

Brèves communications

Intervention du complément dans la neutralisation du Bovid herpesvirus 4

J. DUBUISSON, E. THIRY, M. BUBLOT, P.-P. PASTORET

*Service de Virologie, Immunologie
et Pathologie des maladies virales,
Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège,
Rue des Vétérinaires, 45 - 1070 Bruxelles, Belgique.*

RESUME

Le Bovid herpesvirus 4 (BHV-4) induit une réponse immunitaire humorale caractérisée par une production faible ou nulle d'anticorps neutralisants. Nous avons vérifié l'intervention du complément dans le mécanisme de neutralisation du BHV-4. Des sérums de taureaux infectés par une souche de BHV-4 (V. Test.) ont été prélevés tous les 2 jours durant 1 mois. Ils ont été utilisés dans un test de neutralisation classique et dépendante du complément.

La présence de complément augmente considérablement les titres en anticorps neutralisant le BHV-4 lors d'une réponse primaire. Cette production d'anticorps apparaît assez tardivement (jour 18).

Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.).

J. DUBUISSON est Aspirant du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

Manuscrit déposé le 04/11/1986.

INTRODUCTION

Le groupe des Bovid herpesvirus 4 (BHV-4) est constitué d'un grand nombre de souches antigéniquement apparentées, qui ont été isolées de bovins apparemment sains ou atteints d'affections cliniques très diverses (Ludwig, 1983). En plus de leur parenté antigénique, ces différentes souches ont en commun la production d'un effet cytopathogène lent en culture cellulaire, sans formation de syncytium (Gibbs et Rweyemamu, 1977), et elles induisent chez l'animal infecté une réponse immunitaire humorale caractérisée par une production faible ou nulle d'anticorps neutralisants (Potgieter et Maré, 1974). Le test de séroneutralisation a donc rapidement été écarté pour la détection des anticorps anti BHV-4, au profit des tests d'immunofluorescence indirecte et ELISA.

Cette absence de neutralisation envers le BHV-4 n'a encore fait l'objet d'aucune étude particulière. Dans ce travail, nous avons vérifié l'intervention du complément dans le mécanisme de neutralisation du BHV-4.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Trois taurillons de race Blanc-Bleu-Belge, âgés de 12 à 14 mois, ont été utilisés dans cette expérience après avoir démontré qu'ils étaient exempts d'infection par le BHV-4 et le virus BVD (Bovine Viral Diarrhoea), selon une technique décrite antérieurement (Dubuisson et al., 1986).

Virus

La souche de BHV-4 (V. Test.), a été isolée en Belgique d'un cas d'orchite œdémateuse accompagnée d'azoospermie chez un

taureau de race Blanc-Bleu-Belge (Thiry et al., 1981). Le virus a été cultivé sur cellules testiculaires exemptes de BVD.

Inoculation

Deux taurillons (n° 2 et 3) ont été inoculés par voie intratesticulaire à l'aide de 10⁶ upf (unités formant plages) de la souche V. Test. par testicule. Le troisième (n° 1) servait de témoin et a reçu un volume identique de surnageant de culture de cellules non infectées (jour 0).

Prélèvements

Des prélèvements de sérum ont été effectués tous les 2 jours jusqu'au jour 28 et à la fin de l'expérience (jour 34). Les sérums ont été immédiatement stockés à - 20 °C.

Séroneutralisation

Un échantillon de chaque sérum prélevé a été incubé durant 30 minutes à 56 °C afin d'inactiver le complément. Des dilutions de raison 2 ont été effectuées pour chaque sérum décomplémenté ou non. Une suspension virale de 100 µl contenant 100 upf de virus V. Test. a été ajoutée à 100 µl de chaque dilution de sérum. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, des cellules Georgia Bovine Kidney (GBK) confluentes, cultivées en microplaques, ont été infectées par le virus mélangé aux différentes dilutions de sérums. Les plaques ont été incubées à 37 °C (atmosphère humide, 5 % de CO₂) pendant 12 jours et les cellules ont ensuite été fixées et colorées par une solution hydro-alcoolique de cristal violet. Le titre obtenu est l'inverse de la dernière dilution du sérum qui inhibe une lyse subtotale du tapis cellulaire.

RESULTATS

Les résultats des séroneutralisations classiques et dépendantes du complément sont exposés dans le tableau 1. Ils

TABLEAU 1
 Titres en anticorps neutralisant le BHV-4, obtenus par séroneutralisations classiques
 et dépendantes du complément.

	taureau 1 (témoin)		taureau 2 (infecté)		taureau 3 (infecté)	
	sérum avec cplt	sérum sans cplt	sérum avec cplt	sérum sans cplt	sérum avec cplt	sérum sans cplt
Jour						
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
18	0	0	1/16	0	1/8	0
20	0	0	1/16	0	1/16	0
22	0	0	1/4	0	1/16	1/2
24	0	0	1/16	0	1/16	1/2
26	0	0	1/16	0	1/16	1/4
28	0	0	1/16	1/2	1/32	1/4
34	0	0	1/16	1/4	1/32	1/8

Cplt = Complément

Jour 0 = injection intratesticulaire de BHV-4.

montrent une nette augmentation de l'effet neutralisant pour les sérums non décomplémentés.

DISCUSSION

La présence de complément augmente considérablement les titres d'anticorps neutralisant le BHV-4 lors d'une réponse primaire. Cette production d'anticorps neutralisants apparaît assez tardivement (jour 18). Dans nos conditions expérimentales, l'infection par le BHV-4 induit une réponse immunitaire complète qui

se traduit par l'apparition d'anticorps détectés par ELISA (Dubuisson et al., 1986), par séroneutralisation dépendante du complément et par le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (augmentation de l'indice de stimulation dans le test de transformation lymphoblastique spécifique (Thomas et Dubuisson, résultats non publiés)).

La neutralisation virale est définie par la perte du pouvoir infectieux du virus. Cette perte de l'infectivité peut être produite par une inhibition de l'adsorp-

tion du virus sur les cellules ou par une diminution de la pénétration du virus dans les cellules (Osterrieth, 1972). Le mécanisme de neutralisation peut être plus complexe : par exemple, le virus influenza neutralisé s'adsorbe, pénètre et se décapside dans la cellule réceptrice mais la transcription du génome est bloquée (Onions, 1983). Le test de séroneutralisation classique ne permet pas d'évaluer la neutralisation *in vivo* envers le BHV-4. La présence des anticorps seuls est insuffisante pour assurer une neutralisation efficace du virus. Le complément intervient donc comme cofacteur dans le mécanisme de neutralisation envers le BHV-4. L'intervention du complément dans la neutralisation des virus a déjà été démontrée par exemple pour l'HSV (Herpes simplex virus) (Yoshino et Taniguchi, 1964), pour le virus de la maladie de Newcastle (Linscott et Levinson, 1969) et pour le virus de l'artérite équine (Radwan et Burger, 1973).

Pour Mandel (1978), le complément interviendrait essentiellement au début de la réponse immune comme cofacteur dans la neutralisation virale. Les anticorps précoces induits par l'infection

virale présentent une faible affinité qui les rend incapables de neutraliser efficacement un virus. Ces anticorps sont essentiellement des immunoglobulines M qui ont le pouvoir de fixer efficacement le complément. L'action du complément dans la neutralisation d'HSV peut être expliquée par le recouvrement du virus par un manteau protéique additionnel (Daniels et al., 1969), contrairement à d'autres virus enveloppés où le complément induit une virolyse (Cooper, 1979).

D'autres facteurs que le complément doivent être pris en considération pour comprendre cette inefficacité relative des anticorps neutralisant le BHV-4. Il faut également tenir compte de l'existence éventuelle d'aggrégats viraux ou d'autres cofacteurs (Mandel, 1979).

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mariane Vercouter pour sa précieuse collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- COOPER N.R. Humoral immunity to viruses. In : Comprehensive Virology, Vol. 15, edited by H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, Plenum Press, New York, 1979, 123.
- DANIELS C.A., BORSOS T., SNYDERMAN R., NOTKINS A.L., Neutralization of sensitized virus by the fourth component of complement. *Science*, 1969, **165**, 508.
- DUBUISSON J., THIRY E., THOMAS I., COIGNOUL F., BUBLOT M., VAN HEULE G., DEKEGEL D., PASTORET P.-P. Infection expérimentale de taureaux par injection intrastriculaire d'une souche de Bovid herpesvirus 4. *Ann. Méd. Vét.*, 1987, **131**, 37.
- GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M. Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet. Bull.*, 1977, **47**, 411.
- LINSCOTT W.D., LEVINSON W.E. Complement components required for virus neutralization by early immunoglobulin antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1969, **64**, 520.
- LUDWIG H. Bovine herpesviruses. In : The Herpesviruses, Vol. 2, edited by B. Roizman, Plenum Press, New York, 1983, 135.
- MANDEL B. Neutralization of animal viruses. In : Advances in Virus Research, Vol. 23, edited by M.A. Lauffer, F.B. Bang, K. Maramorosch, K.M. Smith, Academic Press, New York, 1978, 205.

- MANDEL B. Interaction of viruses with neutralizing antibodies. In : *Comprehensive Virology*, Vol. 15, edited by H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, Plenum Press, New York, 1979, 37.
- ONIONS D.E. The immune response to virus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1983, **4**, 237.
- OSTERRIETH P.M. La neutralisation des virus. *Bull. Inst. Pasteur*, 1972, **70**, 281.
- POTGIETER L.N.D., MARE J. Assay and antigenic interrelationships of recently isolated herpesviruses, DN599, FTC and V11. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1974, **46**, 238.
- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M., DAGENAIS L., VINDEVOGEL H., ECTORS F. Réactivation d'un herpesvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 207.
- RADWAN A.I., BURGER D. The complement-requiring neutralization of equine arteritis virus by late antisera. *Virology*, 1973, **51**, 71.
- YOSHINO K., TANIGUCHI S. The appearance of complement-requiring neutralizing antibodies by immunization and infection with herpes simplex virus. *Virology*, 1964, **22**, 193.

SUMMARY

Role of complement in the neutralisation of Bovid herpesvirus 4.

Bovid herpesvirus 4 (BHV-4) induces an immune response characterized by a low production or even an absence of neutralising antibodies. The effect of complement in the neutralisation of BHV-4 was studied. Sera of bulls infected with a BHV-4 strain (V. Test.) were collected every other day during 1 month. Specific antibodies were titrated by classical and complement-dependent neutralisation tests.

The complement has markedly increased the titres of BHV-4 neutralising antibodies during a primary response. Neutralising antibodies has arisen late after the beginning of the infection (day 18).