

RÉSUMÉ

“Etude comparative de la réponse immunitaire induite par deux types de vaccins (VLP e inactivé) face au virus de la fièvre catarrhale du mouton”

La fièvre catarrhale du mouton (FCM) est une maladie infectieuse, non contagieuse, transmise par des moucheron du genre *Culicoides* qui affectent différentes espèces de ruminants, à la fois domestiques et sauvages. Les animaux qui développent la maladie sont surtout les moutons, les taux de morbidité et de mortalité pouvant être élevés. La maladie de la FCM n'a pas d'incidence sur l'être humain, mais devient très important en raison de son haut pouvoir de transmission et de diffusion qui entraînent de graves conséquences socio-économiques et sanitaires, avec des répercussions dans le commerce international des animaux et des produits d'origine animale. Par conséquent, la FCM est incluse dans la liste des maladies à notification obligatoire pour l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Cette maladie est causée par un virus appartenant au genre *Orbivirus* (famille *Reoviridae*), qui possède 7 protéines structurales (VP1-VP7) et cinq non-structurales (NS 1, 2, 3, 3A et 4). La VP2 est particulièrement importante dans la réponse immunitaire, puisqu'elle est responsable de la formation d'anticorps neutralisants, et elle est spécifique à chaque sérotype.

Dans le contexte actuel de l'Europe, où il ya jusqu'à 6 sérotypes différents (1, 2, 4, 8, 9, 16), la vaccination s'est révélée être un outil de base pour le contrôle et l'éradication de cette maladie comme on peut observer en l'Espagne pour l'éradication des sérotypes 2 et 4.

L'absence d'immunité croisée entre les différents sérotypes est un problème majeur, car cela implique le besoin d'immuniser la totalité du troupeau pour chacun des sérotypes. Actuellement, les vaccins disponibles sont monovalents et seulement dans certains cas bivalents. Jusqu'à ce jour, il n'a pas été possible de développer une méthode de diagnostic permettant de différencier les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé, de ceux infectés.

Pour résoudre les problèmes ci-dessus exposés, il a été mis au point les vaccins appelés VLP (*virus like particles*). Ceux-ci sont des complexes de protéines structurales (VP2, VP3, VP5, VP7), qui n'ont pas de matériel génétique, ce qui implique une incapacité répliquative, qui s'assemblent formant des structures semblables au virus authentique. Pour leur production, sont utilisés des vecteurs d'expression basés sur l'utilisation de baculovirus. Ce type de vaccins montre de grands avantages tels qu'un haut niveau de sécurité, la possibilité de distinguer les animaux vaccinés de ceux infectés, grâce à l'absence de protéines non structurales comme NS1, et la capacité de générer des vaccins multivalents en y intégrant différentes VP2

appartenant à différents sérotypes. Par conséquent, ils présentent un grand potentiel pour devenir des vaccins dans le future, ce qui entraîne le besoin de démontrer que ce type de vaccins induisent une bonne réponse immunitaire et offrent une protection efficace chez les animaux, tenant compte des conditions actuelles en Europe.

L'objectif de cette thèse est l'évaluation de la réponse humorale et cellulaire produite par les vaccins VLP contre le virus de la FCM et sa comparaison avec les vaccins inactivés, évaluant les avantages et les inconvénients que présentent les deux types de vaccins dans un contexte de contrôle et d'éradication de la maladie. À cette fin, des techniques ont été adaptées qui permettent la caractérisation du système immunitaire des moutons, en conditions physiologiques normales, et la réponse immunitaire qui survient à la suite de l'application des vaccins ou après une exposition au virus.

Pour caractériser la réponse immunitaire produite par les vaccins, différents paramètres ont été étudiés, tels que: la production d'anticorps, les taux de virémie, ou les taux de cytokines induites. Pour mener à terme ce travail, des techniques de détection de RT-PCR en temps réel ont été mises au point, d'ARN messenger codifiant pour 6 cytokines différentes chez les ovins (IL2, IL4, IL10, IL12, IFN γ et TNF α) ainsi que la détection de différentes populations cellulaires du système immunitaire dans le sang périphérique des moutons, par le biais de la cytométrie en flux (CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD14⁺, lymphocytes B, la sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ TCR1-N6 et WC1⁺).

Sur le plan expérimental et au sein du projet européen FP6-2005-SSP-5A BTVAC, deux vaccins VLPs ont été testés, un vaccin monovalent face au sérotype 1 et un autre bivalent face aux serotypes 1 et 4 du virus de la FMC, ainsi que le test d'un vaccin monovalent inactivé face au sérotype 1 dans les ovins. Dans ce test des vaccins, la surveillance et le contrôle des animaux s'est effectuée au quotidien, avec enregistrement des symptômes cliniques, de la température rectale et de la température superficielle par thermographie infrarouge. Des prélèvements sanguins périodiques ont également été effectués pour la détection du virus par RT-PCR en temps réel, la présence et les taux d'anticorps par ELISA, la détection des populations cellulaires par cytométrie en flux, et l'extraction d'ARNm pour analyser l'expression de gènes codant des cytokines par PCR en temps réel.

Les résultats de cette thèse indiquent que la réponse immunitaire générée prévient l'apparition des symptômes, des lésions et de virémie après une exposition au virus homologue virulent, à la fois après utilisation des vaccins monovalents (inactivé et VLP) comme le bivalent, indiquant la sécurité qu'offrent ces deux types de vaccin pour être utilisés même en présence du vecteur. Dans la détection des symptômes cliniques, il a été analysé la possibilité d'utiliser la thermographie infrarouge comme outil de dépistage de la fièvre, donnant des résultats d'une sensibilité et une spécificité suffisantes pour son utilisation comme outil d'utilité massive, pouvant cet outil être utilisé dans le suivi des animaux sentinelles.

L'évolution de l'expression des cytokines a montré l'importance de l'IL2 en réponse au vaccin VLP monovalent et de l'IL12 en réponse au vaccin VLP bivalent, ainsi qu' après le défis des animaux contrôle face a leur respectifs virus homologues virulents. Au contraire, l'importance d'autres cytokines telles que l'IFN γ , dont l'importance dans la réponse au virus de la FCM a été décrite précédemment, n'a pas été démontrée dans certains cas, en raison de la variabilité présentée tant par la technique que par les animaux. L'analyse des populations cellulaires a démontré dans le cas des deux vaccins VLP, l'augmentation de la population CD25⁺ post-vaccination, étant plus évidente dans le cas des animaux vaccinés avec le vaccin VLP monovalent. Les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé ont montré une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes B. Les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé et ceux non vaccinés, ont montré une augmentation du taux de lymphocytes T CD8⁺ après infection par le virus, sans qu'il ne soit observée de variation significative dans le cas des animaux vaccinées avec VLP.

La réponse générée par les deux types de vaccins est suffisante pour générer des anticorps protecteurs à la fois dans le cas des vaccins monovalents pour le sérotype 1 (VLP et inactivé) comme dans le cas du vaccin VLP bivalent pour les sérotypes 1 et 4. Finalement, les résultats obtenus au sein des groupes témoins ont indiqué que le sérotype 1 présente une capacité pathogène plus grande que le serotype 4.