	<20	<20	80	80
		D5		<20	40	160
Adjuvant incomplet de Freund	Oui	E1	<20	ND	ND	ND
		E2	<20	<20	80	160
		E3	<20	<20	160	>160
		E4	<20	<20	40	160
	Non	F1	<20	<20	40	160
		F2	<20	<20	160	>160
		F3	20 ?	20	20	160
		F4	<20	80	160	80
Témoins		T1	<20	<20	<20	<20
		T2	<20	40	40	40
		T3	<20	<20	<20	<20
		T4	<20	20	40	40
		T5	<20	<20	<20	<20

TOULOUSE 2007

NOM : PERRENOT

PRENOM : NICOLAS

TITRE :

Evaluation du virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal chez les volailles

RESUME :

Comme d'autres poxvirus, le virus myxomateux (VM) peut être utilisé comme vecteur de gènes d'intérêt vaccinal. La taille importante de son génome (162 kb) permet en effet la construction de souches recombinantes, codant pour des gènes étrangers de grande taille.

Cependant, avant de construire des vaccins recombinants destinés aux volailles, il faut s'assurer de l'innocuité et l'immunogénicité de vecteurs dérivés du virus myxomateux chez le poulet.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer la réponse immunitaire chez le poulet suite à l'inoculation de virus myxomateux recombinants. Cette étude a permis de tester différentes voies d'inoculation et différents adjuvants ; En première approche, la réponse vaccinale a été évaluée sur la base d'un suivi sérologique, après administration du VM recombinant par les voies sous-cutanée, intramusculaire ou oculaire et ce, avec différents adjuvants. Les premiers résultats de cette évaluation sont discutés.

MOTS CLES :

Virus myxomateux ; vecteur vaccinal ; volailles ; poulet ; vaccination.

ENGLISH TITLE:

Evaluation of Myxoma Virus as vaccine vector in poultry.

ABSTRACT:

As other poxviruses, Myxoma Virus (MV) can be used as a vaccinal vector of genes of interest. The size of its genome (162 kbp) allows the construction of recombinants strains, encoding for high size foreign genes.

Before construction of recombinants viruses, the innocuity and immunogenicity of MV-derived viruses have to be evaluated in chicken. The aim of this study is therefore the assessment of immune response in chicken, following inoculation of recombinant MV. Furthermore, this study tested several routes of injection and adjuvants. In a first attempt, vaccinal response has been evaluated through serologic monitoring, after administration of MV by subcutaneous, intramuscular or ocular routes. The first results of this study are discussed.

KEY WORDS:

Myxoma virus; vaccine vectors; poultry; chicken; vaccination.