

Réactivation d'un *herpèsvirus* en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie

E. THIRY *, P.-P. PASTORET *, C. DESSY-DOIZÉ **, C. HANZEN ***,
C.M. CALBERG-BACQ *****, L. DAGENAIS *, H. VINDEVOGEL *****,
F. ECTORS ***

* Service de Virologie et de Pathologie des maladies virales,

** Service d'Histologie,

*** Service d'Obstétrique et de Pathologie des troubles de la reproduction,

**** Service de Clinique aviaire,

Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège,
rue des Vétérinaires, 45

B-1070 Bruxelles, Belgique.

***** Service de Microbiologie générale et médicale,

Faculté de Médecine, Université de Liège,

Sart-Tilman

B-4000 Liège, Belgique.

RESUME

Des cas répétés d'infertilité chez des taureaux reproducteurs, d'allure clinique semblable, sont apparus en 1980 en Belgique. Un taureau présentant les signes cliniques de l'affection (orchite œdémateuse et azoospermie) a subi l'ablation chirurgicale d'un testicule, qui a servi aux prélèvements et dont les cellules ont été mises en culture.

Les techniques d'isolement viral classiques, à partir de l'organe, ont échoué. En culture de cellules testiculaires et en coculture des cellules de l'organe et de GBK est apparu en 7 à 15 jours un effet cytopathogène. Des particules virales caractéristiques du genre *herpès* ont été observées au microscope élec-

tronique. Le virus réactivé n'est pas le BHV 1 (*Bovid herpesvirus 1*). Il n'est pas thermosensible à 39°C. Au cours de passages successifs sur cellules GBK, il se comporte comme un virus conventionnel, à multiplication lente.

La caractérisation du virus, son site de latence et son rôle pathogène exact doivent être précisés.

INTRODUCTION

Des cas répétés d'infertilité chez des taureaux reproducteurs, d'allure clinique semblable, sont apparus en Belgique au cours de l'année 1980. Les animaux présentaient une orchite œdémateuse et de l'azoospermie.

Un taureau a subi l'ablation chirurgicale d'un testicule qui a fait l'objet d'un examen virologique dont les résultats préliminaires sont présentés ici. Les aspects cliniques et anatomopathologiques de l'affection sont décrits dans une publication séparée (Hanzen et al., 1981).

MATERIEL

Souches de BHV 1 (*Bovid herpesvirus 1* ; IBR/IPV)

- Souche P8-2, aimablement fournie par le Prof. L.A. Babiuk, Saskatoon, Canada, qui se multiplie rapidement à 39 °C (Pastoret et al., 1980a) ;
- Souche Los Angeles (LA), souche internationale de référence, aimablement fournie par le Prof. D.G. Mc Kercher, Davis, USA.

Sérums

- Sérum provenant d'un bovin hyperimmunisé contre le BHV 1 (Aguilar-Setién et al., 1980) ;

- Sérum anti-BHV 1, préparé sur lapin et aimablement fourni par le Dr N. Zygraich, Smith-Kline RIT, Rixensart, Belgique ;
- Sérum de l'animal examiné.

Les sérums ont été inactivés à 56 °C, pendant 30 minutes, avant l'emploi.

Cellules et cultures

Comme précédemment décrit (Pastoret et al., 1980b) et sauf indication contraire, les cellules sont entretenues dans le milieu MEM (Minimum Essential Medium), Earle's BSS, bicarbonate réduit (850 mg/l) ; additionné d'acides aminés non-essentiels (NEAA), de pénicilline, de streptomycine, de natamycine et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Flow). Elles sont maintenues à 37 °C, dans des bouteilles de Roux de 25 ou 75 cm².

- Cellules MDBK (Madin Darby Bovine Kidney).

Dans certaines conditions expérimentales, elles sont placées à 35 et 39 °C, après confluence du tapis cellulaire ;

- Cellules GBK (Georgia Bovine Kidney), aimablement fournies par le Prof. L.A. Babiuk, Saskatoon, Canada.

Elles sont dans certains cas maintenues dans le MEM sans SVF. Des cellules en croissance ou confluentes sont, pour les besoins de l'expérience, placées à différentes températures (35, 37 et 39 °C) ;

- Cultures de fibroblastes d'embryon de poule (FEP).

Elles sont préparées selon une technique antérieurement décrite (Vindevoel et al., 1975 ; 1977). Après inoculation, elles sont maintenues dans le MEM avec ou sans 10 % de SVF (figure 1) ;

— Cultures de cellules testiculaires.

Après dissection de l'albuginée et du rete testis, le tissu testiculaire a été finement dilacéré aux ciseaux et soumis 3 heures à l'action de la trypsine. Après filtration sur plusieurs couches de gaze stérile, le filtrat a été additionné de MEM et réparti en bouteilles de Roux. Les cellules testiculaires ainsi mises en culture furent maintenues dans le MEM avec ou sans 10 % de SVF (figure 1) ;

— Cocultures.

Des quantités égales de cellules testiculaires du premier passage et de cellules GBK sont mélangées puis réparties dans des bouteilles de Roux et recouvertes de MEM avec ou sans 10 % de SVF (figure 1).

Prélèvements

Des fragments de tissu testiculaire, prélevés stérilement, sont finement dilacérés aux ciseaux et broyés dans un volume égal de MEM. Le broyat est centrifugé à 2 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est récolté et est filtré ou non (Millipore, 0,22 μ).

Une partie sert immédiatement aux inoculations, une autre est congelée à -70°C , avec ou sans diméthylsulfoxyde (DMSO, Merck ; 5 %).

METHODES

Sauf indication contraire, les inoculations de cultures de cellules se font en bouteilles de Roux de 25 cm² ; 0,5 ml d'inoculum est adsorbé pendant 1 heure à 37 °C. Les cellules sont ensuite recouvertes de 10 ml de MEM avec 10 % de SVF.

Séroneutralisation

Des dilutions de raison 10 d'une suspension contenant 0,5 ml de sérum et 0,5 ml de virus, incubées au préalable 1 h 30 à 20 °C servent à l'inoculation de GBK confluentes. Après adsorption, les cellules sont recouvertes de MEM, contenant 1 % d'agarose

(indubiose) et 2 % de SVF. Après 5 jours, elles sont fixées au formol et colorées au May-Grünwald-Giemsa. Sont utilisés le virus IBR LA, le virus démasqué en coculture, après un passage sur GBK ; le sérum de bovin anti-BHV 1, le sérum anti-BHV 1 de lapin et le sérum du taureau atteint.

Essai d'isolement classique

Des cellules GBK et FEP, à confluence, sont inoculées avec le liquide de broyat de testicule, filtré ou non (figure 1).

Inoculation à des cellules GBK en croissance.

Des cellules GBK, à 60 % de confluence, sont inoculées avec le liquide de broyat de testicule, conservé à -70°C , avec ou sans 5 % de DMSO. Elles sont ensuite placées à 35 et 37 °C.

Essai comparé de multiplication à différentes températures

Après un premier passage sur GBK, le virus démasqué en coculture est multiplié sur cellules GBK et MDBK, de même que le virus BHV 1 (souche P8-2) en guise de témoin. Les cellules sont incubées à différentes températures (35, 37 et 39 °C). Deux essais sont réalisés.

Examen en microscopie électronique

Les échantillons examinés sont préparés selon une technique courante : le matériel est adsorbé à la grille du microscope, lavé à l'eau distillée et contrasté négativement avec du phosphotungstate de potassium (1 % ; pH 6,8). Les examens se font au microscope Philips EM 301.

RESULTATS

Essais d'isolement sur cellules GBK et FEP

Les tentatives d'inoculation de cellules GBK avec le liquide de broyat de testi-

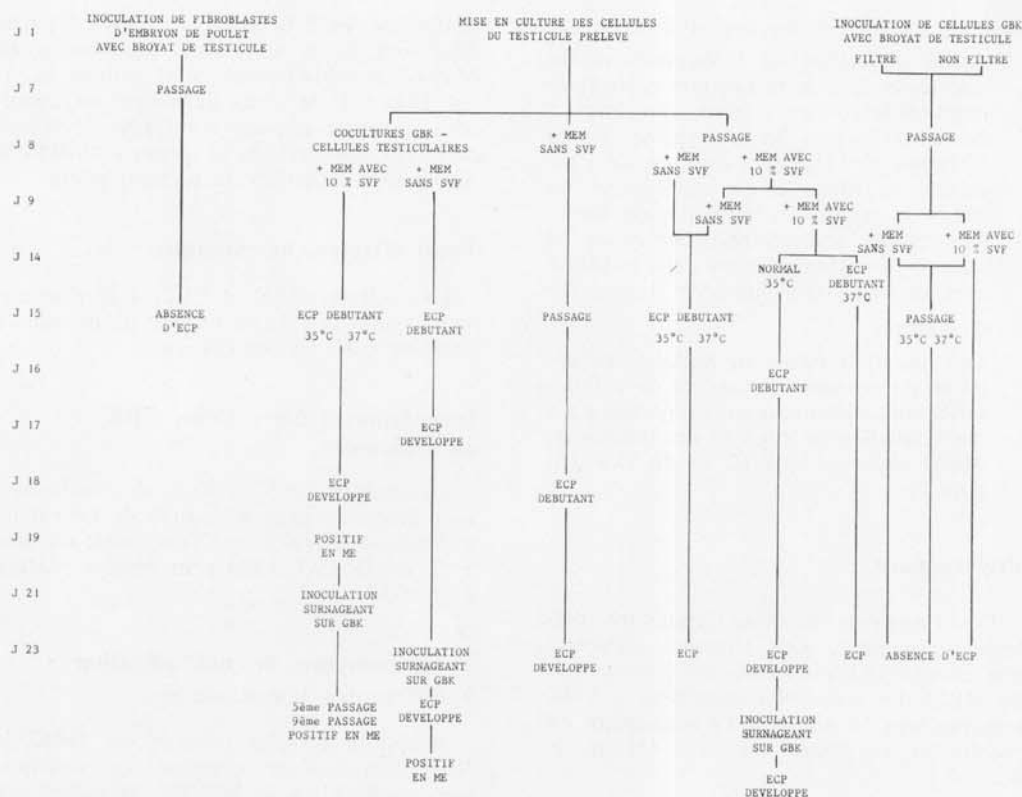


Fig. 1. — Schéma expérimental.

MEM : Minimum Essential Medium ; SVF : sérum de veau fœtal ; ECP : effet cytopathogène ; positif en ME : présence de particules virales caractéristiques du genre *herpès* à l'examen au microscope électronique.

culé, filtré ou non, ont toutes échoué. Les GBK, cultivées jusqu'au deuxième passage après l'inoculation et maintenues dans du MEM avec ou sans 10 % de SVF, à 35 ou 37 °C, n'ont manifesté aucun effet cytopathogène (ECP) (figure 1).

Les techniques d'isolement classiques réalisées sur FEP n'ont rien révélé (figure 1).

La méthode d'inoculation traditionnelle, adaptée sur GBK en croissance, placées ensuite à 35 ou 37 °C, n'a permis aucun isolement.

Réactivation en coculture

Un ECP est apparu après 7 jours, dans les cocultures de cellules GBK et testiculaires, entretenues dans du MEM, avec ou sans 10 % de SVF. Il ne fut pas influencé par la température (35 et 37 °C) (figure 1).

L'ECP se caractérise comme suit : quelques petits syncytia apparaissent en foyer dans le tapis cellulaire. Après 1 à 3 jours, ces foyers évoluent en zones circonscrites privées de cellules, bordées de nouveaux syncytia qui se décollent

peu à peu du tapis cellulaire ; en périphérie, les cellules sont arrondies, granuleuses et présentent une réfringence modifiée.

Le virus isolé de ces cocultures a subi 10 passages successifs sur cellules GBK et se comporte actuellement comme un virus conventionnel ; il a perdu le caractère syncytial et son ECP se développe lentement en 5 à 7 jours : des cellules arrondies, plus réfringentes, apparaissent à la surface de la couche monocellulaire et s'en détachent. Le tapis cellulaire se reforme néanmoins pendant 3 à 4 jours, puis est totalement détruit en 1 à 3 jours.

Réactivation en culture d'organe

Le même ECP s'est développé, 6 à 7 jours après le premier passage, sur les cellules mises en culture à partir du testicule prélevé (figure 1).

Examen en microscopie électronique

Des particules virales dont la morphologie est caractéristique du genre *herpès* ont été observées dans divers échantillons : le surnageant d'une coculture de cellules GBK et testiculaires, le surnageant de GBK inoculées avec une autre coculture, le 5^e et le 9^e passage sur GBK du virus isolé (figures 1 et 2).

Essai comparé à différentes températures

Le virus se développe indifféremment aux 3 températures. Il n'est donc pas thermosensible à 39 °C, température restrictive des mutants ts du BHV 1 (Pastoret et al., 1980a ; Zygraich et al., 1974).

Séronéutralisation

Des tests préliminaires ont montré que le virus n'est neutralisé ni par les sérums anti-BHV 1 de bovin et de lapin, ni par le sérum de l'animal examiné.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le virus réactivé appartient au genre *herpès* et se maintenait à l'état latent dans le testicule. En effet, les techniques d'isolement classiques ont échoué et il a fallu recourir à la culture de l'organe et aux cocultures de cellules testiculaires avec des cellules sensibles pour démasquer l'infection virale, qui s'est révélée après 7 à 15 jours. Plusieurs auteurs rapportent cette difficulté d'isoler un *herpèsvirus* latent, ainsi que la nécessité d'effectuer plusieurs subpassages et de cultiver les cellules de l'organe (Homan et Easterday, 1980 ; Ludwig et Storz, 1973 ; Plummer et al., 1970 ; Rajcani et al., 1977 ; Saxegaard, 1966).

Le virus, une fois réactivé, se comporte comme un virus conventionnel lors de passages ultérieurs sur cellules de lignée continue. Il n'est pas thermosensible à 39 °C et se développe aussi bien à cette température qu'à 35 et 37 °C, contrairement à ce que l'on pourrait imaginer en tenant compte du fait que la température du testicule est inférieure à la température corporelle.

L'*herpès* réactivé n'est pas le BHV 1 (*Bovid herpesvirus 1*), que l'on ne retrouve d'ailleurs pas dans le testicule (Mc Kercher et al., 1963 ; Straub et Böhm, 1964 ; Zygraich et al., 1974), même s'il est souvent associé à des troubles génitaux (formes IPV). Certains caractères culturels laissent penser qu'il

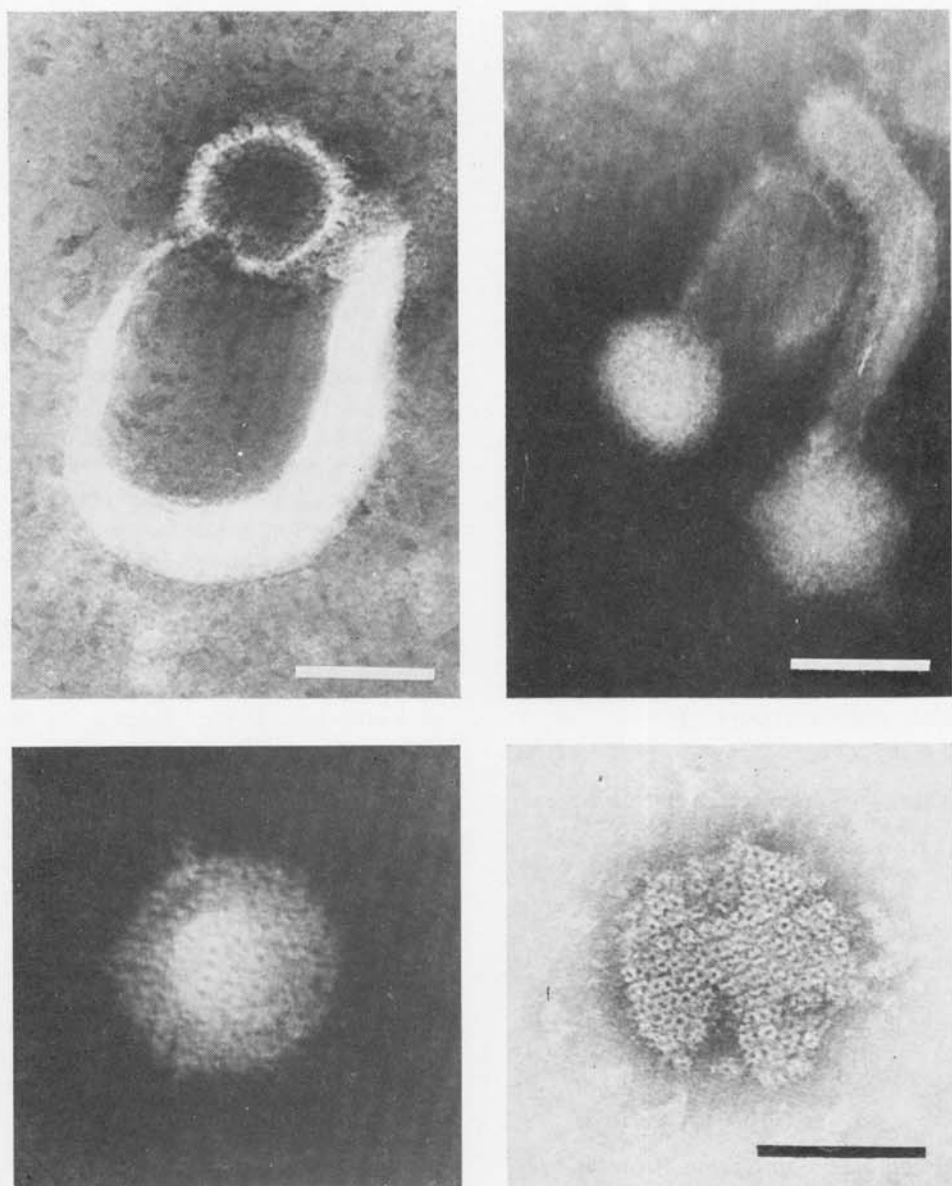


Fig. 2. — Examen au microscope électronique. Présence de particules virales caractéristiques du genre *herpès*.

a, b : virus enveloppés

c : capside isolée

d : capside étalée montrant les capsomères isolés dans une préparation après décongélation.
la barre représente 0,1 μ .

diffère du virus de la mamillite bovine (*Bovid herpesvirus 2*) (Gibbs et Rweyemamu, 1977). Il est encore impossible de le distinguer des autres *herpès* isolés chez le bovin, tel l'*herpès* de type Movar (Gibbs et Rweyemamu, 1977).

La réactivation de cet *herpès* en culture d'organe pose le problème de son site de latence. Bien qu'il existe des terminaisons nerveuses dans le testicule, celles-ci ne se retrouvent pas en culture, où prédominent les cellules de type fibroblastique, entourant quelques îlots de cellules d'aspect épithélial. Le virus se maintient peut-être à l'état latent dans ces cellules d'aspect épithélial.

Outre la caractérisation du virus et l'étude du site de latence, il reste à définir son rôle exact dans la pathologie génitale du taureau. Certaines observations rendent plausible son action patho-

gène : l'échec de détection d'un autre agent pathogène ou toxique par les méthodes courantes de diagnostic de laboratoire, l'absence d'autre isolement viral malgré l'ensemble des techniques utilisées et l'image histopathologique du testicule, présentant des infiltrations de cellules mononucléées, sans polymorphonucléaires neutrophiles, ce qui ne plaide pas en faveur d'une infection bactérienne (Hanzen et al., 1981).

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Prof. L.A. Babiuk, Saskatoon, Canada, le Prof. D.G. Mc Kercher, Davis, USA, et le Dr N. Zygraich, Smith Kline RIT, Rixensart, Belgique, pour les souches virales, les cellules et l'antisérum.

BIBLIOGRAPHIE

- AGUILAR-SETIÉN R., PASTORET P.-P., SCHWERS A. Etude chez le bovin, par neutralisation et immunoprécipitation, des réactions sérologiques croisées entre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*bovid herpesvirus 1*, BHV 1) et celui de la maladie d'Aujeszky (*Sus herpesvirus 1*, SHV 1). *Ann. Méd. Vét.*, 1980, **124**, 199.
- GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M. Bovine herpesviruses. Part 2: Bovine herpesviruses 2 and 3. *Vet. Bull.*, 1977, **47**, 411.
- HANZEN C., DESSY-DOIZE C., THIRY E., WELLEMANS G., CALBERG-BACQ C.M., VINDEVOGEL H., DAGENAIS L., PASTORET P.-P. Aspects cliniques et anatomopathologiques de cas répétés d'orchite chez des taureaux reproducteurs en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, sous presse.
- HOMAN E.G., EASTERDAY B.C. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1212.
- LUDWIG H., STORZ J. Activation of Herpesvirus from normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1973, **158**, 209.
- Mc KERCHER D.G., WADA E.M., STRAUB O.C. Distribution and persistence of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus in experimentally infected cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1963, **24**, 510.
- PASTORET P.-P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBEL P. Reactivation of Temperature-sensitive and non-Temperature-sensitive Infectious Bovine Rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, 1980a, **29**, 483.
- PASTORET P.-P., BURTONBOY G., AGUILAR-SETIÉN A., GODART M., LAMY M.E., SCHOENAERS F. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovid herpesvirus 1*), from respiratory and genital origins, using polyacrylamid gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.*, 1980b, **5**, 187.
- PLUMMER G., HOLLINGSWORTH D.C., PHUANGSAB A., BOWLING C.P. Chronic infections by herpes simplex viruses and by

- the horse and cat herpesviruses. *Infect. Immun.*, 1970, **1**, 351.
- RAJCANI J., CIAMPOR F., SABO A., LIBI-VOKA H., ROSENBERGOVA M. Activation of latent herpesvirus hominis in explants of rabbits trigeminal ganglia: the influence of immune serum. *Arch. Virol.*, 1977, **53**, 55.
- SAXEGAARD F. Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with infectious pustular vulvo-vaginitis virus (IPV-virus) in cattle. *Nord. Vet. Med.*, 1966, **18**, 452.
- STRAUB O.C., BÖHM H.O. Untersuchungen über die lokalisation und persistenz des Virus der Infektiösen Rhinotracheitis und des Bläschenausschlages in experimentall infizierten Rindern. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochensh.*, 1964, **77**, 458.
- VINDEVOGEL H., DUCHATEL J.P., GOUFFAUX M. Pigeon herpesvirus. 1. Pathogenesis of pigeon herpesvirus in chicken embryo fibroblasts. *J. Comp. Path.*, 1977, **87**, 597.
- VINDEVOGEL H., PASTORET P.-P., BURTONBOY G., GOUFFAUX M., DUCHATEL J.P. Isolement d'un virus herpès dans un élevage de pigeons de chair. *Ann. Rech. Vét.*, 1975, **6**, 431.
- ZYGRAICH N., VASCOBOINIC E., HUYGELEN C. Replication of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus in the tissues of inoculated calves. *Zbl. Vet. Med., B*, 1974, **21**, 138.

SUMMARY

Reactivation of a herpesvirus in cells cultured from a testicle of a bull showing orchitis and azoospermia.

An outbreak of infertility, involving breeding bulls, occurred in Belgium in 1980. A testicle was surgically removed from an affected bull presenting oedematous orchitis and azoospermia. Cell cultures were obtained from the organ and samples were taken for classical viral isolation procedures.

No virus has been isolated by classical procedures whereas a cytopathic effect has been observed after 7 to 15 days in testicle cell cultures and testicle cells cocultured with GBK cells. *Herpesvirus*-like particles have been observed by electron microscopy. The reactivated virus differs from BHV 1 (*Bovid herpesvirus 1*) and is not thermosensitive at 39°C. Since initial reactivation, the isolate has been passaged several times by conventional methods in GBK cells where it grows slowly.

This isolate must still be further characterized and its site of latency and its pathogenic role remain to be studied.