

**THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le Jeudi 22 Juin 2017
Par Mlle DEVEER Margaux**

**Développement d'un vaccin
contre la Bursite Infectieuse**

Membres du jury :

Président : **Monsieur le professeur Régis Courtecuisse**, Professeur de Sciences Végétales et Fongiques, Université de Lille 2.

Assesseur(s) : **Madame Christine Demanche**, Maître de conférences de Parasitologie, Université de Lille 2.

Monsieur Sylvain Goutebroze, Vétérinaire, Directeur R&D Boehringer Ingelheim, Saint Vulbas.

Membre extérieur : **Monsieur Bruce Mesnage**, Docteur en Sciences. Boehringer Ingelheim, Saint Vulbas.



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Vice-présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Murielle GARCIN
Professeur Annabelle DERAM
Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
Monsieur Ghislain CORNILLON
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Madame Nathalie ETHUIN
Madame Ilona LEMAITRE

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante M. Thomas MORGENROTH

Chef des services administratifs : Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
Mme	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL

Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie (80%)
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
MLle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

A mon président de thèse, Monsieur le Professeur Courtecuisse,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci également pour vos enseignements de qualité reçus lors de mon cursus universitaire. Veuillez recevoir l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mes directeurs de thèse, Madame Demanche & Monsieur Goutebroze,

Merci de m'avoir accompagnée tout au long de l'écriture de cette thèse. Merci pour votre aide et l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je vous remercie également pour le temps consacré aux relectures, aux modifications et à vos précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A monsieur Bruce Mesnage,

D'avoir si gentiment accepté de faire partie de ce jury de thèse. Un grand merci pour ton soutien, ta disponibilité et l'énergie que tu m'as apporté lors de mon stage au sein de Merial (Raging, raging). Merci pour le temps passé ensemble et le partage de tes connaissances au quotidien.

A monsieur Roland Chery et l'équipe rentes,

Pour la confiance qu'ils m'ont accordée au sein de leur service des Animaux de production. Merci de m'avoir associé à leur travail afin d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences. Et tout particulièrement merci à toi Roland, pour ta disponibilité et ton travail de relecture pour ma thèse.

A mes parents,

C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Je ne vous dirai jamais assez merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour les belles valeurs que vous m'avez transmises. Merci pour tous les merveilleux moments partagés en famille. Vous m'avez toujours soutenue et poussée à donner le meilleur de moi-même durant toute ma scolarité. A nos câlins réconfortants à chacun de mes retours sur Lille. Je vous aime énormément

A mon jumeau,

Merci pour tous ces moments de complicité depuis notre plus jeune âge. J'espère que tu es fier de moi. Mon jum, même si on ne se le dit pas souvent, je t'aime. Tu es ma moitié et nous connaissons ce lien si fort qui nous unis, que je ne voudrais perdre pour rien au monde.

A Nicolas, mon rayon de soleil,

Merci pour ta présence à mes côtés. Merci pour toute ton affection et ton amour. Merci pour le bonheur que tu m'apportes depuis le début. Merci pour ton immense soutien, particulièrement cette année. Cette année qui nous a demandé à la fois beaucoup d'énergie et de patience. Merci de m'avoir toujours réconfortée et reboostée quand je doutais. Je suis fière de nous.

Je t'aime si fort mon Crapi.

A mes amies du Lycée, notre petite team soudée, Ma Consti, Djussy, Laulau, Maé, Puta de fritas, Reina del Dia, Roxy, Sixt, et So.

Pour tous nos si merveilleux moments partagés toutes ensemble depuis le lycée. Malgré le temps qui passe, notre amitié reste intacte. On a beau se trouver aux 4 coins de la France ou à l'étranger, quand on se retrouve, rien n'a changé et ce n'est que des moments de bonheur. Merci pour tout les filles.

A cam, ma choupi, ma confidente, ma meilleure amie.

A Ines, ma binôme, ma meilleure amie, mon pouce magique.

A Marg, ma sœur de prénom, la brune et la blonde, ma meilleure amie,

Merci à toutes les trois d'avoir toujours été présentes pour moi, dans les bons moments comme dans les moins bons. Merci pour votre énergie, votre soutien et vos encouragements, malgré la distance. Merci de faire partie de ma vie. A tous nos futurs moments de joie.

A mes amis de fac,

Pour ces heures passées sur les bancs de la fac ou en travaux pratiques, pour ces soirées inoubliables. Je suis contente d'avoir partagés tous ces moments avec vous.

A mes amis et proches, que je n'ai pas cités,

Merci pour votre présence à mes côtés, votre gentillesse et votre soutien pendant toutes ces années.

Je vous remercie d'être venus aujourd'hui, et je suis honorée et heureuse de vous présenter ce travail qui clôture mes études.

Table des matières

I. Introduction	12
II. Contexte de la bursite infectieuse	13
A. Historique	13
B. Vue d'ensemble de la Bursite Infectieuse	14
C. Étiologie de la Bursite Infectieuse.....	16
1. Généralités	16
2. Considérations moléculaires	16
3. Classification du virus	17
D. Aspects cliniques de la Bursite Infectieuse	18
1. La forme immunodépressive.....	19
2. La forme aiguë.....	19
3. La forme classique.....	19
E. Techniques de Diagnostic de la Bursite Infectieuse	20
F. Traitement et prophylaxie.....	21
1. Les vaccins contre la Bursite Infectieuse	21
2. Les types de vaccins	22
G. Données épidémiologiques	23
1. Distribution des différents types de souches.....	23
2. Impact économique.....	24
3. Modes de transmission de la Bursite Infectieuse	25
H. Présentation des différentes catégories de poulets.....	26
III. Présentation de Merial	28
A. Historique	28
B. Missions et Activités de Merial	29
C. Activités R&D de Merial dans le monde	30
D. Activités R&D de Merial au CRSV	30
1. Présentation du site.....	30
2. Vaccination contre l'IBD au CRSV.....	31
IV. Développement d'un Vaccin.....	32
A. Vue d'ensemble	32
1. Du candidat au Vaccin.....	32
2. Aspects réglementaires et éthique attenants	36
B. Objectif du projet.....	38
1. Les différents types de vaccins.....	38
2. Vaxxitek [®] : notre vaccin recombiné.....	40
3. Tester l'efficacité d'une composition bi-vaccinale	41

V. Partie Expérimentale : Études pré-cliniques réalisées au sein de Merial	43
A. Production d'un stock de souche d'épreuve	43
1. Introduction.....	43
2. Matériel et méthode.....	44
3. Résultats.....	47
4. Conclusion	50
B. Mise au point du modèle d'épreuve.....	50
1. Introduction.....	50
2. Matériel et méthode.....	50
3. Résultats.....	56
4. Conclusion	60
C. Évaluation de l'efficacité du vaccin.....	60
1. Introduction.....	60
2. Matériel et méthode.....	60
V. Conclusion	67
VI. Liste des figures	69
VII. Liste des tableaux	70
VIII. Bibliographie	71

I. Introduction

La maladie de Gumboro, ou Bursite Infectieuse (IBD) est une des maladies aviaires les plus sérieuses, dont les enjeux en Santé Publique et économiques sont extrêmement importants. L'importante variabilité du virus (IBDV) responsable de cette infection, en termes antigéniques et de virulence, rend d'autant plus difficile la lutte contre l'IBD. À ce jour, aucun traitement n'existe, et la vaccination représente le seul rempart pour protéger les populations aviaires.

Merial, industrie pharmaceutique dédiée à la santé animale, propose plusieurs solutions vétérinaires, dont les vaccins, qui représentent une branche importante de ses activités. Parmi ceux commercialisés par Merial, un vaccin dirigé contre l'IBD existe déjà, le Vaxxitek[®]. Ce dernier présente également une protection vis-à-vis de la maladie de Marek, une autre infection importante ciblant aussi les populations aviaires.

Comme cela sera abordé dans cette thèse, le développement et l'obtention d'un vaccin commercialisable se réalise en plusieurs étapes, présentant chacune ses enjeux et ses défis. Pour passer à l'étape suivante du cycle, une étape de mise au point et de tests est, à chaque fois, nécessaire. Et lorsque le produit est déjà commercialisé, le raffinement, ou l'amélioration du produit demeure indispensable. Merial souhaite améliorer l'efficacité du Vaxxitek[®]. Le but est double. D'une part, ce vaccin fut mis au point en utilisant une souche d'IBDV peu représentative du terrain, et d'autre part, Merial voudrait améliorer sa position sur le marché des vaccins contre la Bursite Infectieuse et la maladie de Marek en proposant une nouvelle formulation vaccinale.

C'est dans ce contexte que ces travaux de thèse s'inscrivent. Pour ce faire, trois étapes ont été nécessaires. D'abord, il a fallu obtenir un stock de la nouvelle souche d'IBDV, qui soit en adéquation avec les exigences réglementaires. Ensuite, nous avons déterminé l'efficacité de cette nouvelle souche afin de s'assurer de sa représentativité par rapport à une souche "historique". Enfin, la dernière étape consiste à tester Vaxxitek[®] vis-à-vis de cette nouvelle souche d'épreuve.

Ces trois étapes seront abordées dans la dernière partie de cette thèse. Préalablement, nous nous attacherons à la présentation de la maladie et son agent étiologique, avant d'aborder celle de la société Merial et ses activités. Une partie sur le développement d'un vaccin au sens large suivra. La présentation en détail des études et résultats obtenus conclura, ainsi, ce manuscrit dédié au développement d'un vaccin contre la Bursite Infectieuse en industrie pharmaceutique.

II. Contexte de la bursite infectieuse

A. Historique

Le milieu du 20^{ème} siècle marque le début de l'histoire de la maladie de Gumboro (ou bursite infectieuse) aux États-Unis. Celle-ci va, par la suite, s'étendre dans plusieurs états, avant d'atteindre le Vieux-Continent ^[Voir pour revue OIE 2008].

La maladie tire son nom d'une ville de l'est Américain, Gumboro, dans l'état du *Delaware*. Elle y a été décrite pour la première fois en 1957 par Albert S. COSGROVE au *Delaware Poultry Laboratories* (Voir **figure 1**). Alors qu'il travaillait avec son associé Hiram N. LASHER, ils reconnurent un syndrome chez le Poulet de chair, plus tard nommé "néphrose aviaire", en raison des dommages observés sur les reins tels que le révèlent les examens *post-mortem* des tissus ^[Cosgrove & Hitchner 1957]. La présence d'un virus dans les prélèvements rénaux, le fort degré de contagion de l'infection et l'impossibilité d'isoler un agent bactérien suggèrent une étiologie virale à la maladie ^[Voir pour revue Sharma *et al.* 2000].

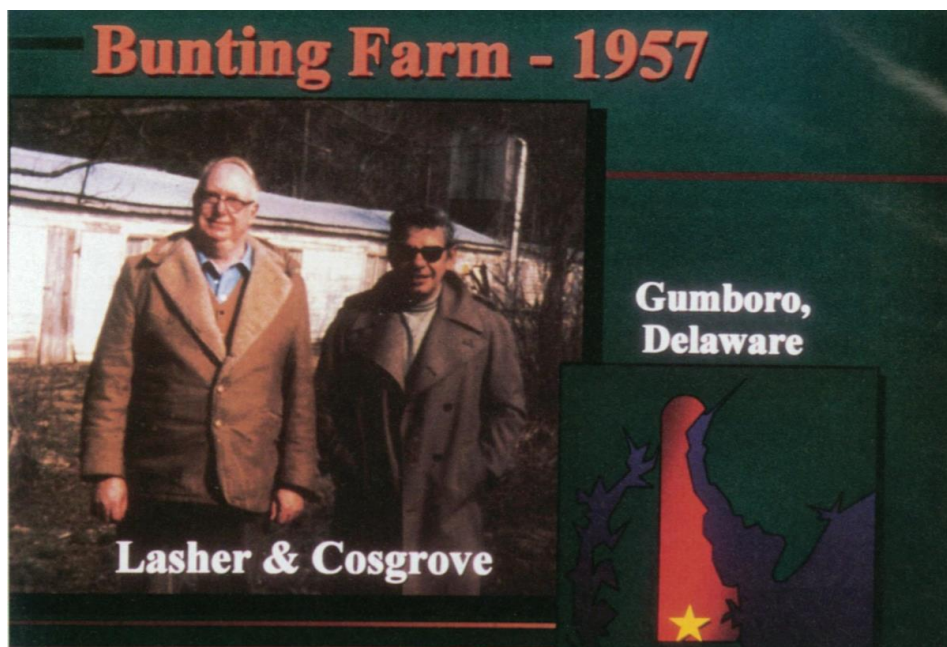


Figure 1: Dr. Lasher et du Dr. Cosgrove à Gumboro Photographie du Dr. Lasher et du Dr. Cosgrove. Ils furent photographiés devant la ferme où ils identifièrent les premiers cas de Bursite Infectieuse, à Gumboro, dans le Delaware (d'après ^[Cosgrove & Hitchner 1957]).

En 1962, WINTERFIELD et HITCHNER observent, en plus des lésions rénales décrites 5 années plus tôt par COSGROVE, une hypertrophie de l'organe lymphoïde du Poulet, la bourse de

Fabricius. L'infection est renommée "Syndrome de néphrite-néphrose". Ils isolent, des animaux infectés, deux types de souches virales baptisées *Holte* et *Gray* [Winterfield & Hitchner 1962]. Les affections rénales observées à l'époque, concomitantes avec les dommages au niveau de la bourse de Fabricius laissent présupposer que l'agent causal du syndrome de néphrite – néphrose était le virus *Gray*, en réalité, apparenté avec le virus de la Bronchite Infectieuse (BI), qui sévissait à cette époque dans la population aviaire [Lasher *et al.* 1997].

WINTERFIELD et HITCHNER conduisent une série de travaux d'immunisation et d'isolement sur culture [Winterfield & Hitchner 1962 ; Winterfield *et al.* 1972 ; et Voir pour revue Lasher *et al.* 1997]. Ils isolèrent l'agent causal de la maladie de Gumboro, ou virus de la bursite infectieuse, ou l'*Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV) [Winterfield 1969].

Le terme de maladie de Gumboro est plus largement usité que le terme actuel de bursite infectieuse, ou *Infectious Bursal Disease* (IBD), en raison des variations morphologiques et histologiques observées dans la bourse de Fabricius. Cependant, "IBD" reflète mieux l'infection que ne le laisse suggérer le terme de maladie de Gumboro. Ainsi, pour ce travail de thèse, nous préférons le terme de bursite infectieuse, ou IBD, dont nous proposons un rapide panorama dans le chapitre suivant.

B. Vue d'ensemble de la Bursite Infectieuse

La bursite infectieuse (IBD) est causée par un agent viral (IBDV, pour *Virus*) appartenant à la famille des *Birnaviridae* [Dobos *et al.* 1979]. Ce virus touche exclusivement la population aviaire, notamment, le Poulet [Müller *et al.* 2012]. L'IBDV provoque la destruction du principal organe lymphoïde de ces animaux, la bourse de Fabricius [Becht & Müller 1991 ; Janković & Isaković 1964]. Localisée dans la région du cloaque et de la taille d'une cerise, la bourse de Fabricius (Voir l'encadré-photo de la **figure 2**) est le siège de la synthèse et différenciation des lymphocytes B (λ_B) dans les premières semaines de vie du poulet [Brand *et al.* 1976].

La période d'incubation de l'IBD est très brève. Quelques heures après contamination par voie orale, le virus infecte les lymphocytes et les macrophages intestinaux. Après atteinte hépatique, il rejoint la circulation sanguine et contamine les organes cibles, dont la bourse de

Fabricsius. Cette atteinte conduit à la destruction des λ_B immatures, et a pu être caractérisée de "bursectomie virale". La cytolysse lymphocytaire induit ensuite la libération de débris cellulaires, causant une inflammation au niveau de la bourse de Fabricsius atteinte [McFerran & McNulty 1993].

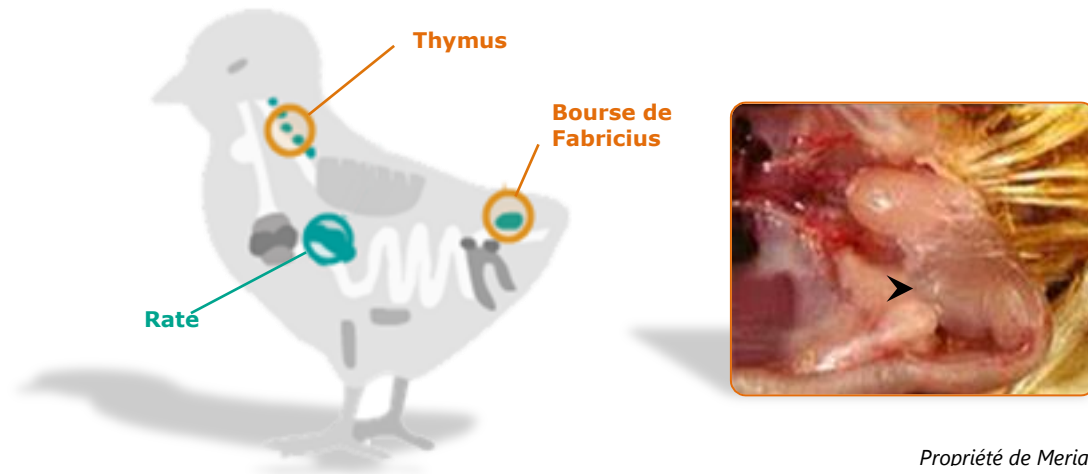


Figure 2 : Principaux organes lymphoïdes chez le Poulet. (**Gauche**) : Le thymus et la Bourse de Fabricsius (orange sur la figure de gauche) sont les organes lymphoïdes *primaires* et la rate (bleu) est dit *secondaire*. Le thymus est le siège de maturation des lymphocytes T, responsables de la réponse immunitaire adaptative. La rate fait partie du système phagocytaire mononucléaire, qui abrite les monocytes et les macrophages. Ces cellules phagocytaires sont responsables de la réponse immunitaire non-spécifique. (**Droite**) : La pointe de la flèche indique la Bourse de Fabricsius (d'après un document support interne à Merial).

La réaction inflammatoire de la bourse de Fabricsius survient trois à quatre jours après l'infection. Une dystrophie (une hypertrophie, suivie d'une atrophie) et une dégénérescence s'ensuivent (dans un délai d'une semaine), associées à une nécrose des autres organes lymphoïdes principaux (Thymus et rate; Voir **figure 2**). Tout ceci concourt à l'immunosuppression, observée chez les oiseaux atteints d'IBD, qui conduit aux échecs de vaccinations postérieures (*e.g.*, dirigées contre la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse, ou encore la maladie de Marek¹).

Privés de λ_B , de multiples agents pathogènes "opportunistes" peuvent également pénétrer dans les organismes immuno-déficients et provoquer la mort de ces animaux [Faragher *et al.* 1974]. Les anticorps maternels, présents dans les premières semaines de vie des jeunes poulets peuvent, cependant, déjouer l'infection par l'IBDV [Van Den Berg *et al.* 1991] (Voir § **vaccination contre la Bursite infectieuse**).

¹ Trois autres affections aviaires majeures

C. Étiologie de la Bursite Infectieuse

1. Généralités

L'agent pathogène de la bursite infectieuse est l'IBDV. Ce virus fait partie de la famille des *Birnaviridae*, du genre *Avibirnavirus*. Ils sont non-enveloppés et possèdent une capsidie de type icosaédrique (20 côtés). La structure de l'IBDV, relativement simple, et sa taille plutôt petite (58 à 60 nm [Van den Berg 2000]), lui confèrent une très grande résistance dans l'environnement et dans le temps [Agut *et al.* 2016]. L'IBDV est notamment résistant à la désinfection, aux radiations, aux UV, à l'inactivation photo-dynamique, à la chaleur, à l'éther, au chloroforme et au pH acide [Voir pour revue Kibenge *et al.* 1986]. Cette stabilité par rapport à de nombreux agents physico-chimiques augmente le risque de véhiculer l'agent pathogène d'un animal à l'autre, tel qu'il le sera abordé dans la **section F** de ce chapitre.

2. Considérations moléculaires

D'un point de vue moléculaire, le génome d'IBDV est constitué de deux segments d'ARN bicaténaires, nommés Segment A et B, qui encodent chacun pour différentes polyprotéines (Voir **figure 3**).

a) Segment A

Ce segment contient deux cadres de lectures ouverts (ORF², pour *Open Reading Frame*). Les deux ORF sont chevauchants³ et de tailles différentes. Le plus grand des ORFs code pour une polyprotéine (PP) considérée comme le principal médiateur de l'immunosuppression et responsable de la pathogénicité induite par l'IBDV. Cette PP est ensuite clivée en deux structures protéiques : les protéines virales (VP, pour *Virus Protein*) VP2 et VP3 d'une part, et une protéase nommée VP4, d'autre part.

VP2 est la cible principale des anticorps induits par la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Cependant, l'étude par cristallographie révèle que VP2 contient une région hypervariable, notée **hVP2**. Cette région est le siège de nombreuses variations d'acides aminés [Coulibaly *et al.* 2005].

² Dès lors qu'une série de trois nucléotides forme un codon *start* et est suivie d'une séquence d'ADN multiple de trois nucléotides, ces portions peuvent potentiellement être transcrites en ARN et traduites en protéines. Ne correspondant pas à des gènes *per se*, ces segments sont appelés *ORFs*.

³ La transcription peut démarrer à plusieurs endroits dans la séquence et conduire à la traduction de plusieurs protéines virales variantes.

VP5 est encodée par l'ORF de taille moindre. Cette protéine virale est impliquée dans la dissémination du virus à partir de cellules infectées [Lombardo *et al.* 2000].

b) Segment B

De taille relativement faible (2,8 kb), ce segment encode la polymérase VP1, d'une taille de 97kDa. VP1 est une ARN polymérase ARN-dépendante, responsable de la réplication de l'ARN viral [Macreadie & Azad 1993 ; Von Einem *et al.* 2004].

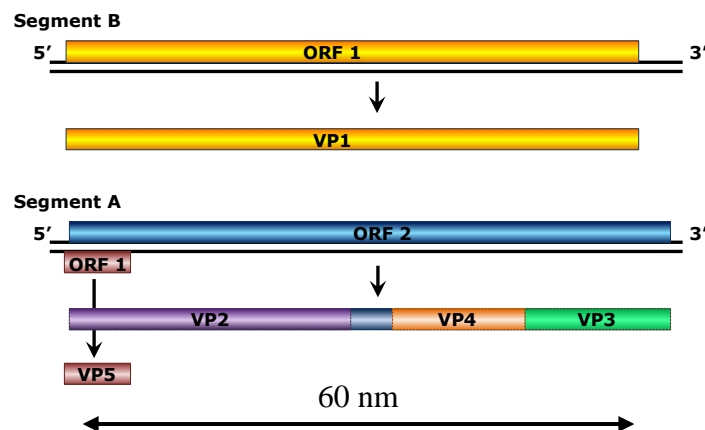
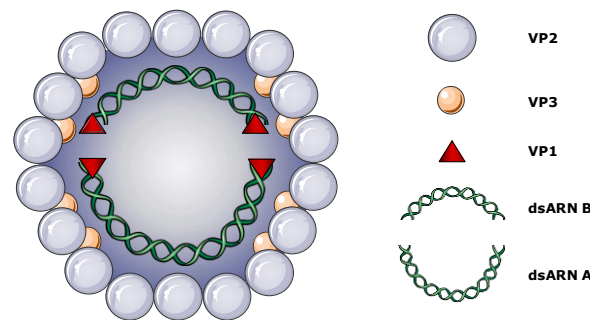


Figure 3: Organisation du virus de la Bursite Infectieuse et de son génome d'ARN double-brins. **(Haut)** La boucle VP2 forme la capside externe de l'IBDV et isole les segments A et B (dsARN) du virus. La boucle VP1, ARN-polymérase, se positionne aux extrémités 5' et 3' des dsARN. VP3 se situe dans la partie interne de la capside. VP1 participe à l'encapsidation du virus, ainsi qu'à la vitesse de réplication virale. VP2 encode la majorité des déterminants antigéniques. VP3 interagit avec VP1 et VP2 pour former des complexes qui pourraient être impliqués dans la morphogénèse de l'IBDV. VP4 est un polypeptide mineur et non-structural, mais sa fonction demeure mal-connue. Enfin, VP5 aurait une fonction régulatrice du virus et participerait à la lyse des lymphocytes B. **(Bas)** L'ORF1 du segment B code pour la boucle VP1. Le segment A est constitué de l'ORF1, codant la boucle VP5, et l'ORF2, codant lui pour les boucles VP2, VP3 et VP4 (d'après [Delmas *et al.* 2012]).

3. Classification du virus

L'IBDV peut être classé, selon les antigènes qu'il présente, en deux sérotypes, chacun ayant ses propres caractéristiques [McFerran *et al.* 1980]. Le sérotype 1 est pathogène pour la

volaille. Plusieurs souches (comportant des antigènes différents) sont regroupées sous ce sérotype distinguées selon leur virulence (*i.e.*, mortalité, lésions de la bourse de Fabricius).

Ainsi, les souches d'IBDV peuvent être définies comme *virulentes classiques*, *variantes* ou *hypervirulentes* (vIBDV, *Very Virulente Infectious Bursal Disease Virus*). Le chapitre suivant détaillera les différences entre ces souches.

Le sérotype 2, apathogène, a été isolé du dindon, chez lequel il ne provoque qu'une affection sub-clinique, c'est-à-dire asymptomatique [Ismail *et al.* 1988].

La différenciation des deux sérotypes est réalisée *in vitro*, par l'absence de séro-neutralisation croisée, et *in vivo*, par l'absence de protection croisée [Ashraf *et al.* 2006 ; Becht *et al.* 1988 ; Jackwood *et al.* 1984].

D. Aspects cliniques de la Bursite Infectieuse

Suite à l'infection par l'IBDV, la période d'incubation est très courte et les signes cliniques de la maladie sont observés dans les 2-3 jours. Les infections causées par l'IBDV entraînent, dans la plupart des cas, de graves signes cliniques et une mortalité élevée. Des épidémies causées par certaines souches peuvent tuer jusqu'à 70% des poules futures pondeuses et 30% des poulets de chair [McFerran & Nulty 1993].

Les signes cliniques sont classiques d'une immunodépression aiguë, associée à une dépression et avec prostration des oiseaux infectés, de la diarrhée, et ce, pendant les premières semaines de vie [Van Den Berg 2000]. Les variations géographiques, à la fois au niveau local (*e.g.*, entre deux fermes voisines) ou mondial (*e.g.*, entre deux continents) sont considérables. Néanmoins, le tableau clinique de l'IBD peut être catégorisé selon les trois formes décrites ci-dessous, dépendantes très fortement de la virulence de la souche, ainsi que de l'âge, de l'espèce et de l'état d'immunité passive à laquelle se trouve l'animal infecté.

1. **La forme immunodépressive**

Touchant préférentiellement les animaux de moins de 3 semaines, elle est dite "inapparente". Ce type de tableau est causé par une souche virale peu pathogène, ou, par action de l'immunité passive⁴ qui aurait persisté chez l'animal. Cette immunité passive n'empêche cependant pas les retards de croissance, l'apparition de pathologies opportunistes, ou encore, l'inefficacité des vaccins chez les poussins atteints [Guérin *et al.* 2011].

2. **La forme aiguë**

Présente en Europe, puis en Asie, les souches hyper-virulentes de l'IBDV sont responsables de la forme aiguë. Les animaux touchés par cette forme sont généralement âgés de trois à six semaines, lorsque l'immunité passive maternelle disparaît. Tel que le décrivait déjà COSGROVE, les animaux apparaissent prostrés, abattus, atteints de diarrhées, d'anorexie, de tremblements, présentent un plumage ébouriffé, des hémorragies sur les muscles (pétéchies⁵) et sont atteints de déshydratation sévère. Elle apparaît brutalement après quelques jours d'incubation. Généralement, les animaux meurent au troisième jour après contamination par l'IBDV. Les survivants retrouvent un tableau clinique sain, en apparence du moins, entre cinq et sept jours post-contamination [Guérin *et al.* 2011].

3. **La forme classique**

Cette forme équivaut à la forme aiguë, mais concerne les animaux âgés de plus de six semaines. Elle est induite par les souches virulentes classiques. La morbidité s'élève à 80% sur des animaux touchés par cette forme de la maladie. La mortalité est de l'ordre de 10%, notamment sur les productions à sensibilité génétique supérieure (comme par exemple les futures pondeuses d'œufs destinés à la consommation humaine, et les poulets à croissance lente type Label). Les lésions de la bourse de Fabricius sont très redoutées car elles rendent les animaux sensibles aux autres infections (dites secondaires) causées par des agents pathogènes opportunistes (*e.g.*, *Escherichia coli*, moisissures, etc. ...) [Guérin *et al.* 2011].

Les lésions de la bourse de Fabricius sont pathognomoniques. Trois à quatre jours après infection, les bourses sont hypertrophiées, hyperhémiques et œdémateuses, avec, dans les cas les plus sévères, un aspect jaunâtre s'accompagnant de pétéchies et d'hémorragie. À partir du 5^{ème} jour, les bourses retrouvent une taille normale, dû à une atrophie qui s'installe. Cette atrophie est cliniquement observable au 8^{ème} jour.

⁴ L'immunité passive est due au transfert d'anticorps maternels à l'œuf embryonné, lui offrant une protection immunitaire.

⁵ Petites taches cutanées de couleur rouge à violacée, ne blanchissant pas sous la pression. Les pétéchies sont dues à l'infiltration de sang sous la peau (hémorragie mineure induite par la rupture d'un capillaire sanguin).

E. Techniques de Diagnostic de la Bursite Infectieuse

Différentes méthodes permettent d'établir le diagnostic de la bursite infectieuse. Les principales méthodes utilisées à cette fin sont listées ci-dessous :

- Diagnostic clinique, par observation des lésions macroscopiques,
- Diagnostic histologique de l'atrophie des bourses de Fabricius.
- Diagnostic sérologique, par techniques immuno-enzymatiques (type ELISA),
- Diagnostic virologique, incluant l'isolement viral, détection des antigènes viraux ou du génome viral (RT-PCR). Ce dernier type de diagnostic est restreint dans l'usage (coûteux et exigeant en matériels).

De façon générale, le diagnostic est réalisé de manière différentiel, afin de distinguer d'autres maladies susceptibles d'être confondues cliniquement avec l'IBD (*e.g.*, Maladie de Marek, Néphrite, la maladie de Newcastle, Bronchite Infectieuse, Coccidiose⁶).

Dans le cadre des travaux de thèse, dont le but est la validation clinique d'un vaccin, nous utiliserons l'examen histologique comme confirmation du diagnostic de l'IBD, conformément aux exigences de la Pharmacopée Européenne, que nous présenterons plus bas.

Le diagnostic histologique permet de mettre en évidence des modifications de la Bourse de Fabricius notamment aux stades précoces de l'infection. En effet, la morphologie de la bourse de Fabricius peut varier considérablement en fonction du stade d'évolution de la maladie et il faut donc analyser plusieurs animaux. Pour ce projet de thèse, nous nous intéresserons particulièrement à une souche hypervirulente (vvIBDV). Cette souche a la propriété d'induire des lésions histologiques importantes au niveau des organes lymphoïdes non-bursaux tels que le thymus, la rate ou la moelle osseuse ^[Inoue *et al.* 1994 et 1999].

⁶ Infection de type parasitique cause par le *coccidium*, un protozoaire épithélial, qui entraîne des troubles intestinaux chez les animaux atteints. La déshydratation et des diarrhées, avec présence de sang, sont deux exemples de symptômes que peuvent partager l'IBD et la Coccidiose (Cf. paragraphe F. Aspects cliniques de l'IBD).

F. Traitement et prophylaxie

1. Les vaccins contre la Bursite Infectieuse

La très grande résistance du virus de la Bursite Infectieuse aux agents physiques et chimiques explique la persistance dans le milieu extérieur, notamment dans les exploitations contaminées, et ce malgré les désinfections pratiquées [Benton *et al.* 1967]. En conséquence, l'éradication de la maladie dans les pays affectés semble illusoire. Dès lors, la prévention de l'IBDV repose à la fois sur l'hygiène et la prophylaxie médicale.

À ce jour, il n'existe aucun traitement thérapeutique ou de soutien capable de modifier le cours de l'infection par le virus IBDV [Parkhurst *et al.* 1964]. Le contact avec des oiseaux infectés et les vecteurs passifs (*ver de farine, moustiques, chiens et rats*) contaminés conduit à une propagation rapide et aisée de l'infection. Dans le cas de l'IBD, des précautions sanitaires doivent être rigoureusement appliquées et suivies afin de limiter au maximum la propagation.

La vaccination des poulets est la principale méthode utilisée pour contrôler l'infection causée par l'IBDV chez le poulet. Il apparaît primordial d'immuniser les élevages de reproducteurs afin que la descendance bénéficie aussi de l'immunisation contre l'IBDV. Ces anticorps maternels protègent la progéniture pendant une à trois semaines. L'association avec un adjuvant de type huileux peut prolonger l'immunité passive jusqu'à quatre à cinq semaines chez les poussins issus des reproducteurs vaccinés [Lucio & Hitchner 1979].

Déterminer la bonne fenêtre temporelle pour une vaccination efficace des jeunes poussins maternellement immunisés est critique pour l'immunisation active. Administré trop tôt, le virus du vaccin ne se répliquerait pas ou peu ; trop tard, et les animaux seraient vulnérables aux souches présentes sur le terrain [Jackwood 2016]. Nous savons que les poussins sont très sensibles à l'IBDV entre trois et six semaines. La persistance des anticorps maternels peut, donc, entraver la bonne réponse vaccinale. Si les poussins sont vaccinés pendant cette période précoce, les anticorps dits passifs neutraliseront cette vaccination et les animaux ne seront pas protégés contre l'infection ultérieure par un virus sauvage plus pathogène.

Avec les niveaux d'anticorps maternels, l'efficacité de la vaccination est également fonction de la voie d'administration et de la virulence de la souche vaccinale. De plus, le stress environnemental est également à considérer pour une vaccination efficace. Afin de déterminer la meilleure fenêtre, la surveillance des niveaux d'anticorps chez les animaux

reproducteurs, ou leur descendance, s'avèrerait être un bon moyen pour augmenter l'efficacité de la vaccination [De Herdt *et al.* 2005].

2. Les types de vaccins

D'une façon générale, la mise en place d'un programme de vaccination efficace avec les vaccins classiques, sensibles aux anticorps maternels, reste un problème difficile à résoudre.

a) Vaccins vivants atténués

Ce type de vaccin est généralement réservé aux jeunes oiseaux : poulets de chair, futures pondeuses et futurs reproducteurs. Chez les futurs reproducteurs, on réalise le plus souvent deux vaccinations à virus atténué. L'objectif est double : protection de la poulette en début de croissance et préparation de l'effet *rappel*, réalisé par l'injection de vaccin inactivé avant l'entrée en ponte.

b) Vaccins inactivés (virus "tué" + adjuvant de l'immunité)

Ces vaccins injectables, réservés aux reproducteurs, offrent une bonne protection immunitaire passive chez les poussins. Le protocole vaccinal est habituel pour les élevages de reproducteurs avant l'entrée en ponte : une primo-vaccination à virus vivant puis rappel avec le vaccin inactivé. Cela permet une transmission d'anticorps maternels efficace pendant toute la durée de la ponte et persistant jusqu'à quatre à cinq semaines chez le poussin.

c) Autres vaccins

Des vaccins innovants, insensibles aux anticorps d'origine maternelle, ont récemment été mis sur le marché mondial :

- *Vaccins à complexe immun* qui permettent un relargage progressif de l'antigène viral au cours de la décroissance des anticorps d'origine maternelle.
- *Vaccins à virus recombinants HVT (Herpes Virus of Turkeys)*, issus de la biologie moléculaire, qui expriment la protéine immunogène de l'IBDV chez le jeune poussin, indépendamment du titre d'anticorps d'origine maternelle. Ces vaccins assurent également une certaine protection contre la maladie de Marek.

Ces deux types de vaccins sont injectables, soit *in ovo*, soit à 1 jour d'âge, sans nécessiter de vaccination en élevage. Ces vaccins sont aujourd'hui largement utilisés et ont pratiquement supplanté les vaccins vivants classiques. Il existe actuellement huit vaccins à

disposition des propriétaires avicoles pour combattre la Bursite Infectieuse. Le **tableau 1** ci-après recense ces vaccins, ainsi que leurs principales caractéristiques.

G. Données épidémiologiques

1. Distribution des différents types de souches

Les régions hautement productrices de volailles sont inévitablement les plus touchées par le virus.

Les premiers cas officiellement observés à Gumboro ont débuté entre 1960 et 1964 [Lasher & Shane 1994]. Ce sont ensuite les pays d'Europe qui ont été touchés de 1962 à 1971 [Faragher 1972], et, de façon quasi-concomitante (1966 à 1974), la maladie a atteint les Moyen- et Extrême-Orient, l'ouest Africain, l'Afrique du Sud, l'Inde et l'Australie [Firth 1974 ; Jones 1986 ; Lasher & Shane 1994 ; Provost *et al.* 1972 ; Van der Sluis 1999]. Les échanges commerciaux pourraient être à l'origine de la globalisation de l'IBDV, tout du moins, d'une souche ancêtre commune du virus. Les réassortiments génétiques (causée par la très grande *mutabilité* de l'IBDV) sont à l'origine de la disparité de la répartition des souches d'IBDV [Voir pour revue Alkie & Rautenschlein 2016].

Bien qu'une carte de répartition puisse être dressée de ces quelques données épidémiologiques, il est difficile de faire état, de façon schématique, de la localisation géographique des différents types de souches d'IBDV. Cependant, nous pouvons dégager une tendance de tel ou tel variant, selon le continent considéré.

Aux États-Unis, les souches d'IBDV variantes apparaissent comme les formes prédominantes. Ces formes n'induisent pas de signes cliniques apparents, mais peuvent également être modifiées par les anticorps et perdent de leur virulence. Les souches classiques et variantes ont été reportées en Australie [Sapats & Ignjatovic 2000]. En Europe, Asie, Afrique et Amérique du Sud, la souche hyper-virulente apparaît être la forme prédominante [Ikuta *et al.* 2001]. Nous pouvons ainsi qualifier cette affection de cosmopolite. Intéressons-nous au cas de l'Europe, vu qu'elle fût le siège de l'émergence de la souche hyper-virulente.

Fin des années 1980, la souche hyper-virulente Européenne (vIBDV, pour *very virulent*) émerge dans plusieurs fermes. Certains cas d'apparitions ont été décrits dans des élevages où les mesures classiques de prophylaxie sanitaire et médicale étaient appliquées et n'ont pu contrecarrer la virulence de la souche [Van den Berg *et al.* 1991; Eterradossi, Picault *et al.* 1992;

Tsukamoto, Tanimura *et al.* 1992]. La forme vvIBDV est capable d'infecter des individus porteurs d'anticorps à des titres normalement protecteurs [Van den Berg *et al.* 1991]. Elle est significativement plus pathogène, mais aucune mutation antigénique susceptible d'expliquer ce pouvoir pathogène augmenté n'a été mise en évidence, on les considère donc comme des variants *pathotypiques* [Van den Berg *et al.* 1991].

La forme vvIBDV a un taux de mortalité de 90% chez les jeunes animaux (jusqu'à 4 semaines) [Chettle *et al.* 1989] et peut causer jusqu'à 70% de mortalité dans les élevages de futures poules pondeuses [Chettle *et al.* 1989; Van den Berg *et al.* 1991b]. Dans les élevages sensibles, l'IBD se développe très soudainement, avec un taux de morbidité pouvant atteindre 100%.

La souche vvIBDV a été isolée plus tardivement aux États-Unis. Elle partage 80% d'homologie avec les souches classiques [Jackwood *et al.* 2009; Stoute *et al.* 2009]. Des souches de type variant ont également été détectées aux États-Unis. Les souches vvIBDV sont, d'un point de vue antigénique, différentes des souches classiques et provoquent une rapide et sévère atrophie bursale [Vakharia *et al.* 1994]. Ces variants antigéniques ne sont pas neutralisés par les anticorps dirigés contre les souches classiques et sont donc capables d'infecter des sujets porteurs d'anticorps à des titres normalement protecteurs.

2. **Impact économique**

La Bursite Infectieuse se place en tête des maladies aviaires les plus contagieuses et dévastatrices. Elle a ainsi un impact socio-économique globalisé extrêmement important et se pose en réel problème pour l'industrie aviaire depuis de nombreuses années. Stable et contrôlée par la vaccination sous sa forme classique pendant quelques temps, la résurgence récente du virus sous formes variantes et hyper-virulentes continue d'impacter le secteur avicole.

Nous pouvons distinguer trois types de pertes liées à la maladie. Les pertes animales directes, qui sont liées à la mortalité spécifique due à l'IBDV. Elles dépendent de la dose et la virulence de l'inoculum, de l'âge et l'espèce des animaux, ainsi que la présence ou l'absence de l'immunité passive maternelle.

S'ajoutent les pertes animales indirectes, conséquences de l'immunodéficience acquise, ou des interactions que l'IBDV peut avoir avec d'autres pathologies virales, bactériennes ou parasitaires.

Enfin, la troisième catégorie concerne les pertes animales liées au retard de croissance et au rejet de carcasses en raison de leur aspect hémorragique [Voir pour revue Van den Berg *et al.* 2000].

3. Modes de transmission de la Bursite Infectieuse

Les études rapportent qu'un risque d'infection demeure dans les bâtiments d'élevage, débarrassés d'animaux malades, plus de 120 jours après. L'eau, la nourriture et les déjections en contact avec des poules infectées demeurent contagieuses plus de 50 jours après prélèvements [Benton *et al.* 1967]. Le virus est excrété dans les selles pendant 2 à 14 jours [Saif *et al.* 2008].

De plus, les études suggèrent également que certains organismes peuvent jouer le rôle de porteurs sains, et ce, sur une longue période. Ces organismes incluent notamment le petit ténébrion (famille des vers de farine) [Snedeker *et al.* 1967] et le moustique [Howie & Thorsen 1981]. Ils pourraient certainement poser des problèmes supplémentaires pour le contrôle de cette infection [Saif *et al.* 2013].

Seule la transmission horizontale est reconnue pour l'IBDV. Les sujets sains se contaminent par voie orale (eau nourriture, litière contaminée par les fientes, etc. ...) ou respiratoire. Les animaux infectés commencent à excréter le virus dans leurs fientes au bout de 48h et sont contaminants par contact direct pendant seize jours [Vindevogel, Gouffaux *et al.* 1976].

Ainsi, la contamination est réalisée par contact direct avec les individus excréteurs ou par contact indirect avec un vecteur souillé, inanimé (matériel), ou animé (personnel d'élevages, rongeurs, insectes). La transmission indirecte est, comme nous l'avons vu précédemment, favorisée par la grande résistance du virus dans le milieu extérieur

Aucun cas de transmission du virus de l'IBD à l'homme n'a été reporté et cette maladie n'aurait donc aucun impact direct sur la Santé Publique Humaine [Pedersen *et al.* 1990].

H. Présentation des différentes catégories de poulets

Le marché avicole peut se découper en trois grandes familles, reflet des trois catégories de Poulets. La première famille est celle du *Poulet de Chair*, qui regroupe les poulets de type "Standard", "Certifié", "Label" et "Bio". La poule "Pondeuse" est le seul membre de la deuxième famille, destinée au marché d'œufs. Enfin, nous avons la troisième famille, qui englobe les Parentaux, c'est-à-dire les poules reproductrices type "Chair" et "Ponte" d'une part, et les coqs reproducteurs type "Chair" d'autre part, dont l'objectif est la transmission à leurs progénitures de caractères d'intérêt spécifiques. Par exemple, dans le cas de la reproductrice type "Chair", on cherche à transmettre une croissance rapide et une excellente qualité de viande. Dans le cas de la reproductrice type "Ponte", on cherche à transmettre une intensité de production élevée, une meilleure efficacité alimentaire et une bonne qualité des œufs.

Outre la destinée différente de ces familles, elles se distinguent également par leur durée de vie. Pour le marché industriel aviaire, la durée de vie moyenne du poulet de chair varie approximativement entre 35 et 91 jours. Pour la poule pondeuse, la durée de vie est d'environ 1 à 2 ans car elle est généralement réformée⁷ après un ou deux cycles de pontes⁸. Enfin, pour les Parentaux, la durée de vie moyenne est de 64 à 68 semaines.

Ces différents "temps de vie" selon les familles de poulets considérées sont extrêmement importants, car ils impliquent un programme de vaccination propre à chacune. En effet, pour l'IBD, par exemple, il est impératif et obligatoire de vacciner les poules et poulets de toutes les familles, du fait du développement précoce des signes cliniques. Cependant, si on considère la maladie de Marek, elle, d'apparition tardive (approximativement 7 à 30 semaines), il n'est pas nécessaire de vacciner les poulets de type Standards par exemple, en raison de leur durée de vie sur le marché de 35 à 41 jours (cinq à six semaines).

⁷ Les poules de réformes ont, en règle générale, passées leurs meilleures années de ponte chez les éleveurs industriels. Ainsi ces derniers s'en débarrassent à prix bas à des particuliers, ce qui évite de les euthanasier.

⁸ La poule, à l'âge adulte (à cinq à neuf mois selon les races), pond un œuf par jour ou un tous les deux jours (soit cent à trois cents œufs par an selon les races et l'âge). Chaque année, la poule diminue sa ponte de vingt à trente pour cent, jusqu'à épuisement des ovocytes. Après la première ponte, une mue intervient (renouvellement de plume), pendant laquelle le système de reproduction de la poule est en repos complet.

Désignation	Titulaire du produit	Type de vaccin	Forme Galénique	Valence	Animal (sexe et âge)	OOI ⁽¹⁾	DOI ⁽²⁾
AviPro GUMBORO VAC	Elanco Europe Ltd	Vivant	Lyophilisat pour eau de boisson	Monovalent (contre l'IBD)	poulette de chair / poule pondeuse / reproducteur (âge 3-4 sem)	3 semaines	min. 14 semaines
AviPro PRECISE	Elanco Europe Ltd				poulet de chair (âge 7 jours)	14 jours	28 jours
HIPRAGUMBORO CW	HIPRA				poulet de chair (âge dépendant du taux d'anticorps maternels encore présent)	14 jours	30 jours
HIPRAGUMBORO-GM97	HIPRA				poulet de chair (âge 1 jours)	14 jours	43 jours
POULVAC BURSA PLUS	Zoetis				poulet (âge 10 jours)	14 jours	32 jours
NOBILIS GUMBORO D 78	MSD Animal Health	Vivant atténué			poule (14-21 jours)	6-7 jours	31 jours
POULVAC BURSINE 2	Zoetis				poule pondeuse / poule reproductrice / poulet de chair (>14 jours)	Non-renseignée	Non-renseignée
VAXXITEK HVT + IBD	MERIAL / Boehringer Ingelheim	Vivant recombinant	Pour injection sous-cutanée ou <i>in ovo</i>	Bivalent (contre IBD et Maladie de Marek)	poulet /œuf embryonné (âge 1 jours)	14 jours	< 9 semaines

Tableau 1: Récapitulatif des huit vaccins vivants disponibles pour lutter contre la bursite infectieuse. ⁽¹⁾ OOI = *Onset of Immunity* : Mise en place de l'immunité. ⁽²⁾ DOI = *Duration of Immunity* : Durée de l'immunisation

III. Présentation de Merial

La partie suivante a pour sujet la présentation de la société Merial. Après un bref historique, nous exposerons les principales activités de façon globale, puis, plus particulièrement, celles du Centre de Recherche de Saint-Vulbas (CRSV), site Merial où les travaux de thèse ont pris place.

A. Historique

L'histoire de Merial débute en 1897, lors de la fondation de l'Institut Biologique Mérieux, par Marcel Mérieux⁹. Charles Mérieux reprend le modeste laboratoire de microbiologie au décès de son père en 1937, et inaugure dix ans plus tard l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse (l'IFFA). Il y lancera la toute première production industrielle de vaccins contre la fièvre aphteuse. Suivront d'autres vaccins, tels que celui contre la rage en 1968, une autre grande étape du développement des techniques de production industrielles des vaccins à grande échelle.

En 1983, l'IFFA et les activités vétérinaires du groupe Rhône-Poulenc fusionnent, créant ainsi Rhône-Mérieux, une nouvelle structure qui va, rapidement transférer son savoir-faire à l'international.

Merial naît véritablement le 1^{er} août 1997, de la fusion des activités vétérinaires de *Sanofi-Adventis*¹⁰, la division Santé Animale de Rhône-Poulenc (France), et celle de Merck & Co. Inc (USA), *MSD AgVet*. Détenue à part égale par ces deux maisons mères, cette nouvelle société devient alors l'entreprise autonome ayant la plus vaste gamme de produits et de services destinés à la prévention et au traitement des maladies animales. Merial devient partie intégrale de Sanofi, lorsqu'en 2009, cette dernière rachète la participation de Merck. Désormais considérée comme la division Santé Animale de Sanofi, Merial décide, en 2011, d'installer le siège mondial de ses activités à Lyon, jusqu'alors localisé aux États-Unis¹¹. Cette décision est motivée par l'ancrage historique de l'entreprise dans la région et la présence d'un écosystème propice au développement de ses activités.

⁹ un ancien de l'Institut Pasteur de Paris

¹⁰ toujours Rhône-Mérieux en cette année

¹¹ Duluth, dans l'État de Géorgie

B. Missions et Activités de Merial

Les trois missions fondamentales de Merial sont :

- Soigner les animaux de compagnie qui occupent aujourd'hui une place importante dans les foyers et auprès des personnes seules ;
- Prévenir et guérir certaines pathologies animales, et permettre ainsi la prévention de ces maladies chez l'homme ;
- Répondre à la demande alimentaire croissante en permettant aux éleveurs de produire des protéines animales de qualité et en quantités suffisantes.

Dans cette optique, Merial propose une gamme complète de médicaments et de vaccins destinés à améliorer la santé et le bien-être d'un grand nombre d'espèces animales, devenant ainsi un *leader* mondial en santé animale. Merial compte trois activités d'expertise : les animaux de compagnie, les animaux d'élevage et la santé publique vétérinaire. Présente dans plus de 150 pays, la société emploie 6 900 personnes pour la fabrication de ses produits destinés à la prévention des maladies, la santé et le bien-être des animaux. Ainsi, plus de 200 maladies sont couvertes, touchant différentes espèces animales.

Les principales marques de Merial pour les animaux de compagnie sont *Frontline*® et *NexGard*® (lutte anti-puces et anti-tiques), *Heartgard*® (lutte contre la maladie des vers du cœur, la dirofilariose), et *Purevax*® (un vaccin pour chats luttant contre plusieurs maladies, telle que la leucémie, la rage, ou encore les maladies respiratoires chroniques). Chez les animaux de production, on peut citer le *Vaxxitek*® (vaccin aviaire contre la Maladie de Marek¹² et la Bursite Infectieuse), *Eprinex*®, *Longrange*® et *Ivomec*® (lutte anti-parasites pour les bovins), *Circovac*® (vaccin pour le porc contre l'infection à PCV2) et *GastroGard*® (luttant contre l'ulcère gastrique Équin).

Merial est un partenaire stratégique pour la santé publique vétérinaire et fournit également aux gouvernements des vaccins pour le contrôle de la fièvre aphteuse, la fièvre catarrhale ovine et la rage. Engagée en faveur de l'innovation et de l'excellence, Merial exploite 13 centres de R&D et 15 sites de production.

¹² Maladie contagieuse et transmissible aux volailles, due à la multiplication d'un herpès-virus, provoquant la formation de tumeurs dans différents organes ou tissus, mais surtout dans les nerfs périphériques.

C. Activités R&D de Merial dans le monde

Les missions de la R&D Clinique de Merial dans le monde est de fournir une excellence clinique sur un plan à la fois immunologique et pharmaceutique. Les principaux sites de R&D américains (Missouri et Athens), japonais (Tōkyō), allemand (Katrinenhof) et français (Lyon et Saint-Vulbas) conjuguent ainsi leurs efforts pour :

- la découverte de principes actifs et antigènes candidats,
- la détermination de la voie d'administration et la formulation les plus optimales,
- la détermination de la dose minimale efficace et protectrice,
- la confirmation des tests d'efficacité et d'innocuité en laboratoires et en terrains,
- la consolidation des données d'efficacité et d'innocuité pour répondre aux exigences réglementaires en vue de soumission à la fois Européenne et mondiale.

Ayant réalisé mon stage au Centre de Recherche de Saint-Vulbas (CRSV), nous allons nous attarder sur les missions spécifiques qui y sont réalisées.

D. Activités R&D de Merial au CRSV

1. Présentation du site

Situé dans l'Ain, le CRSV représente le plus gros centre de R&D Clinique de Merial, avec plus d'une centaine personnes employées, dont 20 vétérinaires responsables d'études.

Les deux missions spécifiques au CRSV sont :

- l'organisation, la conduite et le *reporting* de toutes les phases animales pour le Contrôle Qualité de chacun des lots de vaccins produits sur le site Lyonnais, et la production d'organes infectés pour la fabrication d'antigènes, pour la création de vaccins.
- la réalisation d'études cliniques nécessaires aux projets R&D de Merial.

Les infrastructures de confinement que le centre abrite permettent la recherche et le développement de vaccins vétérinaires pour un grand nombre d'espèces (animaux de compagnie et animaux d'élevage).

Sont ainsi distinguées les infrastructures dédiées aux Rongeurs, Animaux de compagnie, Animaux de rente (Ovins, Bovins, Porcins) et Aviaires, couvrant une surface totale de 9000 m². Les bâtiments se découpent par gamme comme suit :

- 5 bâtiments dédiés aux Aviaires (plus de 2600 m²) ;
- 4 bâtiments dédiés aux Animaux de Rentes (plus de 2800m²) ;
- 5 bâtiments dédiés aux Animaux de Compagnie (plus de 2600m²) ;
- 1 bâtiment dédié aux Rongeurs et Lagomorphes (plus de 700m²).

Chaque bâtiment permet l'hébergement d'un grand nombre d'animaux par espèce mais également, la conduite des travaux cliniques, l'élaboration des produits pharmaceutiques ou vaccinaux, avec leurs tests associés (tests de sécurité ou d'efficacité par exemple). C'est dans ce contexte que sont réalisées, en particulier, les études relatives à l'IBDV.

2. Vaccination contre l'IBD au CRSV

Chez Merial, notre approche de la protection contre l'IBD est axée sur la préservation de l'intégrité de la bourse de Fabricius. Dans ce but, la vaccination précoce, à savoir, dès l'éclosion, est priorisée. Mais pour répondre au mieux aux besoins, trois types de vaccins ont été développés, permettant une administration couvrant les stades de l'éclosion jusqu'à l'administration sur le terrain :

- *Vaxxitek[®] HVT + IBD*, un vaccin vectoriel deux-en-un mondialement commercialisé pour administration à l'éclosoir qui utilise l'Herpes-virus de la Dinde (HVT) comme vecteur. Il exprime l'antigène protecteur (VP2) du virus de la bursite infectieuse et induit une immunisation active vis-à-vis de l'IBD. Il protège aussi de la maladie de Marek.
- *BDA Blen/Gallivac BDA[®]*, virus vivant, lyophilisé, associé à une souche d'IBDV et à un antisérum d'IBD pour l'administration à l'éclosoir,
- *Gallimune[®]*, un vaccin inactivé et une combinaison de plusieurs produits, incluent l'IBD et d'autres maladies.

La stratégie du *Vaxxitek[®] HVT + IBD* est la suivante : vacciner dans la mesure du possible au plus tôt contre les maladies immuno-suppressives les plus graves pour optimiser la santé de la volaille et la productivité. Nous avons ainsi participé, au cours de ce stage, à l'amélioration du *Vaxxitek[®] HVT + IBD*, dans un contexte économique de récupération de parts de marché à la concurrence et d'amélioration de l'offre vaccinale proposée aux éleveurs.

IV. Développement d'un Vaccin

Le processus d'élaboration de produit pharmaceutique est généralement très long. Les différentes étapes présentent chacune des défis à relever, et doivent, pour s'assurer de l'innocuité, de l'efficacité et de la standardisation, satisfaire à des exigences spécifiques. Ainsi, dans ce chapitre, nous allons présenter les grandes lignes du développement d'un vaccin vétérinaire avant d'évoquer, ensuite, le cadre réglementaire encadrant la fabrication des vaccins vétérinaires. Nous développerons également l'aspect éthique, indissociable de tout projet de recherche impliquant des animaux. Pour terminer ce chapitre, nous expliquerons enfin les enjeux du projet au sein de Merial, en détaillant 3 études pré-cliniques réalisées au cours de ces travaux.

A. Vue d'ensemble

Il faut quelques dizaines d'années pour aboutir, depuis la molécule trouvée dans un laboratoire, à sa mise sur le marché. Le temps de surveillance des effets néfastes, secondaires et/ou indésirables (voir § **Pharmacovigilance**) se déroule ensuite sur plusieurs dizaines d'années après la commercialisation.

Dans le cas du développement d'un vaccin, ce temps est, en moyenne, plus court, même si les étapes sont identiques à toutes celles de procédé de Recherche et Développement (R&D) pour les produits thérapeutiques. En effet, l'identification d'un candidat antigénique d'intérêt (virus ou bactérie vivant ou inactivé, antigène recombinant, microorganisme génétiquement modifié etc...) peut être plus rapide que la synthèse et le screening de molécules. Ainsi, la première phase de développement d'un vaccin peut se voir raccourcir de quelques années.

Nous allons maintenant aborder les différentes étapes de R&D, ainsi que l'environnement normatif, réglementaire et éthique qui encadrent et régissent tout le cycle de vie d'un produit, illustré par la **figure 5**.

1. Du candidat au Vaccin

Ce paragraphe s'appuie à la fois sur les connaissances acquises pendant mon cursus pharmaceutique, sur des formations internes de Merial, ainsi que sur ma spécialisation Pharmacie Vétérinaire.

a) Recherche fondamentale et appliquée

Dans le développement de tout médicament, la recherche fondamentale a pour principal objectif d'identifier plusieurs molécules candidates. Les phases de *screening* et de test (voir **figure 5**) vont permettre d'isoler la meilleure molécule candidate. Dans le cas des vaccins, nous avons une phase dite *exploratoire*, qui permet de comprendre la maladie et les données immunologiques qui s'y rapportent afin d'identifier les antigènes à utiliser pouvant jouer un rôle dans la réponse immunitaire.

La recherche appliquée, elle, se concentre sur le raffinement de techniques existantes.

b) Développement – Du candidat à la spécialité

Le développement est l'ensemble des travaux qui suivent la découverte d'une molécule ou d'un antigène pour la transformer en vaccin commercialisable. Il faut, en moyenne, entre 8 à 12 ans depuis l'antigène candidat jusqu'à l'obtention du vaccin mis à la disposition des vétérinaires. Le développement préclinique et clinique est, ainsi, long, mais est également coûteux (voir **figure 5**).

En effet, il fait l'objet d'une prise de risque importante pour le laboratoire, celui-ci n'étant pas assuré, au début du développement, que le projet ira jusqu'à son terme. Toutes les étapes du développement sont complexes, et chacune d'entre elles peut conduire à un résultat susceptible de contraindre le laboratoire à abandonner le développement du produit.

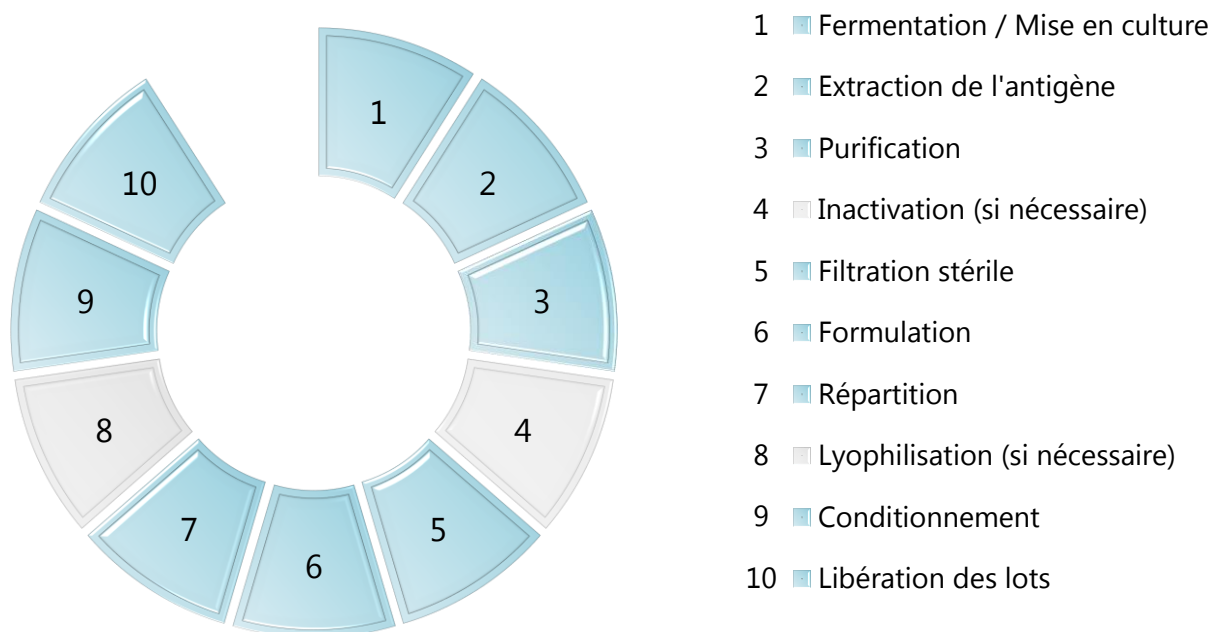
Ainsi, pour essayer de garantir le succès de chaque étape et assurer la qualité des résultats, le développement se conforme à des règles et bonnes pratiques strictes pour s'assurer d'un produit de qualité, efficace et de bonne innocuité. Les étapes de Recherche et Développement suivent les Bonnes Pratiques de Recherche, de Laboratoire et Cliniques (respectivement, BPR, BPL et BPC). Les BPR s'appliquent lors des phases de screening et de sélection du meilleur candidat. Les BPL s'appliquent lors de la phase préclinique pour les études de laboratoire, en particulier les études d'innocuité. Les BPC s'appliquent lors de la phase clinique pour les études sur le terrain.

c) Production et Qualité : De nombreux contrôles pour une production encadrée et évaluée

L'étape de production industrielle suit les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Le médicament vétérinaire est un produit qui, conformément à la Pharmacopée Européenne, doit passer de nombreux contrôles afin de garantir un produit sûr.

Par exemple, les matières premières qui rentrent dans la composition du médicament doivent être conformes à la Pharmacopée. Aussi, la production d'un médicament vétérinaire ne peut se faire qu'au sein d'un établissement qui a reçu une autorisation administrative des autorités compétentes (voir § 2. **Aspects réglementaire et Éthique attenants** ci-après).

Pour la production d'un vaccin, l'antigène est la partie du vaccin qui "mime" la maladie à prévenir. Il provient du pathogène (virus, bactérie ou parasite) causant la maladie. Le pathogène peut être utilisé dans son entièreté, non sans avoir été "affaibli" (vaccin vivant atténué) ou tué (vaccin inactivé) ou pour une petite partie (vaccin sous-unité). Chaque type de vaccin a son propre processus de production et doit généralement être produit dans un laboratoire entièrement dédié à sa production. D'une façon générale, les étapes de la production d'un vaccin peuvent être résumées comme indiqué dans la **figure 4** ci-dessous.



Propriété de Merial

Figure 4: Cycle de production d'un vaccin : Les étapes grisées, 4 et 8, ne sont pas systématique, et dépendent du type de vaccin et du substrat de base (viral ou bactérien par exemple).

d) Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)

Les vaccins vétérinaires sont soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par l'ANSES-ANMV (autorité nationale française) ou l'EMA (*European Medicines Agency*, autorité européenne). L'AMM est accordée sur la base de l'évaluation du rapport bénéfique / risque, qu'après l'examen approfondi par les autorités d'un dossier scientifique rassemblant l'ensemble des études conduites sur le vaccin en conformité avec des normes et

protocoles harmonisés au niveau européen. Pour les médicaments vétérinaires, le niveau d'exigence est comparable à celui des médicaments à usage humain, avec un volet supplémentaire d'études de sécurité vis-à-vis de l'utilisateur et du consommateur pour les médicaments destinés aux animaux producteurs d'aliment. Le dossier remis aux autorités compétentes pour l'obtention de l'AMM contient l'ensemble des données expérimentales et analytiques prouvant la qualité, la sécurité et l'efficacité du candidat vaccin.

La procédure d'AMM, en raison de ses exigences et de ses objectifs, permet de garantir l'efficacité et l'innocuité d'un vaccin pour l'animal et son bien-être. Cependant, après commercialisation, la surveillance des effets potentiellement néfastes et/ou indésirables continue toujours, et ce, pendant toute durée de vie du médicament.

La **figure 5** ci-dessous présente de façon séquentielle les points abordés précédemment.

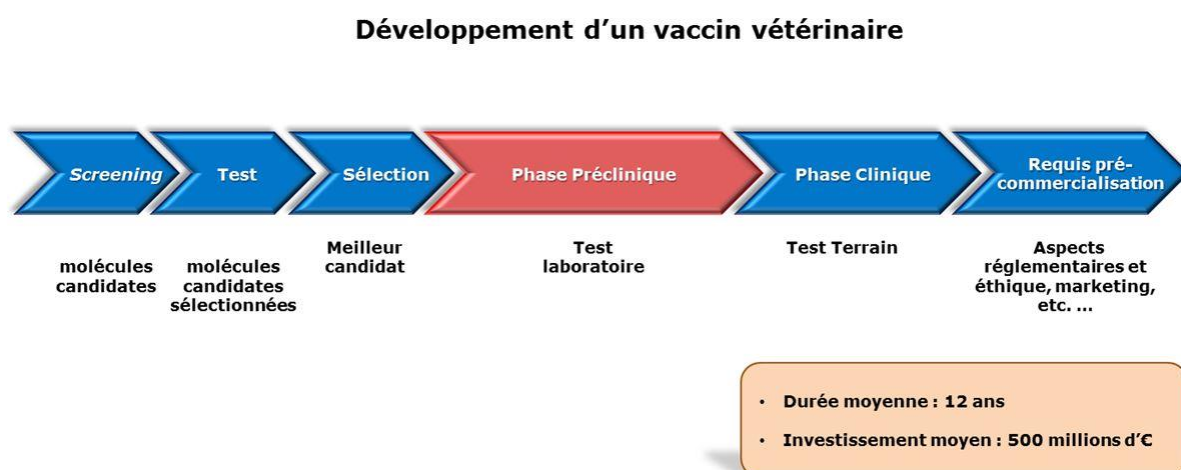


Figure 5: Les différentes phases de Recherche et Développement pour la fabrication de vaccin vétérinaire

e) Pharmacovigilance

La pharmacovigilance vétérinaire prend place pendant la phase de commercialisation. Cette étape consiste en la surveillance des effets indésirables des médicaments vétérinaires, notamment ceux qui n'auraient pas été identifiés au cours du développement, chez les animaux et les êtres humains. Ces informations proviennent directement d'observations de spécialistes (vétérinaires), ou alors de propriétaires qui les transmettent aux spécialistes ou directement au fabricant du médicament en question.

Grâce à une meilleure connaissance du médicament, la pharmacovigilance permet d'améliorer l'information du prescripteur et des propriétaires d'animaux ou professionnels de l'élevage, de confirmer que le bénéfice potentiel est supérieur au risque encouru.

La pharmacovigilance est la dernière phase dans le cycle de vie de tout produit à visée médicale, incluant les vaccins. Nous allons aborder, dans le paragraphe suivant, le contexte réglementaire dans lequel ils s'inscrivent, contexte qui intervient à toutes les phases du cycle de vie.

2. Aspects réglementaires et éthique attenants

a) Aspects réglementaires

Un produit à visée thérapeutique vétérinaire concerne, en plus de la santé animale (épizootie), la santé humaine. Pour assurer l'innocuité et l'efficacité, des études pré-cliniques sont nécessaires. Ainsi, des critères pour l'évaluation des produits ont été établis, pour la protection de l'animal, de l'environnement et du public contre de « mauvais médicaments ». L'utilisateur ne pouvant pas juger de la qualité du produit, des « intermédiaires », légaux, sont nécessaires. Les autorités compétentes, c'est-à-dire, aptes à délivrer les autorisations pour la commercialisation de tout produit à visée thérapeutique. On distingue ainsi les instances nationales, qui sont des entités distinctes en charge de certains types de produits (en France, l'ANMV¹³), des instances multinationales (l'EMA, l'Agence Européenne du Médicament).

Afin d'assurer des produit de qualité, et une standardisation des procédés, la Pharmacopée (Internationale d'une part, et Européenne d'autre part), définissent les exigences de qualité auxquelles doivent satisfaire les substances pharmaceutiques qui composent les médicaments.

Concernant la fabrication d'un vaccin, les exigences sont décrites dans la Monographie 0062 (vaccins pour usage vétérinaire) de la Pharmacopée Européenne, et traite des procédés de fabrication, des matériaux à utiliser (matières premières, chimiques et biologiques, support de conditionnement sous ampoule par exemple) ainsi que les méthodes pour l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité. Des monographies spécifiques à certains vaccins peuvent compléter cette monographie générale. Les monographies utilisées pour l'élaboration du vaccin, à l'étude ici, sont annexées à ce rapport. Le chapitre sur les trois études réalisées au cours de ces travaux reprend également ces directives.

¹³Agence Nationale du Médicament Vétérinaire, l'organisme au sein de l'ANSES (l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) qui permet la libération des médicaments vétérinaires.

Lorsque la Pharmacopée ne décrit pas les spécifications, les exigences minimales de qualité peuvent, toutefois, être énoncées dans les Lignes Directrices Européennes¹⁴.

b) Considérations éthiques

La définition initiale pose l'éthique comme une réflexion visant à établir un équilibre aussi harmonieux que possible entre la place de l'homme et l'animal, le progrès des techniques et de la Science. Néanmoins, depuis quelques années maintenant, l'éthique se place en élément central de la Recherche et du Développement. Toute étude à visée médicale, humaine ou animale, ne peut se faire sans l'évaluation préalable et la validation par un comité Éthique. Au-delà de la prévention de la souffrance et de la douleur, le bien-être animal et la vie doivent, dorénavant, être considérés¹⁵.

L'éthique évalue non seulement les conditions de l'expérience, afin que celle-ci se déroule le mieux pour l'animal, mais aussi, des conditions et la qualité de vie précédant l'expérience. Ainsi, nous pouvons citer, en exemples, une taille des cages d'hébergement plus adéquate, des critères plus restrictifs sur la douleur éventuelle, respect du comportement animal le plus proche des conditions de vie sauvage, ainsi qu'une surveillance quotidienne et des soins adaptés.

En parallèle, la règle des 3R¹⁶ (Remplacement, Réduction et Raffinement) devient formelle et indissociable de l'expérimentation animale, et ce, à tous les niveaux de l'étude. Les différents intervenants garantissant le respect des règles éthiques sont les suivants :

- Le concepteur/porteur de projet doit justifier le recours à l'animal, concevoir un projet respectueux des 3R et garantir le respect de la mise en œuvre du projet dans l'Union Européenne ;
- L'établissement dans lequel l'étude se déroule doit bénéficier d'un personnel compétent, en nombre suffisant et fournir les moyens SBEA (Santé et Bien-Être Animal) adaptés ;
- Un comité d'éthique qui évalue le projet de façon indépendante et compétente ;

¹⁴ que nous avons suivies pour les études 2 et 3 de ces travaux, Cf. le chapitre suivant.

¹⁵ Issus de la Protection des Animaux utilisés à des fins scientifiques, d'après la Convention ETS 123, Directive UE 2010/63.

¹⁶ Après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, W.M.S. Russell et R.L. Burch ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites "humaines", appelé la "règle des 3 R". Cette règle élaborée en 1959, constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord.

- Des autorités, comme le Ministère de l'Agriculture, qui définissent un cadre réglementaire et administratif efficace et qui a la responsabilité de l'autorisation du projet.

Ainsi, tout projet de fabrication de produit thérapeutique, animal en ce qui nous concerne, doit être cadré, sur un plan scientifique, réglementaire et éthique, pour garantir l'innocuité, l'efficacité et la qualité de ce produit. C'est dans ce contexte tripartite que se sont inscrites les études de ces travaux de thèse, qui vont être présentées dans le chapitre suivant.

B. Objectif du projet

Le recours à la vaccination, lorsqu'il est possible pour la prévention de certaines maladies, doit être encouragé pour les animaux d'élevage mais aussi pour les animaux de compagnie. C'est pour répondre à ces objectifs et besoins que la recherche dans le domaine de l'immunité est fortement développée dans les industries du médicament et autres réactifs vétérinaires.

Dans le cadre du stage de fin d'étude au sein de Merial, j'ai été missionnée sur un projet se situant en phase pré-clinique. J'ai eu l'opportunité de m'occuper de trois études sur le projet de développement d'un vaccin bivalent vis-à-vis de l'IBD et de la maladie de Marek. Avant de présenter les études, il nous a paru important d'introduire brièvement les différents types de vaccins pouvant exister et d'expliquer les avantages de notre type de vaccin.

1. Les différents types de vaccins

Par la vaccination, on cherche à induire une réaction immunitaire chez un animal afin qu'il développe des "armes" immunitaires et qu'il soit protégé lors d'une possible réexposition à un agent pathogène viral, bactérien ou, plus rarement, parasitaire. Pour provoquer la réaction immunitaire protectrice, un antigène est administré à l'animal. Cet antigène doit être dénué de pathogénicité afin que la maladie ne se développe pas. Les antigènes vaccinaux peuvent être de plusieurs types différents. La vaccination est un moyen de prévention indispensable contre certaines maladies infectieuses, en particulier les maladies virales pour lesquelles les traitements sont quasiment inexistantes. Elle permet à la fois de protéger l'animal vacciné et les animaux de son environnement ^[Morton 2007].

a) Vaccins inactivés adjuvés

Un vaccin inactivé (ou tué) est obtenu après mise en culture, sous conditions contrôlées, d'un agent pathogène viral ou bactérien, suivie de son inactivation par chaleur, radiation ou l'adjonction d'un composé chimique (formaldéhyde, détergent). La pathogénicité (ou virulence) est ainsi fortement atténuée et empêche l'infection de l'hôte après administration [Gandon et al. 2001]

Les vaccins inactivés produisent une réponse immunitaire moindre que celle des vaccins atténués. C'est pour cela, d'une part, qu'ils sont souvent combinés avec des adjuvants immunologiques et, d'autre part, que plusieurs injections sont parfois nécessaires. En effet, l'absence de multiplication dans l'organisme peut souvent nécessiter une primovaccination en deux, voire trois injections [Petrovsky & Aguilar 2004]

b) Vaccins vivants atténués

Ce type de vaccin concerne essentiellement les vaccins viraux. L'atténuation de la souche virale se fait selon le processus de passage dans un hôte étranger, c'est-à-dire, un hôte différent de l'espèce qu'il cible habituellement. Des cellules en cultures, des œufs embryonnés, voire des animaux vivants peuvent faire office d'hôtes étrangers. Le processus est le suivant : La population virale initiale est administrée à l'hôte étranger. Parmi les nombreuses mutations qu'un virus subit, certaines d'entre elles vont permettre l'infection du nouvel hôte. Ces virus mutants vont, ainsi, pouvoir y proliférer facilement. La résultante est une population virale significativement différente de celle d'origine. Lorsque la souche virale est administrée dans l'organisme de l'hôte original, celle-ci, adaptée à l'hôte étranger, ne pourra plus y proliférer aussi aisément. Le système immunitaire peut, alors, facilement éliminer et créer des anticorps spécifiques mémoires qui protégeront l'hôte si une exposition à un agent pathogène similaire sauvage se produisait [Badgett et al. 2002]

Ces vaccins provoquent une immunité généralement plus importante et plus durable que les vaccins inactivés. Ils ne nécessitent pas une répétition des injections, ni d'adjuvant et, enfin, stimulent de façon importante l'immunité cellulaire, la production d'immunoglobulines de type A¹⁷ et d'interférons.¹⁸ Dans les grands effectifs de volailles, ils peuvent être administrés par l'eau de boisson ou par nébulisation.

Cependant, ils peuvent, en théorie, recouvrer toute ou partie de leur virulence (en particulier sur des animaux immunodéprimés), ou être contaminés par d'autres virus vivants

¹⁷ Les immunoglobulines A (IgA) sont un isotype d'anticorps majoritairement produit par le système immunitaire des muqueuses. Le lait maternel contient également des IgA, qui sont ainsi transmises passivement au nouveau-né par l'allaitement. (D'après [Woof and Kerr 2004])

¹⁸ http://veto.merial.com/vet/vets/vaccin_chiot.asp#vacc2

pathogènes. Ces vaccins atténués nécessitent des précautions particulières pour leur conservation [Cook-Moreau *et al.* 2016].

c) Vaccins recombinés

Cette dernière voie, la plus récente, est obtenue par génie génétique. Les gènes d'un agent pathogène codant pour des protéines antigéniques protectrices sont insérés dans le génome d'un agent non-pathogène. L'administration de ce vaccin chez l'animal permet, ainsi, la synthèse des antigènes induisant une réponse immune sans que la maladie puisse s'y développer. C'est ce dernier type de vaccin que nous allons traiter dans le paragraphe suivant [Souza *et al.* 2005].

Ces vaccins présentent les avantages des vaccins atténués avec l'innocuité des vaccins inactivés et ils n'ont pas besoin d'adjuvant.

2. Vaxxitek® : notre vaccin recombiné

Les virus se caractérisent par leur capacité à court-circuiter la synthèse protéique de la cellule-hôte infectée, au profit de *leurs* protéines. C'est ce mécanisme qui est exploité pour la création des vaccins recombinés¹⁹, en faisant synthétiser des protéines d'intérêt, et non plus les protéines natives des virus. Par des outils de génie génétique, des portions d'ADN vont être insérées dans le génome d'un virus (utilisé comme *vecteur*). Ces portions d'ADN donneront lieu à la synthèse de protéines, qui joueront le rôle d'antigènes dans la cellule infectée, sans pour autant que la maladie ne se développe. Ainsi, l'organisme infecté pourra mettre en place une réponse immunitaire et développer des anticorps spécifiques de la maladie ainsi mimée. L'organisme pourra alors déployer ses défenses de l'exposition à une version *sauvage* du virus [Voir pour revue Lodish *et al.* 2000].

Par exemple, l'herpès virus spécifique de la Dinde (HVT, pour *Herpes virus Turkey*) est classiquement choisi pour la création de vaccins recombinés chez le poulet²⁰, chez lequel il est apathogène [Cauchy & Coudert 1986]. Seules les protéines que l'on souhaite induire dans l'organisme infecté seront produites.

Le HVT présente d'autres caractéristiques faisant de lui un candidat de choix dans le développement de vaccins chez le poulet. L'ADN de l'HVT comporte plusieurs sites

¹⁹ Les plasmides sont également utilisés dans le même but.

²⁰ Le HVT est aussi utilisé dans les vaccins contre la maladie de Marek, ou encore, celle de *Newcastle*.

d'insertion possibles. De plus, génétiquement stable, le HVT persiste longtemps dans les lymphocytes après infection et peut être facilement mis en culture *in vitro*. Ce virus est peu sensible aux anticorps maternels et peut donc être utilisé pour une vaccination *in ovo* ou chez très jeunes poulets d'un jour par exemple.

Le virus recombiné utilisé pour ces travaux, le vHVT013, exprime la boucle VP2 (voir partie II, § **Considérations moléculaires**) de l'IBDV, permettant l'expression de cet antigène protecteur²¹. Cela va produire une immunité *active* et une réponse sérologique (anticorps détectés) contre l'IBD. Le vaccin n'est pas sensible aux anticorps dérivés de la mère et peut ainsi être administré aux poussins d'un jour et *in ovo* sans présenter de problème de tolérance ni d'effet immunosuppresseur. Cette protection débute 14 jours après la vaccination et persiste jusqu'à la 9^{ème} semaine. Le vaccin est également efficace contre la maladie de Marek (immunité conférée par le vecteur HVT lui-même). La protection est présente dès 4 jours après la vaccination. Une seule vaccination permet de protéger les animaux pendant la période de risque. Le vaccin Vaxxitek HVT+IBD (correspondant au virus HVT dans lequel on a inséré le gène de la boucle VP2 de l'IBDV) est disponible en Europe depuis 2002 et est largement utilisé dans le monde entier.

Dans ces travaux, nous avons voulu tester l'efficacité d'une composition bi-vaccinale incluant le virus recombiné vHVT013 contre l'IBD lorsqu'il est associé à un autre vaccin. C'est ce que nous allons voir ci-dessous.

Pour des raisons de confidentialité, le vaccin associé au virus recombiné vHVT013 ne sera pas décrit.

3. **Tester l'efficacité d'une composition bi-vaccinale**

L'objectif de ces études a été double : d'une part, le raffinement d'un modèle d'épreuve, et, d'autre part, tester la mise en place d'une immunité précoce chez le poulet de chair, avec le modèle d'épreuve mis au point précédemment.

Dans un premier temps, la première étude a consisté en la production d'un stock de souche d'épreuve hypervirulente de l'IBD (vvIBDV) sur le poulet (exempt d'organismes pathogènes spécifiques, ou EOPS).

La deuxième étude a, quant à elle, pour objectif la mise au point du modèle d'épreuve de la Bursite Infectieuse (souche hypervirulente) chez le poulet Label, utilisant le virus produit précédemment.

Enfin, la troisième étude a porté sur l'évaluation de l'efficacité d'une association du vHVT013 avec à un autre vaccin vivant. Cette efficacité a été testée vis-à-vis de l'IBD (souche

²¹ Il induit également l'expression d'un antigène spécifique de la maladie de Marek.

hypervirulente), chez le poulet Label, après administration sous-cutanée de cette association vaccinale.

La vaccination est importante pour contrôler la maladie de Marek et de l'IBD, toujours omniprésentes, et qui peuvent causer des pertes économiques importantes dans les élevages de poules et de poulets. La quasi-totalité des volailles à durée de vie longue dans le monde est ainsi vaccinée contre la maladie de Marek, et tous les poulets de chair et les volailles à durée de vie plus longue sont vaccinés contre l'IBD.

La stratégie de Merial est double. Associer au vHVT013 (ce qui équivaut au Vaxxitek HVT+IBD), un autre vaccin au sein d'une même ampoule et améliorer ainsi le vaccin vaxxitek. Le but est d'avoir une double-protection contre la maladie de Marek et contre la Bursite Infectieuse et cela en une seule injection. Ainsi, Merial veut créer un nouveau vaccin reprenant les avantages du Vaxxitek HVT+IBD et en ajoutant une nouvelle protection grâce à l'association d'un autre vaccin.

V. Partie Expérimentale : Études pré-cliniques réalisées au sein de Merial

Dans cette partie, nous allons vous présenter les études cliniques qui se sont toutes déroulées au sein du CRSV, et dont les analyses ont été réalisées au Laboratoire d'Analyse Clinique de Merial-Gerland et ainsi que dans un laboratoire d'histopathologie *Idexx*. Nous allons tout d'abord nous intéresser à la production d'un stock de souche d'épreuve. Puis nous allons expliquer le raffinement de notre modèle d'épreuve avant de tester l'efficacité de notre vaccin bivalent vis-à-vis de l'IBD.

A. Production d'un stock de souche d'épreuve

1. Introduction

Actuellement, il est impossible de connaître la quantité d'IBDV circulant sur le terrain et encore plus ce qu'est une dose infectieuse rendant un animal malade. Néanmoins, nous pouvons à minima connaître les différentes souches circulantes dans les élevages et pays. La souche hypervirulente utilisée chez Merial, souche que nous nommerons « souche historique », n'est pas la plus représentative des souches circulantes sur le terrain. Nous savons par expérience qu'elle est plus virulente que les souches circulantes et que utilisée à une trop forte concentration lors des tests d'efficacité, la charge virale pourrait être beaucoup trop forte pour permettre une mise en place de l'immunité optimale avec un vaccin.

D'autre part, la réglementation stipule que les épreuves virulentes pour l'établissement de vaccins doivent être effectuées avec des souches virales représentatives des souches contemporaines. Pour satisfaire ces exigences, l'ANSES nous a fourni une souche plus récente et plus représentative de la situation épidémiologique actuelle, que la souche utilisée historiquement chez Merial.

Ainsi, l'objectif de cette première étude a été de produire un stock de souche d'épreuve de la souche, que nous nommerons "NP", pour Nouvellement Produite, fournie par l'ANSES, à partir de poulets EOPS de trois semaines d'âge, après inoculation par instillation oculaire de la souche.

2. Matériel et méthode

a) Animaux

Pour la production du stock de souche d'épreuve, des poulets exempts de microorganismes pathogènes spécifiques (EOPS) ont été utilisés. Ces poulets, de type Leghorn, ne possèdent pas d'anticorps maternels (ce qui aurait pu interférer avec la réplication virale) ce qui assure d'une sensibilité spécifique à l'IBDV. De plus, la souche d'épreuve obtenue ne pourra pas être contaminée par un quelconque pathogène, ce qui assurera une production optimale et de qualité. Quinze animaux, mâles et femelles, de 3 semaines d'âge ont été utilisés. Ces animaux nous ont été fournis âgés de 20 jours par un éleveur d'animaux EOPS.

b) Souche NP

La souche d'épreuve hypervirulente d'IBD NP, fournie par l'ANSES, titre 5.8 log₁₀ DIO₅₀/mL. (DIO : Dose infectieuse sur Oeuf). Elle est sans risque pour l'homme. Cependant, c'est une souche hypervirulente pour le poulet classée Ea1 pour l'environnement (norme AFNOR FD CR 12894), et est diffusible avec un risque de contamination croisée. Ainsi, l'étude a été réalisée dans un bâtiment confiné A3 où les animaux ont été hébergés dans des isolateurs, afin de limiter le risque de contaminations croisées pour les autres études réalisées au sein de ce même bâtiment et empêcher toute diffusion vers l'extérieur.

c) Autres réactifs

Nous avons eu besoin pour cette étude d'eau physiologique tamponnée pH= 7.1 pour diluer la souche d'épreuve.

Nous avons également utilisé du PBS²² supplémenté en antibiotiques : 10% Gentamycine 1% + 10% Pénicilline dihydrostreptomycine + 1,3% Monosulfate de Kanamycine, d'alcool à 70° et du stabilisateur 30 pour les opérations de prélèvement des bourses de Fabricius que nous détaillerons plus bas.

d) Hébergement

À leur réception les animaux ont été placés dans deux isolateurs du bâtiment aviaire dédié pour cette étude. Ce bâtiment est un bâtiment confiné A3 dont l'objectif est de protéger l'environnement et protéger les animaux grâce à la dépression des locaux et à la filtration de l'air entrant et de l'air extrait au moyen de filtres HEPA (*High Efficiency Particules*

²² Le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais *phosphate buffered saline*) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et du chlorure de potassium.

Arresting). Les poulets EOPS ont eu une période d'acclimatation²³ de 6 jours permettant de stabiliser leur état physiologique et de réduire leur niveau de stress.

e) Définition et constitution du groupe

À J0, les poulets EOPS ont été individuellement identifiés par bague alaire chiffrée et ont été hébergés dans deux isolateurs. Un isolateur contenait huit poulets et le second, sept. Ils ont constitué le groupe G1. Après inclusion dans ce groupe, tous les animaux ont été éprouvés par l'IBDV.

Groupe	Nombre de poulets EOPS à J0	Epreuve de l'IBD
G1	15	J0

Tableau 2 : Définition des groupes

f) Épreuve

À J0, la souche vvIBDV NP, stockée dans des tubes de 0,5 mL, a été décongelée, puis reprise dans 0,6 mL d'eau physiologique, pour obtenir une suspension titrant approximativement $5.5 \log_{10} \text{DIO}_{50} \text{ mL}$ soit $4.2 \log_{10} \text{DIO}_{50}$ sous 0,05 mL. La préparation est maintenue dans de la glace jusqu'à la fin des administrations.

Chaque poulet de G1 a été éprouvé par instillation oculaire (dans un seul œil) de 0.05 mL de la suspension d'épreuve, à l'aide d'une seringue de 1 mL dépourvue d'aiguille.

g) Suivi clinique des animaux après épreuve

Tous les animaux ont été observés quotidiennement, pendant 3 jours suivant l'épreuve, de J1 à J3, pour soins éventuels. Un relevé de la mortalité et des signes cliniques critiques (apathie, prostration, plumes ébouriffées ou encore trouble locomoteur) ont été réalisés quotidiennement.

À J3, les animaux ont été euthanasiés par injection intra veineuse de pentobarbital sodique (Dolethal) et la bourse de Fabricius de chaque animal a été prélevée.

²³ Une période d'acclimatation donnera aux animaux nouvellement arrivés la possibilité de s'adapter à leur nouvel environnement et mode d'hébergement. Elle est nécessaire avant de les faire entrer en expérimentation. Elle a pour objectifs de stabiliser les animaux au point de vue physiologique et comportemental (une perte de poids transitoire peut être constatée après le transport des animaux), contribuer à diminuer le stress, et permettre la validation des résultats expérimentaux.

h) Prélèvement des bourses de Fabricius

Le prélèvement aseptique a été réalisé selon les opérations suivantes. Après mouillage des plumes d'un animal à l'alcool 70°, la cavité abdominale est ouverte par un premier opérateur. Le second est en charge du prélèvement de la bourse de Fabricius, à l'aide d'instruments stériles.

La bourse de Fabricius est ensuite rincée par passages en alcool à 70°, puis par deux passages successifs dans une solution de PBS supplémentée en antibiotiques (10% Gentamycine 1% + 10% Pénicilline-dihydrostreptomycine + 1,3% Kanamycine monosulfate). La bourse est transférée dans un pot à prélèvement contenant le PBS supplémenté.

Lors du prélèvement des bourses de Fabricius, leurs aspects a été relevé. Les résultats sont consignés dans le **tableau 5** ci-après.

Les pots à prélèvements ont été décontaminés en surface avant sortie de la salle d'autopsie et ont été à nouveau décontaminés avant de sortir du bâtiment pour envoi au laboratoire d'Analyses cliniques sous conditions réfrigérées pour préparation du stock de la souche d'épreuve.

i) Traitement des prélèvements, constitution et contrôle du stock de souche d'épreuve

La préparation de la souche d'épreuve à partir des bourses de Fabricius récoltées a été réalisée au laboratoire d'Analyses cliniques de niveau 3. Les Bourses de Fabricius sont égouttées et pesées. Elles ont ensuite été finement découpées au scalpel puis additionnées à 7,5 mL de PBS et 8,8 mL d'antibiotiques. La préparation est alors passée au Turax²⁴ et centrifugée pendant 10 minutes à 2 000 G. Les surnageants sont récupérés et consignés dans un même tube.

Cette étape est réalisée une seconde fois avec reprise du culot, addition de 7,5 mL de PBS et 8,8 mL d'antibiotiques et centrifugation. Après récupération des surnageants du second cycle (8.2mL et 9.5 mL), ils sont ajoutés au tube de récupération. Un stabilisateur est rajouté et le volume final de souche d'épreuve est obtenu. Un contrôle de stérilité bactériologique, fongique et mycoplasmique est alors effectué sur trois tubes de 1 mL de suspensions par un laboratoire externe, puis le titrage de la souche est réalisé. Ces tubes seront ensuite stockés à -70°C au Centre de Recherche de Saint-Vulbas.

²⁴ disperseur et broyeur pour petits volumes permettant l'homogénéisation de solutions, de suspensions ou encore d'émulsions d'émulsions

j) Résumé des différentes étapes de l'étude

Jour	G0
J0	C + SC
J1	SC
J2	SC
J3	SC + E + BF + A

SC : suivi clinique

C : épreuve

A : autopsie

E: euthanasie

BF: récolte bourse de Fabricius

Tableau 3 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 1

3. Résultats

a) Signes cliniques

De J1 à J2, les animaux ne présentaient pas de signe clinique. À J3, treize poulets avaient des signes cliniques caractéristiques de l'IBD : apathie, plumes ébouriffées et/ou prostration (**tableau 4**). Bien que deux poulets sur quinze ne présentaient pas les signes, la maladie a été généralisée à l'ensemble du groupe, car les deux sans signes cliniques étaient potentiellement atteints de l'IBD. Pour cette raison, la totalité des animaux a été euthanasiée à cette date, les deux animaux sans signe clinique apparent inclus, et les bourses prélevées.

Groupe	N° animal	Observations cliniques de J1 à J3
G1	961	apathie et plumes ébouriffées
	962	apathie et plumes ébouriffées
	963*	apathie
	964	apathie et plumes ébouriffées
	965**	absence de signe clinique
	966	prostration
	967	prostration
	968	prostration
	969**	absence de signe clinique
	970	apathie et plumes ébouriffées
	971	apathie et plumes ébouriffées
	972	apathie et plumes ébouriffées
	973	apathie et plumes ébouriffées
	974	apathie et plumes ébouriffées
	975	apathie et plumes ébouriffées

Tableau 4 : *Observations cliniques après épreuve* : Treize animaux présentent une apathie/prostration trois jours après inoculation, associée dans la plupart des cas à un ébouriffement des plumes. Deux animaux (**) n'ont pas de signe clinique apparent de la Bursite Infectieuse. L'animal 963 (*) est, quant à lui, apathique, alors que sa bourse a un aspect normal.

b) Aspect des bourses à J3 post-épreuve.

Les bourses sont prélevées pour extraction de la souche d'épreuve en laboratoire. Une autopsie est également réalisée.

La plupart des bourses présentent une décoloration, y compris les deux animaux sans signe clinique apparent (voir **tableau 5**). Trois bourses prélevées avaient un aspect œdémateux, et seule une des bourses ne présentait ni œdème, ni décoloration. Enfin, au cours du prélèvement, deux animaux présentaient des pétéchies²⁵ au niveau des membres inférieurs. Ces signes hémorragiques sont une des caractéristiques de l'IBD (voir partie II). En revanche, une bourse présentait un aspect normal au niveau macroscopique, bien que l'animal présentait un signe clinique de l'IBD. Cela illustre l'importance des examens cliniques macroscopiques et histologiques à réaliser de façon conjointe. Le **tableau 5** ci-après résume ces données.

²⁵ Petites taches cutanées de couleur rouge à violacée, ne blanchissant pas sous la pression. Les pétéchies sont dues à l'infiltration de sang sous la peau (hémorragie mineure induite par la rupture d'un capillaire sanguin).

Groupe	Animal	Aspect normal	Aspects des Bourses de Fabricius et autres observations
	961	Non	Décolorée
	962	Non	Décolorée
	963*	Oui	Aucun
	964	Non	Œdémateuse
	965**	Non	Décolorée
	966	Non	Décolorée (pétéchies sur les membres)
	967	Non	Décolorée, atrophiée (et pétéchies sur les membres)
G1	968	Non	Décolorée
	969**	Non	Décolorée
	970	Non	Décolorée
	971	Non	Décolorée
	972	Non	Décolorée
	973	Non	Décolorée
	974	Non	Œdémateuse
	975	Non	Décolorée et œdémateuse

Tableau 5 : Aspect des bourses de Fabricius à J3 post-épreuve : La bourse de la plupart des animaux présente une décoloration caractéristique de la Bursite Infectieuse, y compris les animaux sans signe clinique (**). En revanche, l'animal 963 (*) ne présente pas cette décoloration. L'examen sérologique du tissu confirmera ou infirmera le développement de l'IBD. Trois animaux avec une bourse œdémateuse également. Enfin, des pétéchies sont aussi observées chez deux animaux.

c) Volume final de souche d'épreuve

À l'issue des deux étapes de centrifugation décrite plus haut, un volume total de 34,2 mL de surnageant est récupéré. Un volume de 68,4 mL de stabilisateur 30 est ajouté pour obtenir la solution de souche d'épreuve finale. Ce volume final a été réparti dans des tubes, à raison de 1mL par tube. Quatre-vingt-dix-sept tubes de souche d'épreuve ont été obtenus.

Un contrôle de stérilité bactériologique, fongique et mycoplasmique a alors été effectué sur trois tubes de 1 mL de suspensions par le laboratoire *Clean Cells*. Les résultats des tests sont représentés dans le tableau ci-après :

Contrôles	Résultats
Test de stérilité	stérile
Détection des mycoplasmes	Pas de mycoplasmes détectés

Un titrage de trois tubes de 1 mL de suspensions a été réalisé sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés, et effectué par le laboratoire d'Analyses Cliniques. La lecture ci-dessous a été effectuée 7 jours plus tard.

Tube	Titre
1	7,12
2	6,76
3	5,94
moyenne	6,61
Ecart type	0,60

Ce stock, stérile a un titre en IBDV de 6,61 log₁₀ DIO₅₀/mL.

4. **Conclusion**

Les différentes observations cliniques révèlent que les observations macroscopiques ne sont pas toujours corrélées au niveau anatomo-histologique, illustrant la difficulté de diagnostic de l'IBD.

À l'issue des examens et de la confirmation en laboratoire de la présence de l'IBDV dans les bourses prélevées, puis de son isolement, un stock de quatre-vingt-onze tubes (de 1mL) de souche d'épreuve d'IBDV a été produit.

B. Mise au point du modèle d'épreuve

1. **Introduction**

L'objectif de cette seconde étude est de mettre au point un modèle d'épreuve vis-à-vis de la Bursite Infectieuse (souche hypervirulente) chez le poulet de chair conventionnel (Label) à 28 jours d'âge. À cette fin, différentes doses du stock de souche d'épreuve "historique" de Merial et du nouveau stock de souche d'épreuve produit à partir de la souche de l'ANSES seront administrées par instillation oculaire chez le poulet à 28 jours d'âge. Le but de cette étude est de voir si l'on peut baisser la dose d'épreuve utilisée jusque-là avec la souche « historique » et s'il est possible de remplacer la souche historique par la souche « NP ».

2. **Matériel et méthode**

a) **Animaux**

Afin de mettre au point le modèle d'épreuve, nous avons utilisé des poulets de statut conventionnel pour mimer les conditions terrains. Ces animaux sont des poulets de chair de type Label. Ce type de poulet a été préféré car ils possèdent plus d'anticorps maternels. De ce fait, il est préférable de raffiner le modèle d'épreuve sur la catégorie de poulets potentiellement plus résistante face à la souche d'épreuve afin d'obtenir un modèle

d'épreuve robuste et optimal dans toutes les configurations. Un plus grand nombre d'animaux a été utilisé, 84 poulets, mâles et femelles, et de 28 jours d'âge.

Ayant également besoin de poussins pour la partie sérologie (voir § **Sérologie**), un total de 99 poussins d'un jour d'âge ont été utilisés (J-28) : 15 pour les analyses sérologiques (J-28), et les 84 restants pour le raffinement du modèle d'épreuve (J-4).

b) Les souches

Les deux souches utilisées dans cette étude sont diffusibles dans l'environnement avec un risque de contamination croisée. Ainsi l'étude a été réalisée dans un bâtiment confiné où les animaux sont hébergés dans des isolateurs, afin de limiter le risque de contamination croisée pour les autres études réalisées au sein de ce même bâtiment et empêche toute diffusion vers l'extérieur.

(1) Souche historique

Telle que décrite pour l'étude 1, nous avons utilisé la souche d'épreuve virulente d'IBD, nommée "souche historique", titre 7,4 log₁₀ DIO₅₀/mL. Elle est sans risque pour l'homme, mais virulente classée Ea1 pour l'environnement (norme AFNOR FD CR 12894).

(2) Souche nouvellement produite (NP)

La souche d'épreuve hypervirulente de l'IBD NP, fournie par l'ANSES, titre 6,61 log₁₀ DIO₅₀/mL. Elle est issue de l'étude 1.

c) Autres réactifs

Nous avons eu besoin pour cette étude d'eau physiologique tamponnée pH=7.1 pour les différentes dilutions des suspensions d'épreuve.

d) Hébergement

L'étude commençant à J-4 (J0 étant le jour de l'épreuve à 28jours d'âge), nous nous sommes donc intéressé aux animaux à 24 jours d'âge. Les 84 animaux ont été placés dans 14 isolateurs d'un *box* du bâtiment aviaire dédié pour cette étude. Nos 84 poulets Label ont eu une période d'acclimatation de quatre jours permettant de stabiliser leur état physiologique et de réduire leur niveau de stress.

e) Définition et constitution des groupes

À J-4, 84 poulets de chair Label en bonne santé ont été répartis de manière aléatoire en 7 groupes de G1 à G7, soit douze animaux par groupe. Ils ont ensuite été individuellement identifiés par bague alaire numérotée puis hébergés dans les isolateurs du box, à raison de six animaux par isolateur (deux isolateurs par groupe). La constitution des groupes est définie dans le **tableau 6** ci-dessous.

Groupe	Nombre de poulets à J-4	Souche	Epreuve vvIBDV à J0
			Dose/poulet (log ₁₀ DIO ₅₀ /0,05mL)
G1	12	-	-
G2	12	Historique	4,3
G3	12		3,3
G4	12		2,3
G5	12	NP	4,3
G6	12		3,3
G7	12		2,3

Tableau 6 : Définition des groupes et doses injectées

f) Sérologie

A réception des poussins d'un jour d'âge (à J-28), un prélèvement de sang a été réalisé sur quinze d'entre eux en intra veineuse afin de mesurer leur taux d'anticorps maternels anti-IBDV.

À J0, un prélèvement de sang (1,5 mL maximum) a été réalisé, avant épreuve, sur cinq animaux des groupes G1 à G7. Ces animaux ont été choisis aléatoirement entre les deux isolateurs de chaque groupe (soit deux et trois animaux, respectivement). Ce prélèvement a été réalisé par ponction au niveau de la veine alaire, puis transféré sur tube sec. Les prélèvements ont été envoyés sous conditions réfrigérées au Laboratoire d'Analyses Cliniques pour les analyses sérologiques.

g) Épreuve

À J0 :

- La souche vvIBDV historique a été décongelée, puis reprise en eau physiologique, pour l'obtention des suspensions titrant :
 - **G2 : 4,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 5,6 log₁₀ DIO₅₀/mL)
 - **G3 : 3,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 4,6 log₁₀ DIO₅₀/mL)

- **G4 : 2,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 3,6 log₁₀ DIO₅₀/mL).
- Deux cryotubes de la souche vvIBDV NP ont été décongelés et réunies dans un même tube. La souche a ensuite été reprise en eau physiologique, pour obtention des suspensions titrant :
 - **G5 : 4,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 5,6 log₁₀ DIO₅₀/mL).
 - **G6 : 3,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 4,6 log₁₀ DIO₅₀/mL).
 - **G7 : 2,3 log₁₀ DIO₅₀ sous 0,05 mL** (soit 3,6 log₁₀ DIO₅₀/mL).

Ces préparations ont été réalisées au laboratoire du bâtiment aviaire extemporanément à leur administration et ont été maintenues dans de la glace jusqu'à la fin des administrations.

Chaque poulet des groupes G2 à G7 a été éprouvé conformément au **tableau 6**, à raison de 0,05 mL par instillation oculaire (dans l'œil droit), à l'aide d'une seringue de 1 mL dépourvue d'aiguille. Le groupe G1 étant le groupe témoins, les animaux de G1 n'ont pas été éprouvés.

h) Suivi clinique des animaux

(1) Suivi clinique avant épreuve

Les animaux ont été observés quotidiennement de J-3 à J0 dans le cadre des soins éventuels et de l'entretien quotidien. Aucun poulet n'a présenté de signes cliniques.

(2) Suivi clinique après épreuve

Un suivi quotidien pendant 10 jours a été réalisé pour tous les animaux suivant l'épreuve (de J1 à J10). Ce suivi a compris les soins éventuels et entretien des animaux, ainsi qu'un relevé de mortalité et de signes cliniques (apathie, prostration, plumes ébouriffées ou trouble locomoteur). La prostration est le point limite ici. Tout animal prostré, sera euthanasié immédiatement pour raisons éthiques par injection de pentobarbital sodique (Dolethal) par voie intra veineuse.

i) Devenir des animaux et autopsie finale

À J10 (soit à 10 jours post épreuve), après le dernier examen clinique, tous les poulets survivants de chaque groupe ont été euthanasiés par injection de pentobarbital sodique (Dolethal) par voie intra veineuse.

Suite à l'euthanasie à J10, chaque animal a été pesé puis autopsié. Pour chaque animal, la bourse de Fabricius a été prélevée, pesée, puis transférée dans une solution de formol prête-à-l'emploi.

Cette autopsie a permis également l'observation macroscopique des bourses de Fabricius et la recherche d'hémorragies sur les muscles du bréchet et des cuisses (signes caractéristiques d'atteinte par l'IBDV)

j) Histologie

Les prélèvements des bourses de Fabricius conservées dans du formol ont été envoyés à température ambiante dans un laboratoire extérieur pour analyses.

L'examen histologique des bourses de Fabricius vise à affecter à chaque bourse un score lésionnel selon la grille donnée dans le **tableau 7**.

Score	Observation histologique/ lésion
0	absence de lésions, bourse normale
1	1% à 25% des follicules présentent une déplétion lymphocytaire (avec moins de 50% de déplétion au niveau des follicules affectés). Un afflux de cellules hétérophiles est observé au niveau des lésions.
2	26% à 50% des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale (avec plus de 75 % de déplétion au niveau des follicules affectés). Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles peut être observé.
3	51% à 75% des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles est observé.
4	76% à 100% des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. Une hyperplasie et des structures kystiques sont observées. Les follicules affectés présentent des lésions de nécrose et un afflux important de cellules hétérophiles est observé.
5	100% des follicules présentent une déplétion lymphocytaire presque totale. La structure folliculaire est totalement détruite. L'épithélium est épaissi et plissé. Le tissu de la bourse présente une dégénérescence fibreuse.

Tableau 7 : Grille de notation des lésions histologiques de la bourse de Fabricius.

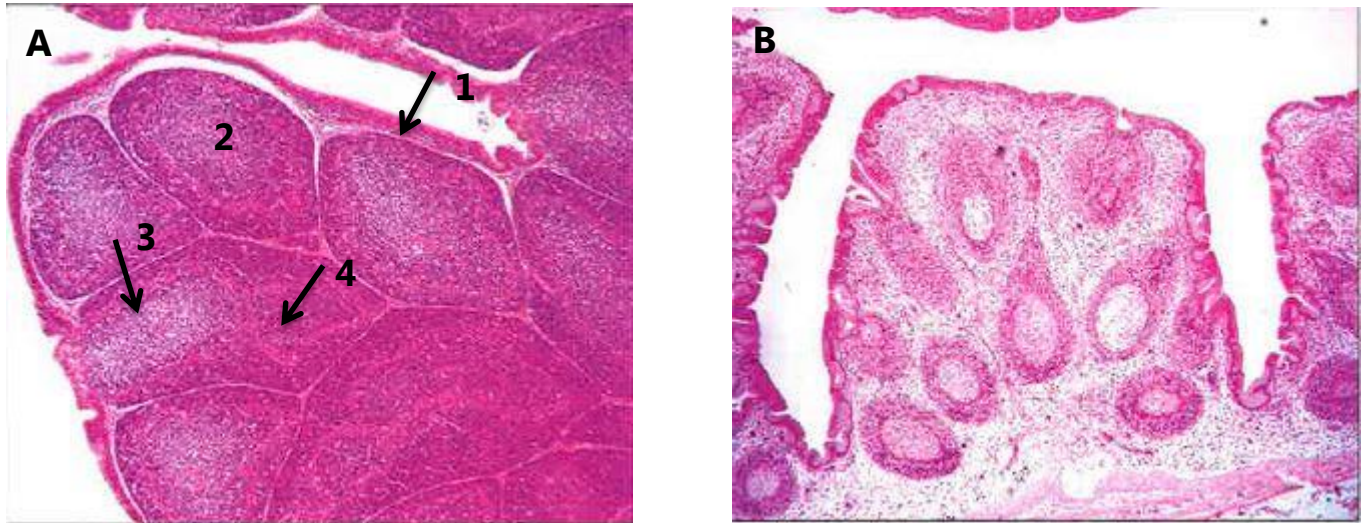


Figure 6 : Coupes histologiques d'une Bourse de Fabricius saine à gauche et infectée par IBDV à droites. **A** : (1) : épithélium de surface, de type cylindrique simple. (2) : Les cellules lymphoïdes s'organisent en un grand nombre de follicules lympho-épithéliaux, séparés par de très fines travées conjonctives. Dans chaque follicule, nous pouvons distinguer en (3) une partie médullaire assez claire et en (4) une capsule périphérique qui l'entoure. Les follicules bursiques sont uniformément peuplés de cellules lymphoïdes, majoritairement des lymphocytes. **B** : Les follicules bursiques sont largement dépeuplés en lymphocytes (pynose lymphocytaire massive) et sont parfois kystiques ou atrophiés. (D'après Guérin JL, Balloy D, Villate D, *Maladie des volailles 3e Edition, France agricole (2011)*)

k) Précautions liées au suivi de l'épreuve de la Bursite Infectieuse

Les pots des prélèvements en formol ont été décontaminés en surface avant de sortir de la salle d'autopsie pour ensuite être stockés dans l'armoire à produit chimique du bâtiment aviaire. Ils ont à nouveau été décontaminés avant de sortir du bâtiment pour envoi.

I) Résumé des différentes étapes de l'étude

Jour	G1 à G7
J-4	SC
J-3	SC
J-2	SC
J-1	SC
J0	S + C + SC
J1	SC
J2	SC
J3	SC
J4	SC
J5	SC
J6	SC
J7	SC
J8	SC
J9	SC
J10	SC + E + A + BF

S : sérologie

C : épreuve

SC : suivi clinique

E : euthanasie

A : autopsie

BF : récolte bourse de Fabricius

Tableau 8 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 2

3. Résultats

a) Suivi clinique

Un suivi clinique journalier des sept groupes de poulets de J1 à J10 a été réalisé :

À J3, un poulet du groupe G2 a présenté une apathie, il a alors été euthanasié pour raison éthique. À J5, un poulet du groupe G3 a été trouvé mort. À J5, un poulet du groupe G4 a présenté une apathie qui s'est atténuée les jours suivants. Un autre poulet du même groupe a été euthanasié pour raison éthique.

Les quatre animaux morts ou euthanasiés ont été autopsiés pour recherche de signes lésionnels caractéristiques d'IBD. Aucun signe lésionnel n'a pu être mis en évidence. Lors de l'autopsie car en début d'infection, on observe plutôt une hypertrophie de la Bourse de Fabricius. Il en a été déduit qu'ils sont morts ou qu'ils ont présenté des signes cliniques dû à l'infection par IBDV, étant en post-épreuve.

b) Aspects des bourses à J10 post épreuve

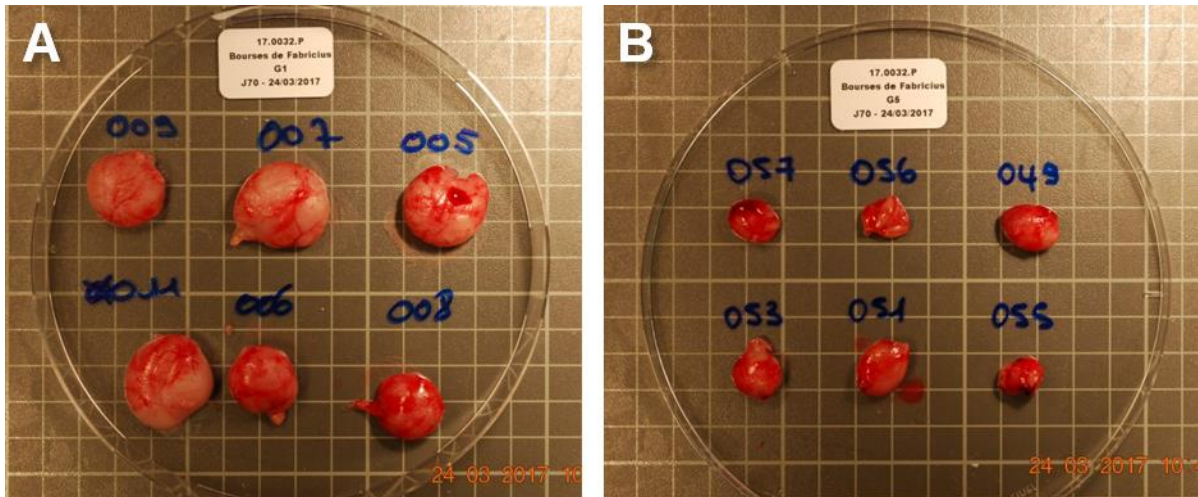


Figure 7 : Aspect macroscopique des bourses de Fabricius. © (A) : Aspect normal de six bourses de Fabricius du groupe G1 (témoin). Ce groupe n'a pas reçu de souche d'épreuve. (B) : Six bourses de Fabricius atrophiées du groupe G5. Les animaux de ce groupe ont été éprouvés par la souche nouvellement produite. *Propriété de Merial*

c) Analyses sérologiques

Un premier prélèvement de sang sur quinze poussins âgés d'un jour (J-28) a été réalisé pour mesurer le taux d'anticorps maternels. Puis, il y a eu un deuxième prélèvement de sang sur cinq poulets de chaque groupe éprouvé à 28 jours d'âge (J0), faisant l'objet d'une recherche des anticorps anti-IBDV. Le titre en anticorps spécifiques d'IBD a été mesuré, pour chaque sérum, au sein du Laboratoire d'Analyses Cliniques, par ELISA. Ce titre en anticorps anti-IBDV (inférieur à $2,74 \log_{10}$) à J0 sur chacun des groupes s'est montré nettement inférieur au titre des anticorps anti-IBDV ($3,24 \log_{10}$) à J-28 pour chacun des groupes éprouvés. Au vue de ces résultats, on constate bien la décroissance des anticorps maternels entre J-28 et J0. Ce qui prouve que nos poulets étaient bien des poulets conventionnels munis dès leurs naissances d'anticorps maternels anti-IBDV. De plus cela nous assure que les animaux n'avaient pas été vaccinés à leur naissance sinon cela aurait faussé nos résultats pour raffiner le modèle d'épreuve.

d) Données cliniques

L'autopsie de chaque poulet est résumée dans le **tableau 9** ci-dessous.

Groupe	Lésions des BF	Lésions des corps
G1 (12 poulets)	Aucune	Aucune
G2 (11 poulets)	Atrophie	Aucune
G3 (11 poulets)	Atrophie	Aucune
G4 (11 poulets)	Atrophie	Aucune
G5 (12 poulets)	Atrophie	Aucune
G6 (12 poulets)	Atrophie	Aucune
G7 (12 poulets)	Atrophie	Aucune

Tableau 9 : Lésions des bourses de Fabricius et du corps après épreuve

Les Bourses de Fabricius de tous les animaux des groupes G2 à G7 ont présenté une atrophie. Aucune lésion n'a été observée sur les bourses de Fabricius des animaux du groupe témoin G1. Le fait de retrouver une atrophie chez les deux groupes d'animaux inoculés par l'une (G2 à G4) ou l'autre des souches (G5 à G7) montre que la dernière, nouvellement produite, conduit elle aussi à l'apparition de l'IBD.

Dans le but d'établir si les conséquences cliniques sont de même grandeur, nous avons ensuite comparé le poids des bourses entre tous les groupes. Les résultats de la pesée de chaque poulet sont résumés dans le **tableau 10** ci-après. Nous avons pu observer que les ratios de poids BF/Corps des groupes éprouvés sont beaucoup plus faibles que le ratio du groupe témoin.

Groupe	Moyenne Poids(g)		Ratio Poids BF/Corps
	Corps	Bourse de Fabricius (BF)	
G1 (témoin)	938	2,56,	0,0027
G2	900	0,73	0,0008
G3	921	0,73	0,0008
G4	867	0,71	0,0009
G5	895	0,71	0,0008
G6	893	0,75	0,0008
G7	943	0,80	0,0008

Tableau 10 : Moyenne de la pesée des sept groupes de poulets : Comparativement, les poids corporels des animaux ne diffèrent pas drastiquement entre le groupe témoin et les autres. En revanche, le poids de la bourse de Fabricius diminue d'un facteur supérieur à 3 entre les témoins et les groupes inoculés par l'une des deux souches. De façon intéressante, l'ordre de grandeur de la perte est sensiblement la même. Ceci est retrouvé lorsqu'est établis le rapport entre la moyenne de poids de la bourse de Fabricius et poids corporel des animaux d'un même groupe, et qu'on compare ce rapport entre les différentes conditions (deux souches différentes, et doses différentes). Les analyses statistiques confirment cette égalité de rapport (voir **figure 9** ci-dessous).

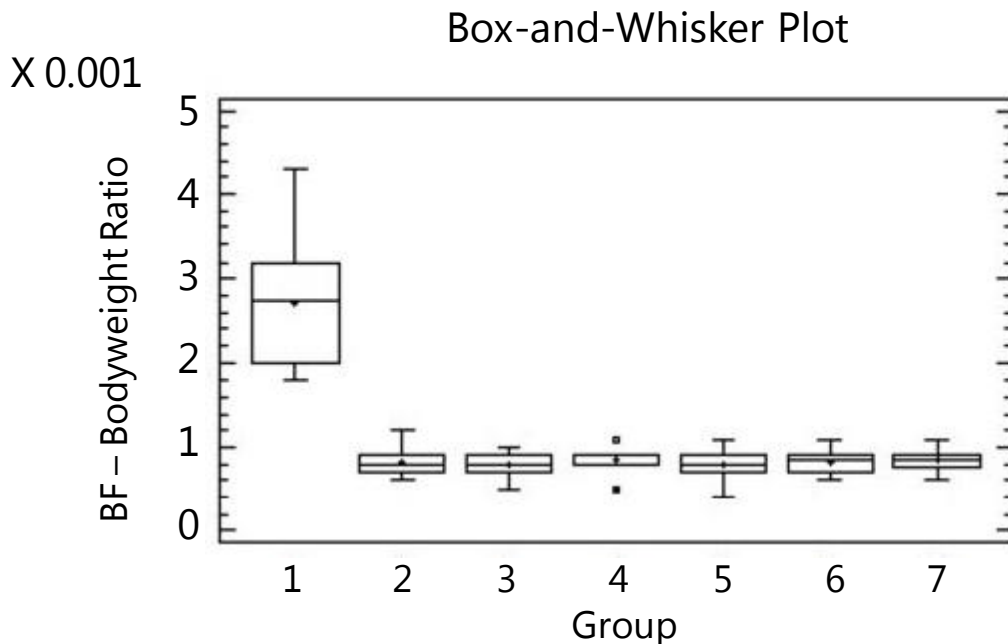


Figure 8 : Représentation graphique Box-and-Whisker de l'analyse statistique représentant le rapport poids BF/corps pour chacun des groupes© : Un rapport poids BF/corps nettement inférieurs que pour le groupe témoin traduit une atrophie de la BF pour les animaux inoculés par l'une des deux souches et à l'une des doses testées.

e) Données histologique

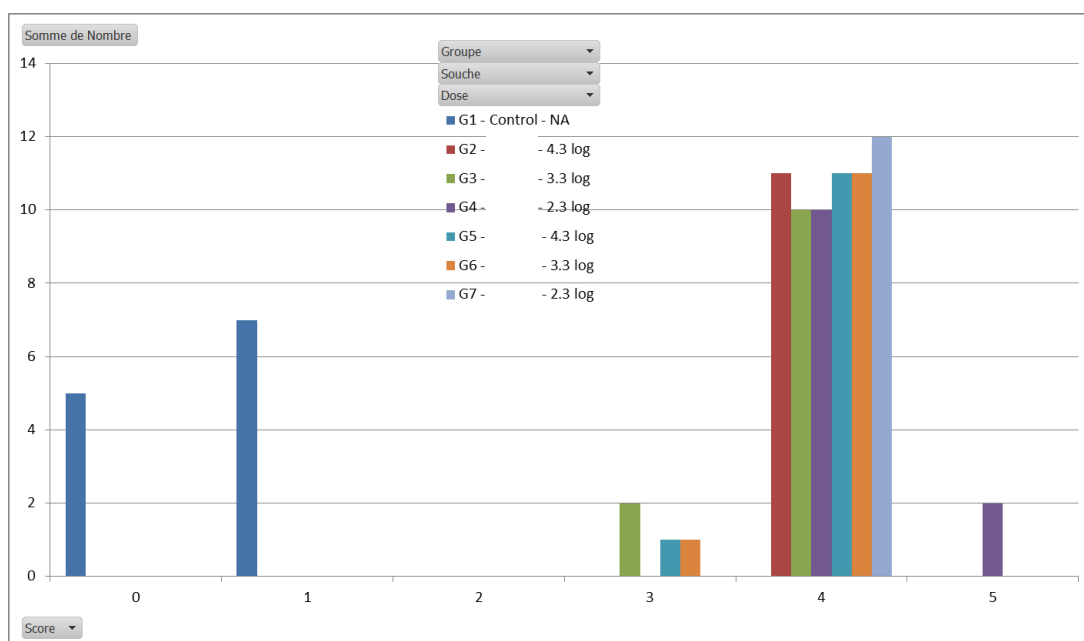


Figure 9 : Score lésionnel selon le type de souche et de la dose injectée. Analyse histologique représentant le score obtenu (voir **tableau 7**) de chacun des groupes en fonction du type de souche et de la dose injectée: on attribue un score de [0-1] pour le groupe G1. On attribue un score de [3-5] pour les six groupes éprouvés.

Selon la grille de notation des lésions histologiques de la bourse de Fabricius, les poulets présentant un score lésionnel supérieur ou égal à trois sont considérés comme n'étant pas protégé contre l'IBD. Les six groupes éprouvés avec la souche historique ou la souche NP présentent tous un score lésionnel entre trois et cinq, signe d'atteinte de l'IBD.

4. **Conclusion**

Nous pouvons tout d'abord conclure que la souche historique et la souche nouvellement produite provoquent les mêmes lésions macroscopiques et microscopiques sur les bourses de Fabricius.

De plus, l'objet de cette étude étant de raffiner le modèle d'épreuve, nous pouvons donc conclure que les trois doses $2,3 \log_{10}$, $3,3 \log_{10}$ et $4,3 \log_{10}$ respectivement des groupes G5, G6 et G7, provoquent les mêmes lésions macroscopiques sur les bourses de Fabricius. Nous avons alors décidé d'utiliser, au vue des résultats, la plus petite des doses ($2,3 \log_{10}$ par animal) pour l'étude d'efficacité du vaccin.

C. **Évaluation de l'efficacité du vaccin**

1. **Introduction**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité immédiate de l'association de vHVT013 et d'un autre vaccin, vis-à-vis d'une épreuve hypervirulente de l'IBD (vvIBD), chez le poulet conventionnel, après administration sous cutanée. À cette fin, après administration des deux vaccins à des poussins de un jour, une épreuve sera réalisée à 28 jours d'âge. Un groupe témoin non vacciné sera également inclus dans l'étude. La protection obtenue dans chaque groupe sera évaluée par un suivi clinique quotidien, une autopsie réalisée à dix jours post-épreuve et une analyse histologique des bourses de Fabricius.

2. **Matériel et méthode**

a) **Animaux**

Afin d'évaluer l'efficacité de l'association de vHVT013 et d'un autre vaccin vis-à-vis de notre souche d'épreuve d'IBD, nous avons utilisé des poulets au statut conventionnel pour mimer les conditions du terrain. Ces animaux sont des poulets de chair type Label. Ce type de poulet a été préféré des autres catégories de poulets car les poulets Label possèdent plus d'anticorps maternels comme vu précédemment pour l'étude 2. Nous avons utilisé 70 poulets, mâles et femelles de 0 jour d'âge à J0.

b) Élément d'essai et véhicule

L'élément d'essai dans cette étude est le vaccin bivalent. Pour des raisons de confidentialité, seul le virus recombiné vHVT013 est présenté ci-dessous.

(1) vHVT013

Le titre est de $7,07 \log_{10}$ PFU par ampoule (moyenne de deux titrages). C'est un virus recombiné vHVT013 composé du vecteur HVT (herpes virus de la dinde) exprimant la glycoprotéine VP2 d'IBDV.

La souche vHVT013 a obtenu une AMM en France et ne présente pas de risque pour l'environnement. C'est un vecteur de Classe 1 avec le numéro d'agrément No. 6245 pour le CRSV. Il existe un risque de diffusibilité du poulet à la dinde et de la dinde à la dinde. La diffusibilité de poulet à poulet n'a jamais été observée au cours des études réalisées. Il existe donc un risque de contamination croisée faible. Ces virus vaccinaux sont sans risque pour l'homme.

Le véhicule utilisé pour préparer le vaccin est le diluant stérile pour vaccins Marek appelé "diluant Marek".

c) Réactifs

La souche d'épreuve hypervirulente d'IBD NP titre $6,61 \log_{10}$ DIO₅₀/mL. Elle est sans risque pour l'homme (voir § **Souche NP** de l'étude 1).

Nous avons eu besoin pour cette étude d'eau physiologique tamponnée pH=7.1 pour la préparation de la suspension d'épreuve.

d) Hébergement

À leur réception les animaux ont été placés dans un *box*, du bâtiment aviaire, équipé de cages batterie.

e) Constitution des groupes et hébergement

À J0, 60 animaux en bonne santé seront répartis par ordre d'attrapage, alternativement entre les groupes G1 et G2, définis dans le tableau I : un animal dans le groupe G1 et un animal dans le groupe G2 jusqu'à atteindre 30 animaux dans chacun des deux groupes. Ils seront individuellement identifiés par bague alaire numérotée. Les animaux seront hébergés dans des unités d'hébergement différentes. Le nombre de cages sera adapté en cours

d'étude pour faire évoluer la surface d'hébergement en fonction de la croissance des animaux, à tracer dans le suivi clinique journalier. Les dix animaux restant constitueront le groupe G0 qui sera un groupe témoin sérologique.

À J7, 5 animaux de chaque groupe G1 et G2 seront choisis par un attrapage aléatoire et euthanasiés pour prélèvement de rate (voir § **Prélèvements de rate** ci-après).

À J28, une réduction d'effectif sera réalisée par attrapage aléatoire pour ne conserver que 20 animaux par groupe. Si des animaux présentent des signes cliniques non reliés à la vaccination (défaut d'aplomb, picage, etc...), ils pourront être retirés de l'effectif en priorité.

Groupe	Nombre de poulets à J0	Dose de vaccin inoculée à J0 (log ₁₀ PFU sous 0.2 mL)		Epreuve à J28 (vvIBD)
		vHVT013	Autre vaccin	
G0*	10	-	-	-
G1**	30	-	-	Oui, n ≤ 20
G2	30	3.6	<i>Confidentiel</i>	Oui, n ≤ 20

Tableau 11 : Définition des groupes : Le groupe témoin G0* constitue le groupe des témoins sérologiques. Ils ne recevront aucune injection ni d'épreuve. Les animaux du groupe G1** sont les témoins non-vaccinés. Ils seront éprouvés à J28 comme les animaux vaccinés et éprouvés du groupe G2.

f) Préparation de la suspension vaccinale et vaccination

À J0, une ampoule de vaccin bivalent a été diluée en diluant Marek pour obtenir une suspension titrant 3,6 log₁₀ PFU de vHVT013 sous 0,2 mL (4,3 log₁₀ PFU de vHVT013 par mL) et donnant un certain titre pour l'autre vaccin. La suspension a été conservée sur glace jusqu'à la fin des administrations.

Les animaux du groupe G2 ont immédiatement reçu une injection de 0,2 mL de cette suspension, à l'aide d'une seringue de 1 mL par voie sous-cutanée au niveau du cou (voie recommandée pour ce vaccin). Les animaux du groupe G1 n'ont pas été vaccinés (voir **tableau 11** ci-dessus).

g) Prélèvements

(1) Prélèvements de sang

À J0, un prélèvement de sang a été réalisé sur les animaux du groupe G0 par ponction intra veineuse, puis transféré sur tube sec. Les animaux ont immédiatement été euthanasiés par injection intraveineuse de Dolethal.

À J28, après réduction d'effectif, un prélèvement de sang a été réalisé avant épreuve sur 10 animaux de chaque groupe G1 et G2, choisis aléatoirement parmi les vingt animaux par groupe qui seront ensuite éprouvés, par ponction à la veine alaire selon le M3226, puis transféré sur tube sec.

Le sang collecté a été centrifugé pour récupérer le sérum à 3200 RPM pendant vingt minutes, pour chaque fraction :

- 1 fraction pour J0,
- 1 fraction pour J28.

Avant centrifugation, les prélèvements de sang ont été conservés à température ambiante ou à +5°C. Ils ont ensuite été envoyés sous conditions réfrigérées au Laboratoire d'Analyses Cliniques pour analyses sérologiques.

(2) Analyses sérologiques

Les sérums collectés à J0 et à J28 ont fait l'objet d'une recherche des anticorps anti-IBDV. Le titre en anticorps spécifiques d'IBD a été mesuré par ELISA (kit ELISA ProFLOK PLUS IBD) dans chaque sérum au Laboratoire d'Analyses Cliniques. Après analyses, les reliquats des sérums de J0 et J28 ont été stockés à -20°C et retournés au CRSV pour stockage avant archivage.

(3) Prélèvements de rate

Ce prélèvement de rate permet uniquement de vérifier la prise vaccinale de l'autre vaccin. Ce dernier ayant un fort tropisme dans la rate.

À J7, un prélèvement de rate a été réalisée sur cinq animaux de chaque groupe G1 et G2, choisis par un attrapage aléatoire. Les animaux ont été euthanasiés par injection de Dolethal par voie intra veineuse.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de matériel stérile, changé entre deux animaux, et en évitant tout contact avec la peau, les muscles et les plumes. Chaque prélèvement de

rate a été stocké dans un tube DNase et RNase *free* maintenu sur glace pendant la séance de prélèvement.

Les tubes ont ensuite été transférés en conditions réfrigérées dans les plus brefs délais au Laboratoire d'analyses cliniques pour mise en évidence du 2e virus vaccinal par PCR.

h) Épreuve

À J28, la souche NP a été décongelée puis reprise en eau physiologique afin d'obtenir une suspension d'épreuve titrant $2,3 \log_{10}$ DIO50 sous 0,05 mL.

Cette préparation a été réalisée au laboratoire du bâtiment aviaire extemporanément à son administration et maintenue dans de la glace jusqu'à la fin des administrations.

Chaque poulet préalablement sélectionné des groupes G1 et G2 a été éprouvé par instillation oculaire (dans un seul œil) de 0,05 mL de la suspension d'épreuve, à l'aide d'une seringue de 1 mL dépourvue d'aiguille.

i) Suivi clinique des animaux

(1) Suivi clinique avant épreuve

Les animaux ont observés quotidiennement dans le cadre des soins et de l'entretien quotidiens de J1 à J28 pour les groupes G1 et G2, y compris les week-ends. Tout signe clinique ainsi que tout animal mort pendant la phase d'élevage a été relevé.

(2) Suivi clinique après épreuve

Tous les animaux des groupes G1 et G2 ont été observés quotidiennement de J29 à J38, dans le cadre des soins et entretien. Un relevé de la mortalité ainsi qu'un relevé des signes cliniques (apathie, prostration, plumes ébouriffées ou encore trouble locomoteur) ont été réalisés quotidiennement.

j) Devenir des animaux et autopsie finale

À J28, lors de la réduction d'effectif, les animaux surnuméraires ont été euthanasiés par injection de Dolethal par voie intra veineuse.

À J38 (soit à dix jours post épreuve), après le dernier examen clinique, tous les poulets survivants de chaque groupe ont été euthanasiés par injection de Dolethal par voie intra veineuse.

Suite à l'euthanasie à J38, chaque animal des groupes G1 et G2 a été pesé puis autopsié. Cet examen a visé tout particulièrement à l'observation macroscopique des bourses de Fabricius et à la recherche d'hémorragies sur les muscles du bréchet et des cuisses. Pour chaque animal, la bourse de Fabricius a été prélevée, pesée puis transférée dans une solution de formol prêt à emploi.

k) Histologie

Les prélèvements de bourses de Fabricius ont été envoyés à température ambiante chez le laboratoire d'histopathologie *Idexx* pour analyses. L'examen histologique des bourses de Fabricius vise à affecter à chaque bourse un score lésionnel selon la grille donnée (voir **tableau 7**).

l) Précautions liées au suivi de l'épreuve de la Bursite Infectieuse

Les pots des prélèvements en formol ont été décontaminés en surface avant sortie de la salle d'autopsie pour ensuite être stockés dans l'armoire à produit chimique du bâtiment aviaire. Ils ont à nouveau été décontaminés avant sortie du bâtiment pour envoi.

m) Résumé des différentes étapes de l'étude

Jour	G0	G1 et G2	Jour	G0	G1 et G2
J0	S + E	SC + V	J20		SC
J1		SC	J21		SC
J2		SC	J22		SC
J3		SC	J23		SC
J4		SC	J24		SC
J5		SC	J25		SC
J6		SC	J26		SC
J7		SC + E + P	J27		SC
J8		SC	J28		SC + C + S
J9		SC	J29		SC
J10		SC	J30		SC
J11		SC	J31		SC
J12		SC	J32		SC
J13		SC	J33		SC
J14		SC	J34		SC
J15		SC	J35		SC
J16		SC	J36		SC
J17		SC	J37		SC
J18		SC	J38		SC + E + A + BF
J19		SC			

V: vaccination de G2 C: épreuve E: euthanasie BF : récolte BF
 SC : suivi clinique S: sérologie A: autopsie
 P: prélèvement de rates

Tableau 12 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 3

n) Analyse des résultats

Au moment de la rédaction de la thèse, les données cliniques pré-épreuve, de prise vaccinale et post-clinique n'ont pas encore été obtenues. Cependant, l'efficacité immédiate de l'association de vHVT013 et d'un autre vaccin, vis-à-vis d'une épreuve hypervirulente de l'IBD, chez le poulet conventionnel, après administration sous cutanée est attendue.

Pour juger de l'efficacité, des critères principaux et secondaires seront alors considérés.

- Critères principaux :

Pour chaque groupe éprouvé, le pourcentage de protection sera calculé en fin d'épreuve. Sont considérés protégés les animaux ne présentant aucun signe clinique notable de l'IBD

(notamment apathie/plumes ébouriffées plus de deux jours consécutifs ou prostration) et présentant un score histologique de la bourse de Fabricius inférieur à trois.

La protection obtenue dans le groupe vacciné sera jugée satisfaisante si elle est significativement supérieure à celle du groupe témoin. La comparaison sera réalisée par un test du χ^2 , si les effectifs attendus sont supérieurs à cinq. Sinon, un test de Fisher sera privilégié.

- Critères secondaires

Les observations macroscopiques faites à l'autopsie seront décrites et discutées.

On calculera pour chaque animal survivant des groupes G1 et G2 le rapport suivant : poids bourse de Fabricius (g) / poids animal (g). Les rapports obtenus dans chaque groupe seront comparés à l'aide d'un test de *Wilcoxon*.

Pour les analyses statistiques, le seuil de signification sera fixé à 5% et les tests seront bilatéraux.

V. Conclusion

Depuis l'apparition de la Bursite Infectieuse (IBD) dans la ville de Gumboro dans la fin des années 1950, aucun traitement n'a été découvert. La vaccination des animaux reste, à ce jour, le seul moyen de lutter contre l'agent pathogène responsable de la maladie, l'IBDV. L'impact économique de l'IBD est influencé par le type de souche virale, l'espèce animale et sa susceptibilité vis-à-vis de la souche en cause, et certainement par des facteurs environnementaux encore mal-connus.

Dans ce contexte, Merial, déjà fortement impliqué dans le secteur de la vaccination aviaire cherche à optimiser un de ses vaccins commercialisé : le Vaxxitek[©]. Le but de ces travaux a été de tester l'efficacité d'un vaccin bivalent vis-à-vis de l'IBD. Grâce aux études menées et à la troisième en cours de réalisation, nous espérons, ainsi, pouvoir atteindre ce but. Au-delà de cette optimisation, d'autres pistes peuvent être explorées.

Actuellement, la Recherche se concentre sur la formulation des vaccins. Ainsi, de plusieurs molécules utilisées en adjuvants des vaccins ont été montrées comme potentialisatrices des effets des vaccins dirigés contre l'IBD ^[Voir pour revue Alkie & Rautenschlein 2017]. Ces molécules sont principalement issues du système immunitaires (interleukines).

La grande mutabilité des virus à ARN, telle que l'IBDV ^[Saif 2004] peut jouer en défaveur de l'efficacité d'un vaccin. L'identification et la caractérisation de nouvelles souches émergentes fait partie intégrante du développement de nouvelle stratégie de vaccination. La possibilité de prévoir l'émergence de souches pourrait en effet s'avérer primordiale dans l'élaboration de nouveaux vaccins. D'autre part, l'étude de l'IBDV pourrait également mener à une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent la Bursite Infectieuse et l'obtention d'un vaccin dirigé contre un antigène commun à plusieurs (toutes ?) souches virales.

Enfin, une très récente étude ^[voir Yang et al. 2017] fait état d'un nouveau moyen de délivrance d'antigène. Les auteurs ont montré que des particules de bêta-glucane²⁶ pouvait être chargées d'un antigène, qui allait, ainsi, pouvoir être transporté et délivré à une cible cellulaire spécifique (dans cette étude, des cellules dendritiques), induisant une réponse immunitaire. Cette nouvelle forme de délivrance d'antigènes, actuellement obtenue et testée en laboratoire seulement n'est qu'une des nombreuses portes qu'il reste à ouvrir, et à découvrir, dans le domaine de la vaccination.

²⁶ Un polysaccharide glucosidique extrait d'une levure (voir pour revue Zeković et al. 2008)

VI. Liste des figures

Figure 1: Dr. Lasher et du Dr. Cosgrove à Gumboro.....	13
Figure 2 : Principaux organes lymphoïdes chez le Poulet.....	15
Figure 3: Organisation du virus de la Bursite Infectieuse et de son génome.....	17
Figure 4: Cycle de production d'un vaccin.....	34
Figure 5: Les différentes phases de Recherche et Développement pour la fabrication de vaccin vétérinaire.....	35
Figure 7 : Conséquences cliniques de l'IBD sur les bourses de Fabricius au niveau microscopique	55
Figure 8 : Aspect macroscopique des bourses de Fabricius.....	57
Figure 9 : Représentation graphique Box-and-Whisker de l'analyse statistique représentant le rapport poids BF/corps pour chacun des groupes.....	59
Figure 10 : Score lésionnel selon le type de souche et de la dose injectée.....	59

VII. Liste des tableaux

Tableau 1: Récapitulatif des huit vaccins vivants à disposition pour la lutte contre la bursite infectieuse	27
Tableau 2 : Définition des groupes.....	45
Tableau 3 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 1	47
Tableau 4 : Observations cliniques post-épreuve	48
Tableau 5 : Aspect des bourses de Fabricius à J3 post-épreuve	49
Tableau 6 : Définition des groupes et doses injectées.....	52
Tableau 7 : Grille de notation des lésions histologiques de la bourse de Fabricius	54
Tableau 8 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 2	56
Tableau 9 : Lésions des bourses de Fabricius et du corps après épreuve.....	58
Tableau 10 : Moyenne de la pesée des sept groupes de poulets.....	58
Tableau 11 : Définition des groupes	62
Tableau 12 : Calendrier des différentes étapes de l'étude 3	66

VIII. Bibliographie

- [Agut *et al.* 2016] : Agut H, Burrel S, Boutolleau D **Classification et modes de transmission des virus humains** (2016) *Elsevier Masson*
- [Alkie & Rautenschlein 2017]: Alkie T, Rautenschlein S **Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects** (2017) *Veterinary Medicine: research and Reports*
- [Ashraf *et al.* 2006] : Ashraf S, Abdel-Alim G, Saif YM **Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus by commercial ELISA kits** *Avian Dis.* (2006) 50(1):104-9
- [Badgett *et al.* 2002]: Badgett M, Auer A, Carmichael L, Parrish C and Bull J **Evolutionary dynamics of viral attenuation** *J Virol* (2002) 76(20): 10524–10529
- [Becht *et al.* 1988] : Becht H, Müller H, Müller HK **Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus** *J Gen Virol.* (1988) 69(3), 631-40
- [Becht & Müller 1988]: Becht H, Müller H **Infectious bursal disease λ B cell dependent immune-deficiency syndrome in chickens** *Behring Inst Mitt.* (1991) 89:217-25
- [Benton *et al.* 1967] : Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK and Lake RS **Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA)** (1967) *Avian Dis* 11:438–45
- [Brand *et al.* 1976]: Brand A, Gilmour DG, Goldstein G **Lymphocyte-differentiating hormone of bursa of Fabricius** *Science* (1976) 23:193(4250):319-21
- [Cauchy and Coudert 1986]: Cauchy L and Coudert F **La maladie de Marek** *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (1986) 5 (4), 1011-1024
- [Chettle *et al.*, 1989] : Chettle N, Stuart JC, Wyeth PJ **Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia** *Vet Rec* (1989) 125:271–272
- [Cook *et al.* 2016]: Cook J, Mehring M, Buxeraud J and Juvin S **L'essentiel sur les vaccins** *Elsevier* (2016) vol.55, Pages 16–22
- [Cosgrove 1962]: Cosgrove AS **An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis** *Avian Diseases* (1962) 6(3) 385-9
- [Coulibaly *et al.*, 2005] : Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, Delmas B, Rey FA **The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses** *Cell* (2005) 25;120(6):761-72
- [De Herdt *et al.*, 2005] : De Herdt P, Jagt E, Paul G, Van Colen S, Renard R, Destrooper C, van den Bosch G **Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers** *Avian Pathol.* (2005) 34(6):501-4

- [Delmas et al. 2012]: B Delmas, E Mundt, VN Vakharia, JL Wu **Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses** *International Committee on Taxonomy of Viruses* Publié par Elsevier Inc. (2012) p.499–507
- [Dobos et al., 1979] : Dobos P, Hill PJ, Hallett R, Keels DTC, Becht H & Teninges D **Biophysical and biochemical characterisation of five animal viruses with bisegmented double-stranded genomes** *J of Virol* (1979) 32, 593-605
- [Faragher et al., 1974] : Faragher JT, Allan WH, Wyeth PJ **Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease** *Vet Rec.* (1974) 26;95(17):385-8
- [Firth 1974]: Firth GB **Occurrence of an infectious bursal syndrome within an australian poultry flock** *Aust Vet J* (1974) 50:3 128–130
- [Gandon et al. 2001]: Gandon S, Mackinnon M, Nee S and Read A **Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence** *Nature* (2001) vol. 414, 2001, p. 751-756
- [Guérin et al. 2011]: Guérin JL, Balloy D, Villate D, **Maladie des volailles 3e Edition, France agricole** (2011)
- [Howie & Thorsen 1981]: Howie RI & Thorsen J **Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes** *Can J Comp Med* (1981) 45:315–20
- [Huang et al., 2017] : Huang Q, Gao X, Liu P, Lin H, Liu W, Liu G, Zhang J, Deng G, Zhang C, Cao H, Guo X, Hu G **The relationship between liver-kidney impairment and viral load after nephropathogenic infectious bronchitis virus infection in embryonic chickens** *Poult Sci* (2017)
- [Isaković & Janković 1964] : Isaković K & Janković BD **Role of the Thymus and the Bursa of Fabricius in Immune Reactions in Chickens** *Int Arch Allergy* (1964) 24:296–310
- [Ismail et al., 1988] : Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD **Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens** *Avian Diseases* (1988) 32:4, 757-759
- [Jackwood 2016]: Jackwood DJ **Advances in vaccine research against economically important viral disease of food animals: Infectious bursal disease virus** *Vet Microbiol* (2016) 5 pages
- [Jackwood et al., 1983]: Jackwood DJ, Saif YM **Prevalence of antibodies to infectious bursal disease virus serotypes I and II in 75 Ohio chicken flocks** *Avian Dis* (1983) 27(3):850-4
- [Jones 1986]: Jones BAH **Infectious bursal disease serology in New Zealand poultry flocks** *New Zealand Veterinary Journal* (1986) 34:3, 36-36
- [Kibenge et al. 1988]: Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG **Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus.** *J Gen Virol.* (1988) 69 (Pt 8):1757-75
- [Lasher & Davis 1997]: Lasher HN, Davis VS **History of infectious bursal disease in the USA: the first two decades** *Avian Dis* (1997) 41(1):11-9
- [Lodish et al. 2000]: Lodish H, Berk An Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J **Molecular Cell Biologt, 4th edition** (2000)

- [Lombardo *et al.*, 2000] : Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernández-Arias A, Rodriguez JF **VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis.** *Virology* (2000) 25; 277(2):345-57
- [Lucio & Hitchner 1979]: Lucio B & Hitchner SB **Infectious Bursal Disease Emulsified Vaccine: Effect upon Neutralizing-Antibody Levels in the Dam and Subsequent Protection of the Progeny** *Avian Diseases* 23;2 (1979) 466-78
- [Macreadie & Azad 1993] : Macreadie IG, Azad AA **Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein in bacteria and yeast** *Biochem Mol Biol Int.* (1993) 30(6):1169-78
- [McFeran *et al.*, 1980] : McFeran JB, McNulty MS, McKillop ER, Connor TJ, McCracken RM, Collins DS, Allan GM **Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype** *Avian Pathol* (1980) 9(3):395-404
- [McFerran & Nulty 1993]: McFerran JB & Mc Nulty MS **Virus Infections in Birds** Elsevier Science Publishers (Am) 1993 213-28
- [Morton 2007]: Morton DB **Vaccines and animal welfare** *Rev Sci Tech* (2007) 13(3):548-5
- [Müller *et al.*, 2012] : Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR **Current status of vaccines against infectious bursal disease** *Avian Pathol* (2012) 41(2):133-9
- [Muskett *et al.*, 1979]: Muskett JC, Hopkins IG, Edwards KR, Thornton DH **Comparison of Two Infectious Bursal Disease Vaccine Strains: Efficacy and Potential Hazards in Susceptible and Maternally Immune Birds** *Veterinary Rec.* (1979) 104;15 332-4
- [Nick *et al.*, 1976]: H. Nick, D. Cursiefen, H. Becht **Structural and Growth Characteristics of Infectious Bursal Disease Virus** *J. of Virol.* (1976) p 227-234
- [Nunoya *et al.*, 1992] : Nunoya T, Otaki Y, Tajima , Hiraga M, Saito T **Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chickens** *Avian Diseases* (1992) 36, 597–609
- [Okino *et al.*, 2017] : Okino CH, Mores MA, Trevisol IM, Coldebella A, Montassier HJ, Brentano L **Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles** *PLoS One* (2017) 15;12(2)
- [Parkhurst 1964]: Parkhurst RT **On-the-farm studies of Gumboro disease in broilers** *Avian Dis* (1964) 8:584-596
- [Pedersen *et al.*, 1990] : Pedersen KA, Sadasiv EC, Chang P, Yates VJ **Detection of antibody to avian viruses in human populations** *Epidemiol Infect* (1990)104(3): 519–25
- [Petrovsky 2004]: Petrovsky N and Aguilar JC **Vaccine adjuvants: current state and future trends** *Immunol Cell Biol.* (2004) Oct;82(5):488-96
- [Provost *et al.* 1972] : Provost A, Borredon C, Bocquet P **Deux maladies aviaires nouvelles au Tchad : la laryngotrachéite et la maladie de Gumboro** *Rev d'Élev et de Méd Vét des Pays Tropicaux* (1972) 25 (3) 347-55

- [Rosenberg & Cloud 1986] : Rosenberg JK & Cloud SS **Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses** Report 123rd Am Vet Med Asso (AVMA) Meeting Atlanta (GA)
- [Sapats *et al.*, 2000] : Sapats SI, Ignjatovic J **Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia** *Archives of Virology* (2000) Vol. 145:4, 773–85
- [Saif 2004]: Saif YM **Control of infectious bursal disease virus by vaccination** *Dev Biol (Basel)* (2004) 119:143-6]
- [Saif *et al.*, 2008]: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR **Diseases of Poultry** (2008) *Blackwell Publishing* 12th Ed. Chapter 7; 187-208
- [Sharma *et al.*, 2000] : Sharma JM, Kim I, Rautenschlein S, Yeh H **Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression** *Dev Comp Immunol* (2000) 24:223–235
- [Snedeker *et al.*, 1967]: Snedeker C, Wills FK and Moulthrop IM **Some studies on the infectious bursal agent** (1967) *Avian Dis* 11:519–528
- [Souza *et al.* 2005]: Souza A.P.D, Haut L, Reyes-Sandoval A and Pinto A.R. **Recombinant viruses as vaccines against viral diseases** *Braz J Med Biol Res* (2005) vol. 38(04) 509-522
- [Thornton & Pattison 1975]: Thornton DH, Pattison M **Comparison of vaccines against infectious bursal disease** *J Comp Pathol* (1975) 85(4):597-610
- [Van den Berg 2000]: Van den Berg TP **Acute infectious bursal disease in poultry: a review** *Avian Pathol* (2000); 29(3):175-94
- [Van den Berg & Meulemans 1991]: Van den Berg TP, Meulemans G **Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination** *Avian Pathol* (1991) 20:409–21
- [Van der Sluis 1999]: Van der Sluis W **World poultry diseases update** *World Poult* (1999)15: 30-32
- [Von Einem *et al.*, 2004] : Von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeyer H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E **VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase** *J Gen Virol* (2004) 85:2221-9
- [Winterfield & Hitchner 1962]: Winterfield RW, Hitchner SB **Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens** *Am J Vet Res* (1962) 23:1273-9
- [Winterfield *et al.*, 1972] : Winterfield, RW, Fadly, AM and Bickford, A **Infectivity and distribution of infectious bursal agent in chickens Persistence of the virus and lesion** *Avian Diseases* (1972) 16: 622-632
- [Winterfield 1969]: Winterfield RW **Immunity response to the infectious bursal agent** *Avian Dis* (1969) 13(3):548-5
- [Woof and Kerr 2004]: Woof JM and Kerr MA **IgA function-variations on a theme** *Immunology* (2004) 113(2):175-7

[Yang *et al.* 2017]: Yang Z, Xu M, Jia Z, Zhang Y, Wang L, Zhang H, Wang J, Song M, Zhao Y, Wu Z, Zhao L, Yin Z, Hong Z **A novel antigen delivery system induces strong humoral and CTL immune responses** *Biomaterials* (2017) April 22;134:51-63]

[Zeković *et al.* 2008]: Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljević D, Moran CA **Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation** *Crit Rev Biotechnol* (2008) 25(4):205-30)].

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2016/2017

Nom : Deveer
Prénom : Margaux

Titre de la thèse : Développement d'un vaccin contre la Bursite Infectieuse

Mots-clés : Maladie de Gumboro, Bursite infectieuse, Maladie de Marek, Vaccins vétérinaires, Vaccination, Immunité, Virus, Epreuve, Pharmacopée européenne, Etude pré-cliniques, Poulet, Efficacité.

Résumé :

La Bursite infectieuse est une maladie virulente, contagieuse et inoculable. Mondialement répandue, elle est provoquée par un birnavirus, affectant les jeunes poulets jusqu'à 6 semaines. Cette thèse a eu pour but l'amélioration du Vaxxitek[®], un vaccin dirigé contre la Bursite Infectieuse (IBD). Ces travaux ont constitué en la production d'un stock de souche d'épreuve plus représentative du terrain, au raffinement d'un modèle d'épreuve pour l'IBD, et de tester l'efficacité du nouveau vaccin sur le terrain. Cette dernière étude, toujours en cours, permettra d'améliorer la protection contre l'IBD.

Membres du jury :

Président : **Monsieur le professeur Régis Courtecuisse**, Professeur de Sciences Végétales et Fongiques, Université de Lille 2.

Assesseur(s) : **Madame Christine Demanche**, Maître de conférences de Parasitologie, Université de Lille 2.

Monsieur Sylvain Goutebroze, Vétérinaire, Directeur R&D Boehringer Ingelheim, Saint Vulbas.

Membre extérieur : **Monsieur Bruce Mesnage**, Docteur en Sciences. Boehringer Ingelheim, Saint Vulbas.