

2m11.2689.1

Université de Montréal

**Réponse immunitaire et protection clinique des veaux
induites par un vaccin inactivé contre la diarrhée
virale bovine.**

Par

Younes Chorfi

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option microbiologie**

Avril 1999

© Younes chorfi, 1999



SF
607
U54
1999
V.007

Année de l'émission

Résumé de l'histoire de la médecine
légale par un spécialiste de la médecine
légale.

Titre

Yves Choisy

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en médecine vétérinaire pour la spécialité de pathologie

Année 1999

Yves Choisy, 1999



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Réponse immunitaire et protection clinique des veaux, induites par un
vaccin inactivé contre la diarrhée virale bovine.**

Présenté par:
Younes Chorfi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Marcelo Gottschalk	Président-rapporteur
Dr Youssef ELAzhary	Directeur
Dr Sylvette Laurent	Co-directeur
Dr Brian Talbot	Membre

Mémoire accepté le: ...99...05...28...

SOMMAIRE

L'infection par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) a des conséquences économiques importantes dans le monde entier. Ce virus est responsable de taux élevés de morbidité et de mortalité chez les bovins.

Le BVDV est classé comme membre du genre pestivirus de la famille des flaviviridae (Francki et al, 1991). Son génome est constitué d'un seul brin d'ARN à polarité positive avec un seul cadre de lecture (Deng et Brock, 1992). Ceci rend sa pathogénie complexe et difficile à cerner et par conséquent, le développement de vaccins efficaces et sécuritaires s'avère difficile (Baker, 1995).

Les vaccins actuellement sur le marché, destinés au contrôle et à la prévention de l'infection par le BVDV sont soit des vaccins vivants modifiés soit des vaccins inactivés. Les vaccins vivants modifiés sont largement utilisés, mais ils peuvent causer la maladie post-vaccinale, des avortements, des anomalies congénitales et parfois la maladie des muqueuses (Harkness, 1987). Les vaccins inactivés ont été développés dans le but de remédier aux inconvénients des vaccins vivants modifiés, notamment dans le cas des femelles gestantes qui peuvent donner naissance à des veaux infectés de manière persistante (Brownlie et al, 1995).

Le but de notre travail est de mettre au point un vaccin inactivé qui protège les animaux contre l'infection par le BVDV. Le vaccin utilisé est un mélange de différentes souches de BVDV, de type I et II, avec un nouveau système d'adjuvant. Nos résultats démontrent que l'utilisation de ce vaccin génère une réponse cellulaire et humorale à la suite d'un challenge par la souche New York 1. Il est connu que la majorité des vaccins classiques contre le BVDV ciblent une protection par la production des anticorps neutralisants. Cependant ce travail démontre que même si la production des anticorps neutralisants n'est induite qu'après challenge, les animaux vaccinés n'ont pas développé les signes de la sévérité de la maladie. Notre vaccin confère aux animaux une protection face à une infection virale par la souche New York 1.

TABLES DES MATIÈRES

<u>HORS-TEXTE</u>	<u>PAGES</u>
IDENTIFICATION DU JURY	II
SOMMAIRE	III
TABLES DES MATIÈRES	IV
LISTES DES TABLEAUX	VII
LISTES DES FIGURES	VIII
DÉDICACE	IX
REMERCIEMENTS	X
<u>PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION</u>	
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
II. PATHOGÉNIE.....	3
1- La diarrhée virale bovine (BVD) ou primo-infection	3
2- L'infection in utero.....	4
3- Les maladies des muqueuses.....	4
III. EPIDÉMIOLOGIE.....	5
V. PERTES CAUSÉES PAR LE VIRUS BVDV.....	5
V. CONTRÔLE DU BVDV SANS VACCINATION.....	6
VI. PROPHYLAXIE.....	7
VII. CONTRÔLE DE LA MALADIE PAR VACCINATION.....	8
1- Vaccin vivant modifié (MLV).....	9
2- Vaccin inactivé.....	10
2.1- Adjuvants des vaccins inactivés et leurs rôles.....	11

3- Les vaccins futur.....	13
---------------------------	----

DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Vaccin.....	16
2- Virus et cellules.....	16
3- Inactivations du virus.....	16
4- Immunisation et challenge des animaux.....	17
5- Test d'immunoperoxydase.....	17
6- Test de séroneutralisation.....	18
7- ELISA.....	19
8- Test d'interféron γ (INF- γ).....	20
9- Test de prolifération des cellules mononucléaires bovines.....	20
10- Essai de cytotoxicité.....	21
11- Analyse hématologique.....	22
12- Analyse statistique.....	22

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

I- RÉPONSE HUMORALE	24
1- Anticorps sériques.....	24
1.1- Anticorps spécifiques.....	24
1.2- Anticorps neutralisants.....	24
2- Anticorps sécrétoires.....	27
II- RÉPONSE CELLULAIRE	27
1- Réponse proliférative.....	27
2- Production d'INF- γ	32
3- Réponse cytotoxique.....	32
III- COMPTAGE DES NEUTROPHILES ET DES PLAQUETTES.....	32
IV- ÉVALUATION DES SIGNES CLINIQUES.....	38

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION..... 42

BIBLIOGRAPHIE..... 48

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableaux 1</u> : Système de score clinique pour les veaux inoculés par des souches du virus de la diarrhée virale bovine (Cortese et al, 1998a)	40
---	-----------

LISTE DES FIGURES

<u>FIGURES</u>	<u>PAGES</u>
<p>FIGURE 1 : Production d’anticorps sériques détectés par IMPA contre la souche Singer (A) et la souche 125 (B) du BVDV après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES).....</p>	25
<p>FIGURE 2 : Production d’anticorps neutralisants détectés par SN contre la souche Singer (A) et la souche 125 (B) après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES).....</p>	26
<p>FIGURE 3 : Production d’anticorps sécrétoires détectés par ELISA contre les antigènes BVDV des veaux après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES).....</p>	28
<p>FIGURE 4 : Réponse proliférative des mononucléaires des animaux vaccinés (A) et de contrôle (B) après stimulation par la souche 125. Les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES).....</p>	29
<p>FIGURE 5 : Réponse proliférative des mononucléaires des animaux vaccinés (A) et de contrôle (B) après stimulation par la souche Singer. Les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES).....</p>	30

- FIGURE 6 :** Prolifération des mononucléaires des animaux vaccinés et de contrôle après stimulation par la concanavaline A. Les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs de (\pm ES)..... 31
- FIGURE 7 :** Production de l'interféron γ in vitro par les cellules mononucléaires des animaux vaccinés et de contrôle. Les cellules ont été stimulées par la souche Singer (A) et 125 (B) du BVDV. Un rappel a été fait la semaine 4, et les animaux ont été challengés la semaine 5..... 33
- FIGURE 8.a :** Prolifération en fonction du temps des lymphocytes collectés des animaux vaccinés et de contrôle en présence des fibroblastes infectés par la souche Singer du BVDV.... 34
- FIGURE 8.b :** Prolifération en fonction du temps des lymphocytes collectés des animaux vaccinés et de contrôle en présence des fibroblastes infectés par la souche 125 du BVDV..... 35
- FIGURE 9 :** Comptage en fonction du temps des leucocytes collectées des animaux vaccinés et de contrôle durant la période post-challenge..... 36
- FIGURE 10 :** Comptage en fonction du temps des plaquettes collectées des animaux vaccinés et de contrôle durant la période post-challenge..... 37
- FIGURE 11 :** Évaluation des signes cliniques des animaux vaccinés et de contrôle après challenge avec la souche NY-1. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES) 39

A ma femme
A mes parents
A mes frères et soeurs

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail. Leur aide inestimable a été grandement appréciée.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance particulière au docteur **Youssef Elazhary** qui m'a suggéré ce travail et guidé avec patience et compréhension ma formation scientifique, ainsi que pour ses excellents conseils et son soutien actif. J'exprime aussi ma reconnaissance au docteur **Sylvette Laurent** pour ses conseils judicieux et sa disponibilité.

J'aimerais encore remercier docteur **Marcello Gottschalk** d'avoir présidé ce jury et D'avoir l'amabilité de corriger ce mémoire. J'exprime aussi ma reconnaissance au docteur **Brian Talbot**, pour ses encouragements et son aide dans la correction de ce travail.

Enfin, je suis redevable à plusieurs de mes collègues et amis pour m'avoir fait bénéficier de leurs critiques, de leurs suggestions et de leur soutien précieux.

INTRODUCTION

I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Le virus de la diarrhée bovine (BVDV) est un agent pathogène viral ubiquiste du bovin qui provoque une grande variété de maladies touchant des systèmes organiques multiples (Pritchard, 1969). Ces maladies sont légères à fatales, pouvant être aiguës ou chroniques et affectent les bovins à tout âge. Le virus infecte un grand nombre de cellules dont les cellules épithéliales de la partie supérieure du tube digestif, les cellules nerveuses du cerveau et des intestins, les cellules endocriniennes, les cellules de la moelle osseuse et les cellules lymphoïdes. La déplétion des cellules lymphoïdes précède souvent la plupart des maladies induites par le BVDV. Avec le virus classique de la peste porcine et le virus de la maladie des frontières du mouton, le BVDV est classé comme membre du genre pestivirus dans la famille des *Flaviviridae* (Francki *et al.*, 1991). C'est un virus sphérique et enveloppé de 40 à 60 nm de diamètre. Il a un seul brin d'ARN, à polarité positive, contenant environ 12500 nucléotides avec un seul cadre de lecture codant pour une polyprotéine de 4000 acides aminés (Deng et Brock, 1992). Collet *et al.* (1988) ainsi que Renard *et al.* (1985) ont montré une forte analogie des séquences en acides aminés et des protéines codées par le BVDV et les Flavivirus. Les membres de cette famille ont la particularité au niveau génomique d'être dépourvus d'une queue de poly A à leur extrémité 3'.

Il existe deux biotypes du virus BVDV, qui se différencient dans les cultures cellulaires par leurs effets cytopathogènes. Le BVDV non cytopathogène infecte les cultures cellulaires sans produire d'effet notable. Lorsque le BVDV cytopathogène infecte les cultures cellulaires, il se produit une vacuolisation cytoplasmique et une mort de cellules dans les 24 à 48 heures (Horzinek, 1981). Point important à garder présent à l'esprit : Les termes 'cytopathogène' et 'non cytopathogène' désignent l'activité virale dans la culture cellulaire et non chez les bovins (Bolin, 1992). La plupart des BVDV sont non cytopathogènes en culture cellulaire mais certains BVDV non cytopathogènes sont extrêmement virulents chez les bovins. L'ensemble des deux biotypes sont apparentés sur le plan sérologique. En 1993, malgré la vaccination conventionnelle, des records de morbidité et de mortalité ont été enregistrés par les éleveurs de veaux à viande ainsi

que dans l'industrie de la vache laitière. Harpin *et al* (1995) ont démontré que la souche BVDV responsable de cette épidémie se distinguait génotypiquement des souches classiques. Contrairement aux souches classiques faisant partie du génotype 1, les isolats du BVDV émergeant de cette épidémie sont classés comme membres du génotype II. Bien que les bovins soient les hôtes naturels du BVDV, ce virus infecte aussi le porc, le mouton et plusieurs autres ongulés (Nettleton, 1990). Occasionnellement, le BVDV provoque des maladies graves chez des espèces autres que les bovins. Il infecte aussi les cultures cellulaires provenant d'une grande variété de tissus de plusieurs espèces (Levings *et al.*, 1991; Potts *et al.*, 1989). La plupart des BVDV provoquent une infection inapparente des cultures cellulaires. Les effets de ces infections inapparentes sur les procédures de diagnostic et sur les produits biologiques peuvent être graves. Du fait que le BVDV est largement répandu et induit des maladies cliniques chez les bovins et chez d'autres espèces, la lutte contre ce virus est essentielle (Paton *et al.*, 1994).

II- PATHOGÉNIE

Le virus du BVD est caractérisé par une pathogénie diverse et complexe. Il cause principalement 3 types de syndromes (Duffel et Harkness, 1985).

1- La diarrhée virale bovine (BVD) ou primo-infection

La diarrhée virale bovine affecte le plus souvent des bovins immunocompétents et séronégatifs âgés de 6 à 24 mois (Blood *et al.*, 1983). Après une période d'incubation de 4 à 7 jours, les animaux présentent une virémie s'accompagnant d'hyperthermie et de leucopénie. La virémie peut persister jusqu'à une dizaine de jours (Quatpers *et al.*, 1992).

Les symptômes non pathognomoniques se traduisent par l'anorexie, la fièvre, le jetage oculo-nasal et la diarrhée. La réponse sérologique devient manifeste la deuxième semaine pour atteindre un maximum entre la quatrième et la sixième semaine.

2- L'infection *in utero*

Le résultat d'une infection *in utero* dépend pour une grande part du stade de développement foetal au moment de l'infection de la mère. L'infection de la mère est ordinairement bénigne ou subclinique, et s'accompagne d'une virémie de courte durée. Il en résulte une placentite qui peut conduire soit à la mort foetale avec avortement, soit à une momification foetale, ou le plus souvent, à une infection du foetus lui même. Si l'infection du foetus par une souche non cytopathogène a lieu avant le 120^{ème} jour de la gestation, avant le stade d'immunocompétence, il peut en résulter la naissance d'un veau chétif ou cliniquement normal, mais infecté de manière persistante et spécifiquement immunotolérant vis-à-vis de la souche qu'il héberge (McClurin *et al.*, 1984). Si l'infection du foetus a lieu après le 120^{ème} jour, elle ne provoque que rarement une maladie et induit le plus souvent une réponse immune spécifique similaire à celle induite chez l'adulte, de telle sorte que les veaux naissent pourvus d'anticorps neutralisants. Les veaux issus de vaches infectées ont une mauvaise croissance et surtout des infections persistantes, et chez la vache il peut en résulter des infertilités. Les lésions caractéristiques de l'infection par le BVDV sont souvent des lésions du système nerveux et du globe oculaire (Duffels et Harkness, 1985, Done et Terlecki, 1980).

3- La maladie des muqueuses

La maladie des muqueuses frappe les jeunes bovins âgés le plus souvent de 6 mois à 2 ans. Cliniquement, il s'agit d'une gastro-entérite ulcéreuse hémorragique sévère, ordinairement fatale. Cependant, celle-ci ne se déclare que dans une sous-population d'animaux virémiques persistants immunotolérants. La surinfection de ces individus, hébergeant une souche non cytopathogène, par une souche cytopathogène homologue (antigéniquement identique) serait responsable de la forme aiguë de la maladie des muqueuses (gastro-entérite hémorragique, ulcération de la cavité buccale, diarrhée aqueuse parfois hémorragique, ulcères interdigités avec inflammation des bourrelets coronaires). La mort survient après 5 à 7 jours d'évolution suite à une déshydratation importante. La forme chronique se traduit par une diarrhée discontinue et récidivante d'évolution fatale.

III- ÉPIDÉMIOLOGIE

Les sources de contamination par le BVDV sont généralement les mêmes dans les différents pays. Elles peuvent subir de légères variations d'une région à une autre selon les structures des fermes et les systèmes de gestion. Dans les régions à forte prévalence, les animaux immunotolérants doivent être considérés comme une grande source potentielle d'infection des troupeaux et d'excrétion du virus dans la nature (Niskanen., 1995). Le maintien du virus dans l'environnement se fait principalement par l'intermédiaire des sécrétions et excréctions corporelles des immunotolérants. Les animaux ayant subi une primo-infection peuvent également contaminer le troupeau parce qu'ils peuvent excréter le virus entre le quatrième et le dixième jour après l'infection. On a même pu isoler chez des animaux en primo-infection le virus des poumons et des ganglions bronchiques jusqu'au cinquante-sixième jour de l'infection (Corapi *et al.*, 1987). Le porc, le mouton, la chèvre et les ruminants sauvages sensibles au BVDV peuvent également le transmettre. Les animaux infectés de manière persistante excrètent le BVDV dans toutes les sécrétions y compris le lait. Le sperme des taureaux infectés de manière persistante peut contenir du virus à un titre pouvant atteindre 10^4 à 10^6 TCID 50/ml. Le transfert d'embryon infecté peut être l'occasion de transmettre la maladie. Les insectes piqueurs contaminés sont une source d'infection. Tarry *et al.* (1991) ont montré que sous certaines conditions expérimentales, des insectes piqueurs tels que *Stomoxys calcitrans* et *Haemotopota pluvialis* et même les insectes non piqueurs tel *Hydrotae irritans* peuvent transmettre le BVDV aux bovins et aux ovins, bien que de telles transmissions n'aient jamais été jusqu'à présent prouvées dans les conditions naturelles. Les vaccins vivants atténués peuvent également, à des périodes non appropriées telle qu'au début de gestation, entraîner des nouveau-nés infectés de manière persistante (Bolin, 1995).

IV- PERTES CAUSÉES PAR LE VIRUS BVDV

Selon le conseil de recherche des pêches et de l'agro-alimentaire du Québec, il semblerait que les pertes annuelles soient évaluées à 1,1 millions de dollars en animaux de remplacement, à 1,12 millions en coût de médicaments et à plus de 5 millions en pertes dûes à des retards de

croissance. L'infection par le BVDV provoque une forte morbidité et une infection persistante, auxquelles vont s'ajouter une forte mortalité et surtout des avortements. La diarrhée virale bovine présente une forte morbidité de 80 à 100%, et une mortalité allant jusqu'à 20% selon Radostits et Littlejohns (1988).

V- CONTRÔLE DU BVDV SANS VACCINATION

Le contrôle et l'éradication de l'infection sont basés sur l'identification des troupeaux avec des infections actives, l'élimination des animaux qui abritent le virus et ces mesures de contrôle doivent s'élargir à tous les troupeaux pour prévenir la transmission à d'autres troupeaux sans infection ou la réinfection du troupeau dont on a éliminé les sujets infectés. Des tests efficaces pour la démonstration de l'infection active chez les individus et les troupeaux sont essentiels comme étant des tests pour démontrer que les animaux et les troupeaux sont indemnes de l'infection.

Le contrôle de l'infection sur une large échelle a été fait dans les pays Scandinaves. L'extension du contrôle et l'éradication au Danemark a été évaluée et comparée avec les pertes nationales dues à l'infection sans intervenir sur le contrôle de la maladie (Bitsch et Rønsholt, 1995). La population bovine de Scandinavie est principalement laitière et le but du programme de contrôle est premièrement d'identifier les troupeaux indemnes de l'infection et de prévenir leurs infections. Le deuxième but est de réduire graduellement le nombre de troupeaux infectés.

En Norvège, des échantillons des réservoirs à lait de 26430 troupeaux laitiers ont été testés en 1993 en utilisant un test ELISA pour la détection des anticorps (Swedish indirect ELISA) (Waage *et al.*, 1994). Les troupeaux acceptés indemnes de l'infection étaient ceux dont les résultats de l'ELISA démontraient une valeur d'absorbance du lait inférieure à 0.25, les troupeaux avec une forte valeur d'absorbance mais leur lait après la 1ère parturition était anticorps négatif et les troupeaux avec une forte valeur d'absorbance du lait mais le sang de 5 veaux de 8 à 12 mois d'âge était négatif. Tous les examens étaient obligatoires et payés par les industriels bovins. Approximativement 9% des troupeaux laitiers se sont révélés avoir une infection active au BVDV. Le BVDV a été une maladie à déclaration obligatoire en Norvège

pour plusieurs années, et des restrictions ont été placées sur tous les troupeaux infectés pour prévenir l'expansion de l'infection (Bitsch et Rønsholt, 1995).

En Finlande, le programme de dépistage du BVDV est coordonné avec le programme de la leucose enzootique bovine qui limite les troupeaux et les zones géographiques indemnes de la leucose bovine (Husu *et al.*, 1993). Les troupeaux à viande peuvent aussi participer à un programme BVDV. Dans ce type d'élevage, le statut de l'infection par le BVDV est généralement déterminé par des tests sur le sang des jeunes animaux. Par exemple le programme de contrôle du BVDV au Danemark implique les tests suivants:

- 1- Test dans les réservoirs à lait à des intervalles de 6 à 9 mois.
- 2- Test aléatoire de sang de 9 animaux c'est à dire 3 vaches primipares, 3 vaches gestantes et trois veaux âgés de plus de 8 mois pour clarifier le statut de l'infection du troupeau. Tous les échantillons sont testés pour la présence d'anticorps et les 3 jeunes veaux sont testés pour la présence du virus. Le statut du troupeau est considéré favorable si les jeunes veaux sont virus et anticorps négatifs.
- 3- Test aléatoire du sang des 3 jeunes animaux âgés de plus de 8 mois pour la présence du virus et d'anticorps pour le suivi du statut favorable à des intervalles de plus de 12 mois.
- 4- Test individuel des animaux et des troupeaux suspectés être infectés de manière persistante pour les identifier et les éliminer.

Dans ce programme, aucun troupeau n'est classé indemne du BVDV. Les troupeaux au Danemark sont classés comme ayant un statut favorable, indéterminé ou avec une infection persistante. Même les animaux venant des troupeaux dont le statut est classé favorable ne peuvent pas être considérés comme des animaux non infectés d'une manière permanente sauf après des tests négatifs du sang.

VI- PROPHYLAXIE

Les principales précautions observées pour éviter l'introduction de l'infection dans les troupeaux sont déterminées par les moyens de transmission de BVDV. Les méthodes de contrôles doivent se baser sur l'élimination des immunotolérants et l'isolement des vaches

gestantes avec anticorps positifs jusqu'à vêlage et leurs produits doivent se révéler négatifs de l'infection persistante.

Pour éviter l'introduction d'animaux infectés, il est souhaitable de garder ces animaux en quarantaine pendant 3 semaines. Les animaux ne doivent pas pâturer dans des terrains voisins de ceux fréquentés par des animaux ayant des infections persistantes. Les animaux envoyés pour l'exposition ou pour la vente doivent avoir des tests de sang et un certificat indiquant qu'ils ne sont pas des animaux infectés d'une manière persistante. Dans les fermes infectées, les petits ruminants doivent être inclus dans l'examen, et enfin les vétérinaires et les personnes qui visitent les fermes doivent prendre les précautions appropriées pour ne pas transmettre l'infection à d'autres troupeaux.

VII- CONTRÔLE DE LA MALADIE PAR VACCINATION

L'utilisation des vaccins contre le BVDV en Amérique du nord dépend de la taille du troupeau et de son système de management, de la localisation géographique et des préférences vétérinaires. Pendant plusieurs années, le BVDV a été associé à la maladie respiratoire dans les élevages à viande, et aux défauts de reproduction chez les producteurs laitiers. La vaccination a été dirigée contre les problèmes causés par la maladie et l'usage des vaccins a peu varié d'année en année. L'émergence ou la réémergence du BVDV virulent qui induit une maladie sévère chez les veaux et les adultes a stimulé l'utilisation des vaccins chez les bovins (Corapi *et al.*, 1990). Aussi l'augmentation de la diversité antigénique du BVDV (Xue, 1990) a poussé quelques vétérinaires à revenir sur leur programme de vaccination. La fréquence de la revaccination a augmenté, et la rotation des vaccins a été utilisée pour immuniser les vaches contre les différentes souches du BVDV utilisées par différents manufacturiers. L'objectif de ces pratiques est de maintenir une concentration sérologique élevée des anticorps contre une grande diversité antigénique du virus pour assurer une longue protection (Bolin, 1995). Il est difficile de donner exactement l'étendue de leur utilisation. De récentes études auprès des producteurs bovins, montrent qu'approximativement 58% des fermes laitières aux États Unis vaccinent régulièrement leur génisses contre le BVDV, mais seulement 32% des fermes vaccinent les vaches non gestantes. Les bovins à viande sont vaccinés régulièrement contre le BVDV sur 13% des fermes.

Ces données indiquent que la vaccination contre le BVDV est d'utilisation large chez les vaches laitières mais peu chez les bovins à viande (Bolin, 1995).

De nombreux produits biologiques destinés à la lutte contre le BVDV ont été mis au point en particulier des vaccins à virus vivant modifié et à virus inactivé, rien qu'aux États-Unis il existe plus de 150 produits biologiques agréés à l'échelle fédérale pour la lutte contre le BVDV (Bolin, 1992). La plupart des vaccins anti-BVDV contiennent un isolat viral unique, mais certains fabricants de vaccins utilisent des isolats viraux différents. Il existe ainsi une grande variété de souches de BVDV dans les vaccins. En outre, il existe de nombreux vaccins contenant du BVDV avec des bactéries ou d'autre virus. Ces vaccins combinés peuvent être vivants, inactivés ou contenir une combinaison d'immunogènes vivants et tués.

On utilise plusieurs méthodes pour inactiver les virus dans les vaccins à virus tué, et plusieurs adjuvants ou combinaison d'adjuvants pour renforcer l'immunogénicité (Clarke *et al.*, 1987).

1- Vaccins vivants modifiés (MLV)

Le besoin du vaccin contre le BVDV a été perçu rapidement après la description de la maladie en 1946 (Olafsen *et al.*, 1946). Les premiers prototypes du vaccin contenaient des souches non cytopathogènes du BVDV qui ont été atténuées par des passages chez le lapin. Ces vaccins ont été considérés protecteurs mais n'ont pas été commercialisés. Les vaccins contre le BVDV n'ont été produits commercialement que lorsque la souche cytopathogène a été isolée en 1959 (Gillespie *et al.*, 1960). Récemment, les vaccins licenciés utilisent la souche cytopathogène qui a été atténuée par passage sur des cellules bovines ou porcines. L'atténuation altère le virus et ainsi restreint sa réplication chez la vache. Les mutations chimiques ont aussi été utilisées pour atténuer le BVDV. Les vaccins utilisés en Europe contiennent des virus modifiés chimiquement qui sont thermosensibles, se répliquent peu chez la vache et ont un grand degré de sécurité chez les vaches gestantes (Lobmann *et al.*, 1986).

L'utilisation du MLV pour le BVDV offre plusieurs avantages, car l'antigène est amplifié par la réplication virale chez les animaux vaccinés. Seul un nombre réduit de particules est nécessaire pour l'immunisation. Ces vaccins MLV sont économiques pour la production et

moins chers à l'achat. La majorité des vaccins MLV sont administrés par injection sous-cutanée (SC) ou en intramusculaire (IM), et une seule dose de 2 à 5 ml de vaccin est suffisante pour l'immunisation. Les animaux sont contenus une seule fois avec une restriction minimale pour la vaccination. Les vaccins MLV stimulent une réponse immunitaire rapide qui est avantageuse quand la protection doit être établie rapidement. Trois semaines après la vaccination, les anticorps sont détectés dans le sérum qui neutralise diverses souches de BVDV (Bolin, 1995). Cependant, la durée des anticorps dans le sérum après vaccination avec les vaccins MLV n'est pas connue. Il semble qu'elle soit similaire à celle induite par le virus en cas d'infection naturelle. Les anticorps stimulés par infection naturelle sont détectés à des concentrations élevées pendant plus d'une année et persistent pour plusieurs années chez la plupart des vaches. Chez quelques vaches, pourtant, des concentrations détectables d'anticorps neutralisants contre le BVDV antigéniquement distincts du virus du vaccin disparaissent en deux ans. L'immunisation des veaux par des vaccins MLV n'est pas inhibée par les anticorps colostraux à des titres de neutralisation virale supérieurs à 1:32 (Menanteau-Horta *et al.*, 1985). L'immunisation se fait avec succès chez la plupart des veaux qui ont 4 à 6 mois d'âge. La revaccination avant l'entrée en élevage est recommandée et assure la protection de tous les veaux (Schultz, 1993). L'immunosuppression et la recombinaison génétique sont de potentiels problèmes associés au vaccin MLV. Les souches vaccinales du BVDV semblent conserver quelques propriétés immunosuppressives qui sont manifestées après vaccination (Roth *et al.*, 1983). Cette immunosuppression peut augmenter la pathogénicité d'autres agents infectieux résultant en maladie postvaccinale. Il y a aussi un potentiel pour les vaccins MLV de donner une recombinaison génétique avec des acides nucléiques d'autres virus de l'animal vacciné (Qi, 1992). Il a été démontré que l'ARN du BVDV est capable de se recombiner avec de l'ARN d'origine virale ou cellulaire. Ceci peut générer un virus capable de causer la maladie (Meyers *et al.*, 1991, Meyers *et al.*, 1992).

2- Vaccins inactivés

La commercialisation des vaccins inactivés pour le BVD a suivi celle des vaccins MLV de plusieurs années. Le premier stimulus pour développer les vaccins inactivés a été les

inconvénients associés à l'utilisation des vaccins MLV. Différentes méthodes ont été utilisées pour détruire l'infectivité virale dans les vaccins inactivés prototypes. Le chloroforme ou des détergents ont été utilisés pour inactiver la particule virale produisant des vaccins à antigène viral soluble (Mohanty *et al.*, 1989). Des vaccins contenant des virus tués intacts ont été produits en utilisant la formaline, la betapropriolactone, l'acétyléthylénemine ou l'éthylénemine binaire pour détruire l'infectivité. Récemment, l'éthylénemine binaire est le plus fréquemment utilisé.

Deux doses de vaccins inactivés administrés à 2 et 4 semaines sont souvent recommandées pour l'immunisation. Les vaccins inactivés sont administrés en IM ou SC à un volume de 2 à 10 ml dépendant du contenu du vaccin. Comme les vaccins MLV, les anticorps stimulés par les vaccins inactivés neutralisent différentes souches du BVDV antigéniquement diverses (Bolin, 1995). Les vaccins inactivés n'ont pas les inconvénients associés aux vaccins MLV. Parce que l'infectivité du virus a été détruite, la réversion à la virulence ou à la recombinaison génétique avec un autre virus ne peuvent pas survenir. Les méthodes utilisées pour inactiver le vaccin réduisent le potentiel de la maladie postvaccinale dûe aux vaccins contaminés. Parce que le virus ne peut pas infecter, il est sécuritaire pour l'utilisation chez les vaches gestantes. Aussi, le virus inactivé ne peut pas entraîner d'immunosuppression ou l'altération du nombre des lymphocytes. Mais il reste que les vaccins inactivés contre le BVDV nécessitent deux doses pour donner une immunisation primaire. Les vaccins inactivés sont plus coûteux à produire que les vaccins MLV. Comme les vaches doivent être contenues deux fois pour l'administration de deux doses de vaccin, le coût du travail pour le producteur est élevé pour les vaccins inactivés. Aussi, le temps nécessaire pour établir une immunité protectrice est plus long que celui procuré par les vaccins MLV. Ceci peut être un désavantage significatif quand la protection doit être établie rapidement.

2-1 Adjuvants des vaccins inactivés et leurs rôles

L'utilisation des adjuvants dans les vaccins inactivés contre le BVDV a été limitée à ceux d'usage conventionnel. L'association avec un adjuvant a notoirement augmenté la puissance antigénique et/ou amélioré la réponse immunologique du vaccin. Par l'augmentation de l'efficacité de la vaccination, un adjuvant approprié va permettre d'induire une immunité à long

terme utilisant des doses réduites d'antigène et minimisant les effets secondaires de la vaccination. Une immunité à long terme va permettre aussi d'espacer les injections de rappel. Les adjuvants sont un groupe hétéroclite de substances incluant un matériel bactérien ou chimique complexe. Au début, les adjuvants qui ont été utilisés pour renforcer les vaccins consistaient en un matériel naturel comme le tapioca, la lanoline, les tanins, et des sels de calcium, aluminium et magnésium. Ces substances étaient capables d'induire des réactions inflammatoires au niveau des sites d'injection. Il est bien connu qu'une vaccination efficace contre les infections virales nécessite l'induction d'une immunité à médiation cellulaire en plus de l'immunité humorale. Ceci a été souvent effectué par l'utilisation de l'adjuvant complet de Freund mais aussi avec l'huile minérale et les liposomes (Bizzini, 1984). Aussi, la réponse cellulaire spécifique à l'antigène, incluant la réponse des cellules CD8, peut être induite en utilisant des formulations d'adjuvants contenant les saponines et les liposomes (Newman *et al*, 1995). Les cytokines représentent un autre type d'adjuvant qui ont un mécanisme d'action différent. Le développement des cytokines comme adjuvant est plus difficile par rapport à des adjuvants de petites molécules. Car les cytokines doivent être délivrées aux cellules appropriées et dans le moment opportun de la maturation de la réponse immunitaire. Plusieurs cytokines ont plus d'un effet, il peut être inhibiteur comme il peut être stimulateur. Toutefois, ils peuvent donner des effets indésirables comme l'induction d'une réponse inflammatoire aiguë. Le grand problème technique des cytokines est la spécificité des espèces. Ceci limite leur utilisation chez les modèles d'animaux expérimentaux qui sont utilisés pour caractériser et optimiser les formulations et pour évaluer leur sécurité (Gillott *et al*, 1993). Les adjuvants ont des mécanismes d'action variables. La définition de mécanisme d'action est compliquée par la complexité du système immunitaire, l'hétérogénéité des préparations d'adjuvants et les effets multiples de différents adjuvants (Frost *et al.*, 1978; Edelman, 1980). D'après Bizzini (1984), on peut limiter quelques effets connus sur le système immunitaire en essayant d'associer l'action avec le matériel adjuvant :

- Un transporteur inerte : son effet résulte dans l'agrégation des antigènes solubles ce qui facilite la prise des antigènes par les macrophages, exemple: des particules latex, particules acryliques et les liposomes (quelques types de liposome sont immunogéniques).

- Formation des dépôts: il localise l'antigène au niveau des sites d'injection SC et IM. Exemple : huile minérale et végétale et les sels métalliques (Edelman, 1980).
- Altération de la circulation lymphocytaire : localise les lymphocytes au niveau des noeuds lymphatiques du drainage, ceci facilite les associations cellulaires.
- Stimulation des lymphocytes T : certains adjuvants peuvent générer des cellules T précurseurs, augmenter leur maturation et leur différenciation fonctionnelle. Exemple : Acide polyadénylique-polyurydique.
- Effets sur les lymphocyte B: Exemple lipopolysaccharides (LPS) qui ont une action mitogénique sur les lymphocytes B.
- Métabolisme phospholipidique : certains adjuvants comme la silice, la saponine, l'adjuvant complet de Freund et la vitamine A activent la phospholipase A, qui donne la formation de la lysophosphatidylcholine. Ceci inhibe la synthèse de la prostaglandine qui réduit l'influence négative sur les cellules lymphoïdes.
- Altération de la membrane cellulaire: la saponine, la lysolectine et le retinol, facilitent les interactions cellulaires et activent la synthèse des molécules de régulation.
- Localisation de l'antigène au niveau du noeud lymphatique: un matériel hydrophobe associé à l'antigène contribue à la localisation sélective dans le thymus et les noeuds lymphatiques.
Exemple : le bromide de dimetyl dioctadecyl d'amonium et l'octadecylamine.
- Stimulation des macrophages: l'action de l'adjuvant est généralement une stimulation directe des macrophages. Il augmente la phagocytose de l'antigène par des macrophages et stimule leur action. Exemple : LPS.

3- Les vaccins du futur

Les vaccins contre le BVDV vont changer dans un futur proche. Les avancées dans les connaissances de base du virus ainsi que les changements génétique et antigénique vont stimuler le développement de nouveaux vaccins. Par exemple, il est établi maintenant qu'il y a deux génotypes de BVDV qui ont des caractéristiques antigéniques distinctes, les nouveaux vaccins doivent contenir des virus de chaque génotype (Pellerin *et al.*, 1994). Le type de protection désirée peut pousser au changement du vaccin. Présentement, les vaccins doivent protéger contre

la maladie clinique. Dans le futur, les vaccins devront protéger contre l'infection foetale, ce qui peut être difficile à accomplir. Plusieurs études décrivent l'utilisation de nouvelles approches pour l'immunisation contre le BVDV et les virus étroitement liés au BVDV, comme l'utilisation des complexes de stimulation d'immunité (ISCOMs). Ce sont des mixtures de cholestérol, de saponine et de protéines. Des protéines partiellement purifiées du BVDV ont été utilisées pour faire des ISCOMs, qui ont produit des titres élevés d'anticorps neutralisants après une inoculation chez les bovins et les ovins (Carlsson *et al.*, 1991; Kamstrup *et al.*, 1992). Les anticorps anti-idiotypiques représentent une autre nouvelle approche pour l'immunisation. Comme les anticorps anti-idiotypiques réagissent avec le site de liaison tridimensionnel d'un autre anticorps, un anticorps anti-idiotypique agit comme un répliquât d'antigène (Onisk *et al.*, 1992).

Les souris et les vaches injectées avec des anticorps anti-idiotypiques contre le BVDV à titre de vaccin, produisent des anticorps neutralisants contre le BVDV (Xue *et al.*, 1991). Finalement, la technologie d'ADN recombinant a été utilisée pour incorporer les séquences d'acides nucléiques du virus BVDV directement en injection intramusculaire chez l'animal. Après challenge, les animaux vaccinés avec de l'ADN ont montré une protection clinique et de hauts titres d'anticorps neutralisants au niveau sérique (Harpin *et al.*, 1997).

Le but de ce travail de recherche est de mettre au point une nouvelle préparation vaccinale inactivée plus efficace à générer une réponse immunitaire chez les bovins contre le challenge par la souche NY-1 du BVDV.

MATERIEL & METHODES

Matériel et Méthodes

1- Vaccin

Le vaccin est une combinaison de souches de BVDV inactivées avec la bêta-propiolactone contenant un volume égal de chacune des souches suivantes: la souche C24V (de titre 10^6 TCID₅₀), la souche 125 (de titre $10^{6.2}$ TCID₅₀), la souche Singer (de titre 10^7 TCID₅₀) et la souche 96B3296 (de titre 10^7 TCID₅₀), avec un adjuvant UM (Université de Montréal) de composition confidentielle.

2- Virus et cellules

Des cellules de rein de bovin MDBK (Madin-Darby bovine kidney) exemptes de BVDV ont été propagées en culture dans un milieu essentiel minimum Earle (MEM, Gibco BRL) supplémenté et contenant de la gentamycine (50 µg/ml, Sigma) avec 10 % de sérum de cheval (Gibco BRL). Pour cette étude, la souche Singer type I de BVDV et la souche 125 type II ont été obtenues des Services de National Veterinary Laboratory, United States Department of Agriculture (NVSL-USDA; Ames, Iowa, USA). La souche NY-1 utilisée pour le challenge (NVSL-USDA BVDV/NY I lot # 97-12) a été préparée par le service d'inspection de santé animale et végétale. Le virus a été conservé à -80 °C.

3- Inactivation du virus

L'inactivation du virus a été établie selon la procédure développée par Schmidt et Emmons (1989). Cinq cents ml de chaque souche conservée à -80 °C est mise rapidement dans un bain marie à 37 °C. Une solution aqueuse à 10% de la beta-propiolactone est préparée et gardée sur la glace jusqu'à utilisation. Soixante-six ml de cette solution (concentration finale 0.33%) sont ajoutés sur le mélange viral tamponé avec 100 ml de tampon Hépès 2M pour une concentration

finale de 100mM. Cette mixture est incubée à 37⁰C pendant deux heures avec une faible agitation. Le pH est alors ajusté à 7.4 par ajout de 4.5 ml de NaOH 7.5 N. L'incubation est poursuivie à 4⁰C pendant 68 heures additionnelles. Pendant l'hydrolyse de la bêta-propiolactone, la suspension virale devient acide (pH = 6,3) et un peu trouble. Elle est ainsi centrifugée à 200g pendant 10 mn à 4⁰C. Par la suite le pH est ajusté à 7.4 (0.4 ml de NaOH à 7.5 N sont nécessaires).

4- Immunisation et challenge des animaux

Six veaux Holstein âgés de 3 à 4 mois négatifs pour la présence d'anticorps contre le BVDV ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont séjourné dans des boxes isolés et ont été soumis à des précautions strictes pour prévenir l'introduction du BVDV. Trois animaux ont été immunisés par voie intramusculaire (IM) avec 2 ml du vaccin inactivé, et les trois autres ont servi de contrôle. Les injections de rappel ont été données à la 4^{ème} semaine. Des échantillons sanguins ont été prélevés de tous les animaux chaque semaine. Pendant la 5^{ème} semaine après la vaccination, les animaux ont été challengés avec 1.2 ml du 10^{7.9} TCID₅₀ de la souche N Y-1 du BVDV par voie intra-nasale. Un volume de 0.6 ml par narine est donné en goutte à goutte à chaque animal.

Selon un score préétabli, les signes cliniques ont été observés quotidiennement du 3^{ème} jour avant challenge jusqu'au 14^{ème} après challenge (tableau 1). Durant la période du challenge, les échantillons de sang pour doser les anticorps et pour les essais de prolifération des cellules mononucléaires bovines ont été collectés aux jours -3, 0 (challenge), 2, 4, 6, 8, 10, 14 et 21. Les sécrétions nasales ont été prises en même temps que les sérums et ceci jusqu'à la fin de l'expérimentation.

5- Test d'immunoperoxydase

Les échantillons du sérum ont été testés pour la présence d'anticorps spécifiques anti-BVDV par la technique immunoperoxydase qui a été réalisée selon le protocole de Lambot et al (1997). Des cellules MDBK (200 000 cellules par ml) en culture dans des plaques de 96 puits ont

été infectées par une préparation standard de la souche Singer et 125 du BVDV. Dans chacune des plaques, deux cupules sont non infectées pour servir de contrôle de la réaction des sérums contre les protéines des cellules MDBK. Après 3 jours d'incubation, les cellules monocouches ont été lavées avec PBS-Tween (0.05% Tween, Sigma), fixées avec 20% d'acétone dans le PBS et séchées à 30 °C pendant 3 heures. Les plaques sont ensuite conservées à -20 °C prêtes à l'utilisation. Les plaques sont hydratées avec 150 µl de PBS par cupule et incubées 30 mn à température de la pièce. Elles sont ensuite séchées pendant 15 mn à la ventilation d'une hotte laminaire. Les échantillons de sérums sont dilués à un demi et 50 µl de chaque dilution sont ajoutés en duplicata dans les puits, sauf ceux de contrôle avec le sérum positif et le sérum négatif, puis incubées 15 mn à 30 °C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois avec 200 µl de PBS-Tween et séchées 15 mn dans la ventilation d'une hotte laminaire. Pour la détection des anticorps spécifiques anti-BVDV liés aux antigènes, 50 µl par puits d'anticorps conjugués à la peroxydase anti-IgG bovins (BIO-RAD, 1:400) dilués dans SDF (serum and conjugate dilution fluid) ont été ajoutés et incubés pendant 15 mn. Les plaques sont lavées 3 fois avec des PBS-Tween en utilisant un flacon laveur puis séchées 15 mn à la ventilation d'une hotte laminaire. Le substrat est préparé en ajoutant 0.25 ml de l'AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) à 5 ml du tampon acétate à 0.05 M et 1.67 µl de H₂O₂ à 30% immédiatement avant l'usage. 50 µl de substrat sont ajoutés dans chaque cupule. Après 10 mn d'incubation, les plaques sont séchées et visualisées sous microscope optique. Les résultats montrant des cellules avec une coloration rouge intracellulaire sont considérés positifs

6- Test de séroneutralisation

Le test de séroneutralisation a été établi comme il a été décrit par Elahi et al (1997). Il a été conduit en utilisant soit les échantillons des sérums soit les sécrétions nasales. Des plaques de 96 puits contenant des cellules MDBK (200 000 cellules par ml) ont été préparées et incubées dans un incubateur à 37 °C avec 2% de CO₂ pendant 3 à 4 heures. Les plaques sont ensuite vérifiées pour l'adhésion et la confluence des cellules (entre 30 à 50% de confluence). Les sérums et les sécrétions nasales sont inactivées durant 30 mn dans un bain-marie à 56 °C. Dans

une plaque non utilisée, 150 µl (la rangée A), et 100 µl (la rangée B à H) de milieu MEM avec 150 µl de gentamycine ont été distribués. Les échantillons de sérum ou de sécrétions nasales inactivées sont ajoutées dans la rangée A en duplicata (50 µl par échantillon), et 100 µl du mélange sont transférés successivement de la rangée A jusqu'à la rangée H pour avoir des dilutions doublantes. cent TCID₅₀ du BVDV (souches Singer et 125) ont été ajoutés dans chaque puits sauf pour ceux du contrôle cellulaire pour voir la réaction anti-protéine des sérums contre les cellules MDBK. les plaques sont ensuite pré-incubées pendant une heure à 37 °C avec 2% de CO₂. Cette mixture (100 µl) est transférée sur des cellules MDBK préparées trois jours à l'avance et confluentes à 80-90% puis incubée à 37 °C pendant une heure. Ensuite 100 µl du milieu MEM complété ont été ajoutés dans chaque cupule. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 4 jours. L'inverse de la plus grande dilution qui inhibe complètement l'effet cytopathogène viral dans au moins un des deux puits, a été retenu comme titre de neutralisation.

7- ELISA

Ce test est basé sur la technique décrite par Elahi et al (1997) et Lambot et al (1997). Pour détecter les anticorps sécrétoires au niveau des sécrétions nasales, des cellules MDBK infectées avec les souches C24V, 125, Singer et 96B3296 sont inactivées à la bêta-propiolactone et ont été utilisées pour préparer des plaques de 96 puits. Après 24 heures, les plaques avec l'antigène fixé sont lavées deux fois avec le PBS-Tween (0.05%) et séchées pendant 10 mn à la ventilation d'une hotte laminaire. Cent µl de chaque dilution des sécrétions nasales sont ajoutés en duplicata dans les cupules et 100 µl de PBS dans deux cupules pour servir de contrôle négatif. Les plaques sont ensuite incubées pendant deux heures à température ambiante, puis lavées trois fois avec le PBS-Tween et séchées pendant 10 mn à la ventilation d'une hotte. Cent µl par puits d'anticorps anti-IgG bovins (BIO-RAD, 1:400) conjugués à la peroxydase dilués dans SDF (serum and conjugate dilution fluid) sont ajoutés. Une incubation d'une heure est effectuée à température ambiante. Après quoi, les plaques sont lavées 4 fois avec le PBS-Tween et le substrat est préparé. Onze µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ajouté à 11 ml de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-EthylBenzthiazoline-6-Sulfonic acid). Cent µl de ce mélange sont ajoutés dans chaque cupule, et les plaques

sont incubées pendant 30 mn à température ambiante. A la fin de l'incubation, 50 μ l de la solution d'arrêt sont ajoutés et les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm. Les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus grande dilution donnant une lecture qui est au moins deux fois supérieure au contrôle négatif.

8- Test d'interféron- γ (IFN- γ)

Basé sur BOVIGAMTM, un Kit ELISA IFN- γ bovin : BOVIGAM (CSL Veterinary, Australia) a été utilisé pour mesurer les concentrations d'IFN- γ produites dans le surnageant des cellules mononucléaires en culture stimulées avec les souches virales Singer et 125 du BVDV.

Les cellules sont suspendues à une concentration de $3 \cdot 10^6$ /ml dans un milieu RPMI-1640 avec 10% du sérum foetal bovin, 2 mM de sodium pyruvate, 2 mM de glutamine et 50 μ g/ml de gentamycine. Elles sont mises dans des puits en triplicata ($6 \cdot 10^5$ cellules/puits) en présence du virus (Singer et 125) à des titres de 10^7 TCID₅₀ et $10^{6.2}$ TCID₅₀ respectivement et incubées à 37 °C dans 5% de CO₂ pendant cinq jours. Les surnageants sont récupérés après centrifugation des plaques à 1500 RPM pendant 15 minutes, ils sont ensuite conservés à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

9- Test de prolifération des cellules mononucléaires bovines

Ce test est appliqué comme il a été décrit par Lambot et al. 1997. Soixante ml de sang périphérique de chaque veau sont pris dans des seringues de 60 ml contenant 6 ml d'héparine à 100 unités/ ml. Les leucocytes bovins sont séparés par centrifugation (1600 RPM pendant 20 minutes à 4 °C) du sang périphérique pour collecter le buffy coat. Les cellules mononucléaires sont purifiées à partir du buffy coat par flottaison sur Histopaque 1.083 (Sigma), et suspendues à une concentration de $3 \cdot 10^6$ /ml dans un milieu RPMI-1640 avec 10% du sérum foetal bovin, 2 mM de sodium pyruvate, 2 mM de glutamine et 50 μ g/ml de gentamycine. Les cellules mononucléaires sont mises dans des puits en triplicata ($6 \cdot 10^5$ cellules/puits) et incubées en présence du virus (Singer, 125 et N-Y 1) ou en présence de mitogènes concanavaline A et

pokeweed dans 200 μl de culture à 37 °C dans 5% de CO₂. Les virus sont utilisés à des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/40 dans du milieu RPMI pour le test. Les titres des souches Singer, 125 et N-Y 1 sont 10⁷ TCID₅₀, 10^{6.2} TCID₅₀ et 10⁷ TCID₅₀ respectivement. Les mitogènes ont été utilisés à 20 g/l pour la concanavaline A et 100 g/l pour le pokeweed. Après deux jours pour les mitogènes et 5 jours pour les virus, les puits ont été incubés pendant 6 heures avec 0.2 μCi de [³H]-thymidine (6,5 Ci/mL, ICN) et récoltés avec un Skatron semiautomatique cell harvester (Flow Laboratories, Rockville MD). L'indice de stimulation est calculé par la formule suivante : IS = Moyenne de compte par minute dans les puits stimulés par antigène / Moyenne de compte par minute dans les puits contenant des cellules avec juste du milieu.

10- Essai de cytotoxicité

Ce test est appliqué comme il a été décrit par Beer et al. 1997. Des morceaux de tissu conjonctif de chaque animal sont pris de manière aseptique au niveau de l'encolure. Ils sont découpés en petits morceaux de 1mm²-1cm² dans du PBS avec 5% de gentamycine (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ils sont lavés 3 fois et suspendus dans 5 ml du milieu DMEM 9.25 complété avec 0.5 ml de collagénase 2000 unités/ml et incubés à 37⁰C avec 5% CO₂ pendant 24 heures. Ensuite, ils sont lavés avec du PBS, centrifugés 5 min à 1500 RPM à 10⁰C et resuspendus dans 8 ml du milieu DMEM 9.25 complété puis incubés pendant 4 jours à 37⁰C avec 5% CO₂. Pour la division cellulaire, les fibroblastes sont mis dans des flacons P30 à une concentration de 2 10⁵ cellules/ml et incubés à 37⁰C avec 5% CO₂ pendant 3 jours. Ensuite, les fibroblastes sont répartis dans des plaques de 96 puits à une concentration de 1.5 10⁵ cellules/ml et les plaques sont incubées à 37⁰C avec 5% CO₂ pendant 3 jours. Elles sont testées par immunoperoxydase pour la présence du BVDV et elles sont infectées avec 100 μl du virus (singer et 125). Les échantillons sont fait en triplicata. Les plaques sont incubées 18-24 heures à 37⁰C avec 5% CO₂. Après incubation, les plaques sont lavées une fois avec du PBS 150 $\mu\text{l}/\text{puits}$, le paraformaldehyde est ajouté à 150 $\mu\text{l}/\text{puits}$ et les plaques sont incubées à 4⁰C pendant 16 heures. Les plaques sont ensuite lavées avec du PBS 0.5 % BSA 100 $\mu\text{l}/\text{puits}$ et conservées des sacs en plastique à -20⁰C.

Pour mesurer la cytotoxicité au niveau du sang des veaux, des cellules fibroblastiques autologues sont utilisées comme cibles. Des monocouches cellulaires sont préparées dans des plaques de 96 puits à 4×10^5 cellules/puits et infectées avec les souches Singer, 125 et 96B3296 du BVDV. Les cellules mononucléaires du buffy coat sont ajoutées à des concentrations de 3×10^5 sur les monocouches de fibroblastes et incubées à 37°C dans 5% de CO_2 . Après 5 jours, les puits ont été incubés durant 6 heures avec $0.2 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]$ -thymidine ($6,5 \text{ Ci/mL}$, ICN) et récoltés avec un Skatron semiautomatique cell harvester (Flow Laboratories, Rockville MD). L'indice de stimulation a été calculé par la formule suivante : $\text{IS} = \text{Moyenne de compte par minute dans les puits stimulés par antigène} / \text{Moyenne de compte par minute dans les puits contenant des cellules avec juste du milieu}$.

11- Analyse hématologique

Pour établir des valeurs de base pour le comptage des leucocytes et des plaquettes, les échantillons de sang ont été obtenus de chaque veau aux jours 0, 2, 4, 7, 11 et 14 après exposition au challenge. Les échantillons de sang ont été collectés dans des tubes de 7 ml contenant de l'EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) 12.15mg. le comptage des leucocytes et des plaquettes est effectué par le compteur cellulaire ABOTT CELL-DYN 3500.

12- Analyse statistique

Les différences significatives observées dans les conditions du test ont été déterminées en utilisant une analyse de la variance à une seule variable suivie par un t test approprié avec des corrections Fisher pour des comparaisons multiples simultanées utilisant statview+SE software (Abacus concepts, Berkeley, CA).

RESULTATS

RESULTATS

I- Réponse humorale

1- Anticorps sériques

1.1- Anticorps spécifiques:

Les titres spécifiques anti-BVDV dirigés contre la souche Singer détectés par immunoperoxydase montrent une certaine similarité entre les animaux vaccinés et les animaux de contrôle (fig.1A). Avant le challenge (semaine 5) seuls les animaux vaccinés montrent une faible réponse et ce après l'injection du rappel (semaine 4). Après challenge, les deux groupes d'animaux présentent une même dynamique des titres anticorps.

Pour la souche 125 type II cytopathogène du BVDV, aucun titre anticorps spécifique contre le BVDV n'a été détectable avant challenge pour les deux groupes d'animaux (fig.1B). Une semaine après challenge, les animaux vaccinés commencent à avoir une réponse, et les titres ont atteint leur maximum à la 7ème semaine ($4 \cdot 10^2$). Les titres d'anticorps des animaux vaccinés restent supérieurs à ceux des animaux de contrôle jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les anticorps spécifiques anti-BVDV ont été détectés par la technique ELISA. les titres anticorps augmentent à partir de la 4 ème semaine après vaccination chez les animaux vaccinés. Cette réponse atteint son maximum au cours de la semaine du challenge et garde des titres élevés jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les animaux de contrôle ont montré de faibles réponses qui restent inférieures à celles des animaux vaccinés (fig. 3b).

1.2- Anticorps neutralisants

On ne détecte pas d'anticorps neutralisants avant le challenge pour les deux groupes d'animaux et ce pour les deux souches Singer et 125 utilisées au cours du test. Dans le cas de la souche Singer, les animaux vaccinés montrent une réponse après challenge, cette réponse atteint des titres élevés ($5 \cdot 10^3$) la 7ème semaine et continuent à augmenter jusqu'à la fin de l'expérimentation (fig.2A). Les animaux de contrôle montrent la même dynamique que les

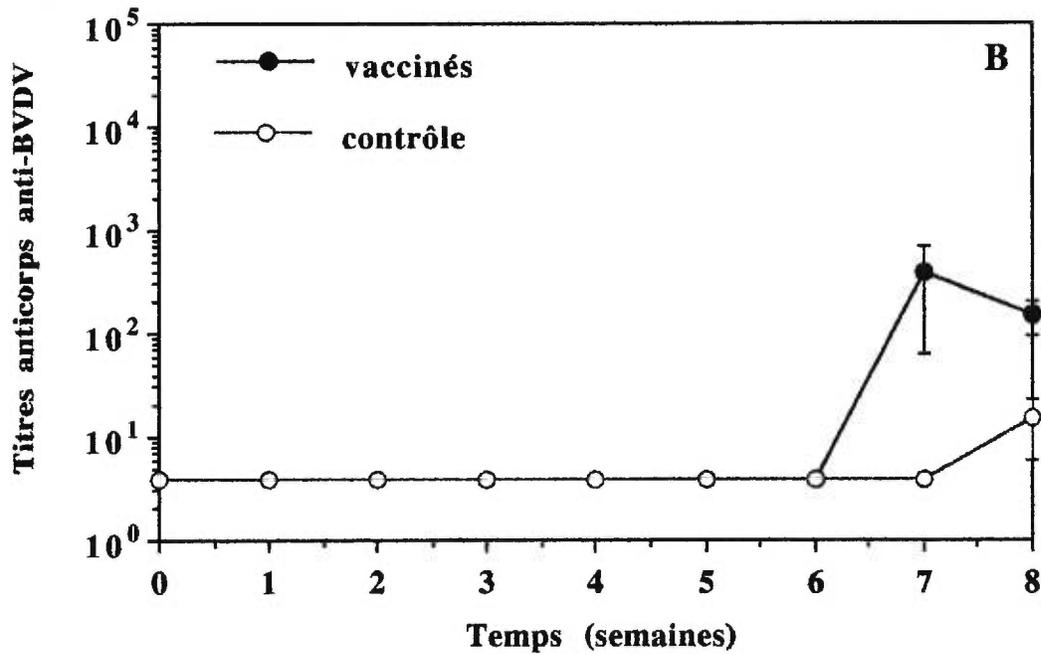
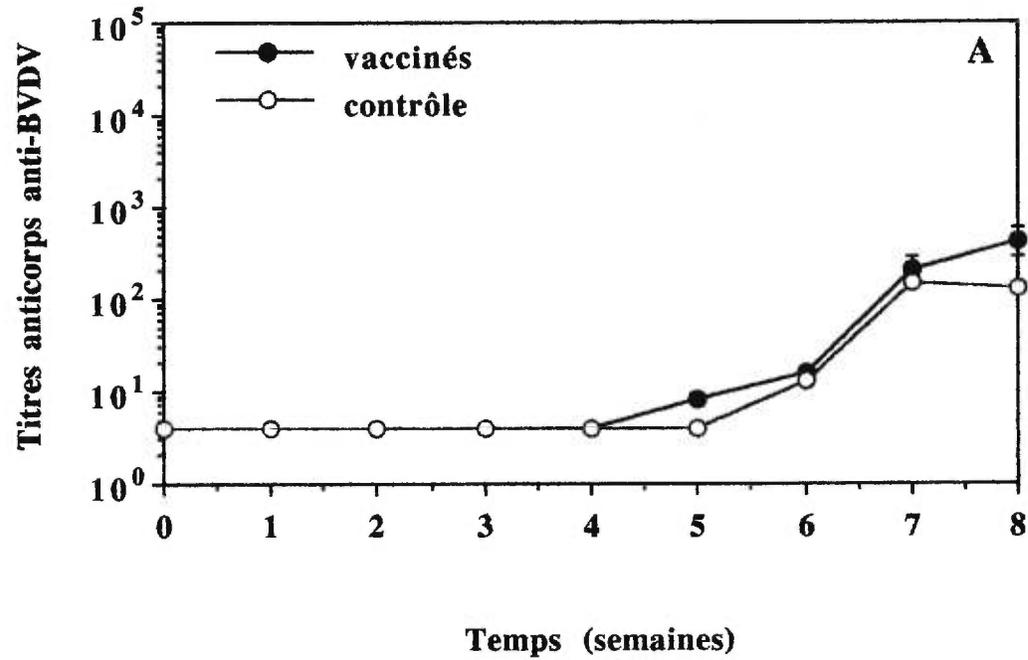


Figure 1: Production d'anticorps sériques détectés par IMPA contre la souche Singer (A) et la souche 125 (B) du BVDV après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

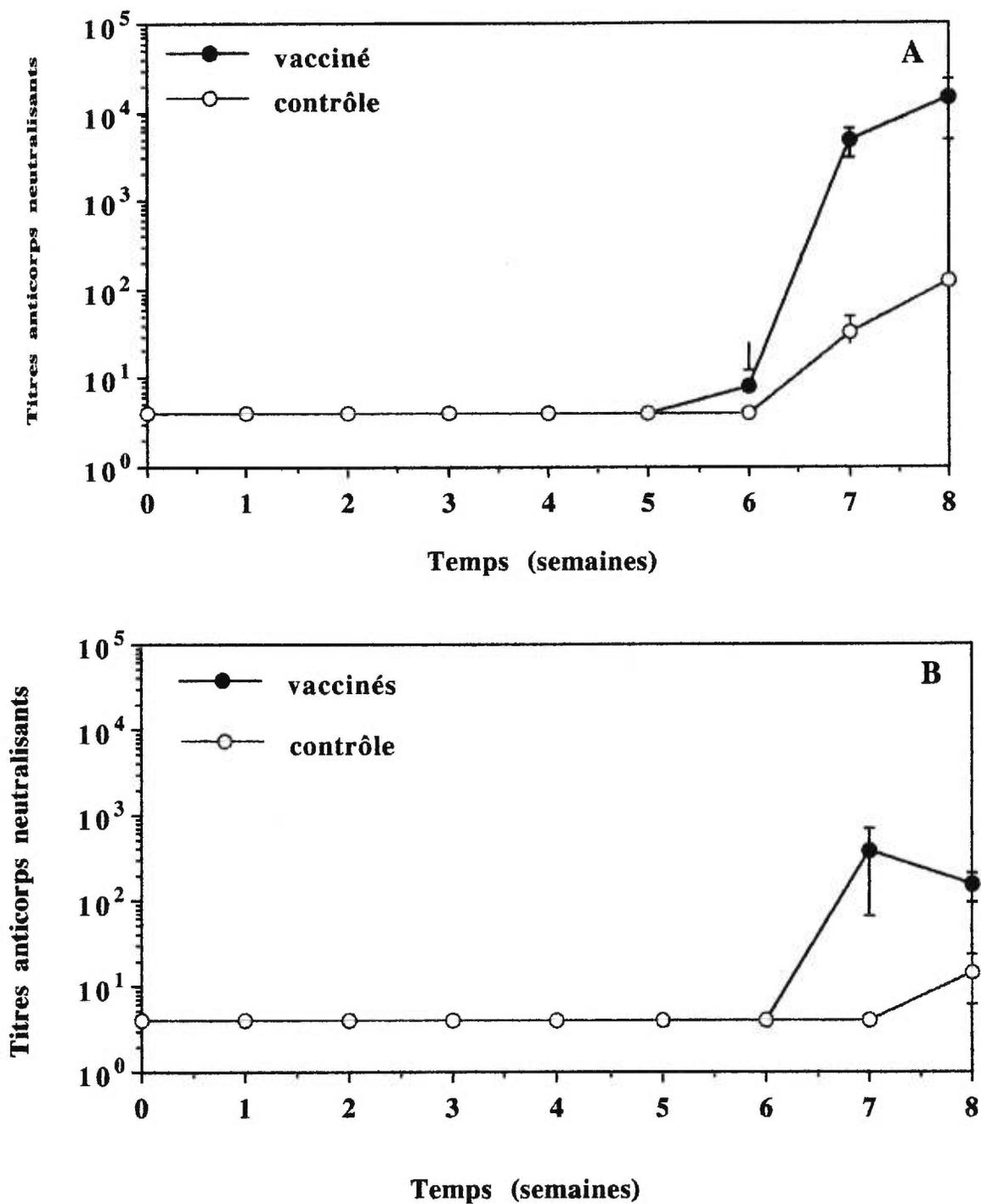


Figure 2: Production d'anticorps neutralisants détectés par SN contre la souche Singer (A) et la souche 125 (B) après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

animaux vaccinés mais à des titres moins élevés qui ne dépassent pas 10^2 . Dans le cas de la souche 125, seuls les animaux vaccinés produisent des anticorps neutralisants contre cette souche et la réponse atteint un titre de 2×10^2 alors que la réponse des animaux de contrôle est presque nulle (fig.2B).

2- Les anticorps sécrétoires

Détectés par ELISA au niveau des sécrétions nasales, les anticorps sécrétoires ont été mis en évidence entre la 4ème et la 5ème semaine post-administration chez les animaux vaccinés. Cette réponse atteint son maximum au cours de la semaine du challenge et garde des titres élevés jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les animaux de contrôle n'ont montré aucune présence d'anticorps sécrétoires pendant toute la durée de l'expérience et leurs réponses étaient similaires au contrôle négatif (fig.3a).

II- Réponse cellulaire

1- Réponse proliférative

A l'inverse de la réponse humorale, la réponse cellulaire a été induite chez les veaux vaccinés avant le challenge comme suggèrent les résultats de la prolifération des cellules mononucléaires bovines en présence du BVDV. Les cellules mononucléaires des animaux vaccinés montrent une réponse proliférative significative suite à la stimulation par la souche 125 type II cytopathogène du BVDV (fig.4). D'autre part, aucune réponse significative à la stimulation par la souche Singer type I cytopathogène n'a été observée en présence des cellules mononucléaires collectées des animaux vaccinés et non vaccinés (fig.5). Tous les veaux semblent immuno-compétents de manière égale, lorsque leurs cellules monocléaires sont stimulées par la concanavaleine A, car les indices de prolifération sont significativement semblables (fig.6).

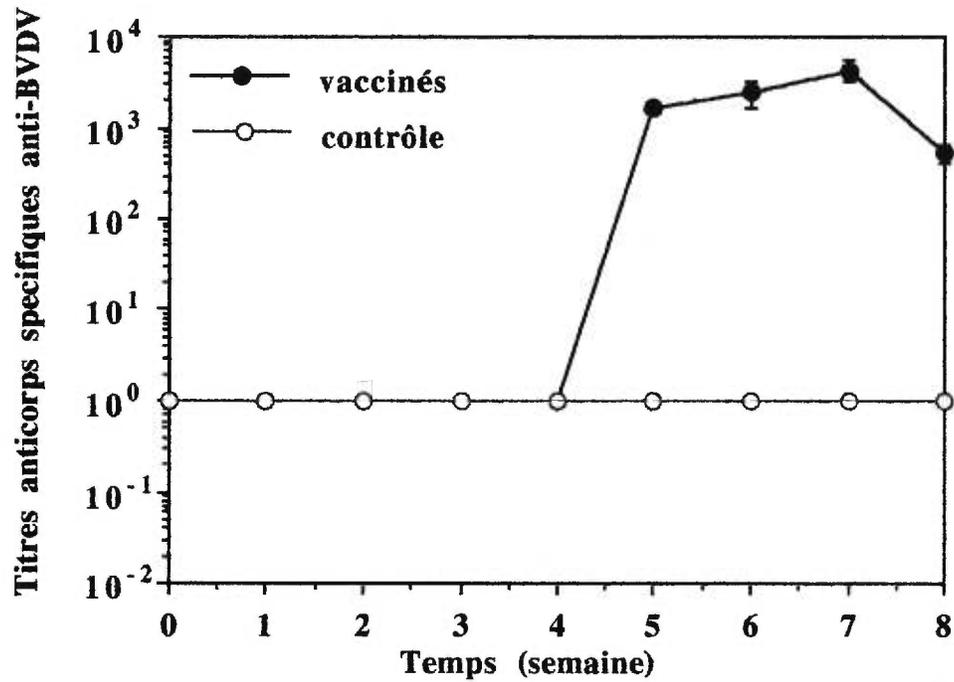


Figure 3a: Production d'anticorps sécrétoires détectés par ELISA contre les antigènes BVDV des veaux après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES)

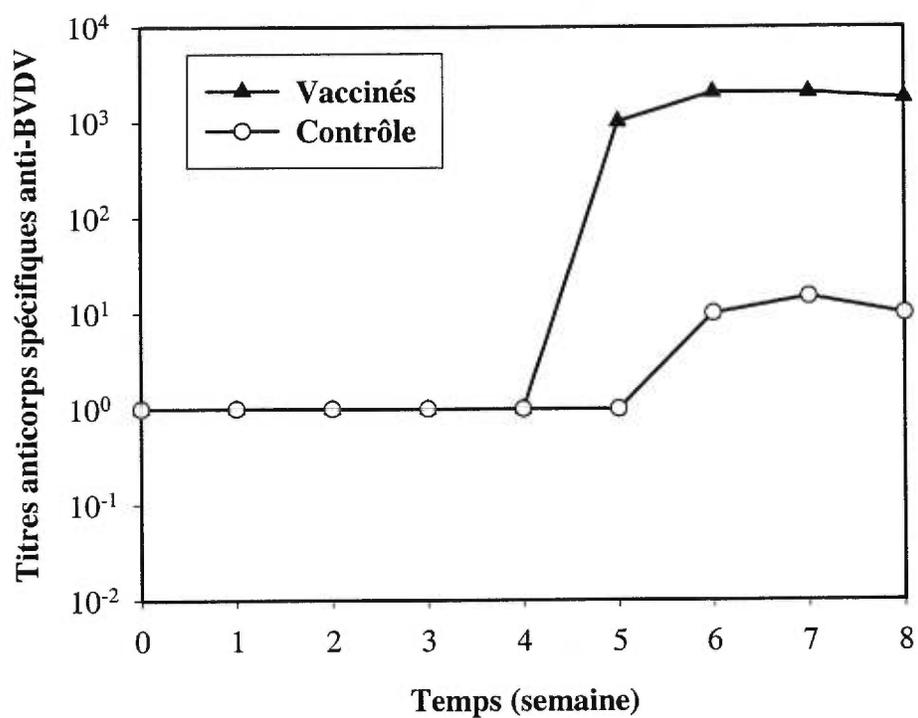


Figure 3b : Production d'anticorps sériques détectés par ELISA contre les antigènes BVDV des veaux après vaccination (semaine 0), rappel (semaine 4) et challenge (semaine 5). Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

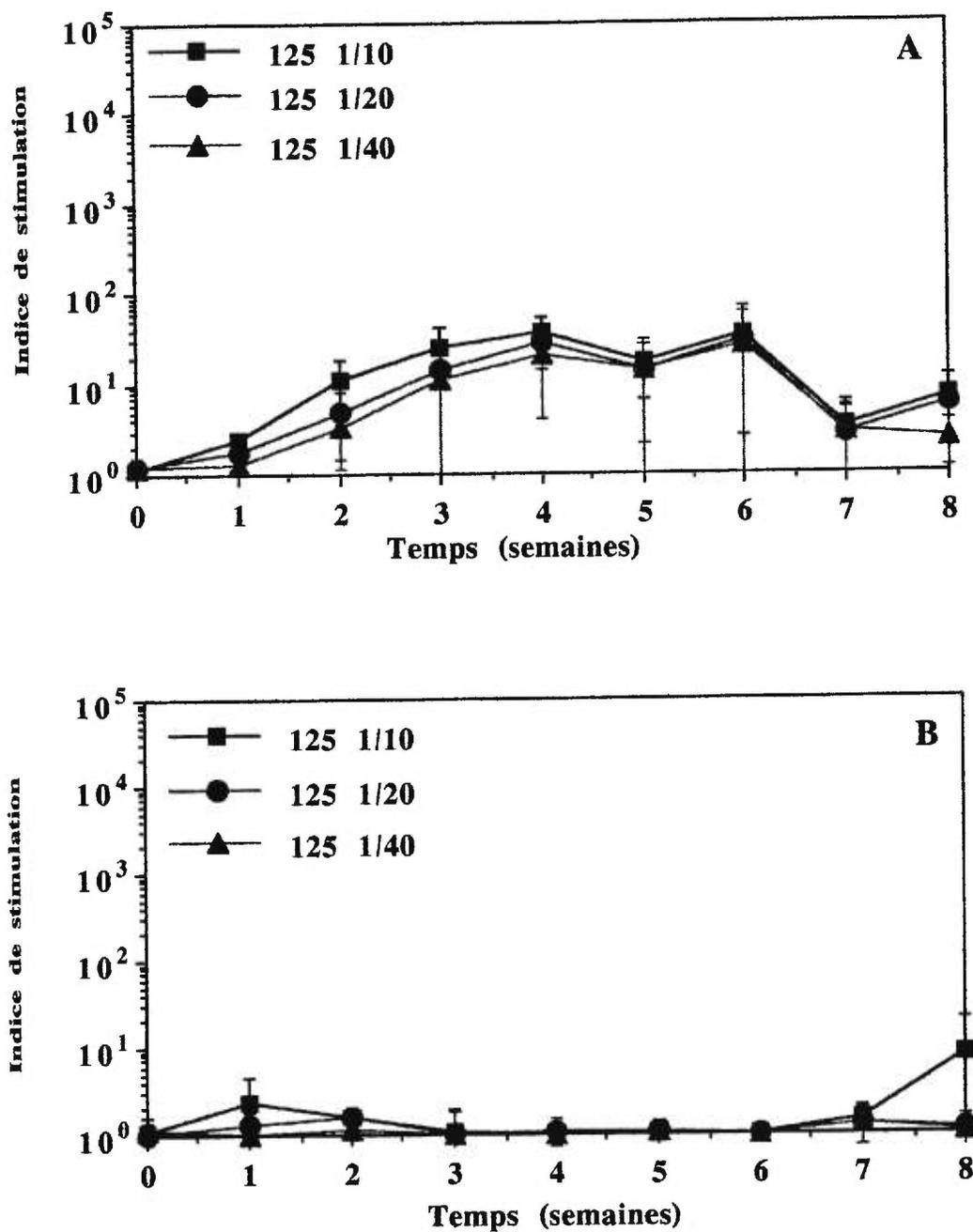


Figure 4 : Réponse proliférative des mononucléaires des animaux vaccinés (A) et de contrôle (B) après stimulation par la souche 125. les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

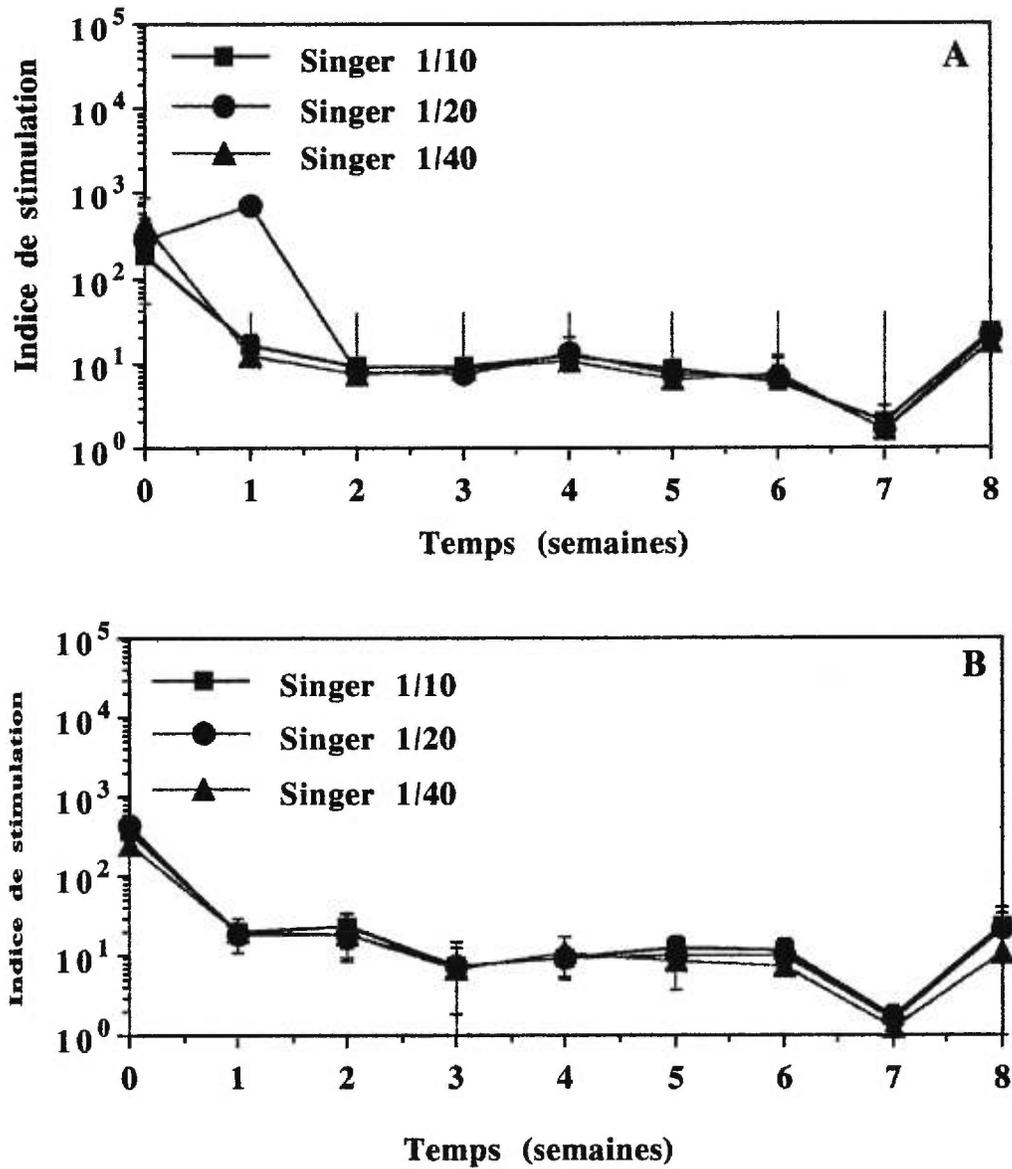


Figure 5: Réponse proliférative des mononucléaires des animaux vaccinés (A) et de contrôle (B) après stimulation par la souche Singer. Les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

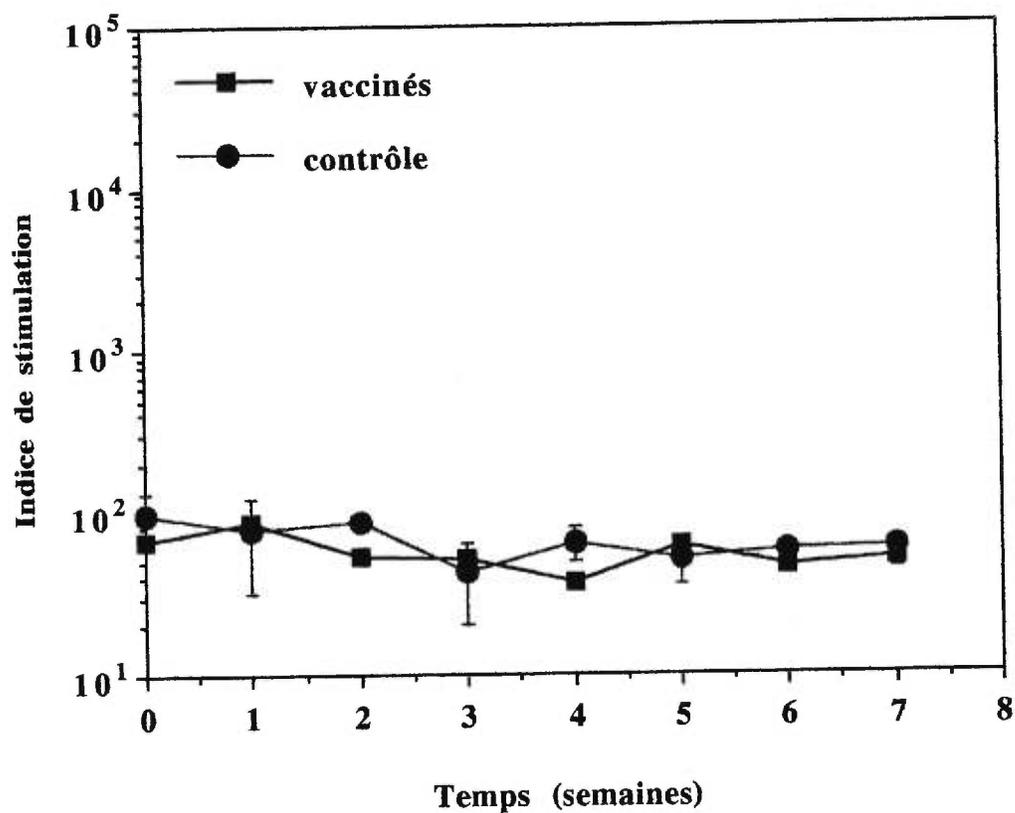


Figure 6 : Prolifération des mononucléaires des animaux vaccinés et de contrôle après stimulation par la concanavaline A. Les animaux ont été challengés à la semaine 5. Chaque point correspond à la moyenne de 3 valeurs (\pm ES).

2- Production d'IFN γ

De grandes concentrations d'IFN γ (au moins le double) sont produites *in vitro* par les cellules mononucléaires collectées des animaux vaccinés par rapport aux animaux de contrôle. Les cellules mononucléaires ont été mises en présence de la souche Singer, la souche 125 et la souche NY-1 (fig. 7). Cette dernière n'a suscité aucune différence entre les deux groupes d'animaux. La production de IFN γ a été mesurée pendant la période du rappel (semaine 4) et du challenge (semaine 5). Cette production continue jusqu'à une semaine après challenge.

3- Réponse cytotoxique

Les résultats de la prolifération des cellules cytotoxiques, utilisant les fibroblastes comme cellules cibles ne montrent pas de différences significatives entre les animaux vaccinés et de contrôle et ceci pour les deux souches utilisées: la souche Singer type I cytopathogène (fig. 8a) et la souche 125 type II cytopathogène du BVDV (fig. 8b).

III- Comptage des neutrophiles et des plaquettes

Durant la période du challenge, le comptage des leucocytes (fig.9) et celui des plaquettes (fig.10) ne montre aucune différence entre les animaux vaccinés et non vaccinés. A noter que les résultats obtenus de cette expérience sont toujours restés dans les normes ordinairement rencontrées chez les bovins. Mais on peut constater que les valeurs du comptage des neutrophiles et des plaquettes accusent une baisse entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour ($3 \cdot 10^9/l$ et $250 \cdot 10^9/l$ respectivement) jour postchallenge pour les animaux vaccinés et ceux du contrôle.

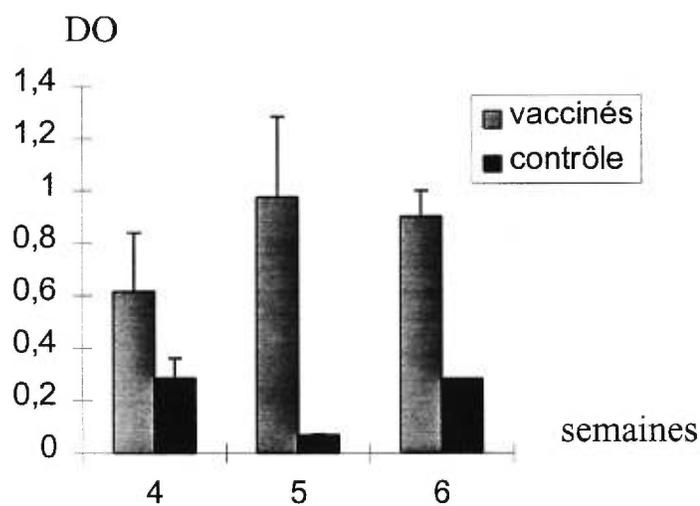
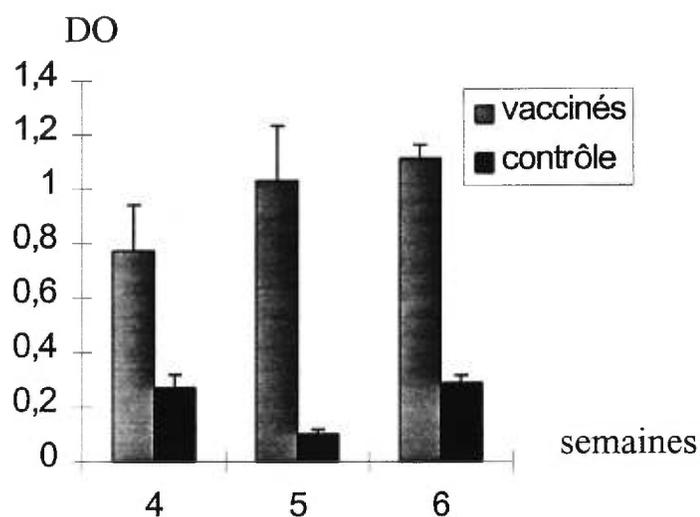


Figure 7 : Production de l'interferon *in vitro* par les cellules mononucléaires des animaux vaccinés et de contrôle. Les cellules stimulées par la souche Singer (A) et 125 (B). Un rappel a été fait la semaine 4 et les animaux ont été challengés la semaine 5

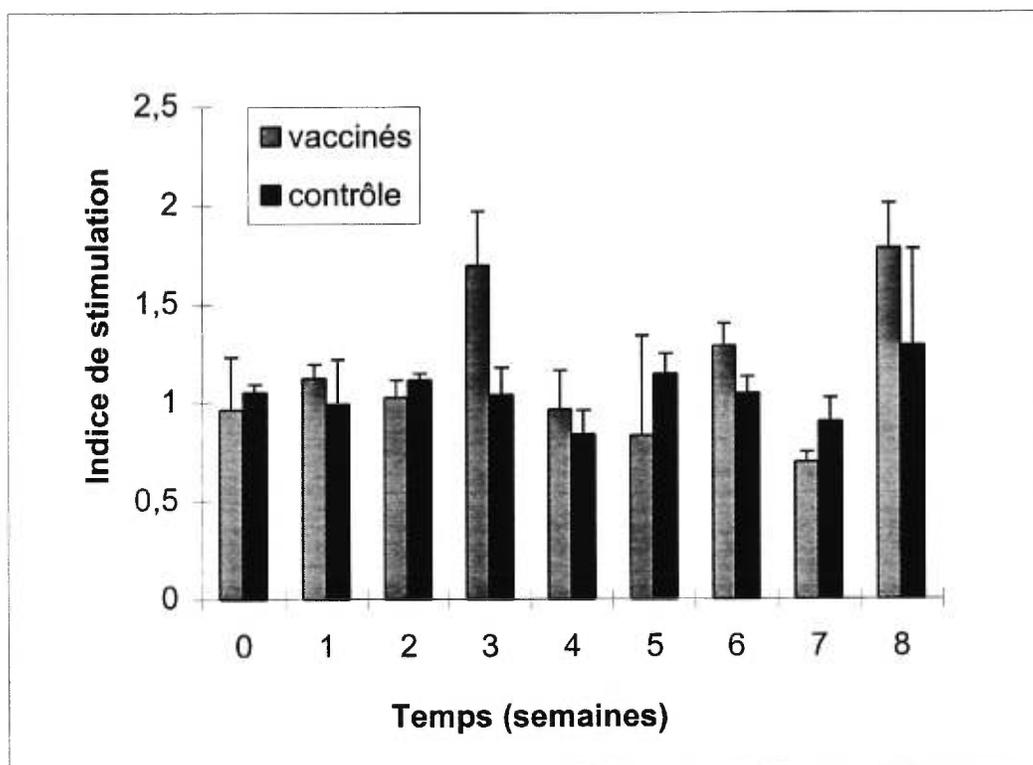


Figure 8.a : Prolifération en fonction du temps des lymphocytes collectés des animaux vaccinés et de contrôle en présence de fibroblastes infectés par la souche Singer du BVDV.

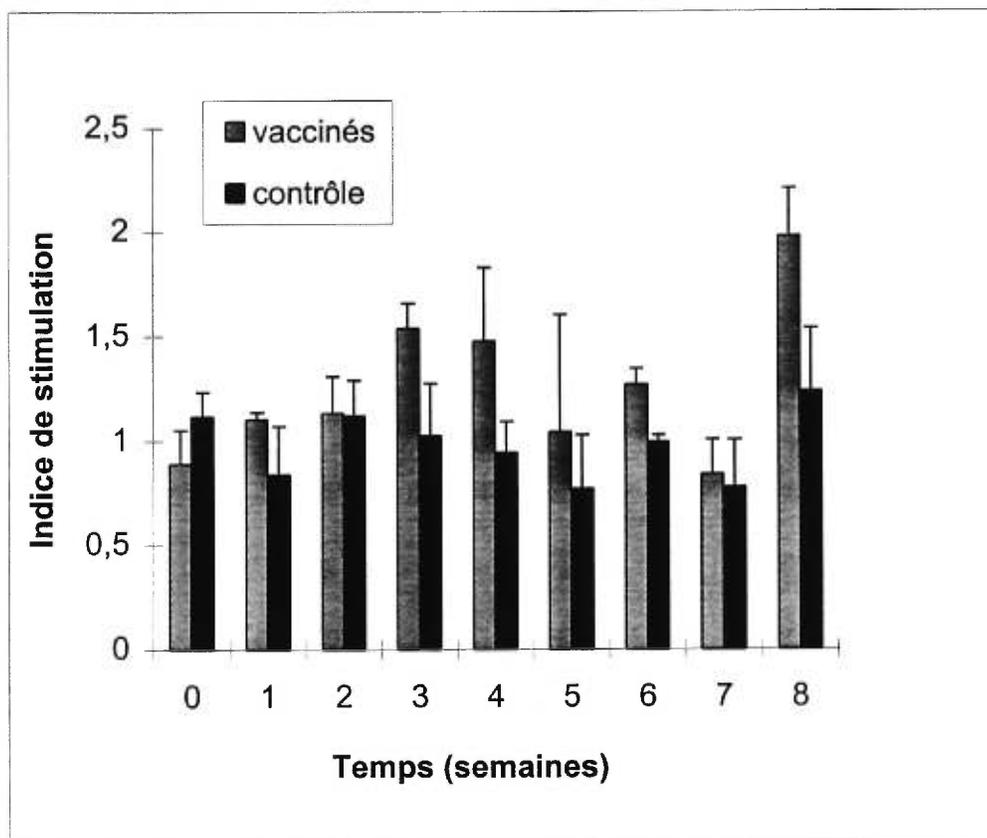


Figure 8.b : Prolifération en fonction du temps des lymphocytes collectés des animaux vaccinés et de contrôle en présence de fibroblastes infectés par la souche 125 du BVDV.

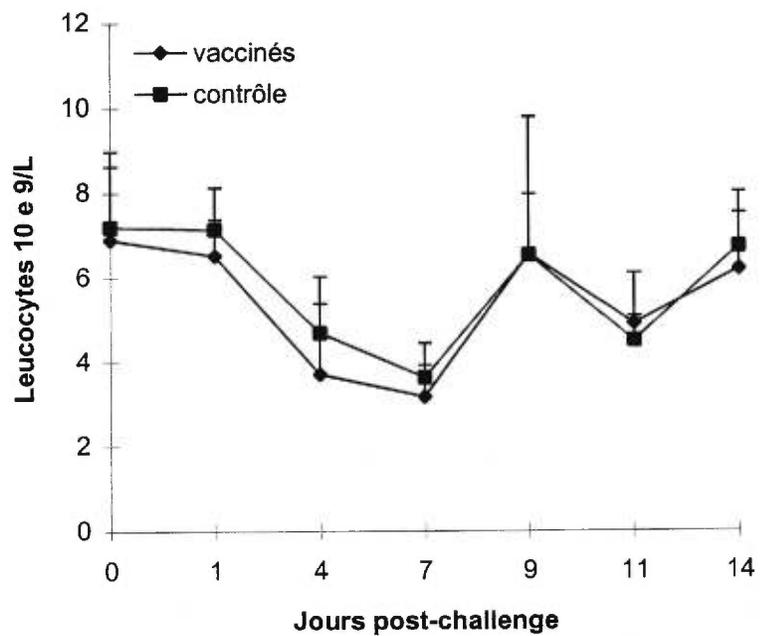


Figure 9: Comptage en fonction du temps des leucocytes collectés des animaux vaccinés et de contrôle durant la période post-challenge.

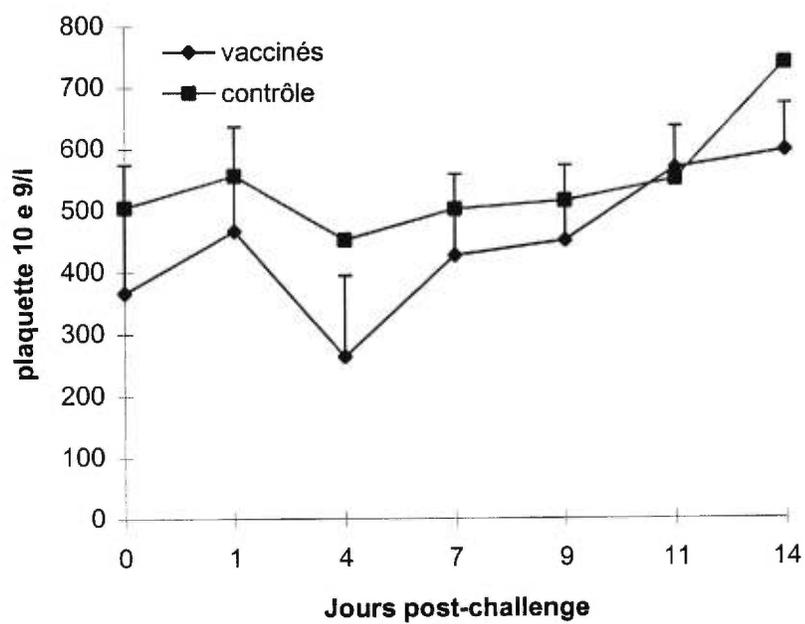


Figure 10: Comptage en fonction du temps des plaquettes collectées des animaux vaccinés et de contrôle durant la période post-challenge.

IV- Evaluation des signes cliniques

Les animaux vaccinés démontrent une protection significative contre l'infection BVDV comparativement aux animaux de contrôle comme le montrent les résultats de la progression de la maladie (fig. 11) utilisant un système de score clinique (tableau 1) chez les deux groupes d'animaux. Une différence significative en terme de protection contre le BVDV a été observée entre les veaux vaccinés et les veaux non vaccinés ($P < 0.001$). Durant la période de l'infection expérimentale, les veaux vaccinés ont manifesté la maladie mais de façon moins sévère que les veaux de contrôle, qui ont été sérieusement atteints entre les jours 8 et 14 après challenge.

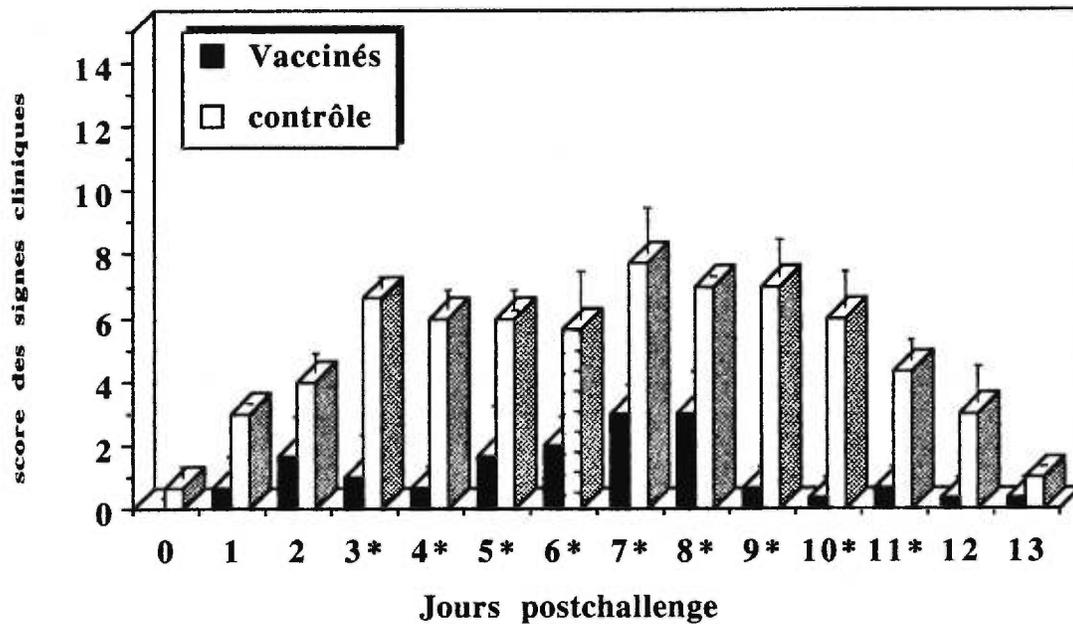


Figure 11: Évaluation des signes cliniques des animaux vaccinés et de contrôle après challenge avec la souche NY-1. Chaque point du graphe correspond à une moyenne de 3 valeurs (\pm ES). * Différence significative

Signe clinique	Score
Temperature	0= 38.5- 39 °C 1= 39- 39.5 °C 2= 39.5- 40 °C 3= > 40 °C
Léthargie	0= Absence 1= Anorexie moyenne 2= Décubitus 4= Mort
Hémorragie	0= Absence 1= Quelques pétéchies sur les muqueuses 2= Pétéchies modérées ou sévères ou hématome (> à 1 cm de diamètre) 3= Hématome large (> à 5 cm de diamètre) 4= Diarrhée sanguinolente ou épistaxis
Signe respiratoire	0= Absence 1= Jetage nasal clair ou toux légère 2= Jetage mucopurulent ou toux sévère 3= Pneumonie sévère
Diarrhée	0= Absence 1= Légère < à 5% déshydratation 2= Modérée 5 à 10% déshydratation 3= Sévère et profuse, > à 10% déshydratation

Tableau 1 : Système de score clinique pour les veaux inoculés par des souches du virus de la diarrhée virale bovine (Cortese *et al*, 1998a).

DISCUSSION & CONCLUSION

Discussion

La diarrhée virale bovine est une maladie d'importance économique mondiale. Dans les dernières années, l'infection par le BVDV a fait surface comme un problème majeur de l'industrie bovine en Amérique du Nord . De fortes mortalités et morbidités ont été associées à de récentes épidémies de la diarrhée virale bovine (Pellerin *et al*, 1994 et Harpin *et al*, 1995) . Les vaccins utilisés pour le contrôle et la prévention de l'infection par le BVDV sont des vaccins à virus vivant modifié ou des vaccins inactivés. Les vaccins à virus vivant modifié sont les plus utilisés mais ils peuvent provoquer des maladies post-vaccinales, des immunosuppressions et des infections foetales qui peuvent conduire aux avortements ou à des malformations congénitales (Roth *et al*,1983). Les vaccins inactivés contre le BVDV représentent à cet égard les vaccins de choix. Ils ne causent ni maladie ni immunosuppression et ils sont d'une utilisation sûre chez tous les bovins, quel que soit leur âge ou leur stade de gestation (Bolin *et al*, 1991). Bien que plus sécuritaires, les vaccins inactivés sont cependant moins immunogènes que les vaccins vivants modifiés et parfois nocifs (Martin *et al*, 1986). Cette situation justifie en soi l'urgence de la mise au point de nouvelles préparations vaccinales inactivées plus immunogènes et moins nocives contre le BVDV. C'est dans cette optique que l'objectif de ce travail a été d'évaluer la protection immunitaire conférée par une nouvelle préparation vaccinale contre le BVDV. Le but de ce travail de recherche a été de démontrer l'efficacité d'un nouveau vaccin inactivé à générer une réponse immunitaire chez les bovins contre le challenge par la souche NY-1 du BVDV. Les animaux utilisés dans cette étude ont été répartis en deux groupes de trois veaux chacun. Le premier groupe constituait les animaux vaccinés avec une mixture de souches du BVDV (Singer, 125, 96B3296 et C24V) combinée à un adjuvant expérimental. Les animaux du deuxième servaient de contrôle.

Nos résultats montrent clairement que notre vaccin inactivé protège les veaux vaccinés contre la maladie causée par la souche NY-1 non cytopathogène du BVDV, probablement par une production de l'IFN γ et une induction précoce de la réponse cellulaire sans provoquer la production d'anticorps spécifiques. Les titres des anticorps spécifiques augmentent après challenge et atteignent des niveaux élevés jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ceci témoigne que notre vaccin induit une réponse humorale mémoire. Il est connu que pour protéger les animaux, un vaccin anti-BVDV doit d'abord induire une production d'anticorps neutralisants considérés comme une composante majeure dans la protection immunitaire (Brownlie *et al*, 1995). En effet, selon les standards du code de la législation fédérale aux États Unis, l'efficacité d'un vaccin anti-BVDV est basée sur sa capacité à induire des anticorps neutralisants chez des veaux indemnes.

Cortese *et al* (1998a), dans une étude sur la spécificité et la durée des anticorps neutralisants après administration de vaccin vivant modifié, montrent que les vaccins vivants et les vaccins inactivés contre le BVDV stimulent la production d'anticorps capables de neutraliser des souches de BVDV hétérologues et antigéniquement variables incluant les souches de type II.

Nous démontrons dans cette étude pour la première fois, l'implication de l'immunité à médiation cellulaire dans une immunité protectrice chez des veaux de deux à quatre mois utilisant un vaccin inactivé contre le BVDV contenant les souches type I et type II, cytopathogène et non cytopathogène avec un nouvel adjuvant.

Dans une autre étude, Cortese *et al* (1998b) ont démontré récemment qu'un vaccin vivant modifié contenant une souche type I protège contre le challenge par la souche 24515 type II non cytopathogène du BVDV en absence d'anticorps sériques incluant les anticorps neutralisants. Ces anticorps n'ont été sécrétés qu'après le challenge, soit trois semaines après la vaccination. De même, nos résultats démontrent que la production des anticorps sériques est principalement induite après le challenge des animaux à la cinquième semaine après la vaccination.

La production de l'IFN γ et la prolifération des cellules mononucléaires *in vitro* en utilisant un virus vivant révèle une augmentation de la capacité proliférative des cellules, probablement par une présentation de l'antigène via le CMH classe II à des proportions supérieures à celle via le CMH classe I. Cette hypothèse peut être confirmée par les résultats de la cytotoxicité

cellulaire utilisant les fibroblastes infectés par le BVDV comme cellules cibles et qui donnent de faibles réponses des animaux vaccinés.

Dans nos conditions expérimentales, les résultats de la prolifération des cellules mononucléaires sont meilleurs en utilisant la souche 125 que la souche Singer ou NY-1. Il se peut que la souche 125 possède des épitopes immunodominants par rapport aux autres souches. La réponse immune cellulaire à la souche Singer du BVDV pourrait être occultée par une réponse mitogénique non spécifique.

Dans une étude de Brownlie *et al* (1995) à propos de la protection du fœtus bovin contre le BVDV par un vaccin inactivé, il est démontré que le vaccin utilisé stimule des mécanismes protecteurs par une réponse humorale d'abord et une immunité à médiation cellulaire ensuite. Le vaccin, de ce fait, était efficace contre les infections *in utero*. Dans notre étude, nous avons utilisé un vaccin inactivé, mais la nouvelle formulation d'adjuvant influence l'orientation de la réponse immunitaire vers une immunité à médiation cellulaire.

Une grande production d'anticorps sécrétoires et d'anticorps sériques incluant les anticorps neutralisants ont été détectés chez les veaux vaccinés après le challenge. Ceci peut être expliqué d'une part, par l'action du nouvel adjuvant que contient le vaccin et qui induit directement chez les veaux indemnes, l'activation des cellules-B mémoires à travers la stimulation des cellules Th1, et l'augmentation de son profil cytokine incluant l'IFN γ . D'autre part, l'inactivation du virus utilisé dans le vaccin peut entraîner une destruction et une linéarisation des épitopes conformationnels impliqués dans la génération des anticorps neutralisants. La reconnaissance par les cellules-T CD4+ (Th1) de l'antigène BVDV et de l'adjuvant oriente préférentiellement l'immunité vers une réponse à médiation cellulaire et un développement des cellules-B mémoire, mais permet aussi la production et la sécrétion très peu spécifique d'IgG et d'IgM. Ce qui explique la présence d'anticorps sécrétoires, qui dans le cas des bovins sont des IgG (Tizard, 1996), au niveau des sécrétions nasales chez les animaux vaccinés avant le challenge. Le développement des cellules B mémoire explique la réponse humorale observée des animaux vaccinés après le challenge. Pour mettre en évidence le rôle crucial des cellules-T CD4 contre l'infection par le BVDV, Howard *et al* (1993) ont effectué une étude sur l'infection par le BVDV utilisant des anticorps monoclonaux pour réduire les cellules-T CD4 et

CD8 chez les bovins. Ils ont montré que les cellules CD4 étaient importantes dans la protection contre l'infection primaire, mais ils n'ont pas établi un rôle central pour les CD8. Toujours d'après Howard, la vaccination peut stimuler les CD4 permettant une aide rapide pour la production anticorps et/ou la génération de cytokines capables de potentialiser les cellules effectrices après challenge.

Durant la période du challenge, le comptage des leucocytes et des plaquettes n'a montré aucune différence entre les animaux vaccinés et ceux de contrôle. Les résultats obtenus de cette expérience sont toujours restés dans les normes ordinairement rencontrées chez les bovins. Mais on peut constater que le nombre des plaquettes et des leucocytes diminue entre le quatrième et le septième jours post-challenge pour les deux groupes d'animaux. Ceci coïncide avec la période d'incubation après infection par le BVDV décrite par Bolin (1992), et les animaux infectés présentent de l'hyperthermie avec une leucopénie et une thrombocytopénie. Ceci suggère que le vaccin n'a pas contrôlé l'infection mais le développement de la maladie.

Les animaux vaccinés n'ont pas montré de signes sévères de la maladie alors que les animaux de contrôle ont développé la maladie après challenge comme le montrent les résultats du système de score des signes cliniques. Les animaux vaccinés ont été significativement moins affectés par l'inoculation de la souche NY-1 que les animaux de contrôle. Ce qui nous pousse à croire que notre vaccin a induit une protection contre le développement de la maladie chez les veaux vaccinés.

Conclusion

A la lumière des résultats, nous pouvons conclure que notre vaccin inactivé contre le BVDV induit une immunité protectrice contre l'infection par la souche NY-1 du BVDV. Il est capable de contrôler le développement de la maladie, mais le mécanisme immunitaire protecteur conféré par ce vaccin reste peu clair, ce qui ouvre le champ à d'autres études. Parmi les avantages de notre vaccin, c'est qu'il induit une production d'anticorps sécrétoires, mais pas neutralisants, capables de réduire les chances d'infection par les voies respiratoires. Aussi il exerce son action en induisant une réponse à médiation cellulaire sans causer de production d'anticorps neutralisants chez les veaux indemnes. Il est possible que la vaccination stimule les cellules B mémoire qui répondent rapidement avec une production d'anticorps contre le BVDV précocement après le challenge. La sécrétion de l'IFN γ aussi bien que la prolifération des cellules mononucléaires stimulées par le BVDV sont corrélées avec la protection des animaux vaccinés.

REFERENCES

REFERENCES

- Baker, J.C. 1995.** The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet. Clin. Of North America: Food animal practice.* **11:** 425-445.
- Beer, M., Wolf, G., Pichler, J., Wolfmeyer, A., Kaaden, O.R. 1997** Cytotoxic T-lymphocyte responses in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* **58:** 9-22.
- Bitsh, V. , Rønsholt, L. 1995.** Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines. *Vet. Clin. Of North America: Food animal practice.* **11:** 26-29
- Bizzini, B. 1984.** Present state of the knowledge in the field of adjuvants. *Agriculture Adjuvants, interferon and non-specific immunity. European report. Luxembourg.* P: 77-86.
- Blood, D.C. 1983.** *Veterinary medicine.* Baillire Tindall, London , 6th ed., 754-761.
- Bolin, S.R. 1991.** Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* **52:** 1033-1037.
- Bolin, S.R. et Ridpath, J.F. 1992.** Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *Am. J . Vet. Res.* **53:** 2157-2201.
- Bolin, S.R. 1995.** Control of bovine diarrhea infection by use of vaccination. *Veterinary clinics of North America, food animal practice.* **11(3):** 615-25.
- Brownlie. J., Clarke, M.C., Hooper, L.B., Bell, G.D. 1995.** Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.* **137:** 58-62.

- Carlsson,** 1991. Protective effect of an ISCOMs bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines against an experimental BVDV infections in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine* **9**: 577-582.
- Clarke, M.C., Brownlie, J., Howard, C.J.** 1987. Isolation of cytopathic and non cytopathic bovine viral diarrhea virus from tissues of infected animals. *In*. Pestivirus infections of ruminants. Harkness, J.W. Ed. Commission of the European Communities, Report Eur 10238 EN. 3: 10.
- Collet, M.S., Larson Gold, R., Strick, C., Anderson, D., DK Purchio, A.F. et al .** 1988. Proteins encoded bovine viral diarrhea virus: the genomic organisation of pestivirus. *Virology*, **165**: 200-208.
- Corapi, W.V., Elliot, R.D., French T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M. et Dubovi, E.J.** 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with BVDV. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**: 590-594.
- Cortese, V.S., Whittaker, R., Ellis, J., Ridpath, F., Bolin, R.** 1998a. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhea. *AJVR*. Vol 59, No: 7.
- Cortese, V.S., West, H.H., Hassard, L.E., Carman, S., Ellis, J.A.** 1998b. Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *JAVMA*, Vol: 213, No: 9.
- Deng, R. et Brock, K.V.** 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology*. **191**: 867-879.

- Done, J.T., et Terlecki** 1980. Bovine viral diarrhea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the foetal calf following of T-lymphocyte maturation. *Cell tissue. Res.* **218**: 279-282.
- Duffel, S.J. et Harkness, J.W.** 1985. Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* pp 240-245.
- Edelmen, R.** 1980. Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 370-83.
- Elahi, S.M., Harpin, S., Cornaglia, E., Talbot, B., et Elazhary, Y.** 1997. Antigenic variation among bovine viral diarrhea virus (BVDV) strains and role of different cell fixation methods in immunoassay. *Can. J. Gen. Virol.* **61** : 34-38.
- Francki, R.I., Fauquets, C.M., Knundson, D.L. et Brown.** 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* **2**: 223-233.
- Frost, F. Lance, E.M.** 1978. On the mechanism of action of adjuvants. *Immunology.* **35**: 63-68.
- Gillespie, J.H., Baker, J.A., et McEntee, K.** 1960. A cythopathic strain of bovine viral diarrhea virus. *Cornel. Vet.* **50**: 73.
- Gillott, D.J., Nouri, A.M., Compton, S.J., and Oliver, R.T.** 1993. Accurate and rapid assessment of MHC antigen upregulation following cytokine stimulation. *J.Immunol.Methods.* **165**: 231-239.
- Harkness, J.W., Roeder, P.L., Drew, T, et al.** 1987. The efficacy of an experimental inactivated BVD-MD vaccine. *In* Harkness, JW (ed): Pestivirus infections of uminants. Luxembourg, office for official publications of the European ommunities. **P**: 233.

- Harpin, S., Mehdy Elahi, S., Cornaglia, E., Yolken, R.H. et Elazhary, Y.** 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of BVD virus. *Arch. Virol.* **140**: 1285-1290.
- Harpin, S., Talbot, B., Mbilky, M., Elazhary, Y.** 1997. Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp 53 (E 2). *FEMS. Microbiology letters.* **46**: 229-2347.
- Horzinek, M.C.** 1981. Non-arthropod-borne Togaviruses. Academic press. London, 1-200.
- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P., Brownlie, J.** 1994. Systemic vaccination with inactivated bovine viral diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.* **42**: 171-172.
- Husu, J. et Kulkas, L .** 1993. Control of enzootic bovine leucosis and BVD. *Suomen Eläinlääkälehti.* **99**: 482-483.
- Kamstrup, S. Ronsholt, L., Jensen, M.H., et al.** 1992. A novel subunit ISCOM vaccine against bovine viral diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* **11**: 873.
- Lambot, M., Douart, A., Joris, E., Letesson, J. J, and Pastoret, P. P.** 1997. Characterization of the immune response of cattle against noncytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **78** : 1041-1047.
- Levings, R.L., Wessman, S.J.** 1991. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell culture and viral vaccines. *Develop. Biol. Standards.* **75**: 177-181.
- Lobmann, M., Charlier, P., Klassen, C.L., et al.** 1986. Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 557.

- Martin, S.W., Bohac, J.G.** 1986. The association between serologic titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and the treatment for respiratory disease in ontario feeder calves. *Can.J. vet. Res.* **50**:351-358.
- Menanteau-Horta, A.m., et al.** 1985. Effect of maternal antibodies upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea vaccines. *Can. J. Comp. Med.* **49**: 10.
- Meyer, G., Tautz, N., Dubovi, E.J., et al.** 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* **180**: 602.
- Meyer, G., Tautz N., Stark, R., et al.** 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* **191**: 368.
- Mohanty, J.G., Elazhary, Y., Talbot, B.** 1989. Detergent solubilized bovine viral diarrhea virus elicits a similar immune response as the inactivated virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.* **12**: 129.
- Nettleton, P.F.** 1990. Pestivirus infections in ruminant other than cattle. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* **9**: 131-150.
- Newman, M.J., Powell, M.F.** 1995. Immunological and formulation design considerations for subunit vaccines. *In Vaccine design: The subunit and adjuvant approach.* p: 1-42.
- Niskanen, R.** 1995. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* **133**: 341-344.
- Olafson, P., MacCallum, A.D., et Fox, A.** 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell. Vet.* **37**: 104-106.

- Onisk, D.V., Donis, R., Kelling, C.L., et al.** 1992. Bovine viral diarrhea virus. Specific neutralizing antibodies induced by anti-idiotypic antibodies. *Viral. Immunol.* **5**: 257.
- Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S. et Alenius, S.** 1994. Identification of herd specific bovine viral diarrhea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* **9**: 131-150.
- Pellerin, C., Van der Hurk, J., Lecomte, J. et Tijssen, P.** 1994. Identification of a new group of BVD stains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology.* **203**: 260-268.
- Potts, B.J.** 1989. Peroxidase-labelled primary antibody method for detection of pestivirus contamination cell culture. *J. Viral. Methods.* **26**: 119-124.
- Pritchard, W.R.** 1963. The bovine viral diarrhea mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.* **8**: 1-47.
- Qi, F., Ridpath, J.F., Lewis, T., et al.** 1992. Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology.* **89**: 285.
- Quartpers, D., Mignon, B., Boulanger, D., Pastoret, P.P.** 1992. Epidemiologie, pathogénie et aspects cliniques des troubles provoqués par le virus de la diarrhée virale bovine/ maladie des muqueuses. *In* Dernières avancées sur les mécanismes de diagnostic et de contrôle du complexe diarrhée virale bovine/ maladie des muqueuses. pp: 3-19.
- Renard, A., Dina, D. et Martial J.A.** 1985. Molecular cloning of bovine viral diarrhea virus sequences. *DNA,* **4**: 429-438.

- Rodostits, O.M., Littlejohns, I.R.** 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by bovine viral diarrhea virus. *Can vet J* **29**: 513-528.
- Roth, J.A. et Kaeberle, M.L.** 1983. Suppression of neutrophil lymphocyte function induced by a vaccinal strain of BVDV with or without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res* **44**: 23-66.
- Schultz, R.D.** 1993. Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. *In* Proceeding of the American Association of Bovine Practitioners, Albuquerque, NM, p.19.
- Schmidt, N.J., Emmons, R.W.** 1989. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection. 6th.Ed. American public health Ass, Washington, D.C
- Tarry , D.W.** 1991. Transmission of bovine viral diarrhea virus by blood feeding flies. *Vet. Rec.* **128**: 82-84.
- Tizard, I.** 1996. *Veterinary immunology.* W.B. Sanders Company. Philadelphia. p: 260
- Waage, S., Krogsrud, J., Neyberg, O.** 1994. The Norwegian programme for eradication of bovine viral diarrhea / mucosal disease. *In* proceeding of the 18th World Buiatric Congress, Italy. p: 773-776.
- Xue, W., Blecha, F., Minocha, H.C.** 1990. Antigenic variation in bovine viral diarrhea viruses detected by monoclonal antibodies. *J. Clin. Micribiol.* **28**: 1688.
- Xue, W. Orten, D.J, Abdelmagid, O.Y, et al.** 1991. Anti-idiotypic antibodies mimic bovine viral diarrhea virus antigen. *Vet. Microbiol.* **29**: 201.