

19

Les vaccins produits par ingénierie génétique

P.P. PASTORET, B. BROCHIER, D. BOULANGER, M. DENIS, E. THIRY

*Département de Virologie-Immunologie, Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège, Sart Tilman, Liège, Belgique.*

Si l'obtention d'animaux génétiquement résistants à certaines maladies est un rêve que caressent actuellement les généticiens, l'approche traditionnelle de la protection envers les maladies infectieuses, tout particulièrement celles d'origine virale, demeure la vaccination [6].

Cependant, la difficulté de disposer de certains principes actifs dans des conditions économiquement acceptables et le risque potentiel de contamination humaine ou de l'environnement sont des facteurs limitant le développement des vaccins classiques. Dans de rares cas même, l'impossibilité de multiplier le virus ou le parasite condamne toute approche vaccinale conventionnelle. La recombinaison génétique, en permettant l'intégration de gènes étrangers dans un génome hôte et leur expression, a ouvert de nouvelles voies de production des vaccins; cette technique impose de connaître le ou les antigènes actifs portés par le virus, la bactérie ou le parasite et d'isoler le ou les gènes qui les codent (ou leur ADN complémentaire dans le cas des virus à ARN). Ces gènes sont alors insérés

dans différents systèmes vecteurs-hôtes : l'expression par un système procaryote ou eucaryote permet l'obtention d'antigènes qui, purifiés, fournissent les principes actifs de vaccins sous-unitaires. L'expression par des systèmes viraux (poxvirus, virus herpès, ...) donne naissance à des virus recombinants qui sont utilisés comme vaccins vivants ou, dans de plus rares cas (intégration de l'antigène néoformé au niveau de l'enveloppe ou de la capsid virale), comme vaccins inactivés. Des bactéries peuvent également être utilisées comme vecteur (BCG,...).

Un nombre croissant d'immunogènes est actuellement identifié et les gènes qui les codent peuvent être insérés dans des systèmes vecteurs d'expression. Les vaccins obtenus par les techniques de l'ingénierie génétique offrent en outre l'avantage de pourvoir les souches de marqueurs, permettant ultérieurement de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. D'excellents exemples nous sont fournis dans le domaine de la santé animale par la lutte contre la maladie d'Aujesky, à l'aide de virus délétés et par la vaccination antirabique du renard par voie orale, à l'aide du virus recombinant vaccine-rage.

Les déterminants antigéniques susceptibles d'induire une réponse immune protectrice peuvent parfois être synthétisés : ce sont de courts peptides qui doivent être couplés à des protéines porteuses et injectés avec des adjuvants appropriés. La technique des peptides branchés permet actuellement d'obtenir une immunisation à l'égard de peptides sans devoir recourir à une molécule porteuse. Si d'importants progrès doivent encore être réalisés dans la connaissance des déterminants antigéniques, les premiers résultats obtenus confirment cependant la fiabilité d'une vaccination fondée sur la synthèse chimique des déterminants antigéniques utilisés. Une contrainte majeure reste cependant le polymorphisme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, indispensables à une réponse immune cellulaire. C'est pourquoi, les virus vecteurs offrent encore de nombreux avantages pour la délivrance d'antigènes hétérologues appropriés.

La récente description d'un virus de la vaccine délété en de nombreux gènes (NYVAC) [11] offre à cet égard de nouvelles perspectives, tant en médecine humaine que vétérinaire. Une autre solution réside dans l'emploi de poxvirus aviaires pour la vaccination chez l'homme. Un virus recombinant du canaripox, comportant le gène codant pour la glycoprotéine de la rage et présentant un cycle de multiplication abortif chez l'homme, en est actuellement au stade des premiers essais cliniques en France avec des résultats extrêmement prometteurs.

La réalisation d'ouverture comme NYVAC n'aurait pas été possible sans la connaissance préalable de la séquence complète en nucléotides du virus de la vaccine [7]. L'analyse de cette séquence et la comparaison des séquences de lecture ouverte avec les séquences codant pour d'autres protéines et déposées dans les banques de données, a montré que le virus de la vaccine et d'autres poxvirus codaient pour des protéines intervenant dans la régulation de la réponse immune, ouvrant ainsi un nouveau chapitre de la virologie générale [10]. L'application de cette technique a également permis de démontrer que l'herpèsvirus EBV code pour une protéine analogue à l'interleukine 10 et que certaines souches cytopathogènes du virus BVD possédaient des séquences codant pour une protéine analogue à l'ubiquitine.

D'autres améliorations pourraient se situer dans la gamme des vaccins disponibles.

En effet, certaines maladies attendent toujours leur vaccin, parmi celles-ci, nombre de maladies parasitaires et, bien sûr, le SIDA.

La lutte contre les maladies parasitaires se fonde encore essentiellement sur la chimiothérapie. L'immunité anti-parasitaire est un sujet de recherches particulièrement ardu et

les connaissances fondamentales qui permettraient le choix de stratégies adéquates pour l'élaboration de vaccins font souvent défaut. Les recherches en immunité anti-parasitaire méritent cependant un soutien accru car l'utilisation de vaccins efficaces permettrait de réduire considérablement l'emploi d'anti-parasitaires. Cette réduction est hautement souhaitable, dans la mesure où certains d'entre eux ont des effets néfastes sur l'environnement. Des progrès spectaculaires sont déjà obtenus dans la lutte contre les tiques en Australie, à l'aide de vaccins à base d'antigènes cryptiques.

Enfin, une dernière innovation est attendue : la mise au point de vaccins anti-parasitaires pour bloquer le cycle de parasitoses responsables d'anthropozoonoses comme les taenioses. De premiers résultats encourageants ont été obtenus en matière de cysticercose ovine. L'utilisation de vaccins capables d'interrompre le cycle de transmission de *Taenia saginata* avant la formation de cysticerques, non seulement révolutionnerait les habitudes et les concepts en hygiène des denrées alimentaires, mais introduirait également une nouvelle dimension dans le rôle de la médecine vétérinaire en élevage bovin.

Enfin, la récente description d'une immunisation à l'aide d'ADN nu ouvre de toutes nouvelles perspectives en vaccinologie [4,5].

Exemple de développement : le recombinant vaccine-rage

Construction

Les souches atténuées du virus rabique utilisées pour la vaccination antirabique du renard par voie orale présentent certains inconvénients; en effet la souche SAD/B19, actuellement largement employée sur le terrain, est pathogène pour les micromammifères. Une amélioration a été l'obtention de mutants avirulents (mutants qui échappent à la neutralisation par des anticorps monoclonaux) par modification de l'arginine située en position 333 de la glycoprotéine. Ces mutants présentent l'inconvénient d'une potentialité de réversion. En outre les souches atténuées résistent mal lorsqu'elles sont soumises aux conditions adverses du milieu extérieur.

En vue d'améliorer à la fois la sécurité, l'efficacité et la stabilité du vaccin utilisé sur le terrain, un virus recombinant vaccine-rage a été construit [8].

La construction du virus recombinant vaccine-rage exprimant la glycoprotéine immunisante du virus de la rage (souche VVTGgRAB-26D3 187XP) n'a pas suivi une voie classique et certains problèmes particuliers ont dû être résolus. Tout d'abord, c'est à cette occasion que la technique d'isolement des virus recombinants de la vaccine a été améliorée en introduisant un double système de sélection; l'addition d'une mutation de thermosensibilité dans le virus de la vaccine a permis de sélectionner en une fois des virus qui, pour la plupart, sont les recombinants recherchés. De plus, la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc ne correspondait pas parfaitement aux autres séquences publiées, car le huitième codon de l'ADNc codait pour une leucine et non pour une proline. Or la présence d'une leucine pouvait conduire à une structure aberrante et un codon proline a été introduit dans l'ADNc par mutagenèse localisée. Il est ultérieurement apparu que seule la glycoprotéine comportant une proline en position 8 est capable de conférer une protection contre la rage. Des cellules animales infectées par le virus recombinant produisent une grande quantité de glycoprotéine rabique dont la structure est probablement identique à

celle de la protéine native, comme cela a notamment été démontré à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Dans le recombinant utilisé, l'ADNc correspondant à la glycoprotéine de la souche ERA du virus rabique a été inséré dans le gène codant pour la thymidine kinase (TK) du virus de la vaccine (souche Copenhague). Le VVTGgRAB est actuellement produit en lignée continue VERO.

Efficacité du virus recombinant

Lorsque 10^7 TCID₅₀ du VVTGgRAB sont directement administrés dans la bouche, 100% des renards (*Vulpes vulpes*) adultes sont protégés à l'égard d'une inoculation d'épreuve sévère [1]. Une dose de 10^8 est nécessaire lorsque le vaccin est contenu dans un appât. Administrée par voie orale à des renardeaux, une dose de 10^7 TCID₅₀ du VVTGgRAB induit une réponse humorale satisfaisante et permet de protéger 92% des animaux à l'égard d'une épreuve virulente. La durée de l'immunité conférée par le recombinant est au minimum de 18 mois chez l'animal adulte, ce qui correspond à la durée de vie réelle du renard.

Innocuité du virus recombinant

Avant d'utiliser le virus recombinant vaccine-rage dans la nature, il était important de s'assurer de sa parfaite innocuité pour l'espèce cible et les espèces non-cibles, ainsi que de l'absence d'excrétion et de transmission du virus. Aucun signe clinique et aucune lésion n'ont été mis en évidence chez les renards chez lesquels le virus recombinant a été administré par voie orale.

L'absence de pathogénicité a été confirmée quelle que soit la dose inoculée (de 10^2 à 10^{10} TCID₅₀) ou la voie d'administration (orale, intramusculaire, intraduodénale, sous-cutanée, intradermique (scarification), conjonctivale ou intranasale). L'absence de pathogénicité du VVTGgRAB administré par voie orale a été démontrée chez la souris de laboratoire, le lapin, le furet (*Putorius furo*), les bovins, le chat, le chien, le porc et le mouton. De plus, l'innocuité du recombinant a été démontrée chez de nombreuses espèces animales sauvages qui pourraient entrer en compétition avec le renard dans la consommation des appâts en Europe [2]. Les espèces suivantes ont été utilisées : le sanglier (*Sus scrofa*), le blaireau d'Eurasie (*Meles meles*), le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*), le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*), le campagnol des champs (*Microtus arvalis*), le campagnol agreste (*Microtus agrestis*), le rat taupier (*Arvicola terrestris*), le campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*), la buse variable (*Buteo buteo*), le faucon crécerelle (*Falco tinnunculus*), la corneille noire (*Corvus corone*), la pie bavarde (*Pica pica*) et le geai (*Garulus glandarius*). Les autopsies pratiquées n'ont permis de déceler de lésions de type Pox au niveau de la muqueuse buccale ou de la peau, chez aucun des animaux examinés. Pendant une durée d'observation d'un minimum de 28 jours, aucun signe clinique ou aucune lésion n'ont été observés chez aucun des 107 animaux vaccinés. L'absence de mortalité, tout particulièrement chez les micromammifères est un avantage notable du recombinant par rapport aux souches atténuées du virus de la rage.

Pour mesurer l'excrétion et pour juger d'une éventuelle transmission horizontale du recombinant, des animaux sentinelles non vaccinés ont été maintenus en contact étroit avec les vaccinés. Aucune transmission n'a été observée chez le renard, le chien, le chat,

les bovins, le furet, le blaireau et le sanglier. L'utilisation de plusieurs techniques n'a pas permis de démontrer la présence de virus dans la salive, les glandes salivaires, le sang et les organes internes de renards peu après l'inoculation. La technique très sensible d'amplification génique [12] a permis de mettre la multiplication du virus en évidence uniquement au niveau des amygdales, de la muqueuse buccale et du voile du palais, tout comme pour la souche parentale du virus de la vaccine. Le virus recombinant ne présente pas de glycoprotéine du virus rabique au niveau de son enveloppe et sa réceptivité tissulaire n'est donc pas modifiée.

Il était également important d'éliminer tout risque épizootiologique potentiel comme l'émergence de porteurs asymptomatiques de virus sauvage par vaccination d'animaux en cours d'incubation. Une étude expérimentale a montré que ce risque pouvait être exclu, puisque la vaccination d'animaux en cours d'incubation produit un phénomène de mort précoce ou retardée.

Dissémination volontaire du virus recombinant vaccine-rage

Du fait de son efficacité, de sa parfaite innocuité et de sa stabilité, le virus recombinant vaccine-rage s'est imposé comme une excellente alternative aux souches atténuées de virus rabique actuellement utilisées sur le terrain. C'est pourquoi, un premier essai de vaccination antirabique a été pratiqué à l'aide de cette souche virale, dans le courant du mois d'octobre 1987 [9]. L'expérience préliminaire a été menée sur 600 hectares d'un terrain militaire qui en compte 2700. Cet essai a permis de confirmer l'innocuité du procédé, mais n'a pas permis de juger de son efficacité du fait de la faible étendue traitée. De nouveaux essais ont donc été entrepris en Belgique en octobre 1988 sur un terrain beaucoup plus étendu (436km²) et en novembre 1989, avril et octobre 1990, en collaboration avec les équipes françaises, sur un territoire de plus de 2700 km² afin de se mettre dans les conditions requises pour juger de son efficacité.

Les résultats obtenus permettent d'espérer l'éradication de l'infection [3]. Le vaccin recombinant est actuellement utilisé sur l'ensemble du territoire contaminé au grand-duché de Luxembourg et en Belgique et sur la plus grande partie de celui-ci en France. Plus aucun cas de rage n'a été détecté en Belgique depuis mars 1993.

Références

1. Blancou J., Kiény M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Pastoret P.P., Soulebot J.P., Desmettre P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* ; 322 : 373-375.
2. Brochier B., Blancou J., Thomas I., Languet B., Artois M., Kiény M.P., Lecocq J.P., Costy F., Desmettre P., Chappuis G., Pastoret P.P. (1989). Use of recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus for oral vaccination of wildlife against rabies : innocuity to several non-target bait consuming species. *J Wild Dis* ; 25 : 540-547.
3. Brochier B., Kiény M.P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P. (1991). Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* ; 354 : 520-522.
4. Cohen J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science* ; 259 : 1691-1692.
5. Cox G.J.M., Zamb T.J., Babiuk L.A. (1993). Bovine herpesvirus 1 : immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* ; 67 : 5664-5667.

6. Desmettre P., Chappuis G. (1990). Vaccins et vaccination. In : Pastoret P.P., Govaerts A., Bazin H., eds. *Immunologie animale*. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, France.
7. Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslow J.P., Paoletti E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* ; 179 : 247-266.
8. Pastoret P.P., Brochier B., Blancou J., Artois M., Aubert M., Kieny M.P., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P. (1992). Development and deliberate release of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. In : M. M. Binns, G. L. Smith, eds. *Recombinant Poxviruses*. CRC Press, Baton Roca, USA, 163-206.
9. Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Thomas I., Paquot A., Bauduin B., Costy F., Antoine H., Kieny M.P., Lecocq J.P., Debruyne J., Desmettre P. (1988). First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec* ; 123 : 481-483.
10. Ray C.A., Black R.A., Kronheim S.R., Greenstreet T.A., Sleath P.R., Salvesen G.S., Pickup D.J. (1992). Viral inhibition of inflammation : cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* ; 69 : 597-604.
11. Tartaglia J., Perkus M.E., Taylor J., Norton E.K., Audonnet J.C., Cox W.I., Davis S.W., Vanderhoeven J., Meignier B., Rivière M., Languet B., Paoletti E. (1992). NYVAC : a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* ; 188 : 217-232.
12. Thomas I., Brochier B., Languet B., Blancou J., Peharpré D., Kieny M.P., Desmettre P., Chappuis G., Pastoret P.P. (1990). Primary multiplication site of the vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus administered to foxes by the oral route. *J Gen Virol* ; 71 : 37-42.

20

LEUCOGEN : un exemple de vaccin sous-unité

P. BAYCHELIER

Laboratoires Virbac, Carros, France.

Le virus FeLV

Le virus de la leucémie féline (FeLV, *feline leukaemia virus*) est un rétrovirus (sous-famille des *Oncornavirinae*, c'est-à-dire virus oncogènes à ARN). C'est un virus enveloppé. Deux de ses protéines ont une importance particulière : la glycoprotéine d'enveloppe gp70 (de 70 kilodaltons) et la protéine p27, protéine de la nucléocapside (de 27 kilodaltons).

La gp70 est responsable des phénomènes de reconnaissance membranaire entre le virus et la surface des cellules qu'il infecte : il s'agit d'une reconnaissance spécifique entre récepteurs cellulaires et certaines parties de la gp70. La protéine p27 est une protéine qui est produite en excès lors de la multiplication active du virus dans l'organisme : on la retrouve à l'état libre dans le sang, où elle est classiquement détectée par les tests ELISA du commerce (on parle d'antigénémie).

Le FeLV infecte les cellules de la lignée blanche en particulier. Après adsorption du virion sur la membrane, l'ARN et la transcriptase inverse sont en quelque sorte injectés dans le cytoplasme de la cellule : l'ARN y est transcrit de façon réverse en ADN qui se duplique pour s'intégrer dans son génome. A ce stade, le virus se nomme provirus, et toutes les cellules filles de la cellule infectée seront elles-mêmes infectées. Après un laps

de temps plus ou moins longs (latence), le provirus va s'exprimer et la cellule va produire, par bourgeonnement, de nouveaux virions capables d'infecter d'autres cellules. C'est aussi à ce stade que la p27, produite en excès, se retrouve dans le sang.

Le FeLV existe sous forme de 3 sous-groupes différents : A, B et C. Ce ne sont pas des sérotypes, et le seul moyen de les différencier est de faire un test d'interférence virale *in vitro*.

Seul le sous-groupe A est infectieux. Il est remarquablement stable sur le plan antigénique. En particulier, la séquence de la gp70 est toujours la même d'un isolat à l'autre.

Les différents sous-groupes de type B apparaissent à la suite de recombinaison du provirus A avec des séquences endogènes de FeLV. Ces séquences endogènes sont normalement présentes dans le génome de tous les chats et correspondent à des virus apparentés au FeLV qui sont devenus détectifs, c'est-à-dire incapables de se multiplier, au cours de l'évolution. Les FeLV de type B diffèrent du type A par la séquence en acides aminés de leur gp70. Il y a de très nombreuses possibilités de recombinaison entre le provirus du type A et les séquences endogènes de FeLV, donnant pratiquement un sous-groupe B différent par chat infecté, lorsqu'il y a recombinaison. On isole le sous-groupe A dans 100% des cas d'infection et les sous-groupes A et B dans 50% des cas.

C'est également par recombinaison, mais avec des oncogènes du génome félin, cette fois-ci, que le provirus A peut déclencher l'apparition de tumeurs (leucémie).

Enfin, pour être précis, il faut aussi citer les sous-groupes C. Eux aussi diffèrent du sous-groupe A par la séquence d'acides aminés de la gp70. Ils apparaissent, non par recombinaison avec le génome félin, mais par mutation. On ne les isole que dans 1% des cas d'infection, toujours en association avec le type A.

Il faut donc retenir que seul le FeLVA est infectieux.

Sur le plan de la pathogénie, on doit retenir qu'après une phase d'invasion accompagnée d'une multiplication locale à la porte d'entrée (amygdales), puis d'une virémie par portage intracellulaire, les organes lymphoïdes plus profonds, ainsi que la moelle osseuse sont atteints, ce qui entraîne une très forte virémie (d'origine médullaire) : le virus est alors libre dans le sang et peut coloniser tout l'organisme; on le retrouve dans toutes les sécrétions et excréments du chat.

De façon naturelle, 40% des chats se débarrassent du virus de façon précoce, au stade de virémie intracellulaire (et ne manifestent donc qu'une virémie transitoire). 30% des chats deviennent porteurs latents (provirus intégré dans le génome, pas de virémie, pas d'antigénémie). 30% développent une virémie persistante, laquelle évolue ensuite vers les pathologies (tumeurs, immunodéficience) et 80% des chats virémiques persistants meurent dans les 3 ans suivant l'infection.

Le vaccin LEUCOGEN

Conception

Il paraissait donc logique de s'intéresser au sous-groupe de type A pour le développement d'un vaccin. La grande difficulté a été d'isoler la séquence nucléotidique codant pour la gp70 du sous-groupe A. En effet, il fallait travailler sur le provirus, c'est-à-dire sur le virus à l'état intégré, car le virus est trop fragile. Or, les cellules félines sont pourvues de très nombreuses séquences endogènes qui ont grandement compliqué la tâche. La séquen-

ce isolée, il a été plus simple de l'intégrer à un plasmide. Le plasmide introduit dans *E. coli* a permis d'obtenir une bactérie recombinante capable de synthétiser le squelette protéique de la gp70 (*E. coli* ne glycosyle pas les protéines). On la nomme p45 (45 kilodaltons).

Cette protéine, extraite d'*E. coli* et purifiée, est mélangée à un système de deux adjuvants de l'immunité : l'hydroxyde d'aluminium et une fraction purifiée du Quil A.

Le mélange a donné toutes satisfactions sur le plan de l'efficacité et de la sécurité.

Efficacité

Six essais de laboratoire avec épreuve virulente ont tous donnés des résultats au moins statistiquement significatifs (*) et en général très hautement significatifs (***) (Figure 1)

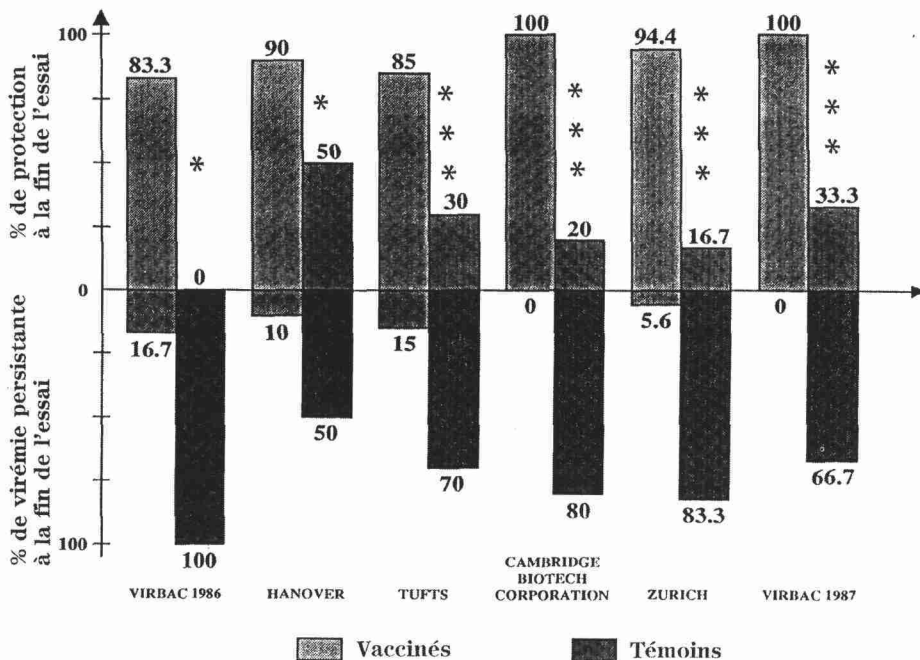


Figure 1. Six essais de laboratoire avec épreuve virulente sur chats EOPS.

Le diagramme résume ces essais réalisés sur chats EOPS. L'épreuve virulente a été très sévère puisque en moyenne 75% des témoins ont été infectés de façon persistante par le virus d'épreuve (contre 30% dans les conditions naturelles).

Sur le terrain, sur plus de 100 chats vivant dans des conditions diverses (80% d'entre eux en refuge), on a obtenu une séroconversion dans 95% des cas (apparition d'anticorps chez les animaux sans anticorps) et tous les chats p27 négatifs sont restés p27 négatifs tout au long de l'étude qui a duré plus d'un an.

Innocuité

L'innocuité du vaccin est due à sa parfaite pureté chimique : protéine p45, hydroxyde d'aluminium et Quil A purifié.

Cette innocuité a été vérifiée aussi bien au laboratoire que sur le terrain.

Au laboratoire, les essais ont porté sur 89 chats ayant reçu 2 ou 3 doses successives par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Durant la période d'observation (2 à 15 semaines), les paramètres suivants ont été étudiés : poids vif, symptômes locaux et généraux, température rectale et résultats hématologiques. Il n'y a pas eu de différence avec les groupes témoins d'animaux non vaccinés du même âge.

Sur le terrain, plus de 1000 chats de propriétaires ont été étudiés. Ils ont reçu 2 injections successives à 2-3 semaines d'intervalle, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intramusculaire. Sur l'ensemble des injections, 3,8% ont été suivies d'un court épisode fébrile et/ou d'anorexie et 1,4% de l'apparition d'un nodule au point d'injection. Les autres réactions furent représentées par des épisodes de diarrhée ou de vomissement ou de douleur (1,4% des injections). Un seul cas d'anaphylaxie a été noté.

Le contrôle de la qualité de chaque lot de production est également assuré sur animaux avant de pouvoir être commercialisé : les tests sont réalisés sur souris, cobayes et chats. Ces derniers reçoivent une double dose de vaccin et ne doivent montrer aucune réaction locale ou générale pendant les 2 semaines qui suivent l'injection.

Enfin, le recul que nous avons nous permet de confirmer l'excellente sécurité du vaccin, puisqu'à ce jour, plus de 3 millions de doses de LEUCOGEN ont été vendues dans le monde.

Conclusion

LEUCOGEN permet donc de protéger contre l'infection par FeLV de façon sûre et efficace :

- primovaccination : 2 injections réalisées à 2-3 semaines d'intervalle, en sous-cutanée, sur des chats âgés de 9 semaines ou plus,
- rappel annuel.

Il est conseillé de vérifier l'absence d'infection par le FeLV avant de vacciner les animaux.

21

Séroprotection virale bovine chez le veau : application, cas

I. TURKI*, Y. ELAZHARY**, R. ELAZHARY**

* *Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi Thabet, Tunisie.*

** *Faculté de Médecine Vétérinaire, Saint Hyacinthe, Canada.*

Le complexe “diarrhée virale bovine (DVB)-maladie des muqueuses (MM)” est une maladie infectieuse, affectant essentiellement les bovins, due à un virus appartenant désormais à la famille des *Flaviviridae* [7,26]. Elle se traduit par des manifestations cliniques très diverses touchant plusieurs appareils, essentiellement les organes de la reproduction et le tube digestif.

Elle fut décrite pour la première fois en Amérique du Nord [25]. Plus tard, l'agent causal fut rapporté un peu partout dans le monde [12,27]. Une enquête sérologique, réalisée dans divers pays, a montré que 60 à 80% des veaux testés étaient positifs [16]. Au Québec, une étude des sérums soumis à des fins de diagnostic étaient positifs et le même résultat a été obtenu en France suite à une étude sérologique effectuée par Dannacher et Moussa [11]. La séroprévalence est donc très élevée, ce qui pose un problème majeur, aussi bien dans le dépistage de la maladie, que dans les mesures de lutte. Par ailleurs, les systèmes de protection pratiqués actuellement, basés sur l'administration du colostrum et sur la vaccination, ne semblent pas efficaces [22].

Les animaux les plus sensibles aux infections par le VDVB sont les veaux. Ceux dépourvus d'anticorps maternels se trouvent démunis de toute défense face à une éventuelle infection par le VDVB, et l'immunisation active des veaux n'est efficace qu'après un délai de 15 à 20 jours, période dans laquelle l'animal est susceptible à l'infection.

Le but de notre travail est d'améliorer les mesures immunoprophylactiques par l'administration de sérum hyperimmun contre le VDVb chez le veau. Un second objectif vise à déterminer les polipeptides immunogènes du VDVb en relation avec les résultats sérologiques.

Matériel et méthodes

Animaux de l'expérience et protocole expérimental

Les animaux de l'expérience sont 5 vaches et 21 veaux, tous de race Holstein. Ils sont divisés en 3 lots :

- le premier est composé de 5 vaches auxquelles est injectée une suspension antigénique du VDVb pour l'obtention d'un sérum hyperimmun (SH).
- le deuxième lot est constitué de 13 veaux parmi lesquels 11 ont servi de témoins. L'analyse sérologique des prélèvements effectués sur ces animaux nous permet de définir les caractéristiques de la séroprotection (demi-vie des anticorps, choix de la dose, de la voie et de la fréquence d'injection).
- l'ensemble du 3^{ème} lot, composé de 8 veaux, a subi une épreuve virulente avec un mélange de 2 souches virales : Singer et NADL, sachant que la moitié a reçu du SH et l'autre moitié a servi de témoin. Le protocole d'injection du sérum hyperimmun est défini selon les résultats de l'expérience faite sur le 2^{ème} lot de veaux.

Production d'antigène et immunisation du lot 1

Une suspension antigénique de VDVb inactivée et adjuvée est utilisée pour immuniser des vaches afin de produire un sérum hyperimmun.

L'inactivation de la suspension de virus propagés sur cellules MDBK utilise un mélange de 2-bromoéthylamine hydrobromide (99%) et d'hydroxyde de sodium. Un adjuvant à la suspension virale inactivée est ajouté. C'est un mélange de Marcol et de Montanide à la proportion de 9:1 (v/v). Ce dernier mélange est ajouté à la suspension virale inactivée 1:1 (v/v).

Le contrôle de l'inactivation est fait sur culture cellulaire et l'innocuité est approuvée suite à l'administration de vaccin à deux jeunes bovins. Ces derniers n'ont pas présenté de complications post-vaccinales.

La fréquence des vaccinations est de 4 injections par semaine soit 16 injections au total par animal. A chaque vache, 4 ml de suspension antigénique sont injectés par voie intramusculaire.

Un contrôle sérologique hebdomadaire est réalisé afin de préciser le moment opportun pour procéder à la saignée des vaches dans le but de récolter du sérum hyperimmun à haut titre d'anticorps anti-VDVB et de l'injecter ensuite aux veaux.

Caractérisation de la séroprotection du lot 2

Le but de l'expérimentation sur le lot 2 est de caractériser la séroprotection par la sélection de la dose, de la fréquence et de la voie d'injection, et par la définition de la demi-vie des anticorps neutralisants.

Pour un litre de sérum hyperimmun obtenu de vaches, 4/3 de litre de sulfate d'ammonium froid à 40% de saturation est ajouté. Le culot est resuspendu dans du TPS (Tampon Phosphate Saline) pour y être dialysé. La lyophilisation du sérum est ensuite effectuée.

Partant d'une dilution de sérum hyperimmun lyophilisé à 30% (1,2 g de sérum dilué dans 4 ml de TPS), le test de séroneutralisation montre que notre sérum reconstitué neutralise 100 DICT₅₀ (Doses Infectantes de Culture de Tissus) de VDVB à la dilution 1/20480. Par conséquent, 1 ml de ce sérum non dilué équivaut à 10^{5,31} DPCT₅₀ (Doses Protectrices de Culture de Tissus).

Deux doses d1=10^{6,3} DPCT₅₀ et d2=10^{6,5} DPCT₅₀ permettent de comparer l'effet de doses. Une comparaison de l'effet de fréquence d'injection est faite par l'utilisation d'une simple et d'une double administration de sérum. Deux voies d'injection sont utilisées à savoir la voie intramusculaire et la voie intraveineuse.

Tous les veaux du 2^{ème} lot ont subi un contrôle sérologique hebdomadaire pendant 11 semaines afin d'évaluer le titre moyen d'anticorps aussi bien par la technique d'IFI (Immunofluorescence Indirecte) que par celle de la SN (Séroneutralisation). Les meilleurs critères de doses, de fréquence et de voie sont retenus pour la séroprotection des veaux du 3^{ème} lot.

Epreuve virulente du lot 3

La moitié des veaux appartenant au 3^{ème} lot ont reçu du sérum hyperimmun selon les critères définis dans l'expérience effectuée sur ceux du 2^{ème} lot. Tous les veaux du 3^{ème} lot ont été expérimentalement infectés pour étudier l'efficacité de la séroprotection.

L'épreuve virulente est effectuée par l'utilisation de deux souches cytopathogènes : NADL et Singer (titrant 10⁵ DICT₅₀/ml).

A partir de la date de l'infection expérimentale, les veaux sont surveillés cliniquement deux fois par jour (matin et soir). Chaque veau dispose d'une fiche clinique sur laquelle sont notés : des paramètres généraux et des paramètres respiratoires selon le système de cotation établi par Espinasse *et al.* [15].

L'isolement viral a été essayé, reposant sur la détection d'éventuel effet cytopathique. Le titre viral est donné par la dernière dilution qui provoque un effet cytopathogène dans 50% des puits et son calcul se fait selon la formule de Kaerber [18].

La spécificité de l'effet est confirmée par la technique d'immunoperoxydase.

Techniques sérologiques

Les techniques d'IFI, de SN et de RIP (Radioimmunoprécipitation) utilisées dans notre travail sont celles décrites respectivement par Silim et Elazhary [28], Corthier *et al.* [10], et Magar *et al.* [21]. Toutefois afin de les adapter aux conditions du laboratoire, ces techniques ont été modifiées.

Résultats

Etude de la réponse immunitaire des vaches hyperimmunisées (lot 1)

D'après la courbe représentée dans la Figure 1, les anticorps anti-VDVB n'apparaissent qu'au bout de 3 semaines. Ils commencent à croître d'une façon exponentielle jusqu'à former un plateau à partir de la 4^{ème} semaine. Le titre devient constant autour de la 7^{ème} semaine, délai dans lequel une saignée des vaches s'impose. Le pic correspond au titre moyen de 4457 (valeur Log = 8,402 "logarithme népérien") détecté par IFI. Le pic du titre moyen d'anticorps révélés par la SN est de 2229 (valeur Log = 7,709). La comparaison des résultats obtenus des deux tests IFI et SN montre une corrélation positive.

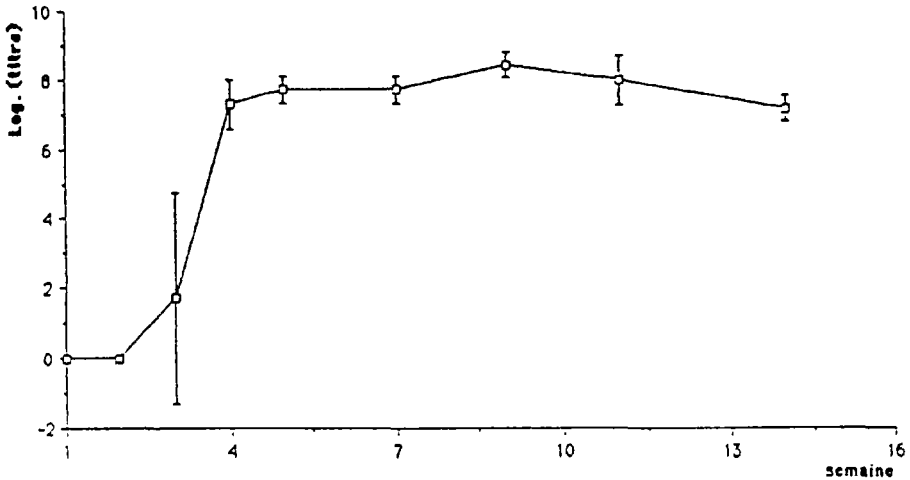


Figure 1a. Cinétique du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test d'immunofluorescence chez 5 vaches.

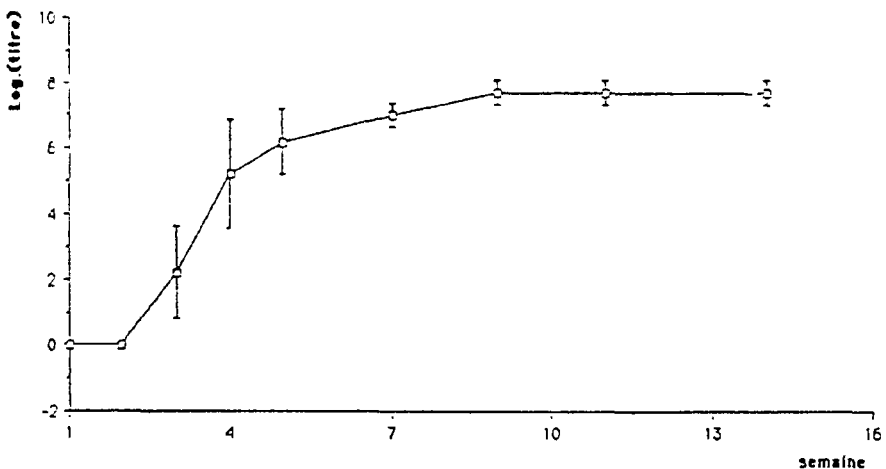


Figure 1b. Cinétique du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test de séro-neutralisation chez 5 vaches.

La Figure 2 montre à la 2^{ème} colonne une immunoprécipitation des polypeptides viraux 66K et 55-53K en très faible quantité par rapport à celle des autres colonnes. Dès la 3^{ème} semaine post-immunisation (colonne 4), une plus grande quantité de polypeptides immunoprécipités 65K et 55-53 K est observée. De plus, l'apparition d'autres bandes dues à l'immunoprécipitation des protéines : 120K, 80K, 47K, et 37K est notée. Les résultats sont reproductibles.

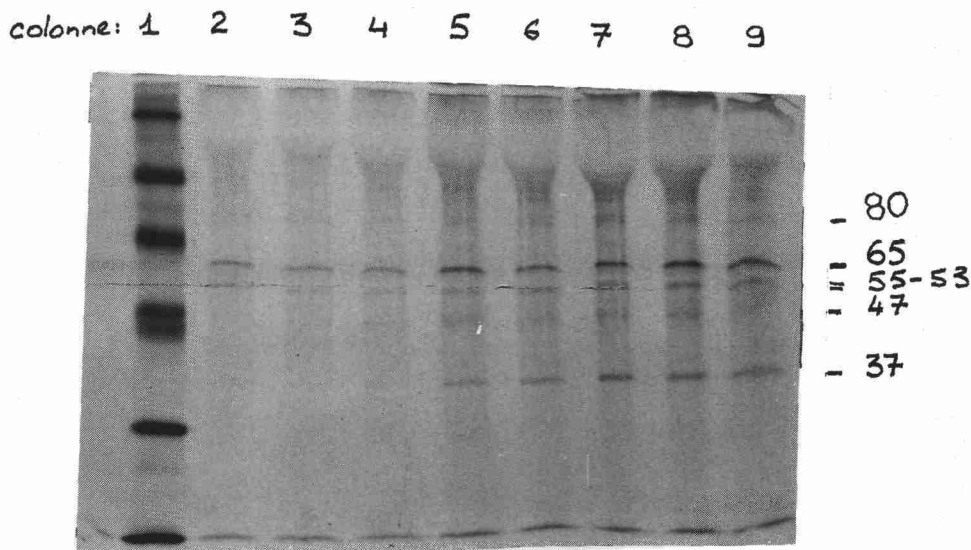


Figure 2. Immunoprécipitation par le test de RIP des polypeptides viraux marqués à la S35-Méthionine de la souche Singer à l'aide de sérums hyperimmuns prélevés de la vache n° à différents moments de l'expérience : avant la vaccination (colonne 2) et à la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème}, 9^{ème}, et 11^{ème} semaine post-immunisation correspondant respectivement aux colonnes 3,4,5,6,7,8,9. La colonne 1 correspond à la précipitation de protéines marquées au C14, utilisées comme marqueurs.

Sélection du meilleur protocole de séroprotection (lot 2)

L'analyse statistique n'a pas révélé de différence significative, aussi bien pour la fréquence d'injection (simple ou double), que pour les doses utilisées (d1 et d2). Par contre, les résultats du test statistique ont révélé la présence d'une différence significative entre les deux voies d'injection à 1% (la valeur de F trouvée est de 9,52). La voie intramusculaire donne de meilleurs résultats que la voie intraveineuse (Figure 3).

Pour calculer la demi-vie des anticorps neutralisant le VDVB, la moyenne de titres d'anticorps est calculée à partir du 5^{ème} jour post-injection car le titre moyen correspondant est le plus élevé. Dans la Figure 4, la chute des anticorps neutralisants et la droite théorique des moindres carrés sont schématisées. L'équation de cette droite a permis d'en déduire que la demi-vie est de 19 jours.

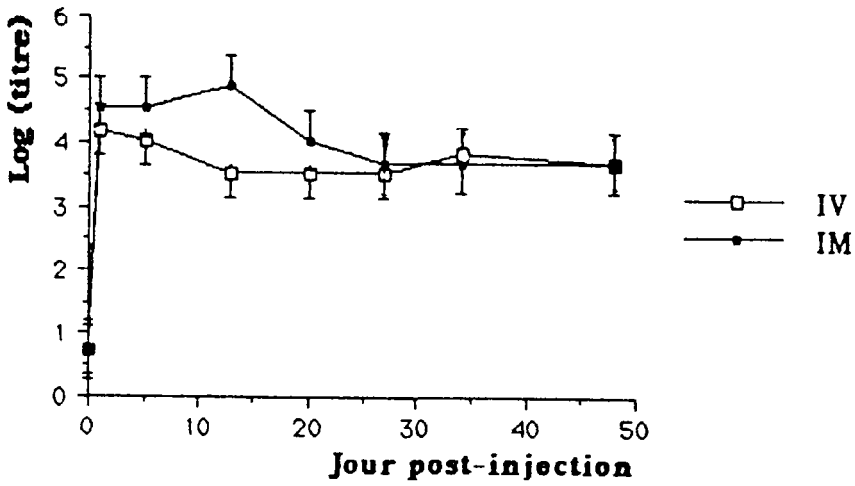


Figure 3. Evolution du titre moyen d'anticorps sériques anti-BVDV révélés par le test d'immuno-fluorescence chez deux groupes de veaux recevant du sérum hyperimmun par différentes voies (IV = intraveineuse; IM = intramusculaire).

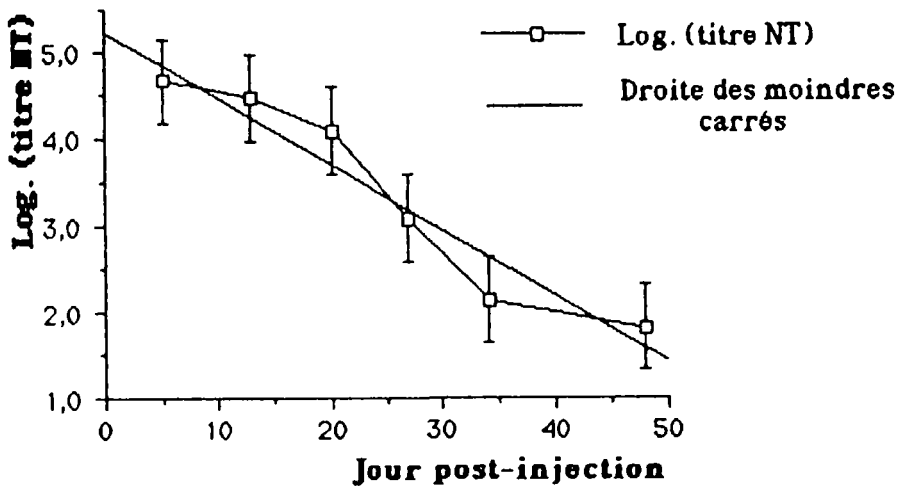


Figure 4. Chute du titre moyen d'anticorps sériques neutralisant le virus BVDV révélés par le test de séroneutralisation chez onze veaux, et représentation de la droite des moindres carrés.

Surveillance des signes cliniques et excrétion virale (lot 3)

Les résultats de l'épreuve virulente montrent que tous les veaux ont présenté une note globale inférieure à 2 excepté le veau n° 16. D'après Espinasse [15], si la note globale moyenne dépasse 2,1, l'animal est atteint d'une maladie grave. Le veau n° 16 a présenté une valeur égale à 2,42 et a succombé au 10^{ème} jour d'expérience. C'est un veau qui, à l'arrivée, présentait un peu de diarrhée souillant le train postérieur et un écoulement nasal. La température, ainsi que la fréquence respiratoire, étaient normales.

L'examen macroscopique du poumon de ce veau a montré la présence de zones de consolidation étendues dans les lobes crâniens et moyens. Les parties affectées sont de couleur brun-rougeâtre. L'examen histologique de quelques prélèvements, effectués au niveau du même organe, a montré la présence d'hyperémie et d'une infiltration cellulaire modérée de la muqueuse des bronches. La lumière bronchique contient des polynucléaires neutrophiles et des cellules épithéliales desquamées se trouvant à proximité de capillaires dilatés. Un exsudat purulent, mêlé de fibrine, est noté dans les bronchioles et les alvéoles. L'ensemencement de broyat d'un prélèvement pulmonaire n'a pas donné de croissance bactérienne.

Dans la Figure 5, l'axe des ordonnées représente la note attribuée aux signes cliniques et l'axe des abscisses mentionne le temps en jour. Chaque valeur est une moyenne de 4 notes mais à partir du 10^{ème} jour, nous avons comparé 3 veaux ayant reçu du sérum hyperimmun à 4 veaux témoins. Cette inégalité du nombre de l'effectif des 2 échantillons est prise en considération dans le test statistique, sans pour autant induire d'erreurs d'interprétation. Les veaux ayant reçu du sérum hyperimmun ont obtenu une note globale moyenne inférieure à celle des veaux témoins. A cause du faible nombre de veaux éprouvés, le test statistique n'a pas détecté de différence significative.

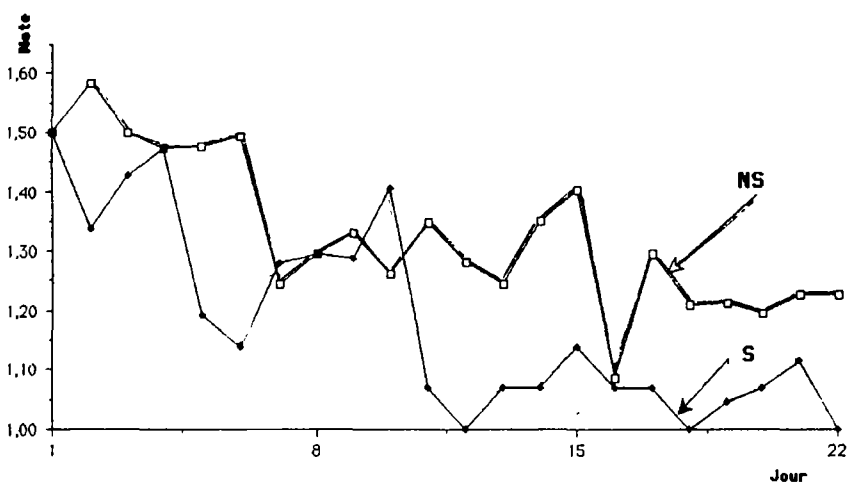


Figure 5. Comparaison des notes correspondant aux signes cliniques de 2 groupes de veaux infectés par BVDV (S et NS).

Le deuxième critère définissant l'efficacité de la séroprotection est la neutralisation virale par le sérum hyperimmun. Nous avons cherché à isoler le virus et à comparer le titre chez les deux groupes de veaux (l'un ayant reçu le sérum hyperimmun et l'autre servant de témoin). Pour ce faire, des prélèvements de sang et d'écouvillon nasal ont été effectués à J0, J1, J2, J3, J4, J6, J8, J13 et J15.

Malgré de nombreux passages "aveugles", nous n'avons pu isoler le virus à partir des sécrétions nasales; nous pensons que le titre y est tellement faible qu'il n'a pu être détecté. Le titre trouvé dans le sang aussi bien chez le groupe ayant reçu du sérum que chez le témoin, est faible, ne dépassant pas 10^2 DICT₅₀/50 µl (Figure 6). Les deux courbes se chevauchent au début mais la chute du titre est beaucoup plus importante chez le groupe ayant reçu du sérum. Après 15 jours, le titre moyen du virus s'annule.

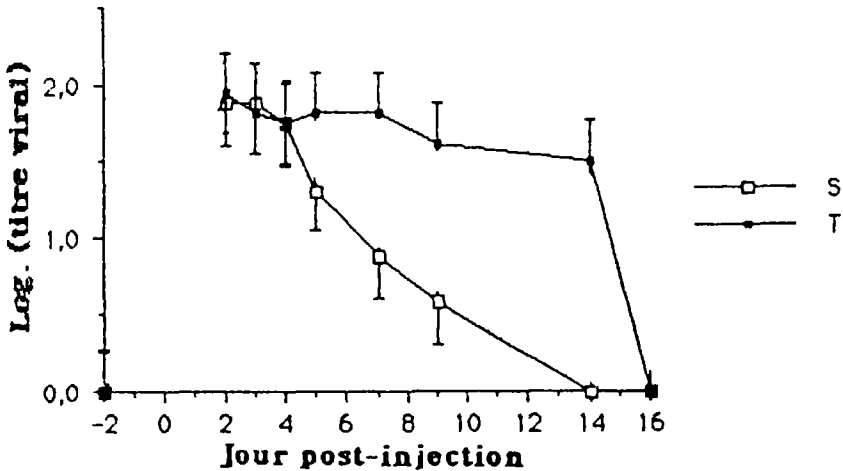


Figure 6. Evolution du titre moyen du VDV B isolé à partir du sang chez un lot de veaux infectés dont la moitié a reçu du sérum hyperimmun (S) et dont l'autre moitié a servi de témoin (T).

Discussion

La vaccination des vaches a induit le développement d'anticorps anti-VDVB n'étant décelables qu'après 21 jours post-injection. Mansfield *et al.* [22] attribuent la rapidité d'apparition des anticorps anti-VDVB au type de vaccin administré. Dans notre étude, nous avons réussi à obtenir un haut titre d'anticorps anti-VDVB, bien qu'il s'agisse d'un vaccin inactivé. Il est compréhensible que la fréquence d'injection en est une raison. Utilisant 4 sortes de vaccins inactivés, Frey (1989) suggère que la présence de 2 biotypes dans un vaccin contribuerait à l'obtention d'un haut titre d'anticorps anti-VDVB. Dans notre expérience de vaccination de vaches, un seul biotype cytopathogène (Singer) est utilisé. L'interprétation la plus raisonnable du haut titre trouvé sans notre travail est donnée par Thomas *et al* [29], insistant sur l'efficacité de l'emploi des immunoadjuvants. L'adjuvant utilisé dans notre travail, composé d'un mélange de Mercol et de Montanide, dont le choix est judicieux, s'avère très efficace.

Les résultats trouvés à partir du test de RIP ont montré, à partir de la 3^{ème} semaine post-immunisation, la présence de polypeptides immunoprécipités : 120K, 80K, 65K, 55-53K, 47K et 37K. Les poids moléculaires de ces protéines concordent avec ceux trouvés dans d'autres travaux [3,21]. Dans notre travail, la comparaison entre les profils électrophorétiques a montré une relation entre la quantité de polypeptides immunoprécipités 55-53K, 47K et 37K à l'aide de sérums prélevés à différents moments de l'expérience, et le titre d'anticorps anti-VDVB révélés par le test de NT. La présence de la protéine 65K, avant même l'immunisation, prouve que le test de RIP est très sensible par rapport aux autres techniques utilisées. La protéine n'a pas de rôle direct sur la neutralisation virale puisqu'elle est immunoprécipitée avant l'immunisation et que le titre d'anticorps anti-VDVB sériques détectés par la SN correspondant est négligeable. Corapi *et al.* [8] ont signalé la forte possibilité que la glycoprotéine 62K soit un précurseur de gp48 et gp25. Nous n'avons pas trouvé de 25K mais Dubovi [13] a précisé qu'il était toujours difficile de la détecter. Il a été démontré, par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, que la gp55-53K est la plus immunodominante des protéines virales. Elle contribue à la constitution de l'enveloppe virale et est donc impliquée dans la neutralisation virale [7,21]. La protéine 37K apparaît à la quatrième semaine post-immunisation. Bolin et Ridpath [3] ont montré l'immunoprécipitation de cette protéine à l'aide d'un sérum hyperimmun. Dubovi [13] reconnaît que la p37K est difficile à détecter à moins que le sérum utilisé soit hyperimmun. Nous pouvons alors conclure que l'immunoprécipitation de la 37K est révélatrice d'un état d'hyperimmunisation. Il semble qu'elle soit la protéine de la nucléocapside.

Dans la 2^{ème} partie de notre travail, nous avons défini les modalités de l'administration du sérum hyperimmun. La demi-vie des anticorps neutralisants calculée dans notre étude est de 19 jours. D'après Levieux [20], la demi-vie des immunooglobulines bovines dans un sérum normal : IgG2 est de 13 et 20 jours respectivement. Kendrick [19] a étudié la chute des anticorps neutralisants contre le VDVB. Les veaux utilisés dans son expérience sont issus de bovins infectés, mais qui ne présentaient pas d'anticorps sériques anti-VDVB avant l'ingestion colostrale. Suite à l'absorption colostrale, les veaux ont été suivis sérologiquement par le même auteur. Ce dernier a trouvé que la demi-vie dépendait du titre d'anticorps absorbés initialement et qu'elle était comprise entre 105 et 230 jours. Coria et McClurkin [9] ont montré que les anticorps transmis par le colostrum aux veaux diminuait au cours des premiers quatre à six mois après la naissance.

Après l'injection du sérum hyperimmun à la moitié du lot 3, tous les veaux du même lot ont été inoculés expérimentalement par deux souches cytopathogènes. Les veaux témoins démontraient une symptomatologie proche de celle impliquée par le VDVB sans toutefois atteindre le degré rencontré chez les animaux infectés naturellement. D'ailleurs Brownlie [4] n'a jamais pu reproduire la maladie clinique sans des conditions expérimentales et Baker [1] approuve le fait que la reproduction de la diarrhée virale bovine est très difficile chez les veaux immunocompétents. Dans notre expérience, les veaux n'ayant pas reçu de sérum hyperimmun ont présenté quelques signes cliniques se traduisant par de la toux, de la diarrhée et surtout un écoulement nasal. Howard *et al.* [17] ont essayé l'effet d'anticorps colostraux suite à une infection expérimentale par la voie nasale. Ils ont trouvé une réduction de la virémie, une excrétion virale moindre et une leucopénie plus faible.

Dans notre expérience, un veau est mort soudainement bien qu'il ait reçu du sérum hyperimmun. Plusieurs hypothèses sont avancées quant à la cause de sa mort : infection persistante, autre infection concomitante ou inefficacité du sérum. Cette dernière hypothèse est à éliminer puisque les autres veaux sont restés en vie même ceux qui n'ont pas

reçu de sérum. Il est difficile d'admettre l'hypothèse d'infection persistante car tous les veaux ont subi un test avant leur admission dans l'expérience, à moins que le titre viral ne soit trop bas pour être décelé. L'utilisation du PCR aurait pu résoudre ce problème mais elle ne fut pas utilisée dans notre travail. Les lésions décrites à l'autopsie du veau n° 16 sont différentes de celles d'une maladie de muqueuses. Les lésions décrites par Jubb *et al.* (1985) n'ont pas été notées dans ce cas particulier. L'hypothèse la plus probable est une infection bactérienne ou virale sévissant d'une manière suraiguë qui s'est déclenchée par le stress dû au transport et aux diverses manipulations de l'infection expérimentale.

L'isolement viral chez les veaux du 3^{ème} lot n'a pu être détecté qu'à partir du sang. Il est vrai que le meilleur échantillon pour isoler le virus est le sang [14], mais nous nous attendions à en trouver dans les sécrétions nasales, ce qui ne fût pas le cas. D'après Brownlie [4], l'isolement à partir de l'écouvillon nasal dépend de l'âge de l'animal. L'absence de virus dans les sécrétions nasales correspondrait probablement à une faible excrétion virale.

Dans l'interprétation de la pathogenèse de l'infection par le VDVB, Brownlie [4] a représenté la cinétique du virus et celle des anticorps anti-VDVB. Les titres trouvés sont similaires à ceux trouvés dans notre travail. Le titre viral commence à diminuer, jusqu'à s'annuler vers le 15^{ème} jour.

La comparaison entre la cinétique du titre viral du groupe ayant reçu du sérum et celle du groupe témoin montre que la chute du titre viral est beaucoup plus importante chez le premier groupe.

Le titre moyen d'anticorps sériques neutralisants chez les veaux ayant reçu du sérum hyperimmun, puis infectés expérimentalement, est de 85. Ce titre est la moyenne de 3 titres des veaux qui ont résisté à l'infection expérimentale. Le titre de 85 protège donc contre une infection, encore faut-il que celle-ci présente les mêmes conditions que celles de notre épreuve virulente. Par ailleurs, nous ne pouvons dire qu'au dessous de cette valeur, le titre d'anticorps ne serait pas protecteur. Ceci nécessite une expérience dans laquelle l'effectif serait divisé en plusieurs lots et où, dans chaque lot, seraient introduits des veaux présentant un certain titre d'anticorps. Le titre protecteur serait donné par la plus faible valeur n'induisant pas d'effet viral.

Bittle [2] a trouvé que les bovins ayant un titre supérieur ou égal à 8 étaient protégés contre l'infection expérimentale avec du virus virulent. Morter *et al.* [24], utilisant du sérum hyperimmun, ont obtenu un titre moyen d'anticorps passant de 4,6 à 181 mais leur expérience n'était pas suivie d'infection expérimentale permettant d'en déduire l'efficacité. L'expérience de Howard *et al.* [17] a montré que les anticorps d'origine colostrale et spécifiques du VDVB sont protecteurs contre l'infection expérimentale par la voie intranasale. Chapek *et al.* [5] ont voulu essayer un nouveau vaccin vivant préparé à partir de la souche Singer. Ils ont montré que le titre moyen d'anticorps neutralisants protecteurs était de 1/40 pour les veaux vaccinés par la voie sous cutanée et de 1/64 par la voie intramusculaire.

Notre étude montre que l'administration de sérum hyperimmun à de jeunes veaux est facile, efficace et réalisable sur le terrain. Sur le plan fondamental, la même étude permet d'impliquer entre autres la glycoprotéine gp55-53K dans la neutralisation virale, et de savoir que la gp37K est révélatrice d'un état d'hyperimmunisation. Il serait préférable de pratiquer notre expérience sur un échantillon beaucoup plus important et si possible, d'évaluer le coût de cette mesure prophylactique afin de la comparer au coût de la vaccination.

Références

1. Baker J.C. (1990). Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9 : 25-41
2. Bittle J.L. (1968). Vaccination for bovine viral diarrhea-mucosal disease. *J Am Vet Med Assoc* ; 152(6) : 861-870.
3. Bolin S., Ridpath (1990). Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res* ; 51 (5) : 703-707.
4. Brownlie J. (1990). The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(1) : 43-59.
5. Chapek M.L., McClaghry L.E., Wilkins L.M. (1978). Evaluation of a bovine virus diarrhea vaccine. *Mod Vet Pract* : 755-757
6. Collet M.S., Larson R., Belzer S.K., Retzel E. (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus : the genomic organisation of a pestivirus. *Virology* ; 165 : 200-208.
7. Collet M.S., Larson R., Gold C., Strick D., Anderson D.K., Purchio A.F. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* ; 165 : 191-199.
8. Corapi W.V., Don R.O., Dubovi E.J. (1990). Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res* ; 51(9) : 1388-1394.
9. Coria M.F., McClurkin A.W. (1978). Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. *Can J Comp Med* ; 42 : 239-243.
10. Corthier C., Aynaud J.M., Galicher C., Gelfi J. (1974). Activité antigénique comparée de deux togavirus : le virus de la peste porcine et le virus de la maladie des muqueuses. *Ann Rech Vet* ; 5 : 373-393.
11. Dannacher G., Moussa A. (1986). Pathogénie et formes cliniques de l'infection par le virus de la diarrhée virale des bovins (BVD). *Rev Méd Vét* ; 137 : 359-365.
12. Della Porta A.J. (1985). Veterinary viral diseases. Their significance in South-East Asia and the Western Pacific. Proc. of international Seminar on Virus Diseases of veterinary importance in South-East Asia and Western Pacific. Aust National Animal Health Laboratory, CSIRO, Geelong, Austria, 27-30 August 1984. Academic Press. Sidney.
13. Dubovi E.J. (1990). Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* ; 9(1) : 105-114.
14. Duffel S.J., Harkness J.W. (1985). Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* ; 117 : 240-245.
15. Espinasse J., Raynaud J.P., Viso M. (1981). L'examen clinique dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (B.P.I.E.) des jeunes bovins. In : *Affections respiratoires enzootiques des jeunes bovins*. Société belge de Buiatrie. Bruxelles Curenghem 26 Septembre : 1-14.
16. Heuschle W.P. (1986). Bovine viral diarrhea-musocal disease. In : *Current veterinary therapy. Food animal practice* 2. W.B. Saunders. Philadelphia : 485-488.
17. Howard C.J., Clarke M.C., Brownlie J. (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet Microbiol* ; 19 : 195-203.
18. Karber G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exper Pathol Pharmac* ; 162 : 480-483.
19. Kendrick J.W. (1974). Bovine viral diarrhea : decay of clostrum-conferred antibody in the calf. *Am J Vet Res* ; 35(4) : 589-591.
20. Levieux D. (1990). Immunoglobulines et transmission de l'immunité passive chez les ruminants. In : P.P. Pastoret, A. Govaerts, H. Bazin,eds. *Immunologie animale*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris : 596-599.
21. Magar R., Minocha H.C., Lecomte J. (1988). Bovine viral diarrhea virus proteins : heteroge-

- neity of cytopathogenic and non cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet Microbiol* ; 16 : 303-314.
22. Mansfield M.E., Woods G.T., Platt-Watkins A., Hill R.O. (1986). Clinical, hematological and serological response of beef calves to modified live and inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *Agri Pract* ; 7 : 3-4, 22-30.
 23. Marsolais G., Assaf R., Di Franco E., Montpetit C. (1984). Rapport des activités du laboratoire de diagnostic des infections virales animales. Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation.
 24. Morter R.L., Amstutz H.A., Roussel A.J. (1984). Prophylactic administration of hyperimmune serum when processing feedlot cattle. *The Bov Practit* ; 19 : 45-48.
 25. Olafson, Richard (1946).
 26. Renard A., Guiot C., Shmetz D., Dagenais L., Pastoret P.P., Dina D., Martial J.A. (1985). Molecular cloning of bovine viral diarrhea viral sequences. *DNA* ; 4 : 429-438.
 27. Saurat *et al.* (1972).
 28. Silim A., ElAzhary M.A.S.Y. (1983). Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhea viruses in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Can J Comp Med* ; 47 : 18-22.
 29. Thomas P.C., Bass E.P. *et al.* (1986). Can an immunodulating adjuvant enhance and extend the protection of a killed BVD virus Vaccine ? *Vet Med* ; 81 : 974-976.

22

Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic

C. SAEGERMAN*, V. WEYNANTS*, T.K-O. VO*, L. DE WAELE*, A. TIBOR*,
PH. A. DENOEL*, J. GODFROID**, P. MICHEL**, E. SAMAN***,
J-J. LETESSON*, J.N. LIMET*

* *Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie, FUNDP, Namur, Belgique.*

** *Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles, Belgique.*

*** *Innogenetic, Gent, Belgique.*

Résumé

*La protection induite par la fraction de la paroi de *Brucella abortus* insoluble dans le dodécylsulfate de sodium bouillant (SDS-I) a été comparée à celle procurée par la vaccination sous-cutanée avec la souche vaccinale B. abortus Buck 19 chez des génisses gestantes inoculées par la voie conjonctivale avec $16,6 \times 10^6$ B. abortus 544. La fraction SDS-I testée retarde les avortements mais ne parvient pas à les empêcher, contrairement au vaccin B19 pourtant administré à faible dose. Contrairement aux animaux des groupes contrôles et vaccinés B19, dont respectivement 25 % et 50 % ont présenté une carcasse non contaminée à l'abattage, presque toutes les carcasses des animaux vaccinés par la fraction SDS-I ont présenté au moins un ganglion contaminé. Le suivi hebdomadaire du*

taux d'anticorps anti-LPS par ELISA a permis de prédire l'avortement, que les génisses soient vaccinées ou non, et ceci plus précocement que les tests classiques usuels. Une étude de la réponse humorale contre les protéines de *Brucella* a été réalisée en immuno-empreinte, ELISA indirect à l'aide de protéines recombinantes et en ELISA de compétition à l'aide d'anticorps monoclonaux. Cette analyse a permis d'identifier une protéine contre laquelle tous les animaux vaccinés puis infectés, ayant avorté ou donné naissance à des veaux infectés, ont produit des anticorps. Cette réactivité était détectable avant l'avortement chez presque tous les animaux. Dès lors, à condition d'améliorer l'activité protectrice de la fraction SDS-I, il serait possible de développer un vaccin, et un ou plusieurs tests de diagnostic utilisant des antigènes différents, capables d'assurer une protection adéquate et permettant l'identification des animaux infectés, sans interférence de l'immunité post vaccinale.

Le lipopolysaccharide (LPS) apparaît comme l'antigène dominant de *Brucella*, avec la réserve que la réponse humorale contre les antigènes protéiques a été étudiée par des techniques peu sensibles [4]. Le dépistage de la brucellose bovine repose sur la recherche des anticorps (AC) spécifiques du LPS de *B. abortus* [12]. La vaccination avec la souche *Buck 19* de *B. abortus* (B19) entraîne la formation d'Ac anti-LPS dans le sérum pendant 6 à 12 mois, parfois d'avantage chez 1 % des animaux [11], ce qui constitue le désavantage majeur de ce vaccin, puisque ces Ac interfèrent lors du dépistage des animaux infectés.

La fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le dodecylsulfate de sodium bouillant (SDS-I) induit, chez la souris, une protection comparable à celle induite par les vaccins cellulaires conventionnels. Cette fraction n'induit pas de réaction cutanée à la brucelline INRA [3,6,7] et pourrait être une alternative à la vaccination B19 [9]. Dans cette optique, nous avons comparé la protection induite par la fraction SDS-I à celle procurée par la vaccination par voie sous-cutanée avec la souche B19 chez des génisses gestantes infectées à 5 mois de gestation par la voie conjonctivale avec $16,6 \times 10^6$ de *B. abortus* 544 .

Matériel et méthodes

Génisses Pie-Noire

Soixante-trois génisses Pie-Noire achetées dans le Morbihan et le Finistère ont été synchronisées et inséminées. Les 26 génisses gestantes obtenues ont été réparties en 3 lots : un lot de 4 non vaccinées, un lot de 12 vaccinées par voie sous-cutanée avec 9 mg de la fraction SDS-I W99-Rev1 dans 2 ml. d'adjuvant BG*, et un lot de 10 vaccinées par voie sous-cutanée avec la souche B19 (150×10^6 germes vivants dans 2 ml. d'eau physiologique). Les vaccinations ont eu lieu au 71^{ème} jour de la gestation. Les infections expérimentales ont été réalisées au jour 162 par voie conjonctivale à la dose de $16,6 \times 10^6$ de *B. abortus* souche 544 (biovar 1). La fraction SDS-I préparée à partir des souches de *Brucella* Rev1 et 99S a été constituée selon le schéma de préparation, et par G. Dubray de

l'INRA à Tours [6]. L'entretien et le dénombrement des Inocula des souches de *Brucella* utilisées ont été réalisés par J.M. Verger de l'INRA à Tours.

Tests classiques

Le test d'agglutination en présence d'EDTA (EDTA) et le test de déviation du Complément (DC) ont été réalisés au Centre de Dépistage des Maladies du Bétail, Erpent, Belgique. La description de ces tests a été publiée antérieurement [1,2,13].

Test d'hypersensibilité retardée

Les intradermo-réactions (IDR) ont été réalisées avec le Brucellergène de Rhône-Mérieux (lot 96G091). Une seringue à tuberculine montée d'une aiguille de 4 mm. sert pour injecter le produit dans le derme, après avoir préalablement coupé le poil à l'aide d'un rasoir électrique. La différence d'épaisseur de peau est mesurée au cuti-mètre à 72 heures et tout épaississement cutané égal ou supérieur à 1 mm. est considéré comme positif [12].

Suivi bactérioscopique et bactériologique

L'étude de l'excrétion lors de chaque vêlage ou avortement et la recherche des *Brucella* sur la carcasse a été réalisée par P. Desmecht et J. Godfroid à l'INRV. Les techniques mises en oeuvre sont décrites dans Alton *et al.* [1].

Immuno-empreintes

Les protéines ont été séparées par la méthode EGPA-SDS décrite à l'origine par Laemmli dans une cuve Protean II (Bio-Rad). Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (50V pendant 2 heures). Les sites non occupés de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués par une incubation de 30 min dans du TBS-BSA 3% à température ambiante et sous agitation. Les membranes ont été successivement incubées une nuit à 4°C avec les sérums dilués 50 fois dans du TBS-BSA 1%-Tw, puis une heure à température ambiante avec l'anticorps monoclonal 1C8 dilué dans le même tampon et 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (Dako). Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 5 lavages de 5 mn sous agitation avec du TBS-Tw. Avant la révélation des membranes, un dernier lavage est réalisé en TBS. Le développement est réalisé à température ambiante dans la solution de révélation contenant 1mg de NBT et 12µl de BCIP par 10 ml de tampon. La réaction est arrêtée par plusieurs lavages à l'eau de ville.

ELISA

ELISA-LPS

L'ELISA-LPS est réalisé selon la méthode décrite par L. De Waele *et al.* [5]. Pour ce test, la sensibilisation des plaques a été réalisée avec un mélange de LPS extrait à partir des souches de *B. abortus* W99 (LPS A dominant) et de *B. melitensis* Rev1 (LPS M dominant). Le conjugué utilisé est l'anticorps monoclonal 1C8 [8].

ELISA indirect sur protéines recombinantes

Les plaques de microtitration 69620 (Nunc) sont sensibilisées par une incubation d'une nuit avec les protéines recombinantes diluées à une concentration finale de 1 µg/ml dans du GBS 0,05M. Les sites non occupés sont bloqués par une incubation de 3 h à 37°C avec du PBS-caséine. Les sérums sont dilués 50 fois dans du GBS-EDTA-Tw avant d'être déposés dans les puits. Les plaques sont incubées une heure à température ambiante. Les anticorps fixés sont révélés par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IgG de bovin couplé à la peroxydase (1C8-PO) dilué dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% d'hydrolysate de caséine (v/v). Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Entre chaque incubation, l'excès de réactifs est éliminé par 6 lavages en NaCl-Tw avec un laveur automatique (Microplate Washer M 96, Titertek). Pour visualiser la fixation, l'O-phenylenediamine (0,4% p/v) et l'H₂O₂ (2mM) dans du tampon citrate-phosphate sont utilisés.

ELISA de compétition

Les plaques de microtitration 69620 (Nunc) sont sensibilisées par une incubation d'une nuit avec des extraits ultrasoniqués de *Brucella melitensis* B115 dilués à une concentration finale de 20 µg/ml dans du GBS 0,05M. Les sites non occupés sont bloqués par une incubation de 3 h à 37°C avec du PBS-caséine. Les sérums sont dilués 2 fois dans du GBS-EDTA-Tw avant d'être déposés dans les puits (25 µl/puits) et ensuite 25 µl de l'anticorps monoclonal, à la dilution appropriée dans le même tampon, sont déposés. Les plaques sont agitées 10 mn puis incubées 50 mn à température ambiante. Les anticorps fixés sont révélés par l'utilisation d'un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (SAM-PO, Amersham) dilué 1000 fois dans du GBS-EDTA-Tw contenant 4% d'hydrolysate de caséine (v/v). Le conjugué est incubé une heure à température ambiante. Les conditions de lavages et de révélations sont identiques à ceux de l'ELISA indirect.

Réactifs

- Tampon Salin Glycine (GBS) : 0.17 M NaCl, 0.1 m Glycine et 6 mM NaN₃, pH 9.2.
- GBS-EDTA-TW : tampon GBS contenant 50 mM EDTA et 0.1% Tween 20, pH 9.2
- Hydrolysate de caséine : 25 g de caséine de lait (Fluka, Buchs, Suisse) sont dissous dans 800 ml de NaOH 0.3 N et incubé sous agitation une nuit à 37°C. La solution est ensuite neutralisée par de l'HCl à pH 7 et le volume ajusté à 1 litre puis filtrée.
- PBS-caséine : tampon salin-phosphate (PBS), pH 7.4, contenant 4% (v/v) d'hydrolysate de caséine.
- Tampon citrate-phosphate : 0.051 M Na₂HPO₄, 0.024 M acide citrique, pH 5.
- NaCl-Tw : 0.15 M NaCl contenant 0.01% Tween 20.
- TBS : tampon Tris-salin, 0,15 M NaCl, 10 mM Tris hydrochloride, pH7,5.
- TBS-BSA 3% : TBS contenant 3% de BSA (p/v)
- TBS-Tw : TBS contenant 0,05% de Tween (v/v).
- TBS-BSA1%-Tw : TBS-Tw contenant 1 % de BSA (p/v)

Antigènes

LPS

Le LPS est préparé selon la méthode décrite par L. De Waele *et al.*[5].

Protéines recombinantes

Les protéines ont été identifiées par A. Cloeckaert (1990) et clonées par P. De Vergifosse (communication personnelle) et A. Tibor (communication personnelle). Elles ont été produites et purifiées par la firme Innogenetics (Gent, Belgique).

Brucella abortus 45/20

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur du *Brucella*-Agar (Gibco) puis récoltées, lavées et leur concentration est déterminée par lecture à 600nm.

Résultats

Symptômes observés

La Figure 1 illustre l'évolution du nombre d'avortements en fonction du temps et pour différents lots. Chez les animaux non vaccinés (témoins), cette infection a conduit à 100 % d'avortement. La vaccination par le vaccin B19 a réduit de 60 % les avortements. La vaccination par la fraction SDS-I a retardé l'avortement de quelques semaines mais toutes les génisses ont finalement avorté.

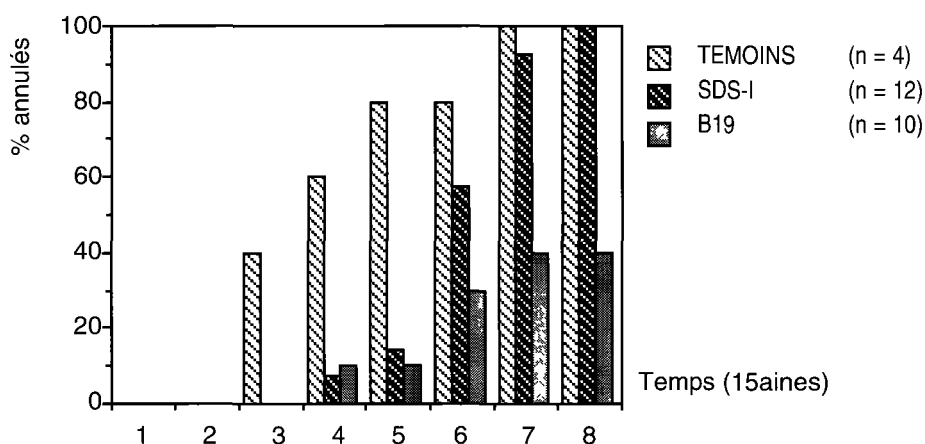
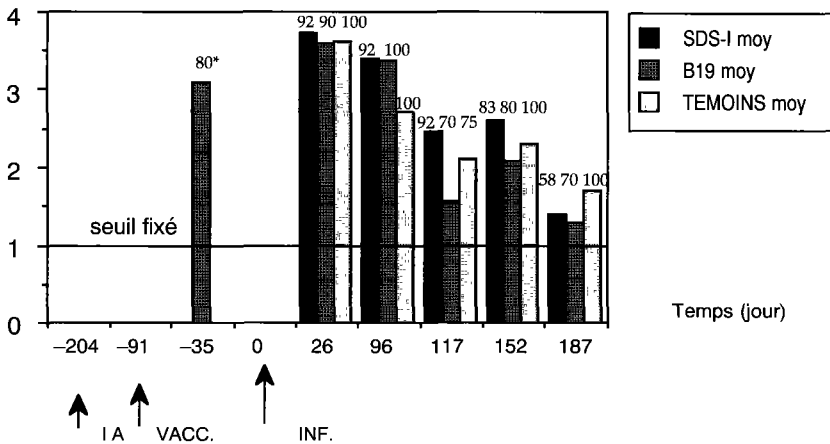


Figure 1. Pourcentages cumulés d'avortements par lot et par quinzaine après l'infection expérimentale par *Brucella abortus* 544.

Par rapport au lot témoin, le pourcentage de rétentions d'arrière-faix, de métrites et de mammites observées dans le lot SDS-I est moindre et moindre encore avec le lot B19 (résultats non montrés).

Suivi de la réponse cellulaire par intradermo-réaction

Les intradermo-réactions (IDR) réalisées avec le Brucellergène de Rhône-Mérieux se sont révélées positives après vaccination B19 pour 80 % des bovins et négatives après vaccination avec la fraction SDS-I (Figure 2). Vingt-six jours après l'infection, 9% des animaux présentaient une IDR positive qu'ils aient été ou non vaccinés. Les animaux qui n'ont pas réagi le 26^{ème} jour ont réagi ultérieurement (résultats individuels non présentés). A part pour 1 génisse, l'infection pouvait être décelée avant l'avortement par le test cutané. Plus on s'écarte du jour de l'infection, plus on constate une décroissance de l'intensité moyenne de l'IDR avec le Brucellergène. Cette décroissance pourrait être mise en relation avec les taux d'anticorps qui augmentent graduellement mais également avec un phénomène de désensibilisation suite aux IDR successives.



* % de bovins positifs à l'IDR par lots.
I.A. : insémination artificielle.

Figure 2. Cinétique par lot de la différence d'épaisseur de peau moyenne de l'IDR avec la Brucellergène (exprimée en mm).

Suivi de la réponse humorale anti-LPS

La réponse humorale anti-LPS des animaux de chaque lot a été suivie par un test ELISA indirect en sensibilisant les plaques par du LPS W99-Rev1 et en utilisant le conjugué 1C8. A titre de comparaison, les tests classiques usuels d'agglutination en présence d'EDTA et de déviation du complément ont également été réalisés.

Les bovins non vaccinés et vaccinés à l'aide de la fraction SDS-I présentent un profil sérologique homogène à l'intérieur de chaque lot. Les Figures 3 et 4 illustrent l'évolution sérologique pour un animal représentatif de chaque lot. Le suivi sérologique post-vaccinal montre que c'est avec l'ELISA que les titres les plus importants en anticorps anti-LPS sont observés.

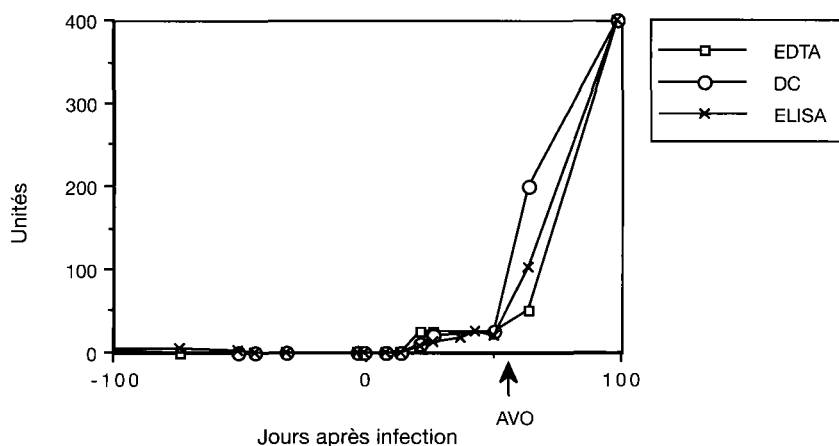


Figure 3. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°4, non vacciné et ayant avorté.

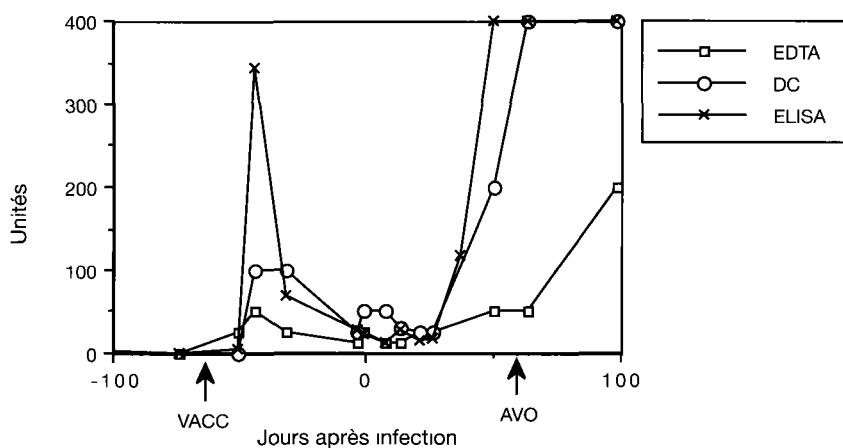


Figure 4. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°15, vacciné avec la fraction SDS-I et ayant avorté.

Les bovins vaccinés B19 présentent des profils sérologiques différents selon qu'il y ait eu ou non avortement et isolement de *B. abortus* 544 dans les produits d'excrétion et sur la carcasse (Figures 5 et 6). Cependant, que l'animal ait avorté ou mis bas, c'est avec

l'EDTA que l'on observe la réponse humorale post-vaccinale la plus importante. Pour le bovin N°9 (Figure 5), les isolements bactériologiques au vêlage (jour 126) et sur la carcasse sont négatifs et l'infection n'induit pas une séroconversion. Par contre, pour le bovin n°8 (Figure 6), l'inoculation d'épreuve entraîne une nouvelle séroconversion.

Dans les conditions expérimentales, le suivi hebdomadaire du taux d'anticorps anti-LPS par ELISA aurait permis de prédire l'avortement. Les animaux ayant mis bas un veau non infecté n'ont pratiquement pas présenté d'augmentation du taux d'anticorps anti-LPS suite à l'infection. La réponse vaccinale anti-LPS de ces derniers était déjà bien diminuée au moment de l'infection.

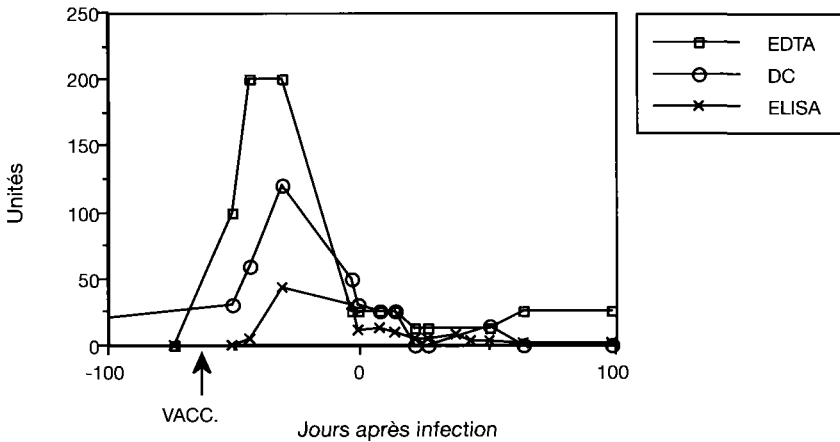


Figure 5. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°9, vacciné avec la souche B19 et ayant surmonté l'infection.

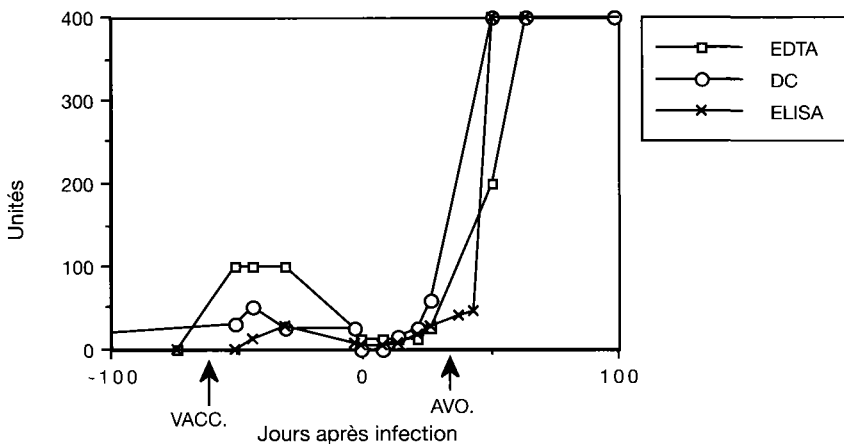


Figure 6. Evolution des titres sérologiques observés chez le bovin n°8, vacciné avec la souche B19 et qui a avorté.

Suivi de la réponse humorale contre les protéines de *Brucella*

Les immuno-empreintes sur extrait protéique de *B. abortus* 45/20, réalisées à l'aide des sérums prélevés 135 jours après l'infection, font ressortir que c'est pour la zone de 60 kDa qu'un fort pourcentage des génisses qui ont avorté ou donné naissance à un veau infecté produisent des anticorps. La zone située entre 14,5 et 17 kDa semble également intéressante puisqu'un grand nombre de génisses produisent également des anticorps qui y révèlent une ou plusieurs bandes.

Des protéines recombinantes correspondant aux OMPs 16,5, 19, 25, 36 de *Brucella* ont également été utilisées en ELISA indirect. Une réponse humorale a été mise en évidence uniquement contre la protéine de 16,5 kDa mais celle-ci est trop tardive pour être utilisable (Tableau I).

Tableau I. Nombre de bovins détectés par des tests ELISA utilisant des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux.

Test ELISA	Nombre de bovins détectés par le test					total n=26
	lot témoin n=4	lot B19 ayant donné			lot SDS-I n=12	
		avortons	veaux infectés	veaux non infectés		
		n=4	n=3	n=3		
<u>Indirect</u>						
PR 16,5 kDA	1**	1*, 2**	1**	2**	2*, 5**	5*, 9**
PR 19 kDA	0	0	0	0	0	0
PR 25 kDA	0	0	0	0	0	0
PR 36 kDA	0	0	0	0	0	0
<u>Compétition</u>						
anti-15,7 kDA	2**	4*	3*	0	11*, 1**	18*, 3**
anti-16,5 kDA	1**	2**	1**	1**	2*, 6**	2*, 11**

PR : protéine recombinante

* : avant avortement ou vêlage

** : après avortement ou vêlage

Afin d'investiguer plus en profondeur la réponse humorale observée en immuno-empreinte dans la zone de 14,5 à 17 kDa, deux anticorps monoclonaux reconnaissant respectivement des protéines de masse moléculaire estimées à 15,7 et 16,5 kDa ont été utilisés en ELISA de compétition. L'AcM anti-15,7 détecte 91 % des génisses avortées ou ayant donné naissance à un veau infecté, dont 78 % avant avortement ou vêlage (Tableau 1). Les données obtenues au moyen de l'anticorps anti-16,5 confirment le caractère tardif de la réponse contre cette protéine déjà observée en ELISA indirect.

Suivi bactériologique

Tous les prélèvements à l'abattage ont été négatifs pour seulement 7 des 26 génisses infectées : une génisse non vaccinée, 5 génisses vaccinées B19 dont 4 ont vêlé normalement et une vaccinée avec la fraction SDS-I (Tableau II). Pour toutes les génisses testées sauf une (n°9, vaccinée B19), il a été possible d'isoler *B. abortus* 544 à partir de prélèvements diversifiés lors des avortements ou des vêlages. Sur les carcasses des génisses ayant avorté ou vêlé, le prélèvement de rate permet plus facilement que celui de foie ou d'utérus de mettre en évidence *B. abortus*. Parmi les ganglions prélevés sur l'ensemble des carcasses, *B. abortus* est le plus facilement mis en évidence à partir des ganglions rétro-mammaires et rétropharyngiens. Les taux de réussite sur ces ganglions sont respectivement de 61 et 36%.

Discussion et conclusion

Bien que la fraction SDS-I ait retardé les avortements et que l'infection puisse être décelée avant l'avortement par le test cutané, cette fraction confère une protection inférieure à celle que confère le vaccin B19, qui pourtant a été administré à faible dose.

Dans les conditions de notre expérience, le suivi hebdomadaire du taux d'anticorps anti-LPS par ELISA aurait également permis de prédire l'avortement, que les génisses soient vaccinées ou pas, et ceci plus précocement que les tests classiques usuels.

Une étude de la réponse humorale contre les protéines de *Brucella* réalisée en immuno-empreinte a permis d'identifier deux zones intéressantes situées respectivement aux alentours de 60 kDa et entre 14,5 et 17 kDa. La ou les protéines reconnues dans la première zone pourraient bien être des protéines de chocs thermiques. En effet, d'une part Lin *et al* [10] décrivent chez *Brucella* une protéine de choc thermique de 62 kDa, et d'autre part l'antigène commun des Enterobactériacées a été identifiée comme une protéine de choc thermique ayant une masse moléculaire de 60 kDa. Les protéines de cette zone pourraient donc être des antigènes potentiels pour le diagnostic à condition d'en identifier et d'en isoler les épitopes spécifiques de *Brucella* car les protéines de choc thermiques sont connues pour être très conservées. L'ELISA indirect à l'aide de protéines recombinantes n'a permis de mettre en évidence qu'une protéine immunogène : la protéine recombinante de 16,5 kDa. Cependant, les génisses produisent des anticorps contre cette protéine assez tardivement et généralement après l'avortement. Quant à l'ELISA de compétition, il a, d'une part, confirmé ce qui a été observé en ELISA indirect avec la protéine recombinante correspondant à l'OMP 16,5 et, d'autre part, a permis d'identifier une protéine contre laquelle toutes les génisses vaccinées qui ont avorté ou bien mis bas un veau infectée, produisent des anticorps. Cette réponse humorale est par ailleurs généralement détectée avant l'avortement ou le vêlage infectieux. Une légère réponse a toutefois été observée contre cette protéine de 15,7 kDa chez 80 % des animaux suite à la vaccination par B19.

En ce qui concerne les deux vaccins, on remarque que pour la fraction SDS-I, les titres maxima en anticorps anti-LPS sont observés avec l'ELISA qui révèle des IgG1 bovins, la séro-agglutination (EDTA) étant la technique qui détecte les titres les plus faibles. Par contre, avec le vaccin B19 c'est l'inverse qui est observé puisque c'est avec l'EDTA que l'on observe les titres les plus importants. Cette séro-agglutination met en évidence des

Tableau II. Résultats des cultures de prélèvements réalisés lors des avortements ou vélages, après le vêlage et sur les carcasses.

bovin	Durée	Culture de prélèvements				Culture sur lait et mucus	Culture sur prélèvements				Culture sur les veaux (3)
	de ges- tation	diversifiés lors d'avortement ou vêlage					de la carcasse				
	en jours	Avortée ou Vêlée	avorton (1)	Arrière -faix	Colostrum (2)		ggl's+/tot ggl's (4)	Foie	Rate	Utérus	
Contrôle infection											
1	204	A	+	+	+	+	6/7	+	+	-	
2	223	A	+	+	+	+	1/5	-	-	-	
3	202	A	+	+	+	+	0/7	-	-	-	
4	215	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
Vaccin Buck 19											
5	252	A	+	+	+	+	3/7	ND	-	+	
6	287	V	cf veau	+	-	+	0/7	-	-	-	-
7	284	V	cf veau	+	+	+	1/8	-	-	-	-
8	206	A	+	+	+	+	5/7	-	+	-	
9	289	V	cf veau	+	-	-	0/8	-	-	-	-
10	249	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
11	248	A	+	+	+	+	0/7	-	-	-	
12	282	V	cf veau	+	+	+	2/7	-	-	-	-
13	271	V	cf veau	+	+	+	0/8	-	-	-	-
14	289	V	cf veau	+	-	+	0/8	-	-	-	-
Fraction SDS-I											
15	244	A	+	+	+	+	1/7	-	-	-	
16	246	A	+	+	+	+	0/2	ND	ND	-	
17	254	A	+	+	+	+	6/8	-	+	-	
18	253	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
19	238	A	+	+	+	+	7/7	-	+	-	
20	251	A	+	+	+	+	3/8	-	-	-	
21	251	A	+	+	+	+	3/8	-	-	-	
22	241	A	+	+	+	+	4/8	-	-	-	
23	244	A	+	+	+	+	6/8	-	+	-	
24	257	A	+	+	+	+	1/8	-	-	-	
25	256	A	+	+	+	+	4/8	-	-	ND	
26	243	A	+	+	+	+	1/7	-	-	-	

ND : non déterminé ;

(1) : liquide de caillotte, rate, foie, poumon ;

(2) : colostrum prélevé quartier par quartier ;

(3) : utérus, testicules, rate, foie, ganglions rétro mammaires, mésentérique, iliaques, préscapulaires, bronchiques, rétropharyngiens, sous-maxillaires et parotidiens ;

(4) : utérus, rate, foie, ganglions rétro mammaires, mésentérique, iliaques, préscapulaires, bronchiques, rétropharyngiens, sous-maxillaires et parotidiens.

IgG2 et ou des IgM et non des IgG1 comme pour l'ELISA. C'est peut-être en partie dans la différence des fonctions biologiques des IgG1 et IgG2/IgM induits par les deux types de vaccination qu'il faut trouver la différence de protection observée au cours de l'expérience. Dès lors, il serait envisageable d'améliorer l'activité protectrice de la fraction SDS-I, soit en orientant correctement la réponse humorale, soit en incluant dans cette fraction un ou des antigène(s) protecteur(s) indispensable(s) et non encore identifié(s). Sur cette base, il serait possible de développer un vaccin et un/ou des test(s) de diagnostic utilisant des antigènes différents, capables d'assurer une protection adéquate et de permettre la discrimination entre des animaux vaccinés et infectés. Les protéines cytoplasmiques ne présentant pas d'activité protectrice dans le modèle murin semblent des candidats très intéressants pour le développement d'un test allergique.

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (IRSIA), le Fonds de Santé et Production des Animaux (convention n°5300A) et par la Région Wallonne (convention n°2285).

Nous remercions G. Dubray et le personnel affecté aux stations expérimentales de l'Unité de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie de l'INRA à Tours. Nous remercions aussi l'INRV à Machelen pour l'entretien et la contention des génisses. Nos remerciements s'adressent également au Centre de Dépistage des Maladies Animales d'Erpent qui a bien voulu réaliser en parallèle les tests classiques d'agglutination et de déviation du complément. Merci également à D. Gilson et M.N. Mattot pour leur aide technique.

Références

1. Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. (1975) Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. Genève : WHO Monograph. ser.n°55,177 p.
2. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. *et al.* (1988) Techniques for the Brucellosis laboratory. Paris : INRA : 190 p.
3. Bosseray N., Plommet M. (1980). Antagonism between two immunogens extracted from *Brucella* (cell-wall peptidoglycan and lipopolysaccharide fractions) and inactivity of the brucelline allergen in immunization of the mouse. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur); 131A : 157-169.
4. Cherwonogrodzky *et al.* (1990).
5. De Waele L., Saegerman C., Gilson D., Thiange P., Vo T. K-O., Limet J.N., Letesson J-J. (1993). Field evaluation of three serum ELISA using monoclonal antibodies or protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Soumis pour publication.
6. Dubray G., Plommet M. (1976). Structure et constituants des *Brucella*. Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. International Symposium on Brucellosis, Rabat, 1975. *Dev Biol Standard.*, 31 : 68-91. S. Karger, Basel, .
7. Dubray G., Limet J.N., Cloeckaert A., Jacques I. (1992). Identification des antigènes protecteurs et mécanismes de la protection. Proceedings in the International Seminar, La Valette, Malte, 28-30 Oct. 1991 In : Plommet M. éd. *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries*, Pudoc Publishers, Wageningen : 9-24.
8. Letesson *et al.* (1985).
9. Limet J.N., Vo T. K-O., Saegerman C., De Waele L., Tibor A., Cloeckaert A., de Wergifosse

- P., Trunde J-M., Zygmunt M., Letesson J-J., Dubray G. (1992). Identification et clonage des antigènes de diagnostic de la brucellose : perspectives d'application. Proceedings in the International Seminar, La Valette, Malte, 28-30 Oct. 1991 In : Plommet M. éd. *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries*, Pudoc Publishers, Wageningen, : 252-264.
10. Lin J., Adams L.G., Ficht T.A. (1992) Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun* ; 60 (6) : 2425-2431.
 11. Plommet M. (1984). Progrès récents en immunisation contre l'infection à *Brucella abortus*. Immunisation chez les bovins. *Prev Vet Med* ; 2 : 205-214.
 12. Saegerman C., Limet J.N., Vo T. K-O., De Waele L., Gilson D., Bastin A., Dubray G., Letesson J-J. (1993). Diagnostic de la brucellose bovine par intradermoréaction : mise au point des conditions d'utilisation et première évaluation. Soumis pour publication.
 13. Thiange P., Saegerman C., Botton Y., Limet J.N. (1992). Brucellose bovine : le test d'agglutination en présence de facteur rhumatoïde après traitement du sérum par le dithiotréitol, dans la différenciation des animaux vaccinés et infectés. *Ann Méd Vét* ; 136 : 471-476.

23

Atténuation de 4 isolats de *Theileria annulata* en culture cellulaire à long terme : résultats préliminaires d'une étude *in vitro* du polymorphisme parasitaire par des marqueurs enzymatiques, antigéniques et génomiques, et *in vivo* du degré d'atténuation et du pouvoir protecteur

M.E.A. DARGHOUGH *, L. BEN MILED*, A. BOUATTOUR **, M. KILANI*

* *Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi-Thabet, Tunisie.*

** *Institut Pasteur, Tunis, Tunisie.*

Quatre isolats de *T. annulata* collectés dans 3 zones bioclimatiques de Tunisie (Figure 1), (zone sub humide = isolat Béja, zone semi-aride = isolats Batan 2, Djedeida 4 et Sousse, et zone aride = isolat Kairouan) ont été maintenus en culture lymphoblastique à long terme (2 ans) en vue de leur atténuation pour la mise au point d'un vaccin vivant atténué. Au cours de cette période, ces 4 isolats ont été suivis *in vitro* par des marqueurs phénotypiques et génomiques, et *in vivo* par l'étude de la virulence et du pouvoir protecteur envers des infections d'épreuve par des surnageants de broyats de tiques infectées par *T. annulata* (S.B.T.I.).



Figure 1. Carte des régions bioclimatiques de Tunisie.

H : Etage bioclimatique humide
 SH : Etage bioclimatique sub-humide
 SA> : Etage bioclimatique semi-aride supérieur
 SA< : Etage bioclimatique semi-aride inférieur

A> : Etage bioclimatique aride supérieur
 A< : Etage bioclimatique aride inférieur
 S : Etage bioclimatique saharien

Etude *in vitro*

Le polymorphisme des 4 isolats a été étudié pour les cultures non atténuées (moins de 10 passages), ainsi qu'au bout de 6 mois (passage 50), 12 mois (passage 100) et 24 mois de culture (passage 200) par :

- électrophorèse des isomères de la glucose phosphate isomérase,
- l'anticorps monoclonal polymorphique 7E7 mis au point par le laboratoire d'Immunopathologie et d'Hématologie de la faculté de Médecine de Tunis. Cet anticorps spécifique du stade schizonte reconnaît une bande antigénique de 30 à 32 kD,
- une sonde génomique polymorphique, la sonde Ta T17, développée au laboratoire d'Immunopathologie et d'Hématologie de la faculté de Médecine de Tunis à partir d'un isolat de *T. annulata*.

Les résultats obtenus sur les cultures non atténuées, ainsi qu'aux passages 50, 100, et 200 (p50, p100 et p200) à l'aide des différents marqueurs, sont consignés dans le Tableau I.

Tableau I. Résultats obtenus avec la GPI.

	Sous-population(s) détectée(s) par électrophorèse de la GPI			
	Stade schizonte en culture cellulaire			
	Passage < 10	Passage 50	Passage 100	Passage 200
Batan 2	2 (I et II)*	1 (II)	1 (II)	1 (II)
Béja	1 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)
Djedeida 4	3 (I,II,III)	3 (I,II)	3 (I,II)	1 (II)
Sousse	2 (I,II) 1 majeure 1 mineure	1 (I) Persistance de la sous- population mineure	1 (I)	1 (I)

* : Les chiffres romains attribués aux sous-populations correspondent à l'ordre de localisation sur l'axe anode cathode

Sur les cultures non atténuées, les 3 marqueurs utilisés dans ce travail confirment l'existence d'un polymorphisme entre les 4 isolats étudiés. De plus la GPI et la sonde génomique Ta T17 révèlent à l'intérieur des isolats Batan 2, Sousse et Djedeida 4 la présence de sous populations distinctes (Tableau II).

Après culture à long terme des 3 isolats polymorphiques (Djedeida 4, Batan 2 et Sousse), la GPI montre une réduction du polymorphisme avec le maintien par isolat d'une seule sous population, probablement la plus adaptée aux conditions de culture. De plus,

cette sélection ne se fait pas toujours en faveur des sous populations dominantes, comme l'illustre le cas de l'isolat Sousse où seule la sous population mineure s'est maintenue. Il est par ailleurs intéressant de noter que pour Batan 2 et Sousse, où cette sélection s'est achevée plus précocement, dès le passage 50, l'atténuation *in vivo* est apparue plus rapidement qu'avec Djedeida 4.

Contrairement à la GPI l'anticorps monoclonal 7E7 n'a pas détecté de variations notables au sein des isolats à différents niveaux de culture. La seule modification a été notée avec Batan 2 où la sous population mineure reconnue par l'anticorps monoclonal 7E7 n'est plus visible dès le 50^{ème} passage.

Tableau II. Résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal 7E7 et la sonde génomique TaT 17 sur les 4 isolats à différents niveaux de culture.

	Anticorps monoclonal 7E7				Sonde TaT 17
	Passage < 10	Passage 50	Passage 100	Passage 200	Passage < 10
Batan 2	-*	-	-	-	3 sou-populations
Béja	+	+	+	+	1 sous-population
Djedeida 4	+	+	+	+	4 sous-populations **
Sousse	-	-	-	-	2 sous-populations

+ : Fluorescence sur > 80-95% des cellules

-* : Fluorescence sur 1-2% des cellules

- : Absence de fluorescence

** : Résultats confirmés après clonage

Etudes *in vivo*

Depuis Juin 1992, 3 essais ont été réalisés avec les isolats Béja p2 et p100, Batan 2 p2, p100 et p200 et Djedeida 4 p8, p100 et p200 en vue de déterminer leur état d'atténuation et la protection qu'ils déterminent.

Protocole général de l'étude

Chaque isolat à niveau donné de culture a été inoculé par voie sous cutanée à un groupe de 4 veaux Frison-Holstein âgés de 4 à 5 mois, à la dose de 2×10 cellules infectées provenant de cultures fraîches. La température des animaux a été prise quotidiennement, l'hématocrite, la parasitémie sur frottis sanguin et la parasitisme sur frottis ganglionnaire ont été suivis 3 fois par semaine. Entre les jours 26 et 44 de l'infection immunisante par les cultures cellulaires de *T. annulata*, les veaux ont subi une infection d'épreuve par des sur-nageants de broyats de tiques infectées par *T. annulata* (S.B.T.I). Pour chaque essai, des veaux témoins indemnes de theileriose ont été inoculés par le SBTI d'épreuve. Deux SBTI ont été utilisés dans ce travail : le SBTI Djedeida 4 préparé expérimentalement avec des tiques *Hyalomma excavatum* de la colonie de l'E.N.M.V, et administré à 1, 6 tique équi-

valent (te) et le SBTI Chergui préparé directement à partir de tiques *Hyalomma detritum* collectées dans une étable à endémie stable de theileriose (étable Chergui).

Trois essais ont été réalisés au cours de ce travail :

- Essai I conduit en juin-juillet 1992 avec Béja p1 Béja p100, Djedeida 4 p8 et Djedeida 4 p200. Les veaux immunisés ont subi une infection d'épreuve par le SBTI Djedeida 4 à 1,6 te au 28^{ème} jour pour Béja p02, Béja p100 et Djedeida 4 p100 et au 26^{ème} jour pour Djedeida 4 p8. A la suite de l'infection d'épreuve, 3 veaux du groupe Béja p100 ont été traités par la buparvaquone (Butalex ND). Ce traitement a été instauré sur la base des critères suivants :

- T° > 40° C pendant plus de 5 jours
- Parasitémie > 50‰
- Hématocrite < 20%.

- Essai II ayant eu lieu en novembre 1992 - janvier 1993 avec les isolats Batan 2 p2, Batan 2 p100, Batan 2 p200 et Djedeida 4 p200. Au 44^{ème} jour les veaux immunisés ainsi qu'un animal témoin, ont subi l'inoculation d'épreuve au SBTI Djedeida 4 à 1,6 te. Au cours de cet essai 1 veau du groupe Batan 2 p2 et un autre du groupe Djedeida 4 p200 ont succombé des suites d'une indigestion acide, consécutive à un excès accidentel d'aliment concentré.

- Essai III : il a été effectué en mai-juillet 1993 avec les isolats Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200. L'inoculation d'épreuve a eu lieu au jour 31 avec le SBTI de terrain Chergui à la dose de 7 te. Ce SBTI a été pré-titré sur 2 groupes de 2 veaux x infectés respectivement par 5 et 10 te, un troisième lot de 2 veaux témoins a été infecté par le SBTI Chergui à 7 te en même temps que les groupes immunisés.

Résultats et discussion

Les résultats moyens obtenus au cours de ces différents essais sont rapportés dans les Tableaux III, IV et V respectivement pour les réactions à l'infection immunisante et aux inoculations d'épreuve par les SBTI Djedeida 4 et Chergui.

Les 3 isolats non atténués testés dans ce travail présentent des degrés de virulence variables, Djedeida 4, l'isolat de plus complexe, étant notablement le plus pathogène (mortalité de 3 veaux /4) suivi de Batan 2 (mortalité 1 veau /4), et enfin Béja. Dans un autre travail non rapporté ici l'isolat Sousse a présenté une virulence intermédiaire entre Batan 2 et Béja.

Après culture à long terme les 3 isolats Béja, Batan 2 et Djedeida 4 ont présenté un état d'atténuation satisfaisant, avec une disparition des formes érythrocytaires, une réduction de la durée de la fièvre à moins de 2 jours notamment pour les températures > 40°, et une baisse relative de l'hématocrite de moins de 15% avec absence de valeurs d'hématocrite inférieures à 20%. Cette atténuation a été obtenue plus rapidement, à p100 avec Batan 2 et Béja et au contraire plus tardivement à p200 avec Djedeida 4 l'isolat le plus virulent.

Lors de l'essai III ayant eu lieu durant l'été 1993, les durées de fièvre > 39,5° ont été plus longues que dans l'essai II conduit en hiver et cela bien que dans les 2 cas les mêmes isolats Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200 aient été utilisés. Cette différence serait probablement due à la tendance des jeunes veaux, durant les périodes de chaleurs estivales, à

Tableau III. Résultats moyens après infection par les isolats en culture.

Groupe	Nombre de veaux	1 ^{er} jour de T ^e > 39,5°C	1 ^{er} jour de T ^e ≥ 40°C	Veaux en accès fébrile	Durée de l'accès fébrile	Baisse du HT* %	Nombre de jours HT* < 20	Jour apparition ME**	Veaux avec ME**	Traitement	Mortalité	Pic de parasitémie en %
Djed 4 p 08	4	15 (15-20)	17 (14-24)	4/4	6,75 (> 39,5) 3,5 (≥ 40)	50,41	7	16 (14-18)	4/4	3	3/4	7-338
Djed 4 p 101	4	16,75 (12-19)	15,25 (13-21)	4/4	9,75 4,75	23,52	0,5	24 (21-2)8	4/4	0	0/4	<1-9
Djed 4 p 200 (11/92-01/93)	4	13,33 (11-16)	13,33 (11-16)	3/4	3,25 2	13,01	0	31	1/4	0	0/4	0
Djed 4 p 200 (05/93-06/93)	4	13,75 (11-18)	15,75 (14-19)	4/4	6,75 2	14,32	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 02	4	14 (14-16)	14,75 (14-16)	4/4	9 5	25,09	0,5	15,5 (14-17)	4/4	0	1/4	6-276
Bat 2 p 100 (11/92-01/93)	4	18,25 (17-20)	18 (17-20)	4/4	1,5 0,25	9,5	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 100 (05/93-06/93)	4	13,33 (13-18)	18 (14-26)	3/4	7 1,75	10,32	0	-	0/4	0	0/4	0
Bat 2 p 200 (11/92-01/93)	4	14,25 (11-17)	13,5 (15-12)	4/4	3,25 0,75	9,66	0	-	0/4	0	0/4	0
Beja p 02	4	17,75 (17-18)	17,5 (17-18)	4/4	5 3,2	13,19	0	20,5 (14-26)	4/4	0	0/4	0
Beja p 100	4	12,67 (12-14)	12,5 (12-13)	3/4	2,25 0,75	6,31	0	0	0/4	0	0/4	0-<1

Tableau IV. Résultats moyens après inoculation d'épreuve par le SBTI Djedeïda 4.

Infection d'épreuve	Groupe 1 Lot témoin	Groupe 2 Beja P 02	Groupe 3 Beja p 100	Groupe 4 Djed 4 p 08	Groupe 5 Djed 4 p 101	Groupe 6 Djed 4 p 200 (11/92-01/93)	Groupe 7 Bat 2 p 02	Groupe 8 Bat 2 p 100 11/92-01/93)	Groupe 9 Bat 2 p 200
	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4	1,6 te Dje 4
Nbre veaux	4	4	4	01*	4	3	2	4	4
1 ^{er} jour de T° > 39,5	6	8,75	6,75	14	8	7,5	7,5	6,75	7
T° ≥ 40	6	12,5	7,75	14	10,25	8	8	7	7,75
Nbre jours à T° > 39,5	10,75	11,75	22	4	11,75	6	4	11,75	13,25
T° ≥ 40	10	4,25	15		4	2,5	2	7,75	10,25
Hématocrite minimum	22,5 12-34	24 19-30	18 15-20	14	25 20-29	28,33 23-31	31,5 29-34	16 11-21	18,75 Oct-28
Réduction de l'hématocrite	45%	13,35%	44,03%	32,24%	8,55%	16,65%	27,85%	60,96%	52,75%
Veaux traités	0	0	3	0	0	0	0	0	0
Veaux morts	4	0	0	0	0	0	0	1	0
Nbre de veaux à hématocrite < 20	2/4	1/4	2/4	1/1	0/4	0	0	3	2
Nbre de jours à hématocrite < 20	1,25	0,5	3	2	0	0	0	4,25 0-8	3,5 0-10
Parasitémie maximale (%)	50-790	<1-5	45-160	4 à 12	<1-1	<1-11	<1-5	24-387	7-326

Tableau V. Résultats moyens après inoculation par le SBTI Chergui.

	Group 10 Lot témoin SBTI Chergui 5 te	Group 11 Lot témoin SBTI Chergui 10 te	Group 12 Lot témoin SBTI Chergui 7 te	Group 13 Batan 2 p100 SBTI Chergui 7 te	Group 14 Djed 4 p200 SBTI Chergui 7 te
Nbre de veaux	2	2	2	4	4
1 ^{er} jour de					
T° > 39,5°C	6,5	7,5	6,5	7,5	7
T ≥ 40°C	7,5	10	8,5	7,5	8
Nbre de jours de					
T° > 39,5°C	20	21	20	10	12,75
T° ≥ 40°C	17,5	17	14	6,5	7
Hématocrite	16,5	13	23	22	20,5
minimum	16-17	13	15-31	18-27	16-27
Nombre de veaux morts	1/2	1/2	1/2	0	0
Nbre de veaux à hématocrite < 20	2/4	2/4	1/2	1/4	2/4
Nbre de jours à hématocrite < 20	1,5	6	2,5	1	3

présenter des températures comprises entre 39,5° et 40°C même en dehors de toute infection. Cependant en se référant aux valeurs thermiques ≥40°C on retrouve dans les deux essais des accès fébriles de durées très limitées.

L'infection d'épreuve par le SBTI Djedeida 4 à 1,6 te s'avère extrêmement virulente. En pratique dans les conditions de terrain, il est peu probable de trouver des infections similaires (infection exprimée en nombre d'acini infectés). Cette infection d'épreuve a cependant été utilisée ici dans l'unique but de mieux révéler des différences dans les niveaux de protection conférés par les cultures testées. D'ailleurs les résultats obtenus montrent que ce degré de protection :

- décroît nettement avec l'atténuation des isolats,
- dépend de la virulence de l'isolat utilisé.

Ainsi Batan 2 et Djedeida 4 protègent mieux que Béja, cette corrélation semble même persister avec les cultures atténuées. Cependant pour Djedeida 4 la meilleure protection obtenue serait probablement liée à l'utilisation d'un SBTI homologue.

Dans le cas de l'essai I l'infection d'épreuve aux jours 26 et 28 pour les groupes Djedeida 4 p8 et p100 est probablement trop précoce, étant données les répercussions importantes de l'infection immunisante sur l'état de santé des animaux, ce qui d'ailleurs expliquerait la protection plus élevée obtenue paradoxalement avec Djedeida 4 à p200 lors de l'essai II.

Enfin la survenue d'un cas de mortalité après infection d'épreuve dans le groupe Batan 2 p100 de l'essai II reste difficile à interpréter compte tenu de la possibilité d'intervention de plusieurs facteurs dans le développement de l'immunité vaccinale et la réaction à l'infection d'épreuve : mauvaise réponse à l'infection vaccinale, phénomène de rejet des cellules vaccinales et enfin réceptivité élevée à l'infection d'épreuve.

Les 2 isolats atténués Batan 2 p100 et Djedeida 4 p200 déterminent un état de protection relative similaire contre le SBTI Chergui à 7 te. Cependant par rapport aux essais précédents avec le SBTI Djedeida 4 cette protection apparaît :

- plus importante avec Batan 2 p100 étant donné la moindre virulence du SBTI Chergui,
- au contraire plus faible avec Djedeida 4 p200 étant donné le caractère hétérologue de ce SBTI.

A la suite des résultats de ces 3 essais l'isolat Batan 2 p100 a été retenu en vue d'essais ultérieurs d'évaluation en conditions expérimentales et sur le terrain pour les raisons suivantes:

- protection relative contre le SBTI Djedeida 4 et le SBTI Chergui, ce dernier étant probablement plus représentatif d'une infection naturelle,
- rendement plus élevé en culture avec formation d'une suspension cellulaire homogène,
- viabilité plus importante après conservation à température du laboratoire (20°C).

Bibliographie

1. Ben Miled L., Darghouth M., Bernadi G., Dellagi K. (1991). Discrimination between Tunisian *Theileria annulata*. In : Singh D.K., Varshney B.C., eds. *Proceedings of the second EEC workshop on orientation and coordination of research on tropical theileriosis*. NDDB, ANAND, INDE : 47.
2. Brown C.G.D. (1987). Theileridae. In : Taylor A.E.R., Baker J.R., eds. *In vitro methods for parasites cultivation*. Academic Press, Londres : 230-253.
3. Darghouth M.E.A., Ben Miled L., Bouattour A., Kilani M., Brown C.G.D. (1992). Epidemiological investigation on tropical theileriosis in Tunisia with relevance to the production of a live attenuated vaccine. EEC contractant Workshop on Resistance or Tolerance to Diseases and Veterinary Epidemiology and Diagnostic Methods. 2-6 Nov 1992, Rethymno, Ile de Crète, Grèce.
4. Melrose T.R., Brown C.G.D., Sharma R.D. (1990). Glucose phosphate isomerase patterns in bovine lymphoblastoid cell lines infected with *T. annulata* and *T. parva* with an improved enzyme visualisation method using meldola Blue. *Res Vet Sci* ; 29 : 298-304.

24

Les glycoprotéines des herpès virus bovins 1 et 4

E. THIRY*, E. BARANOWSKI*, P. LOMONTE*, A. VANDERPLASSCHEN*,
M. BUBLOT**, J. DUBUISSON***, P.P. PASTORET*

* *Virologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Sart-Tilman, Liège, Belgique.*

** *Rhône Mérieux, Laboratoire IFFA, Lyon, France.*

*** *Department of Molecular Microbiology, Washington University, School of Medicine Saint Louis, USA.*

Résumé

Les glycoprotéines des herpès virus jouent un rôle primordial dans la conception des vaccins dirigés contre ces virus. D'une part, certaines glycoprotéines possèdent des propriétés immunogénétiques qui en font des composants essentiels des vaccins. D'autre part, l'absence, dans le vaccin, d'une glycoprotéine non essentielle pour la multiplication du virus offre le moyen de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement.

L'étude des glycoprotéines mineures de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) vise à caractériser des glycoprotéines non essentielles, dont le gène peut être décelé. Une stratégie particulière a été utilisée pour préparer l'antigène destiné à l'immunisation des souris : les glycoprotéines majeures gI, gII et gIV ont été éliminées d'une suspension de glycoprotéines de BHV-1 par immunoaffinité. Les anticorps monoclonaux obtenus par cette

méthode ont permis d'identifier trois glycoprotéines du BHV-1 : il s'agit de gp42, gp93 et gp108.

L'étude des glycoprotéines de l'herpès virus bovin 4 (BHV-4) est destinée à préciser leur rôle biologique dans l'infection virale. Le rôle du BHV-4 dans certaines maladies du bétail amène à considérer le développement des vaccins. Le caractère non-pathogène de certaines souches de BHV-4, comme la souche V.Test, permet leur utilisation comme vecteur viral d'expression de gènes, par exemple dans la perspective de vaccins recombinants pour le bovin. Les gènes codant pour les glycoprotéines non essentielles du BHV-4 sont également des sites potentiels d'insertion de gènes étrangers. Quatre glycoprotéines majeures ont été identifiées : gp1, gp6/gp10/gp17, gp8 et gp11. La glycoprotéine gp8 est impliquée dans la phase d'adsorption du virus sur la membrane cellulaire, par interaction avec les héparan sulfates. L'analyse du génome du BHV-4 a permis de localiser les gènes codant pour les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex. Les séquences des gènes des deux glycoprotéines gH et gL ont été obtenues. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines est la première étape de l'étude qui permettra de définir lesquelles sont essentielles pour la multiplication virale.

Les glycoprotéines des herpès virus jouent un rôle primordial dans les interactions entre ces virus et leurs cellules-hôtes. En effet, ces molécules, présentes à la surface de l'enveloppe virale sont responsables de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule sensible. A la fin du cycle de multiplication virale dans la cellule, les glycoprotéines sont également impliquées dans les phases de maturation et de sortie du virus, ainsi que dans la propagation du virus de cellule à cellule. Les rôles fonctionnels des glycoprotéines des herpès virus sont donc multiples; ils sont supportés par au moins 10 molécules différentes (glycoprotéines gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM chez le virus herpès simplex (HSV)).

Les glycoprotéines sont des cibles importantes pour la réponse immunitaire de l'hôte. Tant la réponse humorale que la réponse cellulaire sont dirigées contre elles, mais pas de manière exclusive. Aussi, certaines glycoprotéines possèdent des propriétés immunogéniques qui en font des composants essentiels du vaccin. D'autre part, certaines glycoprotéines sont non essentielles, c'est à dire qu'elles ne sont pas indispensables pour la multiplication virale. La délétion du gène codant pour une telle glycoprotéine n'affectera que d'une façon mineure la multiplication du virus. Cette approche a donc été récemment développée pour produire des virus vaccinaux porteurs d'un marqueur sérologique : l'absence d'une réponse sérologique envers la glycoprotéine permet de différencier l'animal vacciné de l'animal infecté de manière naturelle.

L'étude des glycoprotéines des herpès virus 1 et 4 (bovine herpes virus 1 et 4 : BHV-1, BHV-4) revêt donc une importance particulière dans la perspective du développement de vaccins porteurs de délétion dans le cas du BHV-1 et de vecteurs viraux dans le cas du BHV-4. Le présent travail a donc pour but de caractériser les glycoprotéines des deux virus et de préciser leurs rôles dans la biologie de l'infection virale.

Les glycoprotéines gp42, gp93 et gp108 de l'herpès virus bovin 1

Le BHV-1 appartient à la sous-famille des *alphaherpes virinae*. C'est un virus pathogène du bétail responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine, d'avortement et de conjonctivite, ainsi que d'une affection génitale dénommée la vulvo-vaginite infectieuse pustuleuse [14]. Quatre glycoprotéines ont déjà été identifiées par anticorps monoclonaux sur l'enveloppe virale du BHV-1 et sur la membrane plasmique des cellules infectées : gI est un hétérodimère de 130 K composée de deux polypeptides de 74 et 55 K liés par des ponts disulfures; gII est une glycoprotéine de 108 K; gIII et gIV sont des glycoprotéines dimériques, respectivement de 180/91 et 140/74 K [26,27,28]. Les glycoprotéines gI, gIII et gIV jouent un rôle très important dans le développement d'une réponse immune protectrice et dans la biologie de l'infection virale. Bien que gIII ne soit pas essentielle pour la multiplication virale, cette glycoprotéine intervient dans l'attachement viral par interaction avec les héparan sulfates de la membrane cellulaire [18]. Les glycoprotéines gI et gIV sont essentielles pour l'infectivité du virus. Elles interviennent également dans l'attachement : gI et principalement gIV sont impliquées dans la pénétration virale, le phénomène de fusion et le passage de cellule à cellule.

La production de vaccins porteurs de délétion envers le BHV-1 est orientée dans deux directions. La première approche a conduit à une délétion dans le gène codant pour la glycoprotéine gIII. Un BHV-1 porteur d'une telle délétion protège les bovins contre l'épreuve virulente [16]. Néanmoins, cette glycoprotéine gIII est un immunogène majeur pour la réponse de cytotoxicité médiée par les lymphocytes T [4], et elle possède un rôle fonctionnel important dans l'attachement du virus sur la cellule. Le gène codant pour gIII n'apparaît donc pas comme le meilleur site de délétion. La deuxième approche utilise le gène codant pour la glycoprotéine gE comme site de délétion [23], en s'appuyant sur les résultats obtenus chez le virus de la maladie d'Aujeszky par délétion du gène codant pour la glycoprotéine homologue gI [20]. Il existe actuellement un manque crucial d'information sur d'autres glycoprotéines dont le gène pourrait être un site potentiel de délétion.

L'objectif de ce travail est d'identifier des glycoprotéines mineures du BHV-1 et d'étudier leurs propriétés dans la perspective de leur utilisation comme marqueur sérologique. L'analyse génomique du BHV-1 révèle en effet que, à l'instar du virus HSV, le virus possède au moins sept gènes de glycoprotéines : les gènes codant pour gI, gIII, gIV et gH ont été identifiés et séquencés [1]; les gènes codant pour les glycoprotéines gE, gI et gG homologues du virus HSV ont été localisés sur le génome du BHV-1. L'immunisation de souris avec un antigène contenant des virus BHV-1 complets a toujours mené à l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre les trois glycoprotéines majeures gI, gIII et gIV. Seuls deux anticorps monoclonaux anti-gII sont décrits dans la littérature [13,28]. Pour parvenir à produire des anticorps monoclonaux envers des glycoprotéines mineures, une stratégie particulière a été utilisée pour préparer l'antigène destiné à l'immunisation des souris : les glycoprotéines gI, gIII et gIV ont été éliminées d'une suspension de protéines de BHV-1 par immunoaffinité. Les anticorps monoclonaux obtenus par cette méthode ont permis d'identifier trois glycoprotéines de BHV-1 différentes de gI, gIII et gIV : il s'agit de gp42, gp93 et gp108.

Matériel et méthodes

Les méthodes de purification de l'antigène viral, d'obtention des anticorps monoclonaux, de radioimmunoprécipitation, d'électrophorèse en SDS-PAGE et le test de neutralisation virale sont décrits par Baranowski *et al.* [1].

Résultats

Plusieurs procédures d'immunisation de souris ont été utilisées. Les détails concernant chaque immunisation sont repris dans le Tableau I. Les surnageants d'hybridomes ont été criblés par immunofluorescence. Cent cinquante-quatre clones ont été obtenus. Les antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux ont été caractérisés par radioimmunoprécipitation de lysat de cellules infectées marquées à la glucosamine ^3H . Du lysat de cellules non infectées a été utilisé comme contrôle négatif.

Tableau I. Production d'anticorps monoclonaux envers les glycoprotéines de l'herpès virus bovin 1 selon les différentes procédures d'immunisation.

Anticorps monoclonaux	Source d'antigène pour l'immunisation des souris		
	lysat de virus	Lysat de cellules infectées	
		Tolérisation des souris par le lysat de cellules	Tolérisation des cellules par le lysat cellulaire plus gI, gIII, gIV et les nucléocapsides
Anti-BHV-1	82	60	12
Anti-gI	3	4	1
Anti-gIII	-	-	-
Anti-gIV	2	-	-
Anti-gp108	18	14	7
Anti-gp42	-	1	-
Anti-gp93	-	1	-

Les glycoprotéines précipitées par les anticorps monoclonaux provenant de lysat de cellules infectées marquées à la glucosamine ^3H ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices. Trois glycoprotéines virales ont été identifiées et dénommées gp108, gp42 et gp93 en fonction de leur poids moléculaire (Figure 1).

Du lysat cellulaire infecté ou non, marqué à la méthionine ^{35}S , a été utilisé pour compléter la caractérisation de ces glycoprotéines. En conditions réductrices, le même profil électrophorétique était observé pour gp108 ; la glycoprotéine gp42 était co-précipitée avec un polypeptide de 12,5 K (Figure 2). La glycoprotéine gp93 n'était pas détectée par le marquage à la méthionine ^{35}S . Néanmoins, gp93 était co-précipitée avec deux polypeptides de moindre intensité de 63 et 47 K. Le marquage à la leucine ^3H a permis d'observer cette glycoprotéine (Figure 2). En conditions non réductrices, le même profil

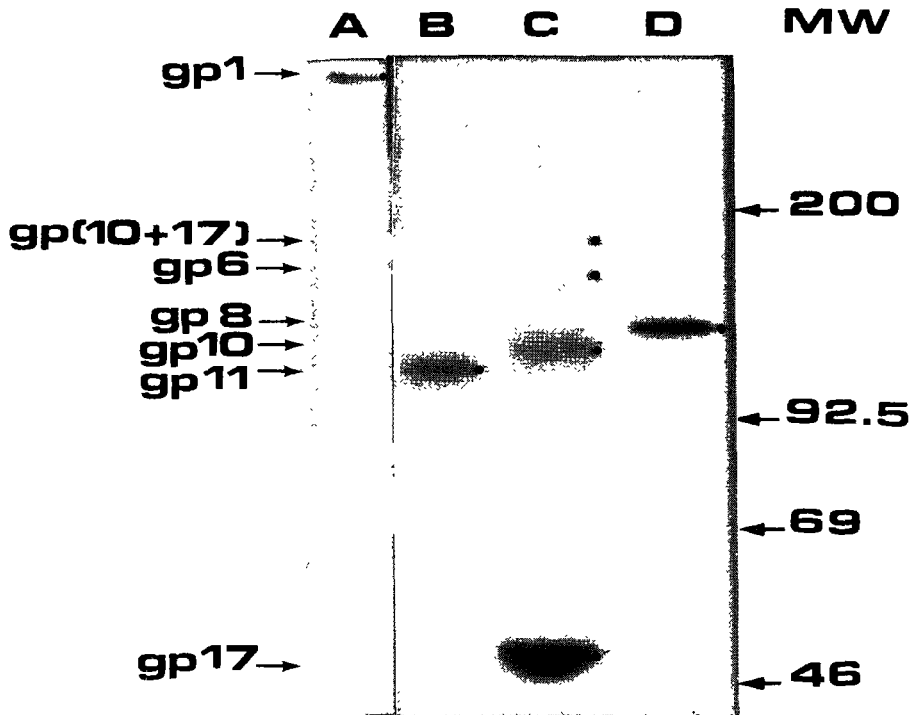


Figure 1. Profil des glycoprotéines de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) identifiées par les anticorps monoclonaux. Immunoprécipitation de polypeptides marquées à la glucosamine ^3H à partir de cellules infectées par le BHV-1 (V) ou de cellules non infectées (C). Electrophorèse SDS-PAGE (10%) en conditions réductrices. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp42 (A), anti-gp108 (B), et anti gp93 (C), ou par des IgG de lapin anti-immunoglobulines de souris, comme contrôle (D). Les valeurs des standards de poids moléculaire sont indiqués en marge de la figure (reproduit d'après Baranowski *et al.* [1], avec permission).

électrophorétique était observé pour gp42 et gp93, indiquant que des ponts disulfures n'étaient pas impliqués dans leur interaction avec les polypeptides co-précipités.

Neuf anticorps monoclonaux sur 32 dirigés contre gp108 ont neutralisé le BHV-1. Cette activité n'était pas influencée par la présence de complément. Trois anticorps monoclonaux anti-gp108 non neutralisants étaient capables de réduire le développement des plages de lyse lorsque le virus se multipliait en présence de ces anticorps monoclonaux. Aucune activité neutralisante n'a été détectée pour l'anticorps monoclonal anti-gp93 ni pour l'anticorps monoclonal anti-gp42.

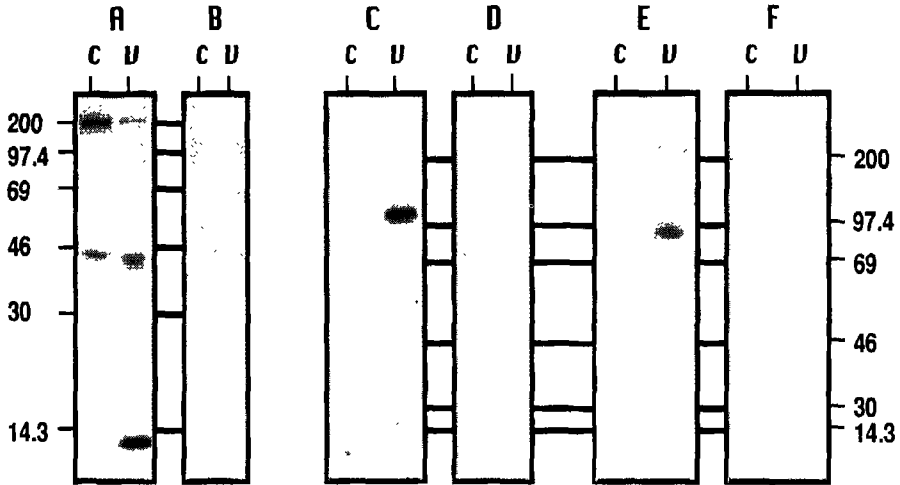


Figure 2. Profil des polypeptides de l'herpès virus bovin 1 (BHV-1) identifiées par les anticorps monoclonaux. Immunoprécipitation de polypeptides marqués à la méthionone ^{35}S (A,B,C,D) ou à la leucine ^3F (E,H) à partir de cellules infectées par le BHV-1 (V) ou de cellules non infectées (C). Electrophorèse en SDS-PAGE (15% : A, B; 10% : C, D, E, F) en conditions réductrices. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp42 (A), anti-gp108 (C), et anti-gp93 (E), ou par des IgG de lapin anti-immunoglobulines de souris (B, D, F). (reproduit d'après Baranowski *et al.* [1], avec permission).

Discussion

Trois nouvelles glycoprotéines du BHV-1 ont été identifiées dans le lysat de cellules infectées par le BHV-1. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines permettra de définir leur homologie avec des gènes de glycoprotéines du HSV. La glycoprotéine gp108 possède le même poids moléculaire que gII. Les deux glycoprotéines sont probablement identiques.

Le rôle fonctionnel de la gp108 a été approché par l'étude de l'effet d'anticorps monoclonaux anti-gp108 sur les plages de lyse. La réduction du développement des plages permet d'impliquer en première approche la glycoprotéine gp108 dans la transmission du virus de cellule à cellule. Cette transmission peut se produire par deux phénomènes : soit par fusion de cellules résultant dans l'apparition de polycaryons, soit par un passage direct sans fusion de membranes plasmiques. La formation de polycaryons est très rare dans les cultures de cellules infectées par le BHV-1. Il est donc probable que la gp108 agisse sur la transmission directe du virus de cellule à cellule. Le rôle fonctionnel des deux autres glycoprotéines reste à définir.

En conclusion, les trois nouvelles glycoprotéines identifiées sont des cibles potentielles pour le marqueur sérologique à introduire dans les vaccins de nouvelle génération contre la rhinotrachéite infectieuse bovine. Ce sont des glycoprotéines mineures, puisqu'elles sont présentes en faible quantité, mais leur caractère non essentiel n'est pas encore démontré. La réponse sérologique développée chez le bovin envers ces différentes glycoprotéines est en cours d'étude, de manière à vérifier leur intérêt comme marqueur sérologique.

Les glycoprotéines gp1, gp6/gp10/gp17, gp8 et gp11 de l'herpès virus bovin 4

Le bovine herpès virus 4 (BHV-4) est un herpès virus répandu dans le monde entier, appartenant à la sous-famille des *gama herpesvirinae*. Certaines souches de BHV-4 ont été isolées de bovins malades, d'autres ont été isolées de bétail apparemment sain ou même de culture de cellules primaires. Peu d'isolats de BHV-4 sont réellement pathogènes; la majorité d'entre eux n'induisent que peu de signes cliniques lors d'infections expérimentales de bovins [22,23].

Le BHV-4 infecte des cellules mononucléées sanguines [19]. Il peut être isolé virtuellement de tous les organes. Son isolement d'un tissu ou d'un organe ne signifie pas son rôle dans les lésions observées, mais peut simplement résulter de sa présence incidente dans des cellules sanguines au moment de la récolte du prélèvement. L'implication du BHV-4 dans les maladies du tractus génital est étayée par plusieurs résultats. Le virus a été associé à la métrite post-partum et la reproduction expérimentale de cette affection a été réussie [30]. Le virus a aussi été isolé de cas d'avortement, mais son rôle n'est pas définitivement élucidé [31].

Il existe donc un double intérêt à étudier les glycoprotéines du BHV-4. Tout d'abord, le rôle du BHV-4 dans certaines maladies du bétail amène à considérer le développement de vaccins. Ensuite, le caractère non pathogène de souches du BHV-4, comme la souche V.Test [5,7,21], permet leur utilisation comme vecteur viral d'expression de gènes, par exemple dans la perspective de vaccins recombinants pour le bovin. Les gènes codant pour des glycoprotéines non essentielles du BHV-4 sont en effet des sites potentiels d'insertion de gènes étrangers.

Matériel et méthodes

L'obtention des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4 est décrite dans Dubuisson *et al.* [6,11,12]). Les techniques de radioimmunoprécipitation et l'étude de la glycosylation par les enzymes endoglycosidase Fet N, et la glycosydase F, sont également décrits par les mêmes auteurs. Les techniques d'inhibition de l'adsorption virale par l'héparine, d'utilisation des enzymes héparinase I et chondroitinase ABC, la production de virus marqué par la thymidine ³H et la chromatographie d'affinité utilisant la sépharose-héparine sont décrites par Vanderplasschen *et al.* [25]. Les méthodes de séquençage du DNA et l'analyse par ordinateur des séquences sont décrites par Bublot *et al.* [3]).

Résultats

Vingt-neuf protéines structurales sont identifiées dans le virus purifié et une protéine de 140K est probablement la protéine majeure de capside [6]. Parmi ceux-ci, dix polypeptides sont glycosylés. Quatre glycoprotéines ont été caractérisées jusqu'à présent (Figure 3) : gp1 possède un haut poids moléculaire (>300K) et contient des glycans N-liés [12]. Gp6/gp10/gp17 est un complexe de trois glycopolypeptides contenant des glycans N-liés [8] : gp10 et gp17 sont liés par des ponts disulfures; gp6 est liée aux autres par des liaisons non covalentes. Le précurseur p(gp10/gp17) a aussi été identifié [6,10]. Gp8 est une glycoprotéine présente à la fois dans le virion et dans le milieu de culture des cellules

infectées [11]. Elle est peu glycosylée. Gp11 contient des glycans N-liés et est liée de manière non covalente à un polypeptide non glycosylé, VP24 [8,10].

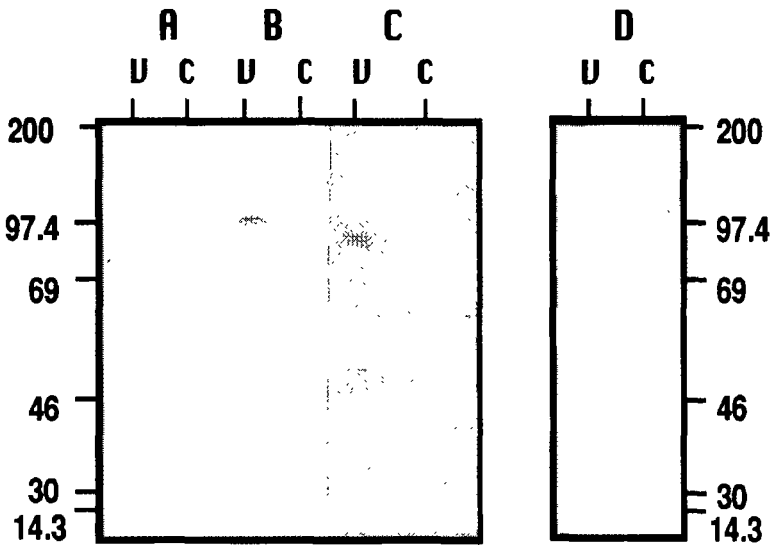


Figure 3. Profil des glycoprotéines du BHV-4. Immunoprécipitation de polypeptides marqués à la glucosamine ^3H à partir de lysats de cellules infectées. Les protéines sont précipitées par des anticorps monoclonaux anti-gp1 (A), anti-gp11 (B), anti-gp6/gp10/gp17 (C), anti-gp8 (D). (reproduit d'après Thiry *et al.* [24], avec permission).

Le rôle fonctionnel de la glycoprotéine gp8 a été étudié plus en détail. Cette glycoprotéine interagit avec les héparan sulfates présents à la surface de la cellule et intervient donc dans le processus d'adsorption du virus. Plusieurs données étayent ce résultat. L'héparine soluble est capable de bloquer l'infection de cellules GBK (*Georgia bovine kidney*) par le BHV-4, en inhibant l'attachement viral (Figure 4). Néanmoins, après adsorption du virus sur cellules GBK, l'héparine est capable de détacher partiellement le virus adsorbé. La digestion enzymatique des héparan sulfates de la surface cellulaire diminue la liaison des virus aux cellules et rend les cellules partiellement résistantes à l'infection, tandis que la digestion enzymatique des chondroïtines sulfates n'altère pas la liaison du virus aux cellules. Le BHV-4 purifié et marqué par un isotope radioactif se lie aux cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) K1, alors que la liaison du virus aux cellules CHO déficientes dans l'ensemble des glycosaminoglycans ou déficientes uniquement en héparan sulfate est significativement diminuée. Par chromatographie d'affinité envers l'héparine, la glycoprotéine gp8 a été connue comme la protéine virale se liant à l'héparine immobilisée. Elle est éluée en présence d'héparine soluble (Figure 5) [25].

Parmi les glycoprotéines du BHV-4 identifiées, il convient de définir lesquelles sont essentielles pour la multiplication virale. L'identification des gènes codant pour ces glycoprotéines est la première étape de cette étude.

La comparaison de séquences nucléotidiques disposées sur l'ensemble du génome du BHV-4 avec les génomes de l'herpès virus saimiri (HVS) et du virus Epstein-Barr (EBV)

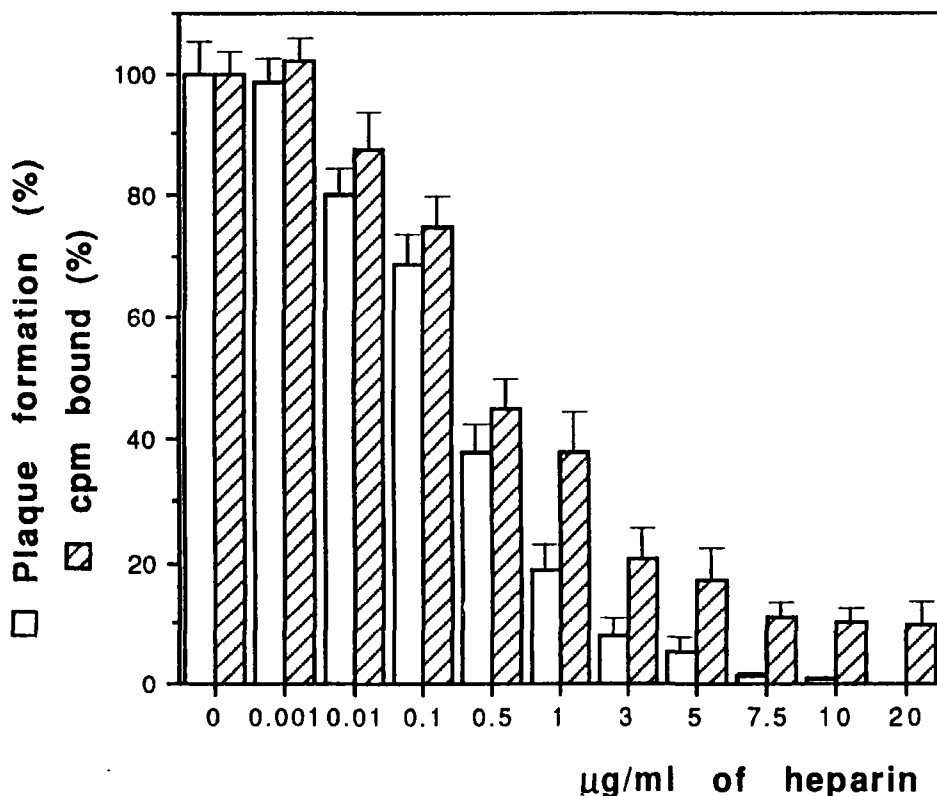


Figure 4. Effet de l'héparine sur la formation de plages de lyse et l'adsorption de BHV-4. Des cellules GBK confluentes ont été incubées à 37°C pendant 1 h avec du PBS contenant de l'albumine sérique bovine (PBSA) et les concentrations indiquées d'héparine et avec le virus purifié ou 10^5 cpm de virus purifié à la thymidine ^3H . Le contrôle représente environ 200 unités formant plages. Pour les essais de liaison, le nombre de coups qui restaient associés à la culture cellulaire était déterminé après lavage au PBSA. Dans cette expérience, approximativement 27% de la radioactivité restait associée aux cellules après adsorption virale sans addition d'héparine. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage du contrôle. (Reproduit d'après Vanderplasschen *et al.*, [25], avec permission).

[3] ont permis de localiser trois gènes de glycoprotéines : les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex. Le gène codant pour gB se trouve dans le premier bloc de gènes conservés; les gènes codant pour gH et gL se trouvent dans le deuxième bloc de gènes conservés parmi les *gammaherpesvirinae* (Figure 6). Le gène codant pour la glycoprotéine gH se trouve adjacent au gène codant pour la thymidine kinase [17]. Le séquençage de gB a été réalisé par ailleurs [15]; les séquences des gènes des deux glycoprotéines gH et gL ont été obtenues. Des expériences d'expression de ces gènes en système eucaryote sont en cours afin de déterminer s'ils codent pour l'une des quatre glycoprotéines déjà identifiées. L'analyse de séquences du BHV-4 qui contiennent des gènes susceptibles de coder pour d'autres glycoprotéines est en cours d'étude.

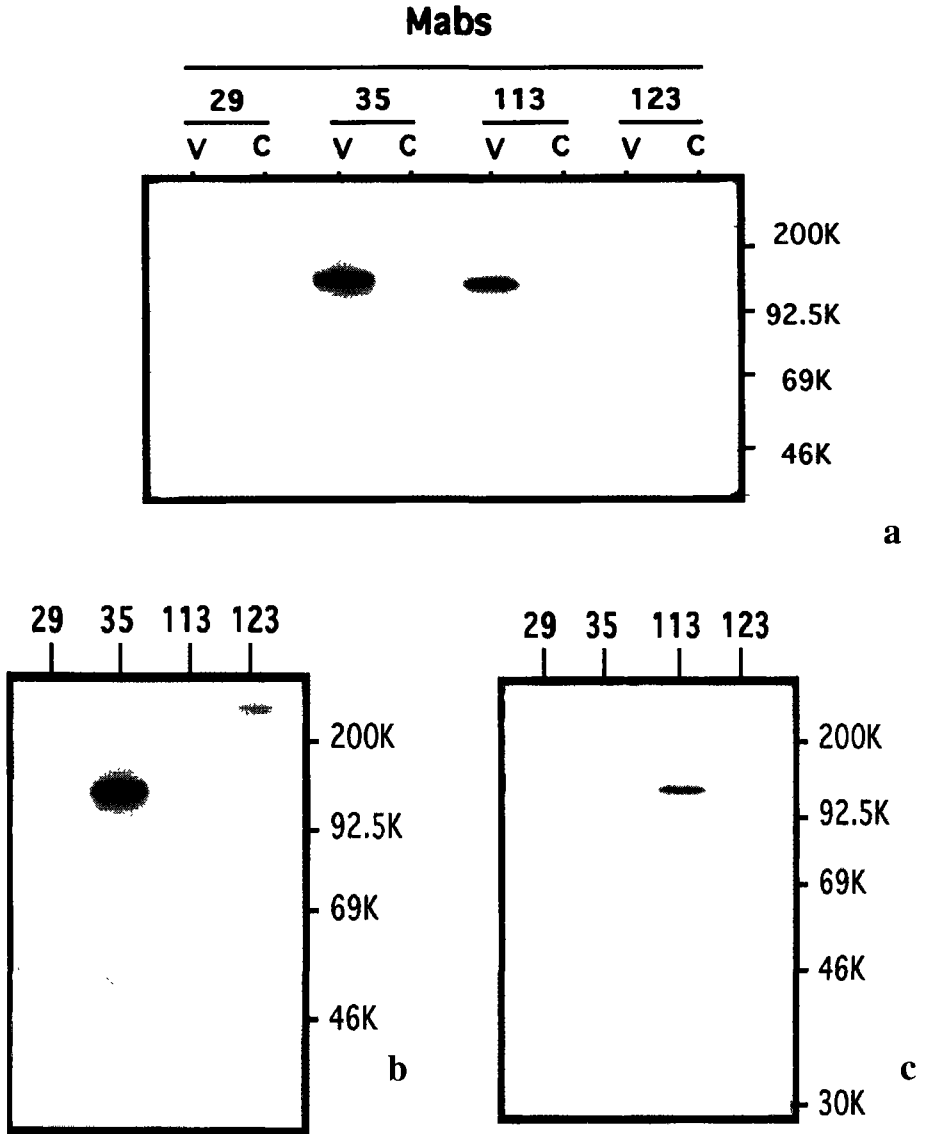


Figure 5. La glycoprotéine gp8 de l'herpèsvirus bovin 4 (BHV-4) est liée à l'héparine.
a : lysat cellulaire infecté et marqué par un radio-isotope (V); lysat cellulaire marqué non infecté (C).

b : le matériel non lié obtenu après incubation du lysat cellulaire infecté marqué avec des billes de sépharose-héparine a été immunoprécipité par des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4.

c : le matériel lié élu par l'héparine a été immunoprécipité par des anticorps monoclonaux dirigés contre les glycoprotéines du BHV-4.

Mab 29 : reconnaît la glycoprotéine gp11/VP24.

Mab 35 : reconnaît la glycoprotéine gp6/gp10/gp17

Mab 113 : reconnaît la glycoprotéine gp8

Mab 123 : reconnaît la glycoprotéine gp1.

(Reproduit d'après Vanderplasschen *et al.* [25], avec permission.)

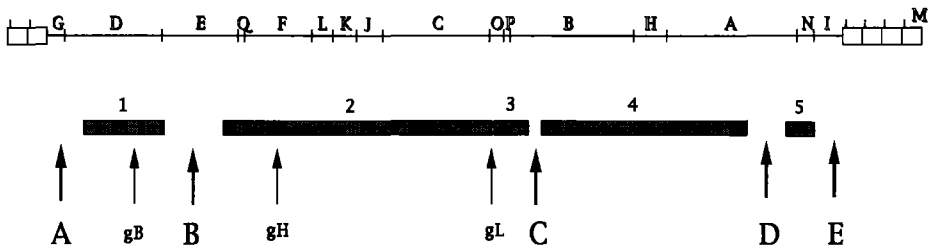


Figure 6. Le génome de l'herpès virus bovin 4 (BHV-4) est représenté par la carte de restriction *Eco* RI. Les cinq blocs de gènes conservés parmi les *gammaherpesvirinae* sont schématisés par des barres horizontales noircies. Les lettres majuscules (A à E) précisent les zones génomiques non conservées parmi les *gammaherpesvirinae*. La position des gènes codant pour les homologues des glycoprotéines gB, gH et gL du virus herpès simplex est indiquée par des flèches.

Discussion

Quatre glycoprotéines ont été identifiées jusqu'à présent chez le BHV-4. Il est vraisemblable que le BHV-4 possède d'autres glycoprotéines, à l'instar des autres herpès virus. Parmi ces glycoprotéines, gp8 possède un rôle fonctionnel important, puisqu'elle intervient dans la phase d'adsorption du virus sur la membrane cellulaire. Le rôle de ces glycoprotéines dans la réponse immunitaire doit encore être déterminé.

L'expression de gènes codant pour des homologues des glycoprotéines gB, gH et gL permettra de déterminer si leurs produits correspondent à l'une des quatre glycoprotéines du BHV-4 déjà identifiées.

Conclusions générales

Les résultats obtenus ont permis d'accroître le nombre de glycoprotéines connues du BHV-1 et du BHV-4 et de les caractériser comme protéines : gp42, gp93 et gp108 pour le BHV-1; gp1, gp6/gp10/gp17, gp8 et gp11 pour le BHV-4. Parmi celles-ci certaines se révéleront de bons candidats, soit pour la délétion du gène dans la perspective d'un vaccin porteur d'un marqueur sérologique (BHV-1), soit pour la création d'un virus vecteur (BHV-4); d'autres, par leurs caractéristiques antigéniques, seront définies comme des éléments indispensables des vaccins. La glycoprotéine gp108 du BHV-1 et la glycoprotéine gp 8 du BHV-4 possèdent toutes les deux des propriétés fonctionnelles importantes pour la biologie du virus, qui font de leurs gènes de mauvaises cibles pour la délétion ou l'insertion.

Remerciements

Les recherches sur les glycoprotéines du BHV-1 sont subsidiées par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture. Les

recherches sur les gènes de glycoprotéines du BHV-4 sont financées par un programme d'actions de recherches concertées de la Communauté française de Belgique. Le texte présente des résultats de recherche du Programme national d'impulsion à la recherche fondamentale dans les Sciences de la vie, mis en oeuvre à l'initiative de l'Etat belge -services du Premier Ministre- Programmation de la Politique scientifique. La responsabilité scientifique est assumée par ses auteurs. A. Vanderplasschen est Aspirant au Fonds National de la Recherche Scientifique.

Références

1. Baranowski E., Dubuisson J., Pastoret P.-P., Thiry E. (1993). Identification of 108K, 93K, and 42K glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. *Arch Virol* ;
2. Bublot M., Van Bresseem M.-F., Thiry E., Dubuisson J., Pastoret P.-P. (1990). Bovine herpesvirus 4 genome : cloning, mapping and strain variation analysis. *J Gen Virol* ; 71 : 133-142.
3. Bublot M., Lomonte P., Lequarré A.S., Albrecht J.C., Nicholas J., Biesinger B., Biller B., Fleckenstein B., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Genetic relationship between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology* ; 190 : 654-655.
4. Denis M., Slaoui M., Keil G., Babiuk L.A., Ernst E., Pastoret P.P., Thiry E. (1993). Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of *in vitro* stimulation. *Immunology* ; 78 : 7-13.
5. Dubuisson J., Thiry E., Thomas I., Coignoul F., Bublot M., Van Heule G., Dekegel D., Pastoret P.P. (1987). Infection expérimentale de taureaux par injection intratesticulaire d'une souche de bovid herpesvirus isolée d'un cas d'orchite. *Ann Méd Vét* ; 131 : 37-48.
6. Dubuisson J., Boulanger D., Bublot M., Thiry E., Pastoret P.P. (1989). Proteins specified by bovine herpesvirus type 4. Structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* ; 70 : 1743-1753.
7. Dubuisson J., Thiry E., Bublot M., Thomas I., Van Bresseem M.F., Coignoul P.F., Pastoret P.P. (1989). Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Vet Microbiol* ; 21 : 97-114.
8. Dubuisson J., Guillaume J., Boulanger D., Thiry E., Bublot M., Pastoret P.P. (1990). Neutralization of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J Gen Virol* ; 71 : 647-653.
9. Dubuisson J., Danyi S., Bublot M., Pastoret P.P., Thiry E. (1991). Comparison of proteins of simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J Gen Virol* ; 72 : 1145-1150.
10. Dubuisson J., Bublot M., Wellemans G., Pastoret P.P., Thiry E. (1991). Bovine herpesvirus 4 isolates : a comparison of three major glycoproteins. *Vet Microbiol* ; 29 : 251-259.
11. Dubuisson J., Koromyslov I., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells : identification of a 135 K glycoprotein involved in viral attachment. *J Gen Virol* ; 73 : 189-194.
12. Dubuisson J., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Identification and characterization of the gp1 glycoprotein of bovine herpesvirus type 4 *J Gen Virol* ; 73 : 1293-1296.
13. Friedli K., Metzler A.E. (1987). Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch Virol* ; 94 : 109-122.
14. Gibbs E.P.J., Rweyemamu M.M. (1977). Bovine herpesvirus. Part I. Bovine herpesvirus-1. *Vet Bull* ; 47 : 317-342.
15. Goltz M., Broll H., Gielow A., Weigelt W., Mankertz J., Ludwig H., Buhk H.J., Borchers K.

- (1992). Bovine herpesvirus 4 gB : phylogenetic and functional relatedness with equivalents of herpesvirus saimiri (HVS) and Epstein-Barr virus (EBV). 17th International Herpesvirus Workshop, Edinburgh, Scotland, 1-7 août 1992.
16. Liang X., Babiuk L.A., Zamb T.J. (1992). An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing b-galactosidase : evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* ; 189 : 629-639.
17. Lomonte P., Bublot M., Pastoret P.P., Thiry E. (1992). Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene : comparison with thymidine kinase genes of other herpesvirus. *Arch Virol* ; 127 : 327-337.
18. Okasaki K., Matsuzaki T., Sugahara Y., Okada J., Hasebe M., Iwamura Y., Ohnishi M., Kanno T., Shimizu M., Honda E., Kono Y. (1991). BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein III with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* ; 181 : 666-670.
19. Osorio F.A., Reed D.E. (1983). Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4 : evidence for a lymphoid-associated persistent infection *Am J Vet Res* ; 44 : 975-980.
20. Quint W., Gielkens A.L.J., Van Oirschot J.T., Berns A., Cuypers T. (1987). Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus : a new generation of "live" vaccines. *J Gen Virol* ; 68 : 523-534.
21. Thiry E., Pastoret P.P., Dessy-Doizé C., Hanzen C., Calberg-Bacq C.M., Dagenais L., Vindevogel H., Ectors F. (1981). Réactivation d'un herpès virus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Ann Méd Vét* ; 125 : 207-214.
22. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P.P. (1989). Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) infections of cattle. In : G. Wittmann ed. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Kluwer Academic Publishers, Norwell : 96-115.
23. Thiry E., Dubuisson J., Bublot M., Van Bresse M.F., Pastoret P.P. (1990). The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsche Tierärztl Wochenschr* ; 97 : 72-77.
24. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Van Bresse M.F., Lomonte P., Lequarre A.S., Vanderplasschen A., Pastoret P.P. (1992). Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet Microbiol* ; 3 : 79-92.
25. Vanderplasschen A., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P.P., Thiry E. (1993). Attachment of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of the g8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology* ; 196 : 232-240.
26. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A. (1985). Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* ; 144 : 204-215.
27. van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L.A. (1986). Synthesis and processing of bovine herpesvirus glycoproteins. *J Virol* ; 59 : 401-410.
28. van Drunen Littel-van den Hurk S., van den Hurk J.V., Gilchrist J.E., Misra V., Babiuk L.A. (1984). Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins : characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology* ; 135 : 466-479.
29. Van Engelenburg F.A.C., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M., van den Burg L., Moerman A., Gielkens A.L.J., van Oirschot J.T. (1992). Deletion of the glycoprotein E gene or thymidine kinase gene of bovine herpesvirus type 1 produces attenuated vaccine strains. 17th International herpesvirus Workshop, Edinburgh, Scotland, 1-7 août 1992.
30. Wellemans G., Van Opdenbosch E., Mammerickx M. (1986). Inoculation expérimentale du virus LVR 140 (herpès bovin IV) à des vaches gestantes et non gestantes. *Ann Rech Vét* ; 17 : 89-94.
31. Wellemans G., Van Opdenbosch E. (1989). Association entre l'infection par le BHV4 et l'avortement chez la vache. *Ann Méd Vét* ; 133 : 347-350.

