



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse isotypique de la réponse humorale suite à une infection de l'herpès bovin (BHV-4)

Fransolet, Alain

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

230890



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ANALYSE ISOTYPIQUE DE LA REPONSE
HUMORALE SUITE A UNE INFECTION
DE L'HERPES BOVIN (BHV-4)

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

FRANSOLET ALAIN
SEPTEMBRE 1990

Liste des abréviations usuelles.

Ac. : Anticorps
Ac2 : Anticorps ant-idiotype
Ag. : Antigène
ALS : AntiLymphocyte Serum
BVD : Bovine Viral Diarrhea
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CTL : Cytotoxic cell
ECP : Effet cytopathogène
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
GBK : Georgia Bovine Kidney
Ia : Antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité
IBF : Immunoglobulin Binding Factor
IBR : Infections Bovine Rhinotracheitis
IFAT : Immunofluorescence Antibody Test
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFN-T (sur graphiques) = IFN- γ : Interféron gamma
Ig. : Immunoglobuline
Igm : Immunoglobuline membranaire
Igs : Immunoglobuline sécrétée
IL : Interleukine
LT : lymphotoxine
Mab : Monoclonal antibody
MHC ou CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
MO : Macrophage
PrDNA : Polyrepetitive DNA
RFc : Récepteur reconnaissant le fragment Fc des Immunoglobulines
TCR : Récepteur spécifique de l'antigène
TDH : Hypersensibilité de type retardé (réaction inflammatoire)
TH : Lymphocyte T helper
TK : Thymidine kinase

Analyse isotypique de la réponse humorale suite à une infection de l'herpès bovin de type 4 (BHV-4)

FRANSOLET Alain

Résumé:

L'immunologie bovine joue un rôle important dans la compréhension, la prévention et le contrôle des maladies du bétail. A ce titre la caractérisation du type de réponse immunitaire, intervenant lors d'une infection virale donnée, peut constituer une étape essentielle pour la compréhension des mécanismes mis en jeu.

Tout au long de ce travail nous nous sommes efforcés de vérifier si lors d'une infection virale provoquée, le système immunitaire bovin répond par la synthèse préférentielle d'un isotype particulier d'immunoglobuline. Ayant choisi d'utiliser le modèle d'une infection par le virus de l'herpès bovin de type 4 (BHV-4), nous nous sommes attardés dans un premier temps, à rechercher l'isotype d'immunoglobuline synthétisée préférentiellement et contenue dans un sérum positif provenant d'un animal infecté naturellement. Dans ces conditions l'isotype quantitativement le plus important, parmi les IgG1, IgG2, IgA et IgM recherchés, fut l'IgG1.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié grâce à une série chronologique de sérums, provenant d'animaux différents et sur base des résultats obtenus précédemment, que la synthèse préférentielle d'IgG1 se vérifiait à nouveau.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1990

Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN

Au terme de cette année, qu'il me soit permis de remercier le professeur A. DEPELCHIN qui a accepté de promouvoir ce mémoire.

Mes plus vifs remerciements vont également au docteur J.J. LETESSON pour sa grande disponibilité et les conseils judicieux prodigués tout au long de ce travail.

J'adresse également un merci tout spécial à monsieur C. DIDEMBOURG pour son aide technique spontanée et efficace; de même qu'à madame M. MULUMBA-ALBERT et madame M.A. DIDEMBOURG-POOS pour leur sympathie.

Je remercie le professeur WATTIAUX de m'avoir permis l'accès à son laboratoire.

Enfin, que toute personne ayant, directement ou indirectement, participé à la réalisation de ce mémoire soit assurée de mon entière gratitude.

PLAN

I. INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| 1. Avant-propos | 1 |
| 2. Les lymphocytes B | 2 |
| 2.1. Ontogenèse | 2 |
| 2.2. Fonction des lymphocytes B | 3 |
| 2.3. Les marqueurs membranaires | 3 |
| 3. Les immunoglobulines | 4 |
| 3.1. Structure | 4 |
| 3.2. Les différents fragments d'immunoglobulines | 4 |
| 3.3. Variations isotypiques | 4 |
| 4. Les mécanismes de diversification des différentes immunoglobulines | 5 |
| 4.1. Les familles multigeniques | 5 |
| 4.2. Les recombinaisons d'origine germinale | 5 |
| 4.3. Imprécision des recombinaisons | 7 |
| 4.4. Les mutations somatiques ponctuelles | 7 |
| 4.5. Association VH-VL | 8 |
| 5. Régulation de la synthèse d'anticorps | 9 |
| 5.1. Régulation au niveau des lymphocytes B | 9 |
| 5.1.1. Au niveau des Ig. membranaires (Igm) | 9 |
| 5.1.2. Au niveau des Ig. sécrétées (Igs) | 9 |
| * Effet positif | 9 |
| * Effet négatif | 9 |
| 5.2. Régulation par un réseau idiotypique | 10 |
| 5.3. Régulation par un réseau isotypique: les "immunoglobulin binding factor" | 11 |
| 5.4. Régulation par les lymphocytes T helper (TH) | 11 |
| a) interrégulation de réponse TH1 et TH2 | 12 |
| b) rôles attendus des cellules TH1 et TH2 pour une réponse normale | 12 |
| * La réponse TH1 | 12 |
| * La réponse TH2 | 13 |
| * Réponse mixte par TH1 et TH2 | 13 |
| c) conclusions générales. | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 6. Virus de l'herpès bovin de type 4 ou BHV4 | 14 |
| 6.1. Statut taxonomique | 14 |
| 6.2. Morphologie | 14 |
| 6.3. Aspect génomique | 15 |
| 6.4. Propriétés physico-chimiques | 15 |
| 6.5. Propriétés biologiques | 15 |
| 6.6. Pathogénie | 16 |
| 6.7. Infection latente | 16 |
| 6.8. Les aspects immunologiques | 17 |
| 6.8.1. Antigénicité | 18 |
| 6.9. Aspects futurs | 18 |
| | |
| 7. But du travail | 20 |

II. MATERIEL ET METHODES.

| | |
|--|-----------|
| 1. Sommaire. | 21 |
| 2. Animaux utilisés. | 21 |
| 2.1. Chez BELDICO. | 21 |
| 2.2. A Liège. | 21 |
| 2.2.1. Protocole expérimental d'inoculation virale. | 21 |
| 2.2.2. Origine du virus. | 22 |
| 2.2.3. Titrage viral. | 22 |
| 3. Prélèvements sanguins. | 22 |
| 4. Méthode de couplage des Ig. à la peroxydase. | 22 |
| 5. Le test ELISA. | 23 |
| 5.1. Généralités. | 23 |
| 5.2. Principe du test. | 23 |
| a) Préparation de l'antigène | 23 |
| b) Coatage des boîtes à ELISA | 23 |
| c) Dépôt du sérum contenant le premier Ac. | 24 |
| d) Dépôt du conjugué | 24 |
| e) Révélation | 24 |
| f) Lecture | 24 |

III. RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| 1. Sommaire | 26 |
| 2. Première phase du travail | 26 |
| 2.1. Mise au point du test ELISA | 26 |
| 2.1.1. Problèmes rencontrés | 26 |
| 2.1.2. Recherche du chromogène le plus performant | 26 |
| 2.1.3. Effet de la solution de lavage | 27 |
| 2.2. Caractérisation des classes d'Ig. contenues dans un sérum positif de référence | 27 |
| 2.2.1. Modèle de distribution du sérum dilué sur la plaque ELISA | 27 |
| 2.2.2. Recherche d'IgM | 29 |
| a) En ELISA classique | 29 |
| b) En ELISA modifié | 29 |
| 2.2.3. Recherche d'IgA | 30 |
| 2.2.4. Recherche d'IgG | 30 |
| a) Les IgG2 | 30 |
| b) Les IgG1 | 32 |
| c) Explications de la synthèse préférentielle d'une des deux sous-classes d'IgG | 32 |
| 2.2.5. Synthèse des résultats | 35 |
| 3. Deuxième phase du travail | 36 |
| 3.1 Introduction | 36 |
| 3.2. Buts du test | 36 |
| 3.3. Evolution des IgG1, mesurées en ELISA, en fonction du temps après l'infection expérimentale | 37 |
| 3.3.1. Problèmes rencontrés | 37 |
| 3.3.2. Résultats et interprétation | 38 |

IV. CONCLUSIONS 41

V. BIBLIOGRAPHIE 43

Liste des abréviations usuelles.

Ac. : Anticorps
Ac2 : Anticorps ant-idiotype
Ag. : Antigène
ALS : AntiLymphocyte Serum
BVD : Bovine Viral Diarrhea
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
CTL : Cytotoxic cell
ECP : Effet cytopathogène
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
GBK : Georgia Bovine Kidney
Ia : Antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité
IBF : Immunoglobulin Binding Factor
IBR : Infections Bovine Rhinotracheitis
IFAT : Immunofluorescence Antibody Test
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFN-T (sur graphiques) = IFN- γ : Interféron gamma
Ig. : Immunoglobuline
Igm : Immunoglobuline membranaire
Igs : Immunoglobuline sécrétée
IL : Interleukine
LT : lymphotoxine
Mab : Monoclonal antibody
MHC ou CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
MO : Macrophage
PrDNA : Polyrepetitive DNA
RFc : Récepteur reconnaissant le fragment Fc des Immunoglobulines
TCR : Récepteur spécifique de l'antigène
TDH : Hypersensibilité de type retardé (réaction inflammatoire)
TH : Lymphocyte T helper
TK : Thymidine kinase

INTRODUCTION

1. AVANT-PROPOS

Le système immunitaire permet la défense de l'organisme envers les agents pathogènes. A côté d'un système non spécifique de défense, existe une défense spécifique réalisée par le système lymphocytaire.

Les organismes vivants sont constamment exposés, non seulement aux nombreuses substances inorganiques de leur environnement, mais davantage encore à la variété infinie de composés organiques, présents aussi bien dans leur milieu interne que externe. Afin de pouvoir manipuler, et dans la plupart des cas même transformer, tous ces composés de façon ordonnée, les organismes vivants ont développé des ligands dotés d'un pouvoir discriminatif exceptionnel: les protéines. Celles-ci doivent leurs propriétés particulières non seulement à la grande richesse de leurs modèles structuraux, mais aussi à la constance rigoureuse de toute structure individuelle. Suivant leur localisation et leur fonction au sein de la cellule vivante (ou en dehors de celle-ci), ces ligands s'appellent: récepteurs, transporteurs, enzymes.

Au moment où les vertébrés font leur apparition au cours de l'évolution, une nouvelle famille de ligands entre en scène: les anticorps. A l'origine, ceux-ci fonctionnaient en tant que récepteurs sur la paroi des lymphocytes, et devaient assurer la distinction entre "soi" et "non-soi" en d'autres mots entre des parties du propre corps et des intrus (le plus souvent vivants) du monde extérieur, afin d'éliminer ces derniers. Ils se distinguent des autres protéines parcequ'ils ont réussi à développer une variété infinie de liaisons possibles, et ce à l'intérieur d'un même organisme, sur base d'un seul modèle de configuration spatiale. Cela n'est possible que par une manipulation particulière du génome, qui permet d'obtenir, avec un minimum d'information génétique, un maximum d'expressions possibles.

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes natifs par des immunoglobulines membranaires qu'ils peuvent sécréter après activation. Cependant les immunoglobulines solubles ne peuvent se lier aux antigènes intracellulaires.

Les lymphocytes T reconnaissent l'antigène par le récepteur des cellules T (TCR), molécules faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Ils ne sécrètent pas de récepteurs et ne reconnaissent pas les antigènes natifs mais des fragments d'antigène associés à des molécules du soi.

| | Lymphocyte B | Lymphocyte T |
|---|-------------------------------|--------------|
| Récepteur spécifique de l'antigène | Immunoglobulines membranaires | TCR |
| Sécrétion du récepteur | + | - |
| Reconnaissance d'un antigène soluble | + | - |
| Reconnaissance d'un antigène présenté en membrane par une CPA | - | + |

TABLEAU 1 : Comparaison du récepteur et de la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B et T

| | Foie foetal / moëlle osseuse | | | Rate / Ganglions | | |
|--|------------------------------|--|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--|
| <i>Type de cellule</i> | cell. souche multipotente | progéniteur B | Pré B | B repos immature | B activé mature | plasmocytes |
| <i>Ig: ce qui se passe au niveau génomique</i> | expression de l'ADN germinal | 1er réarrangement au niveau de la région VH de l'Ig. | VH commence à être transcrite | réarrangement de la ch. légère, mutation et transcription | | |
| <i>Présence d'Ig.</i> | 0 | 0 | μc μ=chaîne lourde c=cytoplasme | μm et μc m=membraire | μm + IgA, IgE et IgG membranaires | IgM, IgA, IgE et IgG membranaires et sécrétées |
| <i>Ag. de classe II</i> | ⊖ | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ | ⊕ |

Tableau 2: Phases de maturation des lymphocytes B

Le tableau 1 reprend les différentes caractéristiques de ces deux types cellulaires.

Dans le cadre de ce travail, nous porterons une attention particulière aux lymphocytes B, car ils sont le siège de la synthèse des anticorps et de leurs divers isotypes, objets de notre étude.

2. LES LYMPHOCYTES B.

Le maintien de la production d'anticorps après la thymectomie néo-natale, plaide pour l'existence d'une population lymphocytaire d'origine non-thymique. L'histologie de la rate et des ganglions, permet également de s'en rendre compte, car on y trouve deux zones différentes, la population lymphocytaire des unes (zone paracorticales ganglionnaires et zones périartériolaires de la rate) étant disparue après thymectomie néo-natale et celles des autres (zones médullaires et follicules lymphoïdes des ganglions, et de la rate) demeurant présente. Cette population lymphocytaire est appelée lymphocytes B.

2.1. Ontogenèse.

Comme les lymphocytes T, les lymphocytes B proviennent de cellules souches de la moelle osseuse. Leur maturation en lignée B se passe chez les oiseaux dans la bourse de Fabricius; chez les mammifères, il n'existe pas d'organe équivalent et l'endroit de formation des lymphocytes B reste inconnu: ce pourrait être le tissu lymphoïde associé au tractus digestif (amygdale, appendice, plaques de Peyer) mais on a aussi proposé les follicules lymphoïdes, ou la moelle osseuse elle-même.

Au cours de leur maturation, les cellules B se couvrent de récepteurs à antigène en surface. Le premier stade de maturation dans la lignée B est caractérisé par une synthèse d'immunoglobulines qui se trouvent en situation intracytoplasmique (cellules pré-B). Ensuite, ces immunoglobulines migrent vers la membrane et s'y implantent (cellules B); elles y sont abondantes et permettent de détecter les cellules B au moyen de sérum anti-immunoglobulines fluorescent. A ce stade, le lymphocyte B est immuno-compétent, et capable de réagir à la rencontre de l'antigène.

On peut retrouver les différentes phases de maturation des lymphocytes B au tableau 2.

Remarques:

* les chaînes lourdes μ membranaires, sont fabriquées dans le cytoplasme.

* l'Ag. de classe II est porté par les cellules présentatrice d'Ag. (CPA).

Il fait partie du Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

2.2. Fonctions des lymphocytes B.

Des expériences de restauration différentielle de souris thymectomisées à la naissance et irradiées, ont conduit à attribuer des fonctions totalement distinctes aux lymphocytes B et aux lymphocytes T. Chez de tels animaux, la restauration complète des capacités immunitaires n'est accomplie que par le transfert conjoint de cellules thymiques (lymphocytes T) et de cellules médullaires (cellules souches conduisant aux lymphocytes B). A condition de provenir de donneurs isogéniques, ces cellules seront conservées et s'exprimeront chez le receveur; on pourra les suivre séparément au cours de leur devenir pour autant qu'elles proviennent de donneurs de sexes différents (présence de chromatine sexuelle chez les cellules mâles). L'examen des lymphocytes de tels animaux restaurés et stimulés par un antigène (globules rouges) montre que les lymphocytes producteurs d'anticorps proviennent de la population médullaire (lymphocyte B).

2.3. Les marqueurs membranaires.

La distinction fondamentale des lymphocytes T et B peut donc se faire sur la base de leurs marqueurs membranaires. On sait maintenant que les lymphocytes B possèdent des récepteurs (les Ig) membranaires ou sécrétés qui peuvent reconnaître des antigènes natifs, c'est-à-dire conformationnels ou encore non-processés.

Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T possèdent des récepteurs uniquement membranaires. Ils ne reconnaissent pas les antigènes natifs, mais seulement les antigènes processés. Ces antigènes processés sont associés à des molécules d'histocompatibilité de classe I ou de classe II.

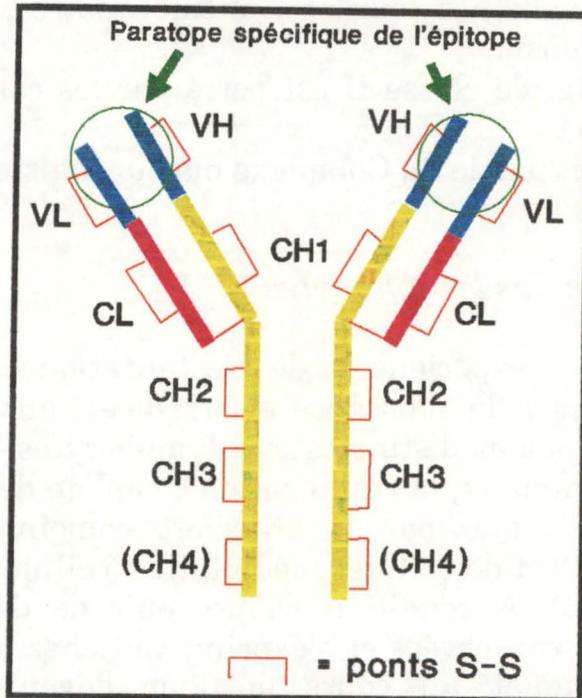


Figure 1: Structure primaire d'une molécule d'IgG

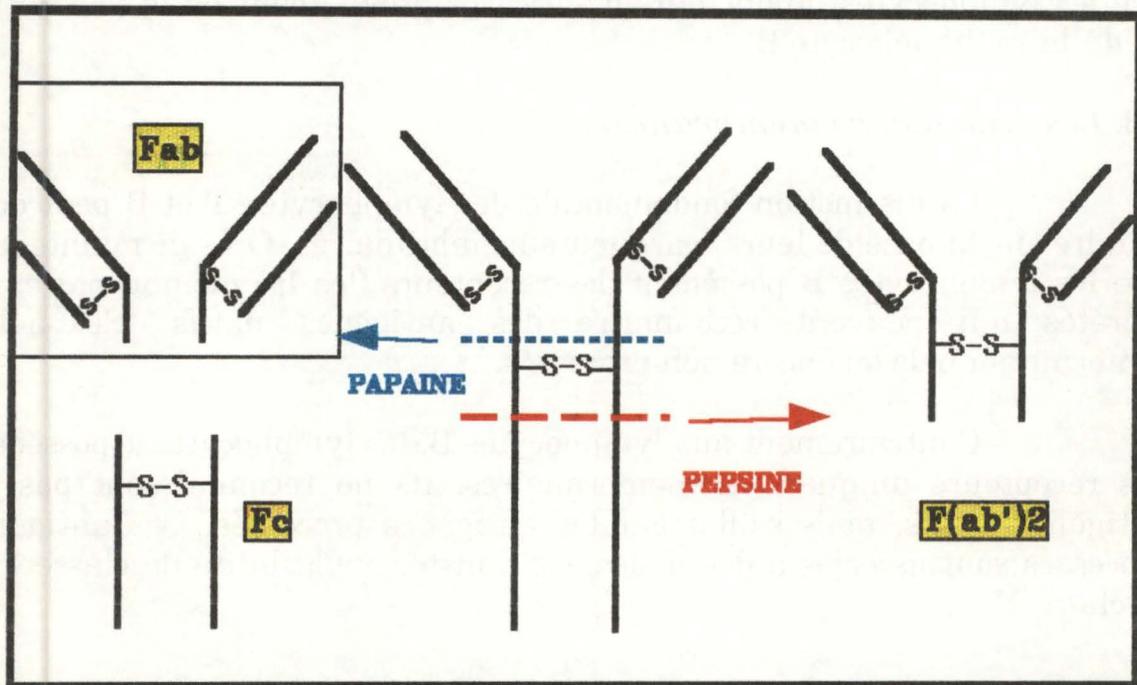


Figure 2: Protéolyse enzymatique d'une IgG

3. LES IMMUNOGLOBULINES

3.1. *Structure*

Les immunoglobulines sécrétées (Igs) sont constituées de deux fois deux chaînes. Deux chaînes lourdes appelées H (pour heavy) et deux chaînes légères appelées L (pour light). Sur chaque chaîne, on trouve une partie constante (C) et une partie variable (V). L'immunoglobuline est composée de différents domaines, et chacun de ces domaines, porte un pont disulfure.

Les parties variables permettent la reconnaissance de l'antigène (site anticorps, paratope spécifique de l'épitope). Les parties constantes, même si elles ne participent pas à cette reconnaissance, jouent un rôle non spécifique important pour l'efficacité des Igs. Cette partie constante caractérise les différentes classes d'immunoglobulines. On peut voir ces différents domaines illustrés à la figure 1.

3.2. *Les différents fragments d'immunoglobulines.*

On peut distinguer 3 fragments par protéolyse grâce à des enzymes telles que la pepsine et la papaïne. On peut voir ces différents fragments à la figure 2.

Le fragment Fc (fragment cristallisable) ne possède aucune spécificité pour l'Ag., c'est à son niveau toutefois que se trouvent d'autres propriétés biologiques importantes des immunoglobulines telles que la fixation aux récepteurs Fc, la fixation du complément ou encore la fixation de la protéine A (ou C) de certains Staphylocoques.

3.3. *Les variations isotypiques.*

Les variations isotypiques déterminent le type de chaîne lourde: α , ϵ , μ , δ , γ et par conséquent les classes d'immunoglobulines: IgA, IgE, IgM, IgD, IgG. Mais elles déterminent également le type de chaîne légère :
kappa (κ) ou lambda (λ).

Dès lors on définira comme isotype, au sein d'une même espèce, toute variation au niveau de la partie constante de la molécule d'Ig., que ce soit sur la chaîne lourde ou sur la chaîne légère, qui caractérise l'antigénicité isotypique de cette chaîne dans cette espèce et la distingue à ce niveau des autres espèces.

| Type de variation | Distribution | Variant | Localisation | Exemples |
|-------------------|--|--------------|---------------------------------|--|
| Isotypique | Tous les variants sont présents dans le sérum d'un individu normal | Classes | CH | IgM, IgA |
| | | Sous-Classes | CH | IgA1, IgA2 |
| | | Types | CL | Kappa, lambda |
| | | Sous-Types | CL | oz+, oz |
| | | Sous-Groupes | VL | VKI, VKII, ... |
| Allotypique | Formes alléliques; ne sont pas présentes chez tous les individus | Allotypes | Surtout CH / CL parfois VH / VL | Groupes Gm (hommes) b4,b5,b8,b9 chaînes L des lapins |
| Idiotypique | Spécificité individuelle de chaque molécule d'Ig. | Idiotypes | Régions V | Formation d'un Ac. antiidiotype |

TABLEAU 3 : Résumé des variants d'immunoglobulines

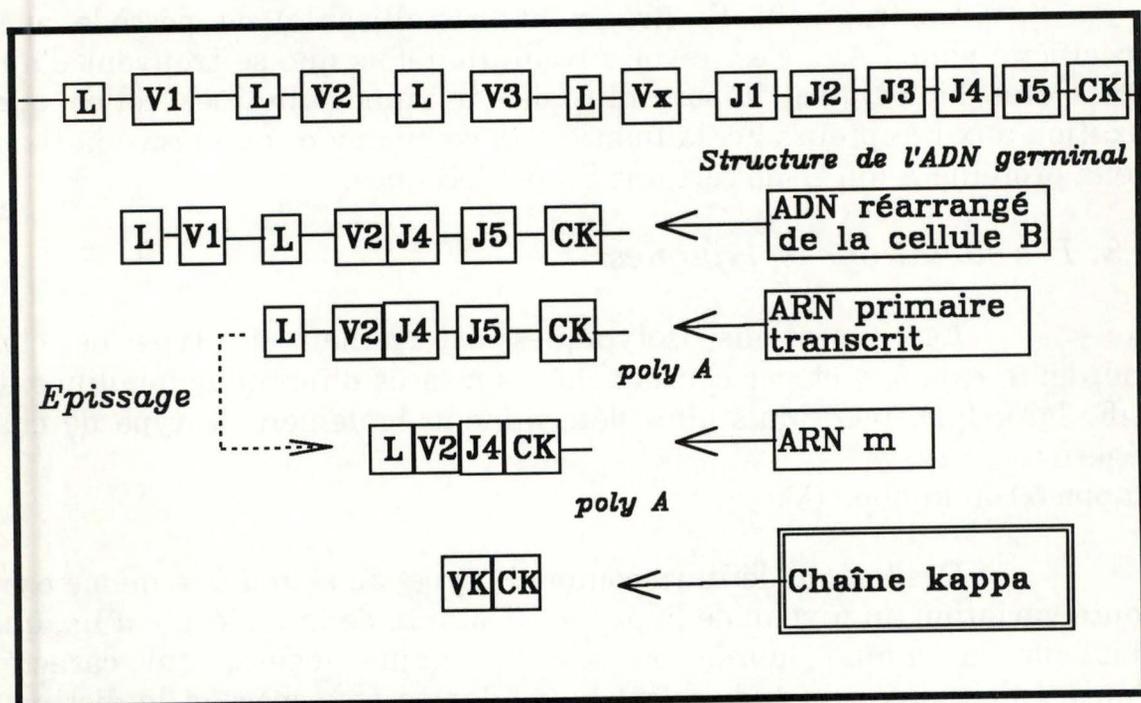


Figure 3: Formation de la chaîne kappa chez la souris

Au même titre que les variations isotypiques, il faut également noter l'existence de variations allotypiques. Celles-ci se présentent en certaines positions dans la séquence des parties constantes de l'Ig. Ce qui permet au sein d'une même espèce, de voir apparaître différents allèles pour l'isotype A et l'isotype G. Il existe aussi des variations idiotypiques qui sont rassemblées au niveau des portions variables de l'Ig. Ainsi, deux individus appartenant à la même espèce répondent à l'injection d'un même antigène, par la synthèse d'anticorps de même spécificité et de mêmes classes (IgM, IgG, etc.) mais se différenciant par une spécificité idiotypique propre (voir tableau 3).

4. LES MECANISMES DE DIVERSIFICATION DES DIFFERENTES IMMUNOGLOBULINES.

Comme à tout antigène correspond un anticorps spécifique, on rencontre dans la nature une variabilité importante de ces anticorps.

4.1. *Les familles multigéniques.*

Il s'agit d'une diversification due à la présence de gènes V codant pour la partie variable de l'immunoglobuline. Ces gènes subissent un véritable tirage au sort. En examinant l'exemple de la formation de la chaîne κ chez la souris, illustré à la figure 3, on remarque que celle-ci ne comporte qu'un seul gène V_k , alors qu'au départ sur l'ADN germinale, avant la recombinaison, on en comptait plusieurs centaines. Chaque gène V possède la même chance que ses voisins d'être tiré au sort.

4.2. *Les recombinaisons d'origine germinale.*

Dans un premier temps nous étudierons la chaîne κ (kappa) chez la souris, celle-ci étant la plus fréquente des deux types de chaînes légères. Chez cette même souris, la partie génique VL est composée d'environ 350 gènes. La famille multigénique κ contient une séquence leader (L), une séquence variable (V_x) et une séquence de jonction (J) qui toutes trois forment la partie variable de la chaîne légère κ . Cette même famille comprend également une séquence codant pour la partie constante de la chaîne légère κ .

Etant donné que la recombinaison se fait toujours entre un L + V_x , un J et un C_k , et qu'en outre il existe quelques 350 (L + V_x) et 5J, un rapide calcul permet d'estimer qu'un tel mécanisme de recombinaison peut

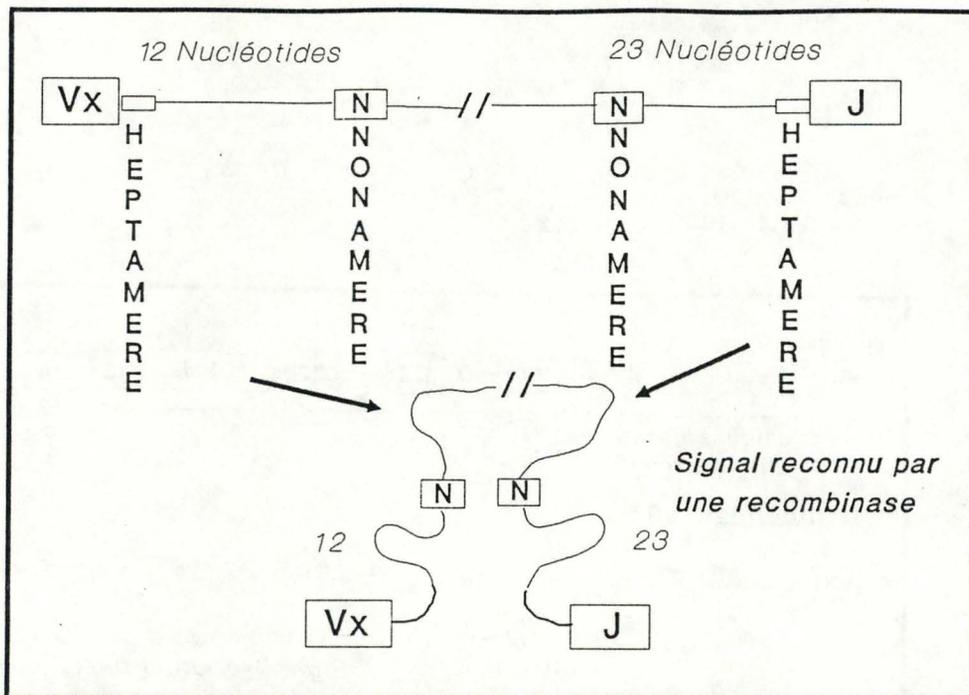


Figure 5: Famille multigénique kappa (VL) chez la souris, mécanisme de recombinaison

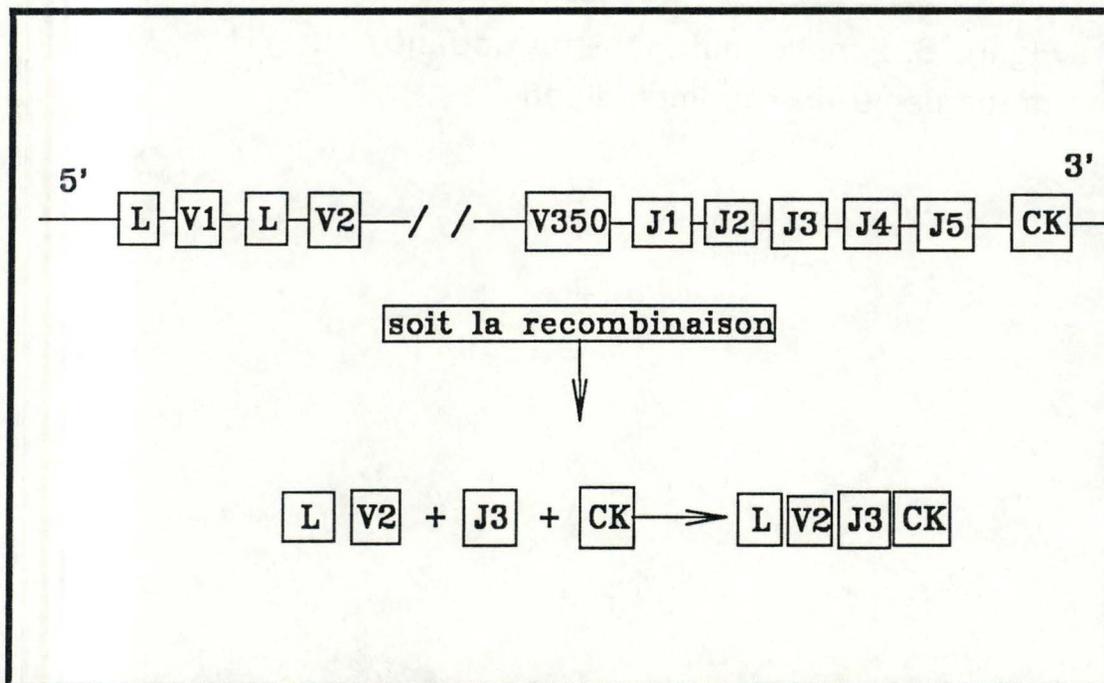


Figure 4: Séquences de la famille multigénique Kappa chez la souris et exemple d'une recombinaison

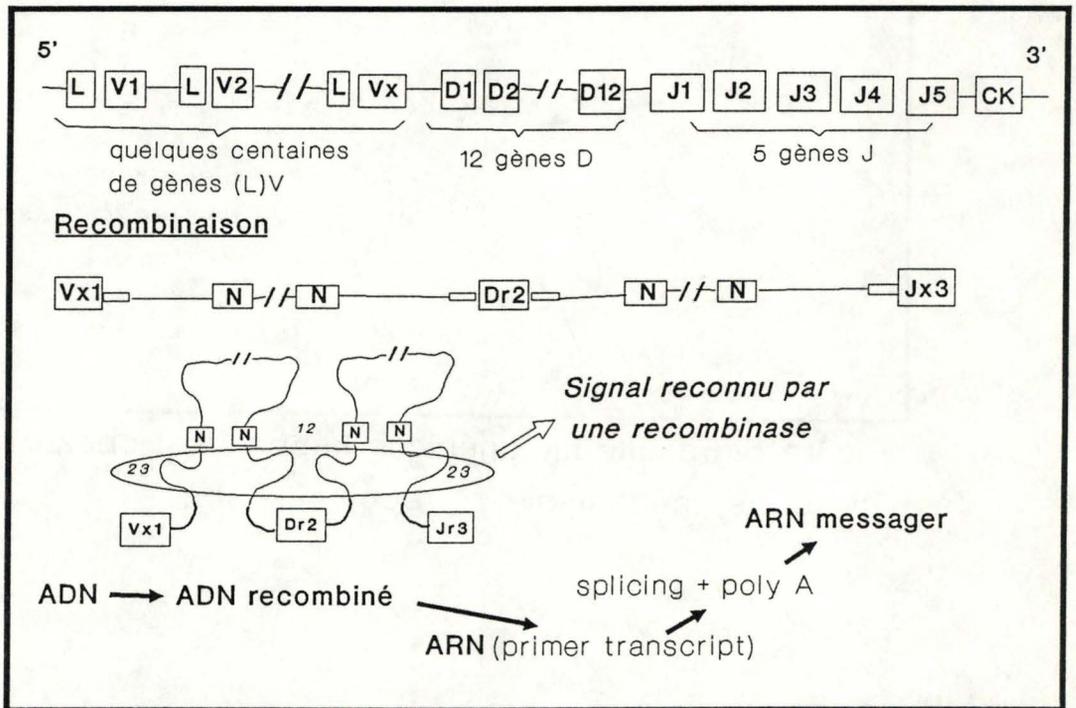


Figure 6: Famille multigénique codant pour VH ,
mécanisme de recombinaison

offrir environ 1750 possibilités de recombinants. Un exemple est repris dans la figure 4.

Il faut savoir, qu'il existe des séquences particulières guidant la recombinaison. On y retrouve des heptamères et des nonamères contenant chacun respectivement 7 et 9 nucléotides. Ils sont disposés comme le montre la figure 5. Le premier heptamère suit directement la séquence variable (Vx) et le second précède la séquence de jonction J. Le premier nonamère se situant à 12 nucléotides de l'heptamère suivant Vx et le second nonamère se trouvant à 23 nucléotides de l'heptamère précédant la séquence J. La recombinaison se passe toujours en 12-23 et jamais en 23-12.

De même, pour la partie variable de la chaîne lourde, on retrouve des séquences particulières guidant la recombinaison, comme le montre la figure 6. Cette chaîne serait composée de quelques centaines de gènes (L)V, au moins 12 gènes D (pour diversification) et de 5 gènes J. On peut observer sur la fig. 6 que la séquence de 23 nucléotides suit directement V et précède J. Puisque les recombinaisons en 23-23 n'ont jamais lieu, V et J ne seront jamais directement associés en VJ. D'autre part, la séquence de 12 nucléotides se trouve de part et d'autre de D, ce qui permettra la jonction entre V et J par l'intermédiaire de D. Nous aurons donc l'ordre suivant: (L)VDJ dans tous les cas. Le nombre de recombinaisons théoriques au niveau des chaînes H est de $\pm 250 \times 12 \times 5 = 15000$.

Nous ne rentrerons pas dans les détails des mécanismes de recombinaison qui sortent du cadre de ce mémoire. Il nous apparaissait cependant important de les citer, car ils constituent une des causes de diversité et partant de spécificité des immunoglobulines.

4.3. Imprécisions des recombinaisons.

Si le mode de recombinaison avait lieu à un nucléotide près à chaque fois, on obtiendrait un nombre fini de possibilités d'Ig., ce qui ne concorde pas avec le nombre d'antigènes reconnus. En fait, pendant la recombinaison, il peut y avoir un "slipping" d'un nucléotide. Ceci peut entraîner la modification de l'acide aminé suivant et donc de la spécificité de l'Ig.

4.4. Les mutations somatiques ponctuelles.

Ces différentes mutations se situent au niveau de la région variable de l'Ig au cours de la multiplication clonale des lymphocytes B, lors de la réponse à l'antigène. Elles permettent une sélection pour une meilleure affinité pour l'Ag.

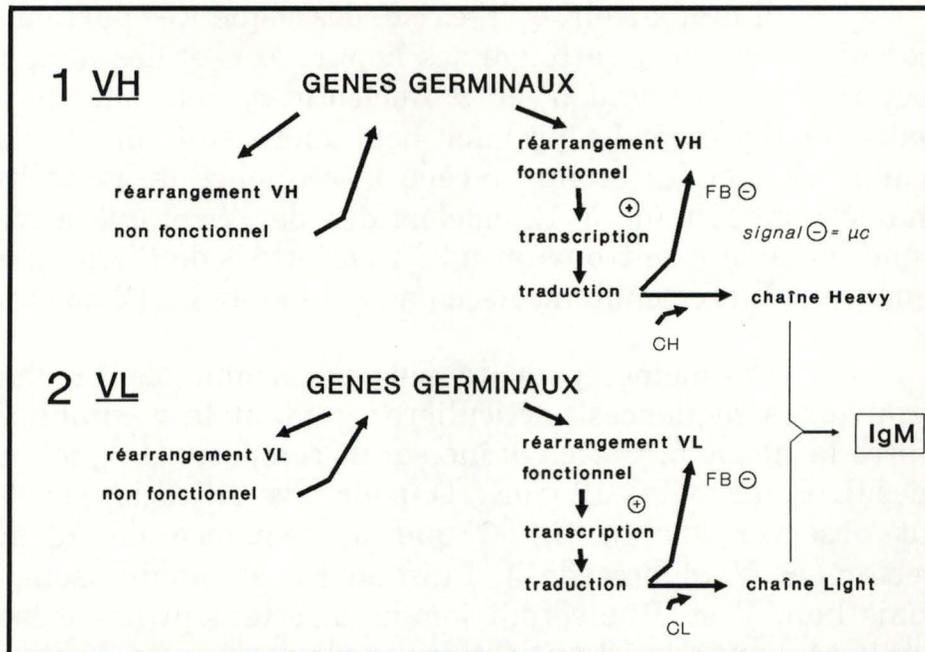


Figure 7: Réarrangement des gènes germinaux conduisant à la synthèse d'IgM

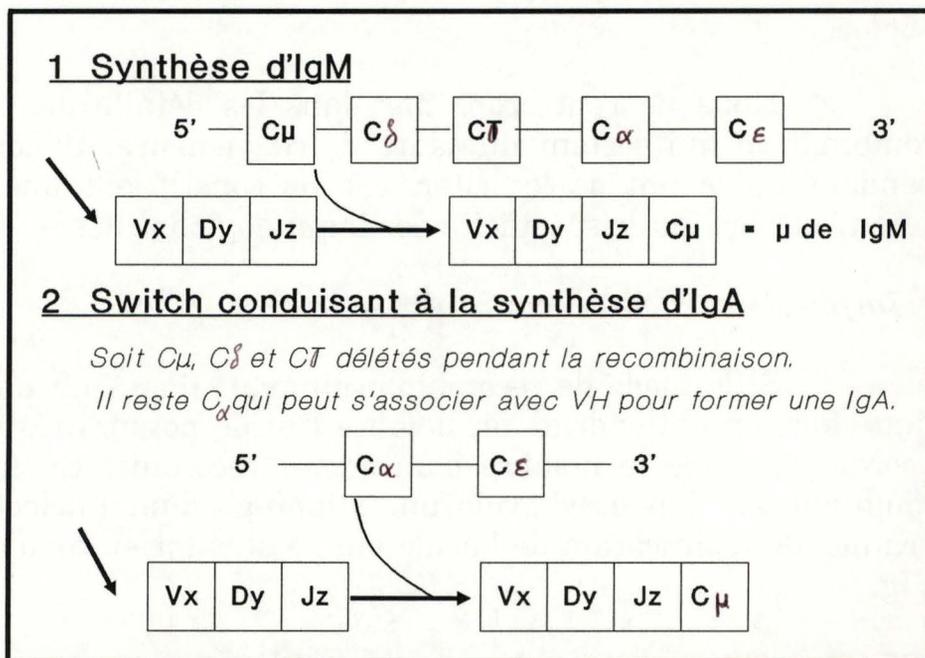


Figure 8: Exemple de Synthèse d'un autre isotype d'Ig. au départ d'IgM.

4.5. Association VH.- VL.

La partie VH de l'Ig. définit sa variabilité propre. Il en est de même pour la partie VL. L'Ig. étant une association de ces deux variabilités, il apparaît dès lors une source de variabilité supplémentaire. Au départ, c'est-à-dire, avant la recombinaison il existe des gènes germinaux non fonctionnels (100 (L)V+12D+5J). Cette portion du génome va être réarrangée par recombinaison jusqu'à obtenir un arrangement fonctionnel de la VH. Il peut arriver que certaines recombinaisons conduisent à des codons "stop". Dans ce cas la recombinaison se poursuit pour obtenir un arrangement capable de fonctionner correctement. Théoriquement, sans tenir compte de ces réarrangements non fonctionnels, le nombre de spécificités anticorps pourront être de $15000 \times 1750 = 26,25 \cdot 10^6$, nombre encore fortement amplifié par les mutations somatiques.

Il est vrai que la fréquence de réarrangements non-fonctionnels est élevée. La transcription de VH n'a lieu que si l'arrangement est correct. Il en est exactement de même en ce qui concerne la partie VL. Une interrelation des deux (VH et VL) permettra la synthèse d'IgM comme le montre le schéma à la figure 7.

Dans l'ontogenèse des lymphocytes B, toutes les phases de différenciation avant la formation de μ m (μ pour chaîne lourde et m pour membranaire) ne sont pas modulées par la présence d' Ag. Il n'y aura au départ que production d'immunoglobulines membranaires de classe M. C'est au contact avec l'Ag., qu'il y aura libération, par les lymphocytes T, d'interleukines (dont IL2, IL4 et IL5 sont les plus connues et les plus importantes) provoquant éventuellement un "switch" (changement qualitatif au niveau de la chaîne lourde dans la production des Ig., par les lymphocytes B). Ce phénomène va entraîner la synthèse d'autres Ig. telles que IgA, IgE, IgG, et IgD.

C'est le gène C qui est responsable de la classe de l'Ig. Selon le type de gène: C_μ , C_δ , C_κ , C_α ou encore C_ϵ ; leur séquence codera respectivement pour la synthèse d'IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Un exemple est repris à la figure 8.

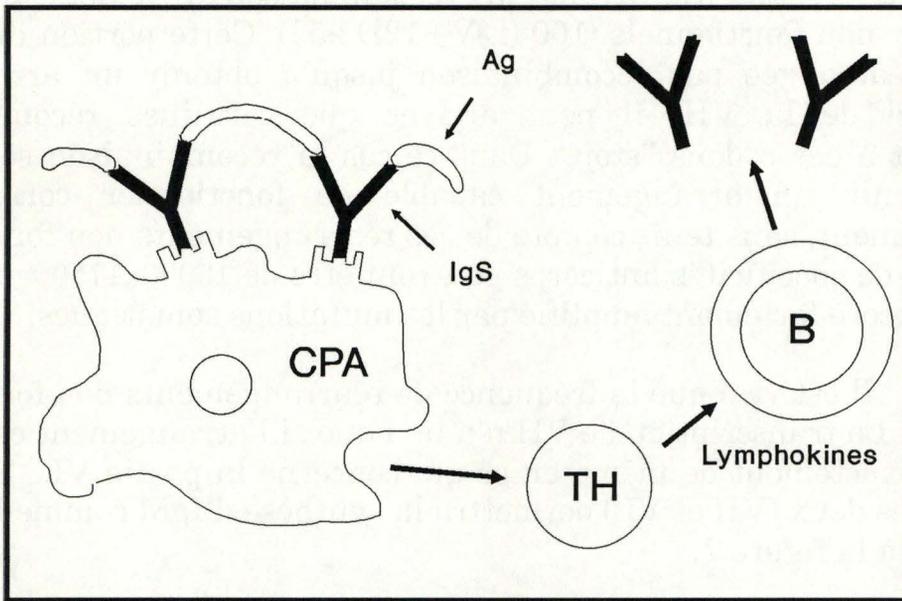


Figure 9: Régulation positive de la Synthèse d'Ig.
par les complexes immuns.

5. REGULATION DE LA SYNTHÈSE D'ANTICORPS.

5.1. *Régulation au niveau des lymphocytes B.*

5.1.1. *Au niveau des immunoglobulines membranaires (Igm).*

Les immunoglobulines membranaires ont un rôle positif car elles servent de piège à antigène. Le complexe Ag.-Igm est phagocyté. Une fraction de l'antigène, qui est partiellement métabolisé, est présentée à la surface de la cellule avec une molécule d'histocompatibilité de classe II.

5.1.2. *Au niveau des immunoglobulines sécrétées (Igs).*

* *Effet positif.*

Au début de la réponse, lors de la synthèse d'IgM par le lymphocyte B, les Igs auront un effet positif sur la synthèse des Ig. En effet, la majorité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) captent l'Ag. de façon non-spécifique, grâce à la portion Fc de l'Ac., qui a préalablement fixé cet Ag. Les CPA possèdent des RFc qui permettront un ciblage du complexe Ag.-Ac. La présence d'Ac. sur une CPA favorise la présentation de l'Ag. aux cellules TH (T helper), qui via la synthèse de lymphokines vont aider les lymphocytes B à produire des Ac. Les lymphocytes B peuvent jouer eux-mêmes le rôle de CPA, par leurs immunoglobulines membranaires pouvant capter l'Ag. (voir Fig.9). Un effet similaire est produit par la fixation sur les CPA, des fragments c3b résultant de l'activation du complément par les complexes immuns.

* *Effet négatif.*

D'un côté, les Ac. peuvent avoir un effet négatif sur leur propre synthèse. En fixant l'Ag. les Igs camouflent le site qu'elles recouvrent empêchant ainsi les lymphocytes B de reconnaître celui-ci. Par cette privation de la reconnaissance, les lymphocytes B ne sont plus stimulés. Il n'y a donc plus de synthèse d'Ac.

D'un autre côté, l'opsonisation augmentant, les lymphocytes B seront moins stimulés. En effet, lorsque la quantité d'Ig. augmente, l'opsonisation s'accroît, favorisant la phagocytose des Ag. par les CPA. Il en résulte une diminution de la quantité d'Ag. Les lymphocytes B sont ainsi moins stimulés et la synthèse d'Ac. est réduite. Bien qu'ayant un effet négatif sur la stimulation des lymphocytes B, cette diminution de la quantité d'Ag. aura néanmoins un effet positif sur la qualité de la réponse. Seules les

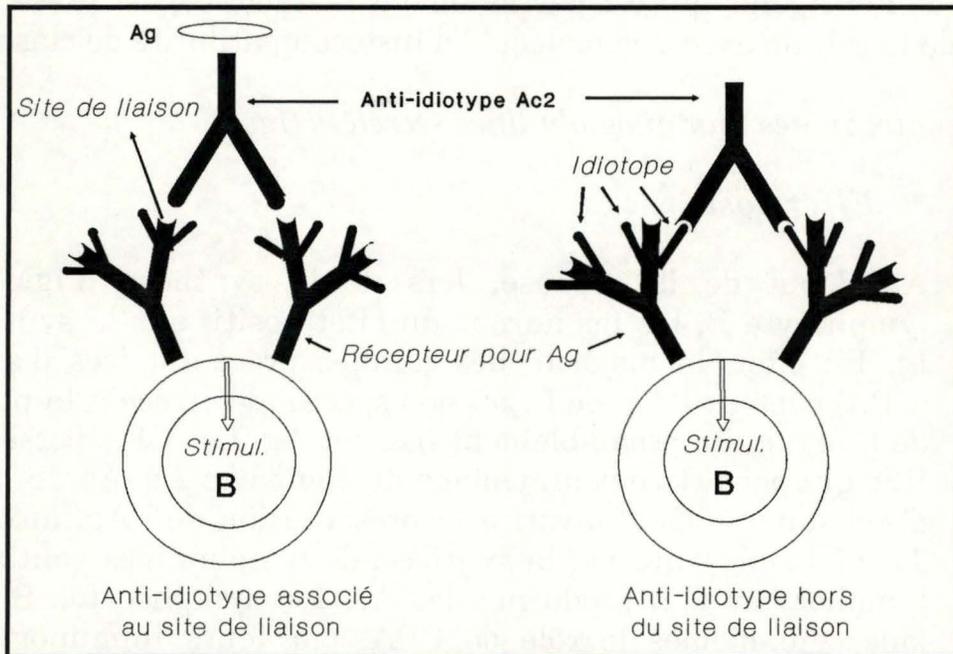


Figure 10: Régulation par les anti-idiotypes associés ou non au site Ac

cellules ayant des récepteurs de forte affinité pour l'Ag. répondront à celui-ci. Ceci explique que l'affinité Ag.-Ac. croît en fin de réponse.

Les cellules B peuvent également se transformer, soit en cellules mémoires, soit en cellules tolérisées.

- Les **cellules mémoire**: quand le récepteur Fc et le récepteur pour l'Ag. des lymphocytes B sont liés par des complexes Ag-Ac, les cellules B reçoivent un signal les empêchant d'entrer dans la phase de production d'Ac. Le pontage de ces deux types de récepteurs induit la transformation en cellule mémoire qui est mise en réserve pour la prochaine réponse. Ce phénomène n'a lieu que lorsque la concentration en Ac. est très faible. Les cellules mémoire sont incapables de produire des Ac.

- Les **cellules tolérisées**: elles n'apparaissent que lorsque la concentration en Ac. est importante. Il se forme dans ces conditions des complexes immuns qui sont constitués de nombreux Ac. et peu d'Ag. Ceci entraîne la tolérisation du lymphocyte B. Cette transformation produit une diminution de la quantité de lymphocytes B, créant ainsi un effet négatif sur la synthèse d'Ac.

5.2. *Régulation par un réseau idiotypique.*

L'idiotype est propre aux régions variables de l'Ig. Ces régions variables portent des idiotopes qui caractérisent l'idiotypie de l'Ac. Ces idiotopes, qui jouent le rôle d'épitopes spécifiques de l'Ig. sécrétée par un clone particulier, vont induire la synthèse d'Ac. dirigés contre cette région. En effet, l'Ac. n'ayant été jamais rencontré dans l'organisme, il est considéré comme étranger, c'est-à-dire antigénique pour le système immunitaire.

Souvent, l'anticorps anti-idiotype (Ac₂) est l'image interne de l'Ag. L'Ag. et l'Ac₂ sont cependant bien différents. L'Ac₂ est une Ig. possédant un fragment Fc qui permet non seulement une régulation lors de la formation de complexes immuns, mais aussi la fixation sur les RFc.

Il est clair que l'anti-idiotype, peut jouer le rôle de l'Ag. d'origine en augmentant ou en diminuant la réponse immunitaire. Les anti-idiotypes associés aux sites de liaison, miment l'effet de l'Ag. et lient entre-eux les récepteurs pour l'Ag.. Ceci délivre un signal stimulant la cellule B. Des anti-idiotypes non associés aux sites de liaison et liant également les récepteurs pour l'Ag., peuvent exercer le même effet (voir Fig.10).

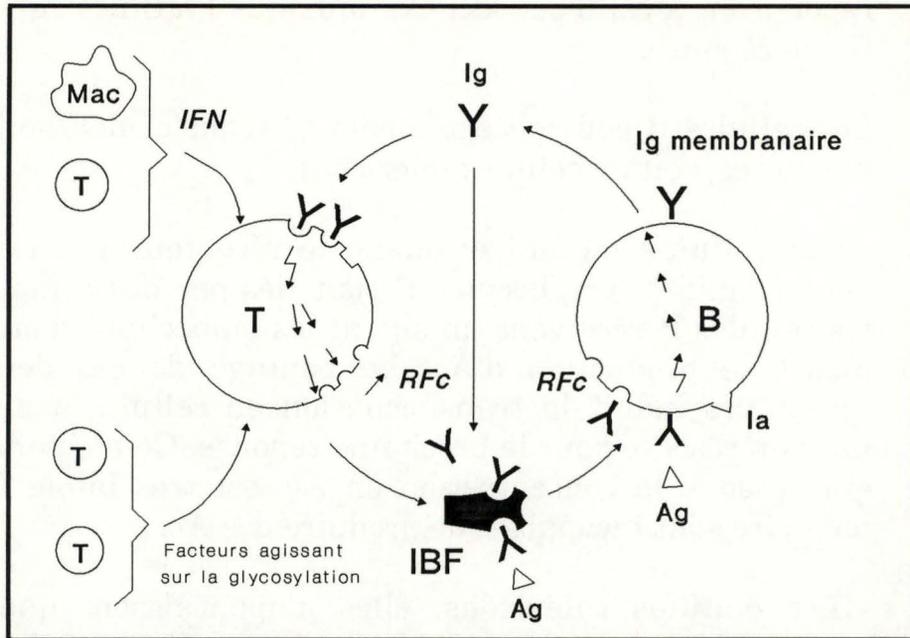


Figure 11: Boucle de régulation par les IBF (d'après SAUTES et FRIDMAN, 1987)

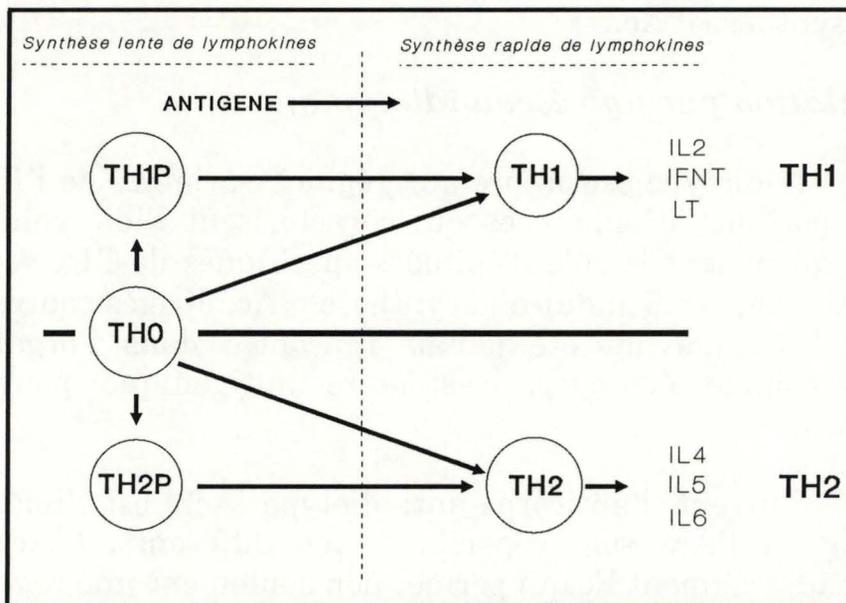


Tableau 4: Lymphokines synthétisées par les TH1 et TH2. (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989).

5.3. *Régulation par un réseau isotypique: les "Immunoglobulin-Binding Factor".*

Les différents isotypes d'Ig. interagissent avec les RFc, récepteurs membranaires de spécificité correspondante, exprimés entre autre sur les lymphocytes T. Cette fixation provoque une augmentation du taux d'expression de ces RFc et une production d'IBF (Immunoglobulin-Binding Factor) spécifique de cet isotype. Ces IBF, qui pourraient représenter une forme soluble ou sécrétoire des RFc, agissent au niveau des lymphocytes B et régulent la production d'un isotype spécifique. Ainsi, chaque classe d'Ig. (IgM, IgG, IgE...) contrôle son propre niveau de synthèse par une boucle de régulation faisant intervenir un IBF spécifique de cette classe et dont l'activité peut-être suppressive ou amplificatrice. Cette boucle est proposée à la figure 11.(SAUTES et FRIDMAN, 1987).

Il semble que la structure membranaire cible du facteur, en ce qui concerne les IBF, soit l'Ig membranaire du même isotype que l'Ig. sécrétée par les cellules B. Par exemple, des lymphocytes B ayant commuté pour synthétiser des Ac. de classe IgG expriment sur leur membrane des Ig. de même spécificité qui peuvent servir de cible à l'IBF.

Ce modèle n'explique évidemment pas quels isotypes vont être produits par les lymphocytes B. Ceci dépend de la nature de l'Ag. et de sa voie d'inoculation. Par contre, il schématise les mécanismes responsables de la modulation du taux de production d'une classe d'Ig. dans des normes physiologiques.

5.4. *Régulation par les lymphocytes T helper (TH).*

Le lymphocyte T helper est une sous-population de cellules T, qui peut aider au développement de cellules T cytotoxiques par l'intermédiaire de lymphokines ou coopérer avec les cellules B pour la production d'anticorps. Les cellules TH reconnaissent habituellement l'Ag. en association avec les molécules de classe II du CMH. En outre elles produisent des lymphokines telles que: l'interféron gamma (IFN- γ), l'interleukine 2 (Il 2), Il 4, Il 6 et Il 3. Les 4 premières vont induire la différenciation des lymphocytes B, alors que l'Il 3 est un facteur multipotent jouant un rôle au niveau de la myélopoïèse. Sur base de leur production préférentielle de certaines lymphokines, on a subdivisé (au moins chez la souris) la population TH en 2 sous-populations: TH1 et TH2. On peut supposer que suivant l'activation préférentielle de l'une ou de l'autre de ces deux populations de TH la réponse immunitaire sera guidée par les lymphokines vers diverses modalités effectrices. Les lymphokines synthétisées par les 2 types de cellules helper sont présentées dans le tableau 4.

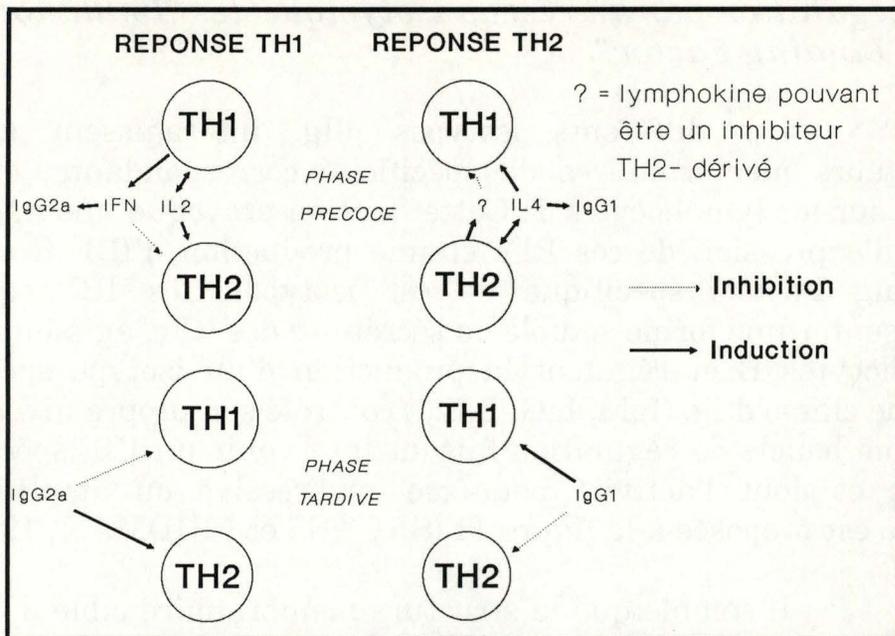


Figure 12: Inter-régulation entre les cellules TH1 et TH2 (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

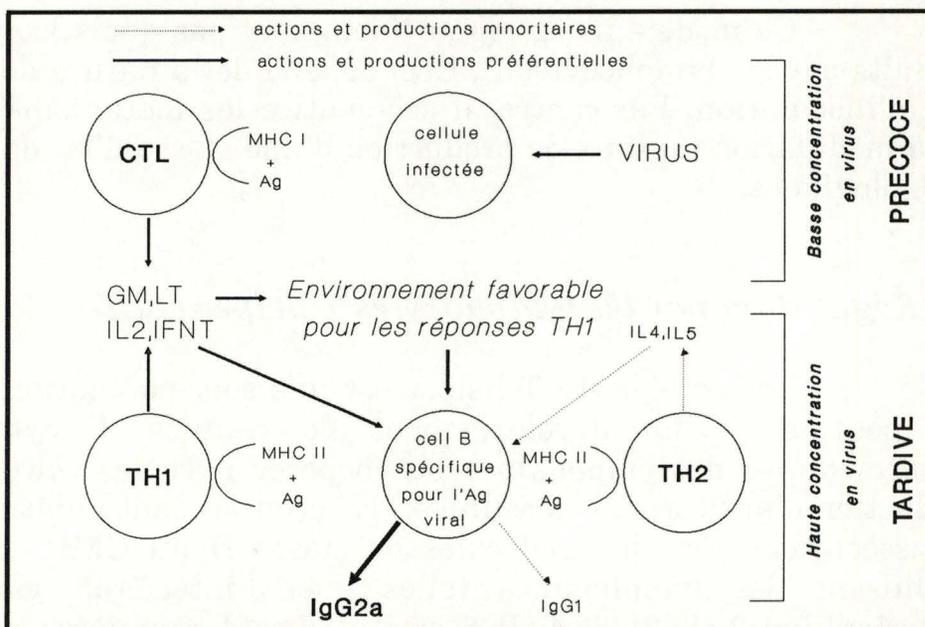


Figure 13: Réponse immunitaire contre un Ag. viral (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

a) **interrégulation de la réponse TH1 et TH2.**

L'existence d'une interrégulation de ces deux types cellulaires nous suggère la question suivante: quel mécanisme détermine l'activation sélective ou la différenciation des cellules TH1 et TH2?

Le ratio des cellules TH1/TH2 semble influencé par les cellules présentatrices d'Ag.(CPA). Les cellules B activent les cellules TH1 et en accroissent le nombre. Quant aux macrophages, ils causent l'expansion clonale des cellules TH2 (JANEWAY, 1988). Ceci nous conduit à la proposition suivante: les interactions les plus importantes entre les cellules TH1 et TH2 se font respectivement avec les macrophages et les cellules B.

Les schémas des figures 12 et 13 ont pour but de montrer cette interrégulation entre cellules TH1 et TH2. A la figure 12, on peut voir les effets prédominants durant la phase tardive et la phase précoce de réponse. Cette réponse étant dominée soit par les cellules TH1, soit par les cellules TH2. La figure 13 illustre la réponse immunitaire contre des antigènes viraux. Les cellules cytotoxiques (CTL) synthétisent un lot de lymphokines très similaires à celles des cellules TH1. L'activation de ces mêmes CTL aurait pour conséquence de faire pencher la balance en faveur des cellules TH1. Ceci concorderait avec les découvertes de VAN SNICK (COUTELIER, 1987), qui démontre que les infections virales favorisent l'obtention d'un ratio IgG2a/IgG1 plus haut que l'immunisation par les antigènes protéiques. Ce qui pourrait s'expliquer, par la synthèse préférentielle d'IgG2a sous l'action de l'IFN- γ sécrété par les cellules TH1.

b. **Rôles attendus des cellules TH1 et TH2 pour une réponse normale.**

** La réponse TH1.*

La réponse prédominante, serait la production d'un bon nombre de mécanismes cytotoxiques. Les IFN- γ et les lymphotoxines (LT) activent les macrophages, ce qui entraîne une augmentation de la mortalité au sein des parasites intracellulaires et des cellules tumorales (MURRAY, 1985 et PACE, 1983), ainsi qu'un accroissement de l'expression des récepteurs Fc pour des Ac. de type IgG2a (WARREN, 1985) (figure 14). En général, il est à savoir qu'une forte réponse par TH1 donnera comme produit surtout des réponses de type cellulaire: hypersensibilité de type IV (retardé), réaction inflammatoire (TDH) mais peu ou pas d'Ac.

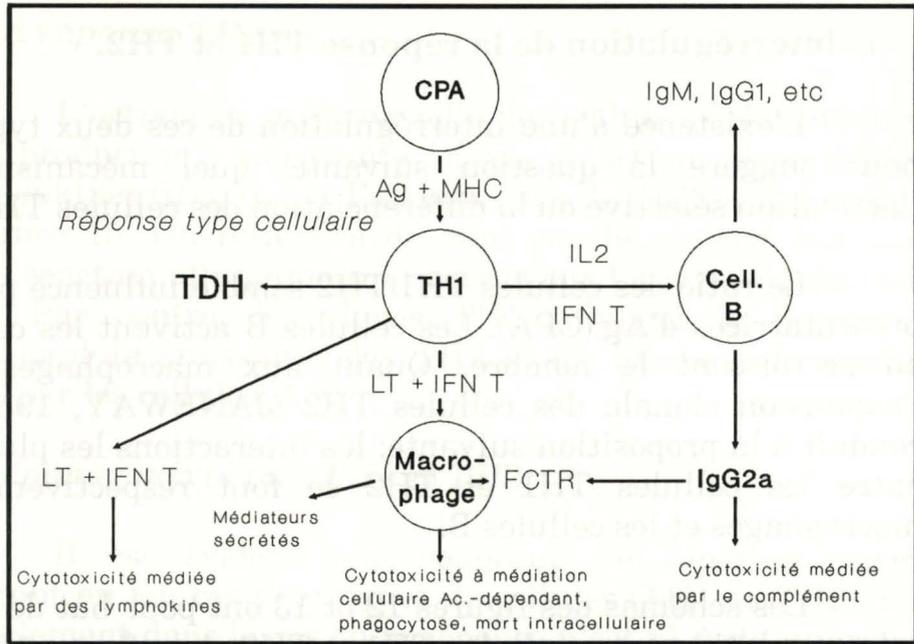


Figure 14: Principaux médiateurs dans la réponse TH1 (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

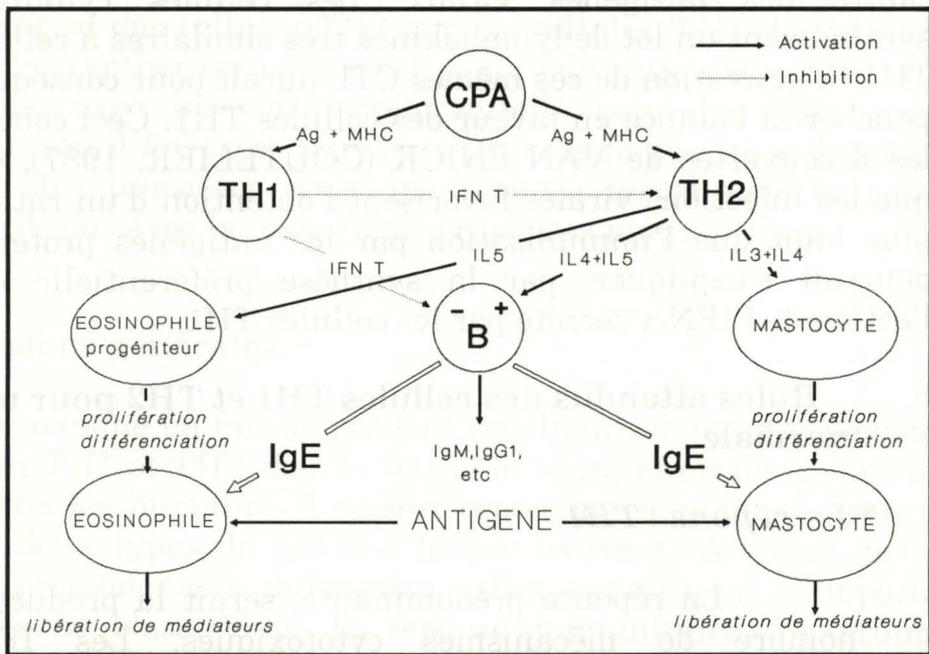


Figure 15: Régulation par les TH1 et TH2 des IgE (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

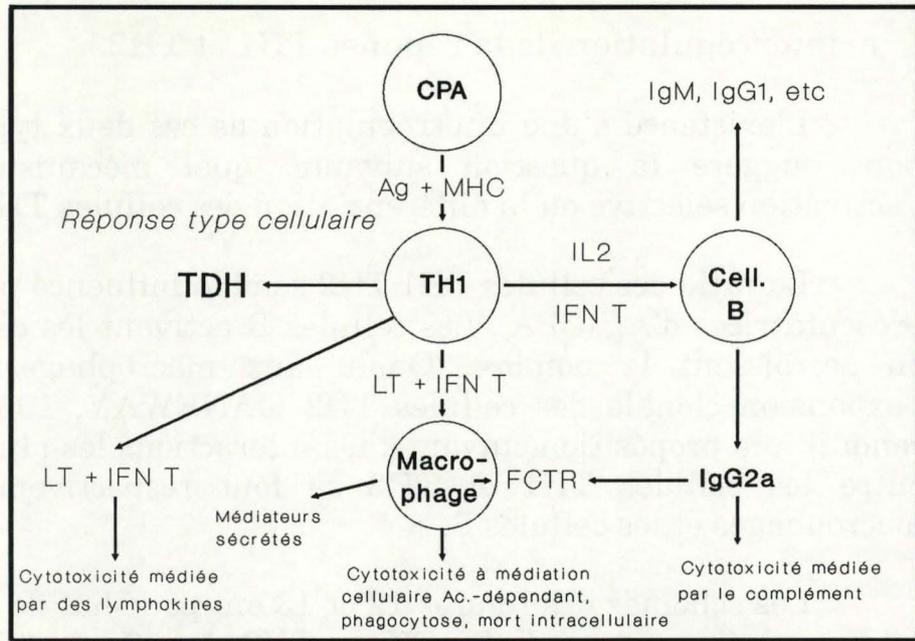


Figure 14: Principaux médiateurs dans la réponse TH1 (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

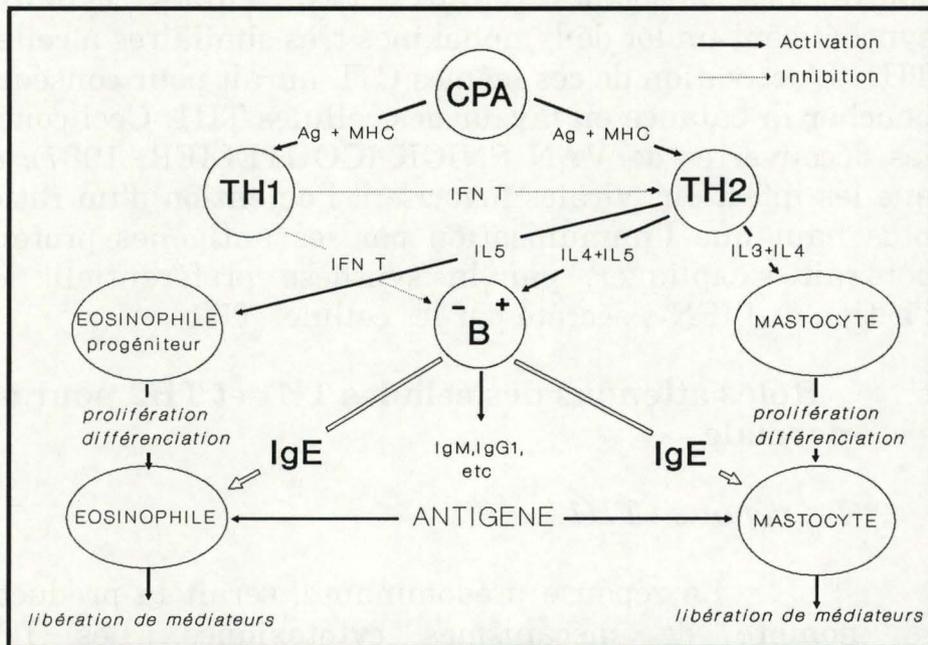


Figure 15: Régulation par les TH1 et TH2 des IgE (d'après MOSMANN et COFFMAN, 1989)

a) **interrégulation de la réponse TH1 et TH2.**

L'existence d'une interrégulation de ces deux types cellulaires nous suggère la question suivante: quel mécanisme détermine l'activation sélective ou la différenciation des cellules TH1 et TH2?

Le ratio des cellules TH1/TH2 semble influencé par les cellules présentatrices d'Ag.(CPA). Les cellules B activent les cellules TH1 et en accroissent le nombre. Quant aux macrophages, ils causent l'expansion clonale des cellules TH2 (JANEWAY, 1988). Ceci nous conduit à la proposition suivante: les interactions les plus importantes entre les cellules TH1 et TH2 se font respectivement avec les macrophages et les cellules B.

Les schémas des figures 12 et 13 ont pour but de montrer cette interrégulation entre cellules TH1 et TH2. A la figure 12, on peut voir les effets prédominants durant la phase tardive et la phase précoce de réponse. Cette réponse étant dominée soit par les cellules TH1, soit par les cellules TH2. La figure 13 illustre la réponse immunitaire contre des antigènes viraux. Les cellules cytotoxiques (CTL) synthétisent un lot de lymphokines très similaires à celles des cellules TH1. L'activation de ces mêmes CTL aurait pour conséquence de faire pencher la balance en faveur des cellules TH1. Ceci concorderait avec les découvertes de VAN SNICK (COUTELIER, 1987), qui démontre que les infections virales favorisent l'obtention d'un ratio IgG2a/IgG1 plus haut que l'immunisation par les antigènes protéiques. Ce qui pourrait s'expliquer, par la synthèse préférentielle d'IgG2a sous l'action de l'IFN- γ sécrété par les cellules TH1.

b. **Rôles attendus des cellules TH1 et TH2 pour une réponse normale.**

** La réponse TH1.*

La réponse prédominante, serait la production d'un bon nombre de mécanismes cytotoxiques. Les IFN- γ et les lymphotoxines (LT) activent les macrophages, ce qui entraîne une augmentation de la mortalité au sein des parasites intracellulaires et des cellules tumorales (MURRAY, 1985 et PACE, 1983), ainsi qu'un accroissement de l'expression des récepteurs Fc pour des Ac. de type IgG2a (WARREN, 1985) (figure 14). En général, il est à savoir qu'une forte réponse par TH1 donnera comme produit surtout des réponses de type cellulaire: hypersensibilité de type IV (retardé), réaction inflammatoire (TDH) mais peu ou pas d'Ac.

* *La réponse TH2.*

L'activation préférentielle des cellules TH2, conduirait à une production importante d'IgE. L'action des différentes interleukines (IL3, IL4 et IL5) ainsi que de l'IFN- γ , est indiquée à la figure 15. On retiendra de ceci, que la plupart des produits d'une réaction allergique sont accrus par l'activation des cellules TH2. Par contre, les clones TH1 inhibent le processus en diminuant la croissance des TH2 et en inhibant la production d'IgE par les cellules B.

* *Réponse mixte par TH1 et TH2.*

Il est évident que beaucoup de réponses normales, mettront en jeu ces deux types de cellules (TH1 et TH2); et plus spécialement dans le cas où la réponse n'est ni forte ni prolongée. Sous ces conditions, nous pouvons penser que les IgE ne seraient pas produites, et ceci à cause de la suppression dominante des IFN- γ sécrétés par les TH1. De même la réponse TDH, initiée par les cellules TH1, ne pourra se produire, étant donné l'action inhibitrice des cellules TH2 sur les cellules TH1. Les différents isotypes synthétisés peuvent dépendre du ratio entre TH1 et TH2 activés; avec une voie préférentielle pour les TH1 vers la production d'IgG2a et pour les TH2 vers la synthèse d'IgG1. Ces propriétés proposées pour une réponse mixte sont tout à fait compatibles avec la majorité des réponses immunitaires.

c. **Conclusions générales.**

On manque en fait de preuves concluantes, quant à l'existence des cellules TH1 et TH2 chez la souris *in vivo*, et encore moins en ce qui concerne les humains. Il ressort cependant que chez la souris *in vitro*, ces deux types de cellules helper existent. A cause de leurs fonctions profondément différentes, elles constituent d'importants régulateurs de classe dans la réponse immunitaire. Beaucoup de questions à ce sujet restent encore sans réponse. Mais ce modèle, semble jusqu'à présent se rapprocher le plus de la réalité observée.

6. VIRUS DE L'HERPES BOVIN DE TYPE 4 ou BHV4.

Le virus qui nous intéresse dans notre travail (le BHV-4), fait partie des *Herpetoviridae*. D'une manière générale, les herpetoviridae ont une capsidie icosaédrique à 162 capsomères d'allure tubulaire, un DNA à double chaîne et l'assemblage des capsides se fait dans le noyau de la cellule hôte. On peut distinguer des α , β et des γ herpesviridés (DEPELCHIN,1987)(ROIZMAN,1982).

6.1. *Statut taxonomique.*

Le BHV4 est encore appelé officiellement Herpès virus de type 3 (ROIZMAN,1981), mais cette désignation devra probablement être remplacée dans un futur proche (BARTHA,1987). Sur base de ses propriétés biologiques, on le classifie comme faisant partie des cytomégalo virus, il peut donc aussi être inclus dans la sous famille des betaherpesvirinae (STORZ,1984). La structure de son génome, contenant des séquences répétées orientées dans la même direction aux deux extrémités, est caractéristique du groupe des herpesvirus beta (KIT,1986). Son organisation génomique ressemble à celle de l'herpesvirus saimiri (saimiriine herpesvirus 2) (EHLERS,1985) et à celle de l'alcephaline herpesvirus-1 (AHV-1), causant la forme africaine de la fièvre catarrhale maligne.

La taille de son génome et le fait qu'il existe un spectre relativement large d'espèces différentes ne favorisent pas leur classification dans les betaherpesvirus. Ces propriétés le rapprochent plus des gammaherpesvirinae, comme par exemple l'herpesvirus saimiri et probablement aussi le AHV-1 (HONNESS,1984).

6.2. *Morphologie.*

La morphologie du BHV-4 est typiquement celle du virus de l'herpès. La nucléocapsidie est icosaédrique renfermant un core ou nucléoïde dense. Des protéines de structure s'assemblent en capsomères de forme tubulaire autour de la capsidie. La nucléocapsidie nue mesure environ 90 à 100 nanomètres de diamètre alors que l'enveloppe des virions possède un diamètre allant de 115 à 150 nanomètres (SMITH,1972) (SCHULZE,1967)(MUNZ,1974). Les nucléocapsides sont formées dans le noyau cellulaire, les virus acquièrent leur enveloppe par bourgeonnement de la membrane nucléaire interne. On observe beaucoup de virions à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques migrant jusqu'à la membrane

cytoplasmique et lachant ainsi les virions dans le milieu extracellulaire (LIEBERMANN,1967) (TODD,1983) (SCHULZE,1967) (MOHANTY,1973) (Mc COY,1985). On observe les nucléocapsides des virus dans le cytoplasme 48 à 72 heures après l'infection. Ceci est caractéristique des cytomégalo virus (TODD,1983).

6.3. *Aspect génomique.*

Le génome du BHV-4 est du DNA assemblé en un double brin linéaire de 144 ± 6 kb, consistant en un seul segment de 110 kb, flanqué à chaque extrémité de répétitions tandem. Le nombre de répétitions tandem, appelées "polyrépétitive DNA" (PrDNA), varie pour chaque extrémité génomique. Mais le nombre total de PrDNA est d'environ 15 par génome.

Le profil de restriction du DNA du BHV-4, diffère complètement de celui des autres herpès bovin (LUDWIG,1983) (OSORIO,1985).

6.4. *Propriétés physico-chimiques.*

Dans un gradient de sucrose de 20-65% (poids/vol.), le BHV-4 a une densité d'équilibre de 1,2 g/ml. Le virus est sensible à pH3, dans une solution à 20% d'éther et 20% de chloroforme, et est labile à une température de 50°C pendant 30 minutes. Sa multiplication est inhibée par du BrdU (0,1 μ molaire) (BARTHA,1966) (CASTRUCCI,1986) (LUTHER,1971). Le BrdU a un effet lors de la réplication de l'ADN. Lorsqu'il est incorporé dans l'ADN à la place de la Thymine, il peut entraîner le remplacement de A(Adénine) par G(Guanine) avec une certaine fréquence à chaque génération. Il en résulte un remplacement des paires A-T par des paires G-C.

Tout comme les autres virus de l'herpès, sa survie dans un environnement est limitée. On utilise des solvants lipidiques comme agents désinfectants.

6.5. *Propriétés biologiques.*

Le bétail domestique est l'hôte naturel préféré du BHV-4. On a décerné aucune infection par le virus sur des animaux sauvages (THIRY,1989 et 1990). Le virion peut être mis en culture sur des cellules de GBK (Georgia Bovine Kidney) ou des cellules testiculaires. Mais ils

croissent également sur des cellules rénales d'origines différentes, telles que: moutons, chats, chiens, lapins, chèvres et poulets (BARTHA,1966) (LUTHER,1971). Un effet cytopathogène (ECP) est caractérisé par la présence de trous arrondis dispersés d'un bout à l'autre de la monocouche. Ceci se passe rarement avant 48 à 72 heures après l'infection. On observe alors une cytolysse et un ECP est total après à peu près 5 jours, ce temps dépendant du type de cellules et de la dose infectante. Le diamètre moyen des plages de lyse varie entre 0,3 et 0,8 mm (CASTRUCCI,1986) (KROGMAN,1982). La surface des plages est d'environ 0,03 à 0,07 mm² et dépend du virion isolé. Cette dimension est beaucoup plus petite que celle des plages produites par le BHV-1 (STORZ,1984). On n'a pas entrepris en fait de larges études de comparaison quant aux effets des différentes souches de BHV-4 sur des bovins ou sur des lapins infectés expérimentalement.

6.6 *Pathogénie.*

Chez le bovin, le virus est associé à des cellules sanguines mononucléées (OSORIO,1983). Il est probable que le BHV4 entre dans le corps via la voie oro-nasale. La multiplication virale se déroule dans des cellules mononucléées, ces dernières disséminant le virus dans tout l'organisme. A partir de ce moment, il peut être isolé dans différents tissus et organes, et se multiplier. On retrouve cette multiplication au niveau de la membrane conjonctive, des voies respiratoires antérieures et de la muqueuse génitale, produisant des excréctions oculaires, nasales et vaginales ou des symptômes de métrite post-partum. Ces métrites post-partum, peuvent être provoquées par le virus BHV4 réactivé, chez des vaches infectées à différents temps avant la parturition (WELLEMANS,1986). Il n'y a aucun signe apparent après la première infection, mais après la parturition on observe des métrites causées par un stimulus de réactivation du virus, comme dans le cas du virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV1). De plus, il apparaît à ce moment une réponse secondaire par anticorps.

6.7. *Infection latente.*

Après une première infection, le BHV4 est capable de rester dans un état de latence. Les caractéristiques biologiques du virus dans cet état de latence ont été décrites il y a peu, bien que VAN DER MAATEN et BOOTHE (1972), avaient déjà préalablement mis en évidence l'isolement du virus de l'herpès dans des leucocytes bovins infectés 9 mois à 1 an auparavant.

Le BHV4 est souvent isolé à partir de cultures d'organes d'animaux en bonne santé. Ceci renforce l'hypothèse disant que le virus est capable de survivre dans un état de latence. THIRY et al.(1981) isolèrent le BHV4 dans des cocultures de cellules de testicules avec des cellules "Georgia Bovine Kidney" (GBK). Les cellules de testicules furent prises sur un taureau montrant une orchite oedémateuse ainsi qu'une azoospermie.

La preuve définitive de l'état de latence du BHV4 fut donnée par OSORIO (1983) et KROGMAN (1982). Le bétail infecté par voie intranasale fut traité à la dexaméthasone deux mois et demi plus tard. La dexaméthasone est glucocorticoïde servant de stimulus de réactivation virale, afin que le virus puisse sortir de sa phase de latence et devenir pathogène. Une seule fois, le virus fut isolé à partir de sécrétions nasales. Cependant le bétail montra un titre en anticorps spécifiques plus élevé que la normale.

Comme beaucoup de virus de l'herpès, le BHV4 en état de latence, est réactivé dans le bétail par l'usage de glucocorticoïdes. Cependant chez le lapin, la dexaméthasone n'a aucun effet de réactivation. Le système nerveux, et plus particulièrement le ganglion trigéminal, semble être le site de latence chez le bovin (HOMAN,1981) (KROGMAN,1982) (CASTRUCCI,1987). D'autres sites de latence ont été découverts: les cellules sanguines mononucléées, ainsi que les organes lymphoïdes (OSORIO,1983) (CASTRUCCI,1987).

6.8. *Les aspects immunologiques.*

La réponse immunitaire du bétail suite à une infection par BHV-4 est caractérisée par une faible production d'Ac. neutralisants, ou même dans certains cas par l'absence de production (MOHANTY,1972) (WELLEMANS,1986) (SASS,1974) (EDWARDS,1984/1985). Lors d'une faible réponse, les Ac. neutralisants n'apparaissent que 22 à 34 jours après l'infection primaire (CASTRUCCI,1984) (DUBUISSON, THIRY, THOMAS, 1987). La présence de complément, accroît considérablement le titre d'Ac. neutralisants, et réduit leur temps d'apparition à 18 jours après l'infection (DUBUISSON, THIRY, BUBLLOT, 1989b). On peut mettre en évidence des Ac. spécifiques par IFAT et ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), 14 à 20 jours après l'infection primaire (DUBUISSON, THIRY, THOMAS, 1987) (OSORIO, 1983) (EDWARDS, 1984/1985).

Après une réactivation expérimentale du virus latent, il se produit une augmentation d'Ac. spécifiques 7 à 15 jours après la première injection de dexaméthasone, mettant ainsi en évidence une réponse immunitaire anamnétique. Tout se passe sans augmentation d'Ac. neutralisants (KROGMAN, 1982).

L'association du BHV-4 avec des cellules sanguines mononucléées et des tissus lymphoïdes, lors d'infections tant aiguës que latentes, aurait ainsi un rôle perturbateur dans la réponse immunitaire chez le bétail. Il faudrait étudier les conséquences de telles infections. De plus le rôle de l'immunité à médiation cellulaire n'a pas encore été mis en évidence et à fait l'objet de très peu de recherches.

6.8.1. *Antigénicité.*

Il n'est démontré aucune relation antigénique par des tests sérologiques réciproques conventionnels, entre le BHV-4 et le BHV-1 (OSORIO,1985) (POTGIETER,1974), ainsi qu'entre le BHV-4 et le BHV-2 (OSORIO,1985). Mohanty et al (MOHANTY,1984) ont mis en évidence une réaction croisée entre le BHV-1 et le BHV-4 par Elisa, mais d'autres études montrèrent qu'il ne s'agissait probablement que d'animaux infectés à la fois par le BHV-1 et le BHV-4 (METZLER,1986). Des anticorps monoclonaux (Mab) préparés sur base d'une souche de BHV-4 ne réagissent pas avec des souches de BHV-1 et de BHV-2. Des études ultérieures furent entreprises afin de clarifier la relation antigénique entre BHV-1 et BHV-4, ainsi qu'avec d'autres virus de l'herpès bovin. Une relation sérologique fut démontrée avec le AHV-1 (OSORIO,1985) ROSSITER,1988). Cette relation partielle fut prouvée en isolant un anticorps monoclonal dirigé contre le BHV-4, lequel reconnaît des cellules infectées par une souche de WC11 ou une souche de AHV-1 par IFAT (immunofluorescence antibody test).

6.9. *Aspects futurs.*

Même si l'infection par BHV-4 est bien connue dans de nombreux pays, sa pathogénicité n'a pas encore été réellement démontrée, comme notamment l'interaction du BHV-4 avec les cellules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire. Le contrôle de l'infection par vaccination ou éradication n'est pas par conséquent d'un intérêt primordial sur le plan sanitaire.

Son manque de pathogénicité lui confère deux avantages. Le BHV-4 est un excellent modèle pour étudier le phénomène de latence dans

des systèmes homologues comme par exemple les bovins. L'infection ne tue pas l'animal et reste facilement accessible de façon répétitive dans les cellules sanguines mononucléées. En outre, des expériences préliminaires peuvent être exécutées sur le lapin.

On pourrait utiliser le BHV-4 comme vecteur viral pour des vaccins bovins recombinants comme le suggèrent KIT et al. (KIT,1986). Pour atteindre cet objectif il est nécessaire d'avoir une meilleure connaissance de sa biologie moléculaire. Il faudrait développer des recherches ultérieures pour réaliser un clonage du génome afin d'obtenir des cartes de restriction du DNA du BHV-4, la localisation des gènes importants et l'analyse des protéines virales.

7. BUT DU TRAVAIL.

L'objectif de notre travail est de vérifier si lors d'une infection virale donnée, le système immunitaire bovin répond par la synthèse préférentielle d'un isotype particulier d'Ig.

Dans cette optique, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'une infection par le virus de l'herpès bovin de type 4 (BHV-4), car nous disposons de séries de prélèvements sérologiques chronologiques, effectués sur des bovins lors d'une infection expérimentale par ce virus.

Par un ELISA indirect, nous tenterons d'identifier pour ces différentes sérologies, à la fois l'isotype produit, son titre et son évolution au cours de l'infection.

MATERIEL

ET

METHODES

1. SOMMAIRE.

Les sérums que nous utilisons lors de nos manipulations proviennent, d'une part de la firme BELDICO qui disposait d'un sérum de référence positif (nv BELDICO sa) ainsi que d'un certain nombre de sérums négatifs, d'autre part de sérologies chronologiques fournies aimablement par le docteur Dubuisson du département de virologie-immunologie de l'institut de chimie de Liège.

2. ANIMAUX UTILISES.

2.1. *Chez BELDICO (Marche en Famenne).*

Les sérums sont obtenus à partir de sang bovin récolté à l'abattoir de Namur, ou sur des animaux de la race bleu-blanc-belge d'une exploitation agricole privée.

2.2. *A Liège.*

Des taurillons de race bleu-blanc-belge, âgés de 13 à 18 mois ont été utilisés après avoir démontré qu'ils étaient exempts d'Ac. envers le virus BVD (Bovine Viral Diarrhea) et envers le virus IBR (Infectious Bovine Rhinotracheitis) en séroneutralisation. L'absence d'infection persistante par un virus BVD non cytopathogène a également été vérifiée. Un test en immunofluorescence indirecte a été également entrepris, afin de démontrer que les animaux étaient exempts d'Ac. envers le BHV-4.

2.2.1. *Protocole expérimental d'inoculation virale.*

Trois taurillons ont été inoculés par voie intratesticulaire à l'aide de 10^5 ufp (unités formant plages) par testicule, de la souche de BHV-4. Un quatrième taureau a servi de témoin et a reçu un volume identique de surnageant de cultures de cellules non infectées (jour 0). A partir du jour 51 post-infection, un animal infecté et le taureau témoin ont reçu 0,1 mg/Kg de dexaméthasone durant 5 jours. Des écouvillons nasaux et conjonctivaux ont été prélevés tous les deux jours jusqu'au jour 34, puis une fois par semaine jusqu'au jour 51 (début de la période de réactivation) et à nouveau tous les 2 jours, jusqu'à la fin de l'expérience (jour 81) pour titrer le virus et ainsi déterminer la période d'excrétion. Du sang, a été prélevé aux mêmes moments pour les examens sérologiques qui nous intéressent plus particulièrement.

2.2.2. *Origine du virus.*

La souche de BHV-4 a été isolée en Belgique d'un cas d'orchite oedémateuse accompagnées d'azoospermie chez un taureau de race blanc-bleu-belge.

2.2.3. *Titrage viral.*

Des cellules "Georgia Bovine Kidney" (GBK) confluentes, cultivées en microplaques, sont infectées par des dilutions de raison 10 des suspensions virales à titrer. Après 24 heures d'incubation à 37 °C (atmosphère humide, 5% de CO₂), le milieu de culture (MEM:Minimum Essential Medium, supplémenté de 2% de SVF) est remplacé par du MEM additionné de 0,6% de carboxyméthylcellulose. Après 10 jours d'incubation supplémentaires, les cellules sont fixées à -20°C pendant 30 minutes dans de l'acétone contenant 5% d'eau distillée. Les plages de lyse dues au BHV4, sont alors révélées en immunofluorescence indirecte avec un sérum hyperimmum spécifique, puis dénombrées.

3. PRELEVEMENTS SANGUINS.

Le sang est prélevé stérilement par ponction au niveau de la veine jugulaire de l'animal vivant ou récolté après section de cette veine à l'abattage.

4. METHODE DE COUPLAGE DES Ig. A LA PEROXYDASE.

- dissoudre 4 mg de peroxydase dans 1 ml d'eau distillée.
- ajouter 200 µl de NaIO₄ 100 mmol (solution fraîche) et agiter le tout pendant 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité .
- dialyser une nuit à 4°C dans de l'acétate de Na 1 mmol. Le lendemain on met à pH 4,4 avec de l'ac. acétique.
- ajouter 20 µl de tampon carbonate pH 9,5 et 200 mmol.
- ajouter 1 ml d'Ig. (concentration 8 mg/ml dans du tampon carbonate pH 9,5 10 mmol.)
- agiter 2 heures à température ambiante et à l'obscurité.
- ajouter 100 µl de borohydrure de Na (NaBH₄) (solution à 4 mg/ml d'eau).
- incuber 2 heures à 4°C.

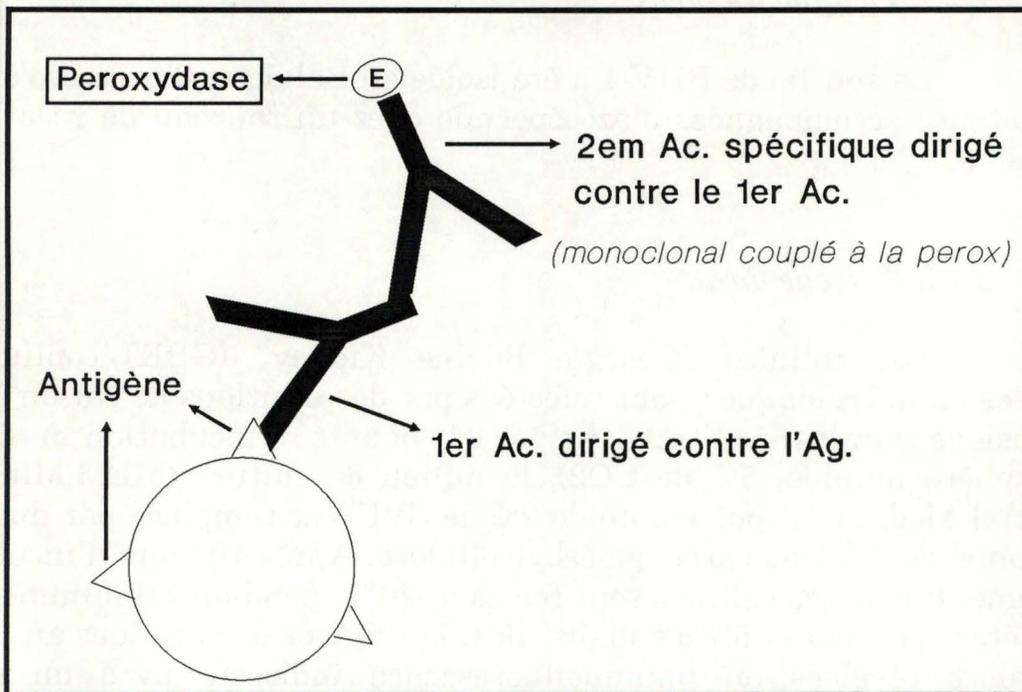


Fig.16: Illustration de la technique ELISA

(1) - **PBS** (Phosphate buffer saline) 10 X en mg/l eau distillée.

- * KCl (Ucb) 200
- * KH_2PO_4 (Merck) 200
- * NaCl (Merck)
- * $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 8000
- * pH: 7,4

- avant le stockage et à des fins de conservation on ajoute 20 mg de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) par ml de conjugué.
- test pour contrôler l'efficacité du couplage et savoir quelle dilution utiliser (NAKANE et KAWAOI, 1974).

5. LE TEST E.L.I.S.A.

5.1. *Généralités.*

La méthode *ELISA* est l'unique technique que nous avons utilisée lors de l'accomplissement de ce mémoire. Elle peut être employée soit pour une mesure d'Ac. soit pour une identification d'Ag. Dans notre cas, elle nous servira à mettre en évidence des Ac. Il s'agit en fait, de permettre la fixation d'un premier Ac. contenu dans un sérum, sur un site antigénique du virus. Une anti-immunoglobuline spécifique du premier Ac., est couplée à un enzyme (peroxydase) qui est révélé par un substrat donnant lieu à une coloration mesurable (Fig. 16). Le deuxième Ac., peut être sélectionné spécifiquement afin de détecter des classes d'Ig. (IgG, IgM ou encore IgA).

5.2. *Principe du test.*

a) Préparation de l'antigène.

- * On infecte des cultures de cellules GBK par le virus BHV-4 sur un milieu MEM.
- * On attend d'observer un effet cytopathogène.
- * Dès que l'on a observé cet effet, on soumet la culture à un cycle de congélation-décongélation afin de lyser les cellules GBK.
- * On centrifuge le tout à 3000 g pendant 10 minutes

b) Coatage des boîtes à ELISA (Maxisorp, Nunc).

- * On récupère le surnageant de culture qui contient le virus et on en applique 100 μ l par puits sur la plaque ELISA.
- * On incube une nuit à une température de 20°C.
- * On lave chaque puits de la plaque, 10 fois, au PBS 1X (1) à l'aide d'un laveur manuel
- * On sature les plaques ainsi précoatées avec 200 μ l de PBS 10% sérum de cheval (HS) durant 1 heure à 20°C.
- * On lave en PBS 1X.

(2) - *1C8 peroxydase ou α -Bovine IgG1*

* (Laboratoire immunologie FUNDP: LETESSON et al., 1985)

*(BELDICO)

- *α -Bovine IgG2 perox* (The Binding Site LTD), PP202.

- *α -Bovine IgM (μ chain) perox* (The Binding Site LTD), PP203.

- *α -Bovine IgA perox* (Monoclonal 3F6) (Dv. VARMAN ICP).

(3) - *Révélateur ABTS.*

* ABTS (Boehringer) 4,2 mg

* tampon citrate (pH:5,6) 5,6 ml

* H₂O₂ 30% 10 ml

- *Tampon citrate ABTS.*

* Na₂HPO₄.2H₂O (Merck) 2050 mg

* acide citrique (Ucb) 890 mg

* eau distillée 100 ml

* pH: 5,6

- *Révélateur TMB.*

* 50 μ l TMB/ ml de tampon citrate.

- *Tampon citrate TMB.*

* acide citrique 0,96 gr/ 100 ml H₂O dist.

* tri-sodium citrate 1,47 gr/ 100 ml H₂O dist.

* 18,52 μ l H₂O₂ 27% / 10 ml de mélange ac. citrique et tri-sodium citrate à pH 4,2.

(4) - *Longueurs d'onde utilisées en fonction du chromogène (max. d'absorption).*

* TMB :450 (voir Fig 18)

* OPD :490 ou 620

c) Dépôt du sérum contenant le premier Ac.

- * On dépose le sérum bovin dilué en PBS 10% HS, à raison de 100 μ l par puits. Les Ac. anti-BHV-4 vont reconnaître l'Ag. fixé au fond de la boîte lors de la première étape (étape a).
- * On incube 1 heure à température ambiante.

d) Dépôt du conjugué (deuxième Ac. couplé à la peroxydase)

- * On lave chaque puits 10 fois avec du PBS 1X (ou du PBS 1X Tween 20 (Fluka) 1°/oo).
- * On distribue 100 μ l par puits d'une dilution préétablie d'un deuxième Ac. (conjugué), anti Ig bovine couplé à la peroxydase. Dans le cadre de nos expériences, il s'agit du 1C8-peroxydase qui est un anticorps monoclonal anti IgG1 (LETESSON, 1985), ainsi que d'anti IgG2, d'anti IgA et d'anti IgM bovines (2)
- * On incube 1 heure à température ambiante.

e) Révélation.

- * On lave chaque puits 10 fois en PBS 1X.
- * On révèle, la fixation du second Ac. par une réaction colorée avec un substrat. Ce dernier est l' H2O2 et le chromogène (3). On en dispose 100 μ l par puits. Le chromogène utilisé, est préférentiellement le TMB (3,3',5,5'-Tetraméthyl-benzidine (Sigma), 4 mg/ml d'HCl 0,1 N). On peut également utiliser, soit l'ABTS (2,2-Azino-di-[3-éthyl-benzthiazolinsulfonat(6)] (Boehringer)), soit l'OPD (O-Phénylenediamine Dihydrochloride C6H4(NH2)2.2HCl (Kodak)). Ces deux derniers étant moins puissants que le premier.
- * Pour le TMB on arrête la réaction après 5 minutes, à l'aide d'une solution de H2SO4 1N (50 μ l/puits). Cette dernière étape permet le virage de la couleur bleue de la première réaction vers une couleur jaune. Avec l'ABTS il n'est pas nécessaire d'arrêter la réaction mais il faut réaliser la lecture endéans les 15 minutes.

f) Lecture.

- * La mesure de l'absorbance se fait via un lecteur Elisa (Titertek Multiskan MCC/340) à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du chromogène utilisé (4). Le système optique est illustré à la Fig.17

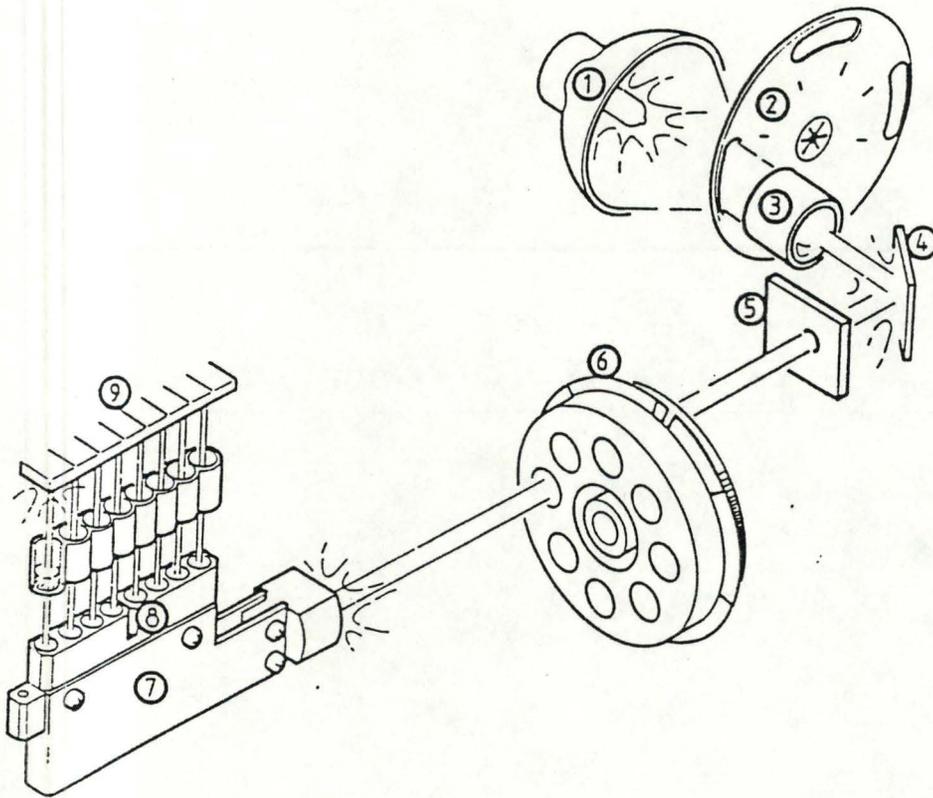


Fig. 17 : Système optique du lecteur ELISA

Le système optique comprend les constituants suivants:

- 1 quartz-halogen lamp
- 2 chopper wheel
- 3 aperture, and condenser lens
- 4 semi-transparent mirror
- 5 aperture
- 6 interference filter (filter wheel)
- 7 optical fibre bundle
- 8 focusing lenses
- 9 upper lenses and detectors

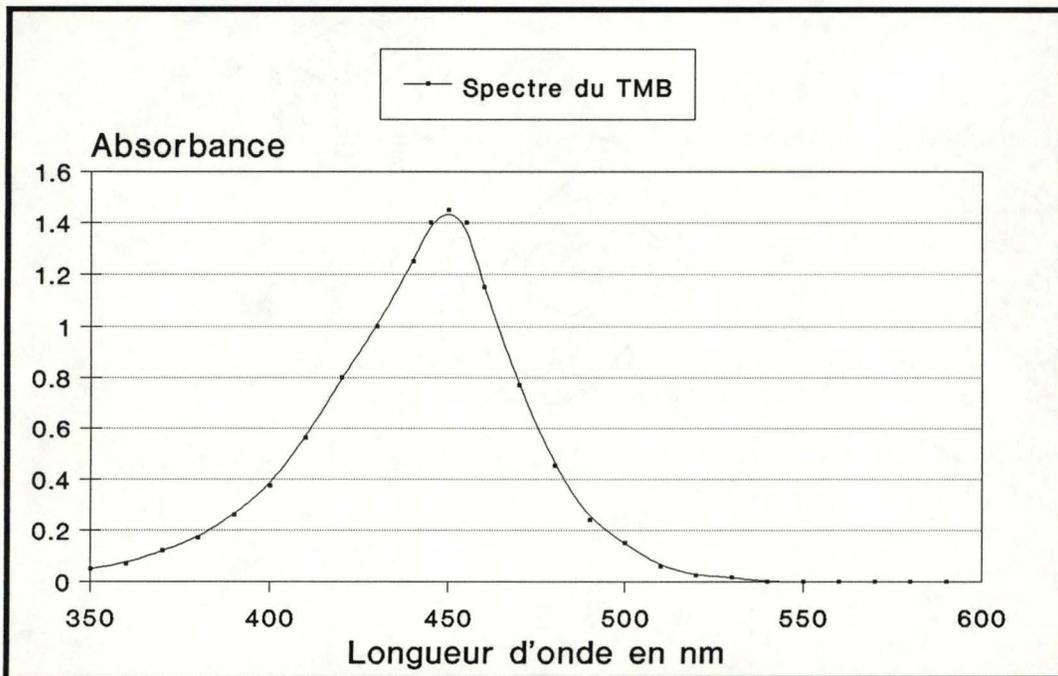


Fig. 18: Spectre d'absorption du TMB

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. SOMMAIRE.

Nous avons divisé les résultats obtenus lors de nos expérimentations en deux parties. La première tend à caractériser la synthèse préférentielle d'une classe d'immunoglobuline contenue dans un sérum bovin positif, de référence. La seconde, consiste à étudier l'évolution du titre en anticorps anti-BHV-4 au cours du temps, sur des animaux infectés expérimentalement.

2. PREMIERE PHASE DU TRAVAIL.

2.1. Mise au point du test ELISA.

2.1.1. Problèmes rencontrés.

Au début de la mise au point de ce test, nous avons essayé de coater les boîtes Elisa nous-même au laboratoire. Ce fut un échec, car les résultats étaient de loin inférieurs à ceux qu'on obtenait sur des boîtes de kit (Beldico), bien que nous ayons travaillé sur un conjugué, un chromogène et des sérums identiques. Le problème principal, vient du fait que nous avons utilisé un antigène différent de celui des boîtes de kit. Cet antigène s'est probablement dégradé au cours du temps. Nous ne disposions pas non plus de matériel de séchage, ni d'enveloppes scellées contenant un dessiccateur pour le stockage des boîtes. Dès lors, nous avons décidé de faire coater nos boîtes par la firme Beldico.

La lecture colorimétrique du TMB, des premières plaques d'Elisa, donnait des valeurs par défaut qui résultaient d'une mesure à une longueur d'onde de 490 nm, indiquée sur le prospectus du kit Beldico, alors que le maximum d'absorption se situait à 450 nm (voir Fig.18, p.25).

2.1.2. Recherche du chromogène le plus performant.

Afin de déterminer le chromogène le plus performant, nous avons réalisé le test suivant. A l'aide de dilutions d'un sérum positif allant

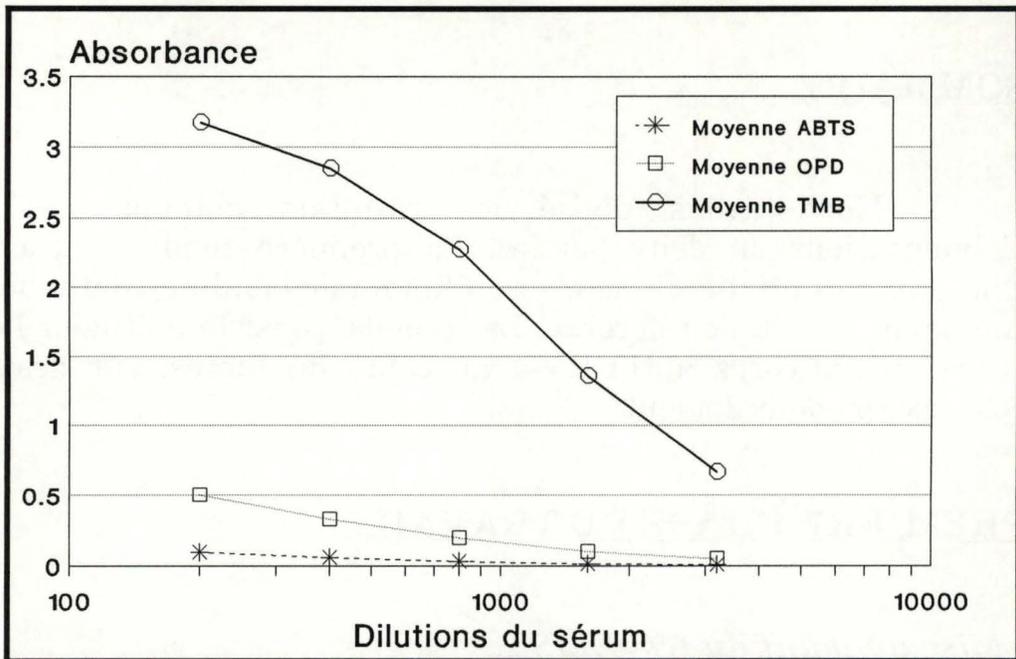


Fig. 19: Influence du chromogène sur l'évolution des IgG1 (conjugué BELDICO).

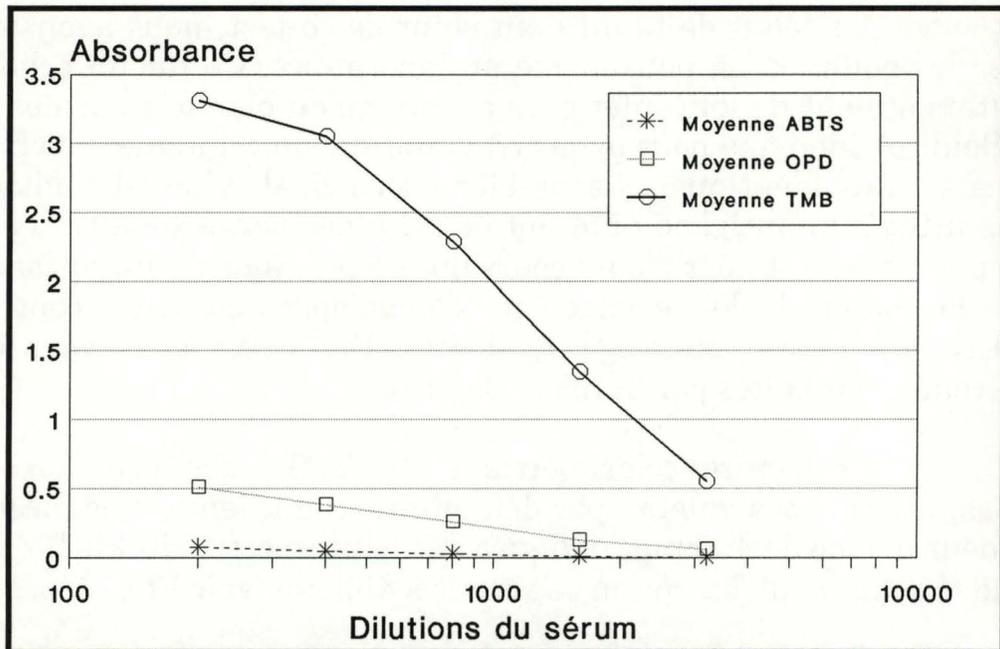


Fig. 20: Influence du chromogène sur l'évolution des IgG1 (conjugué Laboratoire immun.FUNDP: LETESSON et al.,1985)

de 1/200 à 1/3200 (de 2 en 2) en triplicate, nous avons mesuré l'absorbance de la réaction enzymatique du test Elisa pour trois chromogènes différents. Ceci pour deux conjugués qui sont le 1C8peroxydase de Beldico et du laboratoire d'immunologie des FUNDP (Lab. immun. FUNDP) (LETESSON et al.,1985). Ces deux conjugués diffèrent par la dilution à laquelle il faut les utiliser, soit 1/50 pour Beldico et 1/5000 pour Lab. immun. FUNDP. On peut observer sur les Fig.19 et 20, que le TMB est de loin beaucoup plus performant que l'OPD ou l'ABTS. Il serait bon cependant de refaire le test avec de l'OPD et de l'ABTS neufs, car ceux du laboratoire étaient peut-être trop vieux. Cela pourrait justifier le faible signal obtenu pour chacun d'eux. Il appert également, que l'allure des courbes varie très peu selon le type de conjugué. Au vu de ces résultats, nous avons poursuivi nos manipulations avec le TMB et le conjugué Lab. immun. FUNDP. qui est 100 fois plus actif.

2.1.3. Effet de la solution de lavage.

A la suite d'hésitations, quant à la solution de lavage à utiliser, nous avons réalisé un test avec le même sérum positif que précédemment, dilué de deux en deux de 1/100 à 1/3200. Les deux solutions de lavage sont le PBS 1X et le PBS 1X TWEEN 1/1000. La fig.21 montre que la variation d'absorbance du sérum en fonction du \log_{10} de la dilution est pratiquement identique dans les deux cas. Cependant à de faibles dilutions, le test avec le PBS 1X semble montrer un signal très légèrement supérieur à celui du PBS 1X TWEEN. Mais de toute évidence, on ne peut prendre en considération cette très petite différence, afin de préférer une solution plutôt que l' autre. Nous avons préparé et utilisé ces deux solutions simultanément le jour du test. A des fins de facilité de préparation, nous avons opté pour le choix du PBS 1X comme solution de lavage pour les tests ultérieurs à effectuer.

2.2. Caractérisation des classes d'Ig. contenues dans un sérum positif de référence.

2.2.1. Modèle de distribution du sérum dilué sur la plaque ELISA.

Le lysat, de cellules GBK infectées par le BHV-4, est adsorbé sur le plastique du fond des micropuits des colonnes verticales impaires de la plaque (1,3,5,7,9,11). Les colonnes verticales paires contiennent du lysat,

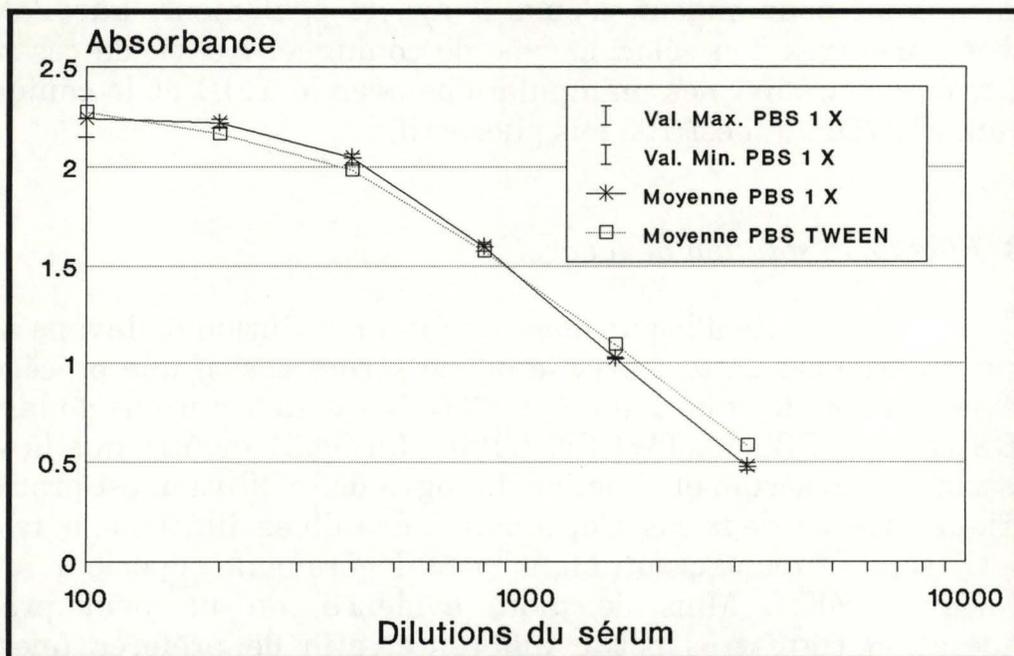


Fig. 21: Evolution des IgG1 selon le type de lavage

de cellules GBK non infectées, qui sert de témoin négatif. Après une incubation d'une nuit à 20°C et après saturation de la boîte, on dispose les sérums dans les puits aux dilutions indiquées sur le schéma ci-dessous.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| A | PBS | PBS | Sér+ | Sér+ |
| B | 1 X | 1 X | réf. | réf. |
| C | | | 1/100 | 1/100 | 1/200 | 1/200 | 1/400 | 1/400 | 1/800 | 1/800 | 1/1600 | 1/1600 |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | Sér+ | Sér+ | Sér- | Sér- |
| F | réf. | réf. | ① | ① | ② | ② | ③ | ③ | ④ | ④ | ⑤ | ⑤ |
| G | 1/3200 | 1/3200 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 | 1/100 |
| H | | | | | | | | | | | | |

Distribution des sérums sur la plaque ELISA

Pour réaliser le blanc, nous remplaçons le sérum par du PBS1X, en conservant impérativement toutes les étapes suivantes (conjugué et chromogène). Nous disposons également de cinq sérums négatifs pour le BHV-4, qui ont fait eux aussi office de témoin négatif. Chaque dilution de sérum a été disposée au fond des puits en quadruplate. Nous en avons calculé la moyenne pour dessiner les différents graphiques.

Nous insistons sur le fait que le sérum positif que nous avons utilisé a été sélectionné, parmi un très grand nombre de sérums d'animaux différents, tous testés, et qu'il a donné le signal le plus positif en réponse à l'Ag. viral. De même, il est important de mentionner que les animaux ont été infectés de manière naturelle, ce qui explique le grand nombre de tests qu'il faut effectuer avant de trouver un sérum nettement au dessus du seuil de négativité.

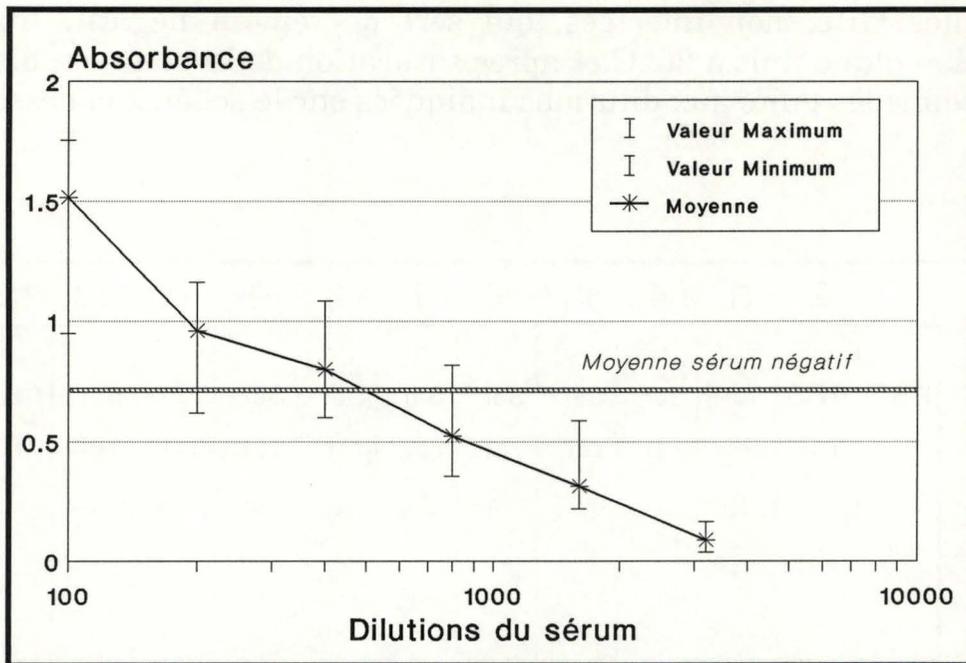


Fig. 22: Evolution des IgM anti BHV-4 en ELISA classique

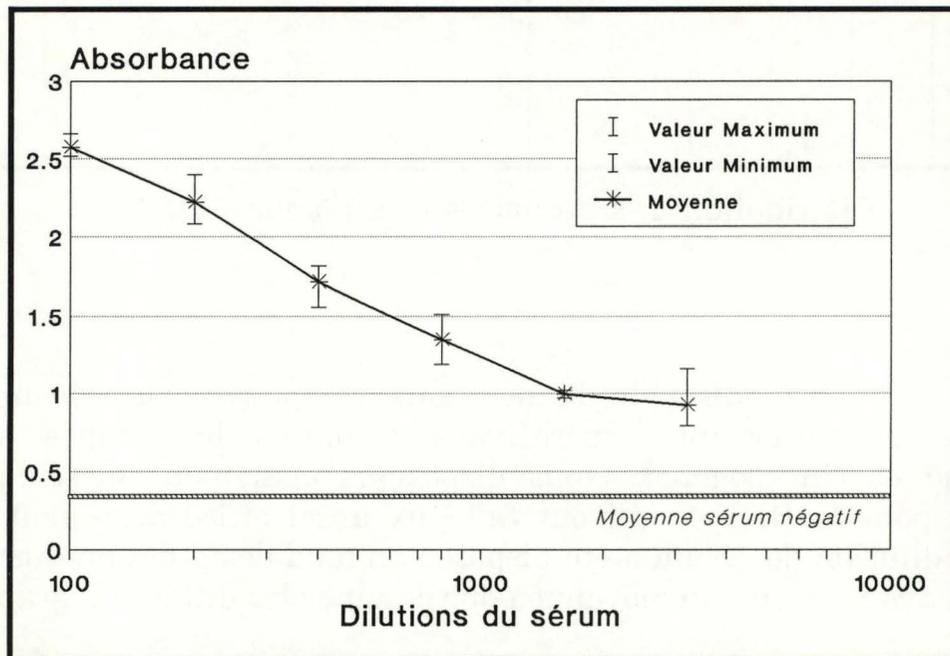


Fig. 23: Evolution des IgM anti BHV-4 en ELISA modifié

2.2.2. Recherche d'IgM.

Les IgM sont les premières synthétisées par le système immunitaire lors de la réponse primaire. On les retrouve en quantité moins importante lors de la réponse secondaire, car il s'est opéré un "switch" (par délétion du DNA) qui a conduit à la production des autres classes d'Ig. Ces IgM, au même titre que les IgG, sont impliquées dans les protections anti-bactériennes et anti-virales de l'organisme.

a) En ELISA classique.

Lorsque nous avons réalisé notre test avec l'objectif de mettre en évidence des IgM par la méthode ELISA classique, nous fûmes confrontés à deux problèmes importants. Le premier étant les variations trop fortes de nos replicates. On peut les observer à la Fig.22, en regardant la différence d'absorbance entre la valeur maximale et la valeur minimale. Le second problème, vient du fait que la valeur d'absorbance, de nos 5 sérums négatifs, est sensiblement trop haute et atteint presque la valeur du sérum positif dilué 1/100. Ceci pourrait s'expliquer soit par le couplage défectueux du conjugué à la peroxydase, soit par le manque de spécificité de l'anti-IgM vis-à-vis de l'anticorps. Nous ne pouvons prendre en considération ces résultats. C'est pourquoi nous nous sommes penché vers un moyen détourné et plus puissant pour mettre en évidence ces IgM.

b) En ELISA modifié.

Nous avons décidé à l'encontre des résultats précédents, de modifier la technique de l'ELISA en ajoutant une étape supplémentaire. Le conjugué commercial (a-IgM perox) utilisé précédemment a été remplacé par du surnageant d'hybride 1H4 (monoclonal anti-IgM) sur lequel nous avons fait réagir après une incubation d'une heure à température ambiante, du Rabbit Anti-Mouse peroxydase (RAMperox: anticorps anti-espèce). On obtint ainsi, non seulement une augmentation de l'absorbance des dilutions du sérum positif, mais aussi une diminution de l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale des replicates. De même, la valeur des négatifs baissa considérablement (voir Fig.23). Après une transformation logarithmique des dilutions du sérum, nous pouvons pratiquement affirmer dans le cas de l'ELISA modifié, que le taux d'IgM varie en fonction de cette dilution d'une manière linéaire jusqu'à une valeur de

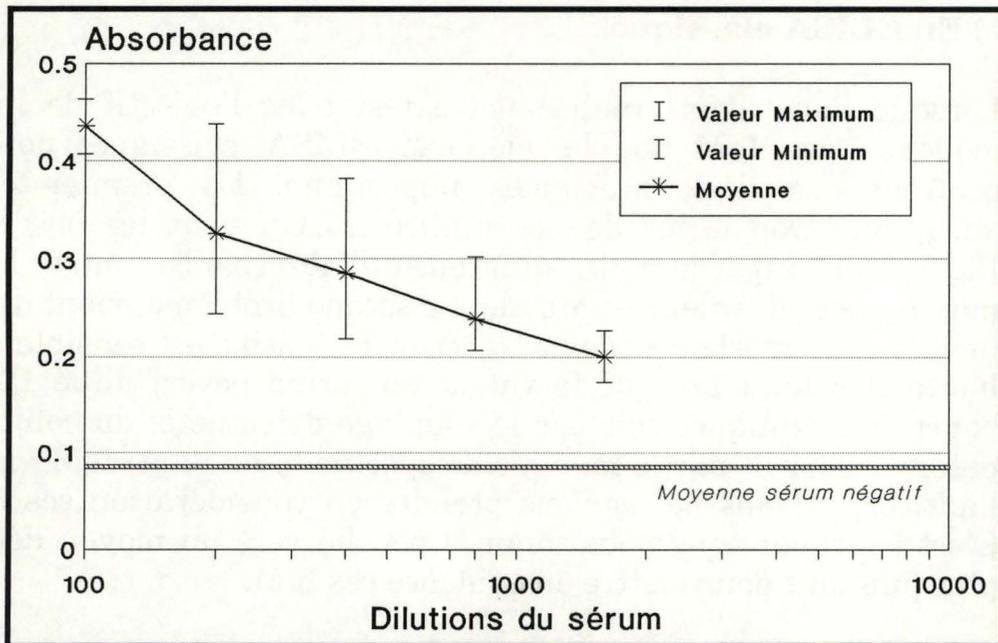


Fig. 24 : Evolution des IgA anti BHV-4

1/1600. Au delà de celle-ci, la pente semble être moins prononcée. Il aurait peut-être été intéressant de continuer les dilutions un peu plus loin, afin de pouvoir déterminer celle qui atteindrait le seuil de négativité.

2.2.3. Recherche d'IgA.

Les IgA constituent la classe des anticorps qui assurent la défense de l'organisme au niveau des muqueuses. La figure 24 montre que leur taux dans le sang, est nettement inférieur à celui des IgM. En effet, à une dilution de 1/100, les IgA développent une absorbance inférieure à 0,5 alors qu'elle atteint 2,5 pour les IgM.

Etant donné les variations relativement importantes entre les valeurs extrêmes des replicates, nous soupçonnons un manque de spécificité du 3F6 (monoclonal anti-IgA). Il se peut que l'anti-IgA que nous avons utilisé reconnaisse d'autres Ig., d'où son manque de spécificité et la dispersion importante relevée dans les différents replicates.

Il est relativement fréquent, lors d'infections par le BHV-4, que l'animal excrète le virus par voie nasale. Il aurait été intéressant dans notre cas, de chercher au niveau des sécrétions nasales d'un animal infecté, le taux d'IgA synthétisées, afin de le comparer avec celui du sang.

2.2.4. Recherche d'IgG.

Sur base de la théorie de la régulation isotypique par les cellules TH1 et TH2 au niveau des sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG2), nous avons entrepris de chercher la synthèse préférentielle de l'une de ces deux sous-classes.

a) Les IgG2.

Si l'on observe la courbe de la figure 25, on voit que le taux d'IgG2 suit presque parfaitement le tracé d'une droite jusqu'à la dilution 1/1600, lorsqu'on exprime celle-ci sous forme logarithmique. Cela signifie, que jusqu'à 1/1600 le nombre d'IgG2 diminue de façon exponentielle en fonction de la dilution. De plus, il est logique qu'à partir de 1/1600 la

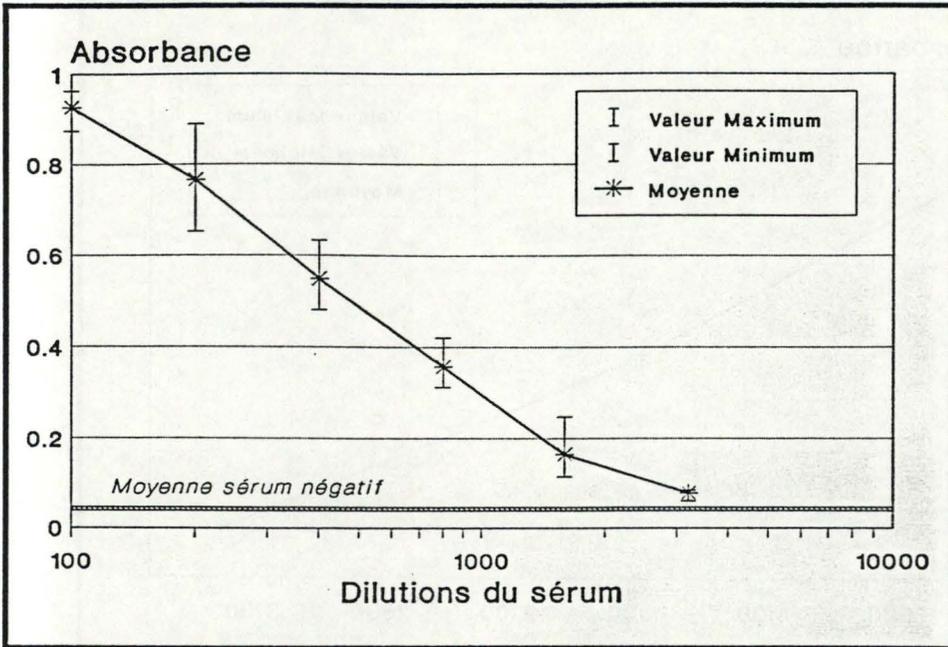


Fig. 25: Evolution des IgG2 anti BHV-4

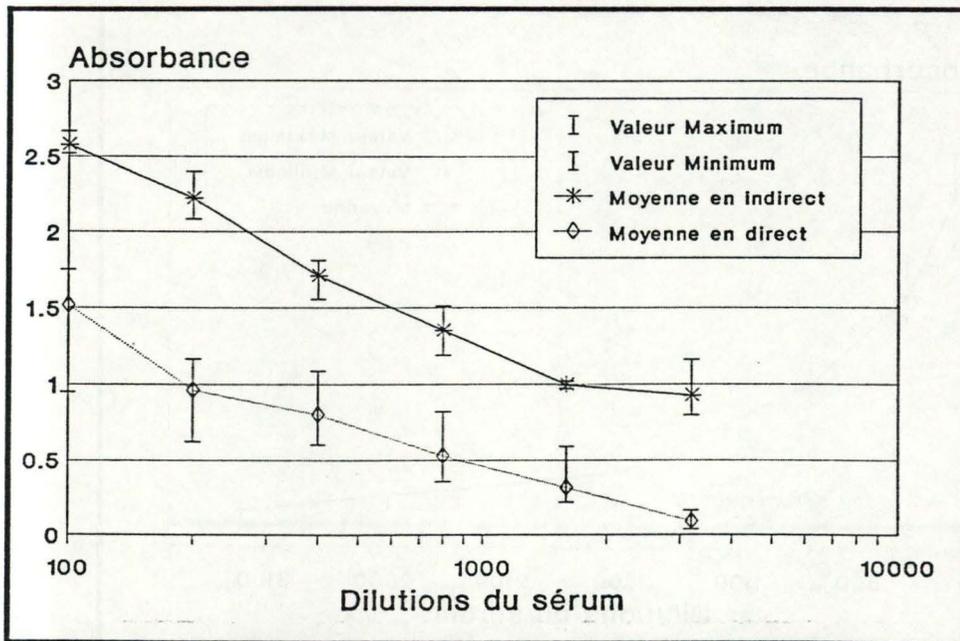


Fig. 26: Evolution du titre en IgM anti BHV-4

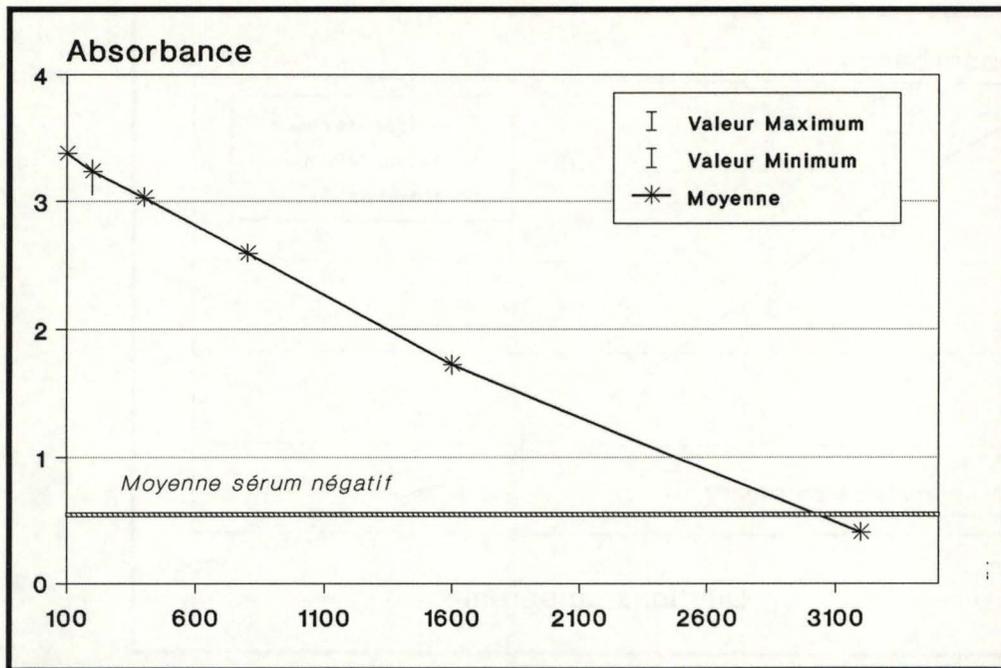


Fig. 27: Evolution des IgG1 anti BHV-4

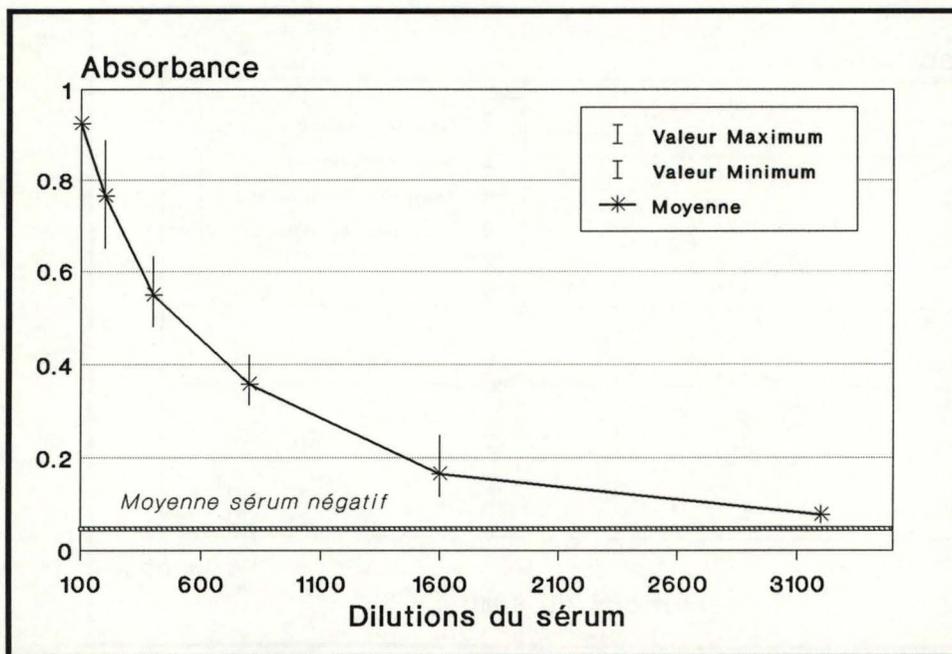


Fig. 28: Evolution des IgG2 anti BHV-4

pente de la courbe soit moins importante puisqu'on se rapproche du seuil de négativité. C'est-à-dire qu'à partir de cette valeur, la dilution ne joue plus un rôle important sur le taux d'IgG2 spécifiques de l'Ag. viral. L'absorbance devient dès lors indépendante de la dilution.

b) Les IgG1.

Les IgG1, sont en quantité nettement supérieure aux IgG2 dans le sérum dont nous disposons. En effet, à une dilution de 1/100, l'absorbance est de 3,4 pour les IgG1 alors qu'elle ne vaut que 0,9 pour les IgG2 (voir figure 26). De plus la diminution des IgG1 en fonction du \log_{10} de la dilution n'est plus une droite, éliminant de ce fait la possibilité d'une fonction exponentielle. Si l'on examine la figure 27 on observe que l'absorbance des IgG1 diminue linéairement avec la dilution jusqu'au seuil de négativité. Cette diminution d'absorbance proportionnelle à la dilution nous paraît logique, le nombre d'IgG1 variant lui-même proportionnellement avec celle-ci. Par contre, l'absorbance due à la dilution des IgG2 diminue plus rapidement avec la dilution puisqu'il s'agit d'une fonction exponentielle. En effet, la diminution des IgG2 représente 62% (0,58/0,93) pour une dilution de 1/800, contre 24% (0,8/3,4) pour les IgG1.(voir les figures 27 et 28). Cette diminution rapide des IgG2 avec la dilution, exprime peut-être une plus faible affinité de cette classe d'Ig. vis à vis de l'Ag., soit encore l'existence d'une compétition avec un autre isotype qui serait en faveur de ce dernier lorsque la dilution augmente. Il faut aussi remarquer que les deux sous-classes d'IgG atteignent leur seuil de négativité respectif à la valeur de 1/3200. On peut aussi observer que la spécificité presque parfaite du monoclonal anti-IgG1 couplé à la peroxydase, se répercute au niveau de la différence, très minime, obtenue entre les valeurs maximales et minimales de nos replicates.

c) Explications de la synthèse préférentielle d'une des deux sous-classes d'IgG.

Il existe une régulation isotypique au niveau des sous-classes d'IgG par les cellules TH1 et TH2, lors d'une réponse immunitaire contre un antigène viral. La figure 13 (page:11), explique que la synthèse préférentielle, chez la souris in vitro, se tourne vers les IgG2a plutôt que les IgG1. De notre côté nous obtenons un ratio IgG1/IgG2 à une dilution de 1/100 égal à 3,6. Si on envisage l'hypothèse de l'existence chez les bovins d'un équivalent aux TH1 ou TH2 murins, alors dans le cadre de la réponse anti-BHV-4 étudiée dans ce mémoire, nous nous

trouvons exactement dans le cas contraire. On peut penser que la production d'IL4 et IL5 par les TH2 serait majoritaire par rapport à l'IL2 et l'IFN- γ produit par les TH1. Les interleukines sécrétées par les cellules TH2 joueraient un rôle inhibiteur sur les TH1 qui synthétiseraient un taux moins important de lymphokines. A leur tour les CTL ne produiraient plus de lymphokines rendant l'environnement favorable à la réponse TH1. L'absence de stimulation des CTL pourrait peut-être s'expliquer par l'état de latence du virus à l'intérieur de la cellule. Tout ce mécanisme aurait pour but de faire pencher la balance vers la production préférentielle d'IgG1.

Une étude analogue à la nôtre fut entreprise, par JOASSIN et al. (1989), sur des humains séropositifs à l'encontre du cytomégalovirus (CMV) qui fait partie des Bêtaherpètoviridés. Ils entreprirent de rechercher la synthèse préférentielle de sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) par la technique de l'ELISA. Les sujets qui furent soumis à cette étude étaient principalement des patients présentant des problèmes rénaux, des femmes après parturition et leurs bébés et des patients affligés de fièvres ondulantes et de fatigues prolongées. Tous ces patients étaient séropositifs vis-à-vis du CMV. Quant aux sérums ils présentèrent un taux nettement supérieur en IgG1 synthétisées comparativement aux autres sous-classes. Les IgG3 venaient, quantitativement, en deuxième position tandis que les IgG2 et IgG4 étaient souvent presque inexistantes. De même LINDE et al. (1983) démontrèrent que des patients, lors d'une infection primaire ou secondaire par un cytomégalovirus, synthétisaient principalement des IgG1 et IgG3. Lors d'une réponse secondaire, les IgG1 étaient prépondérantes par rapport à la réponse primaire. Quant aux IgG2, elles étaient seulement détectées dans les échantillons de sérum qui contenaient un taux élevé d'IgG totaux.

Notre but, n'est pas de comparer nos résultats avec ceux obtenus sur les humains ou sur les souris in vitro. Néanmoins, il faut signaler que cette synthèse préférentielle des sous-classes d'IgG peut varier non seulement en fonction des espèces mais également en fonction de la nature du virus infectant. Par conséquent, le schéma d'explication présenté à la figure 13 (page: 12) ne peut être généralisé pour tous les mammifères. En outre, tant dans notre cas précis que lors de l'expérimentation chez les humains, l'infection était naturelle et non expérimentale. En outre, il est possible que suivant la voie d'inoculation expérimentale le système immunitaire engendre préférentiellement une sous-classe d'IgG. plutôt que l'autre.

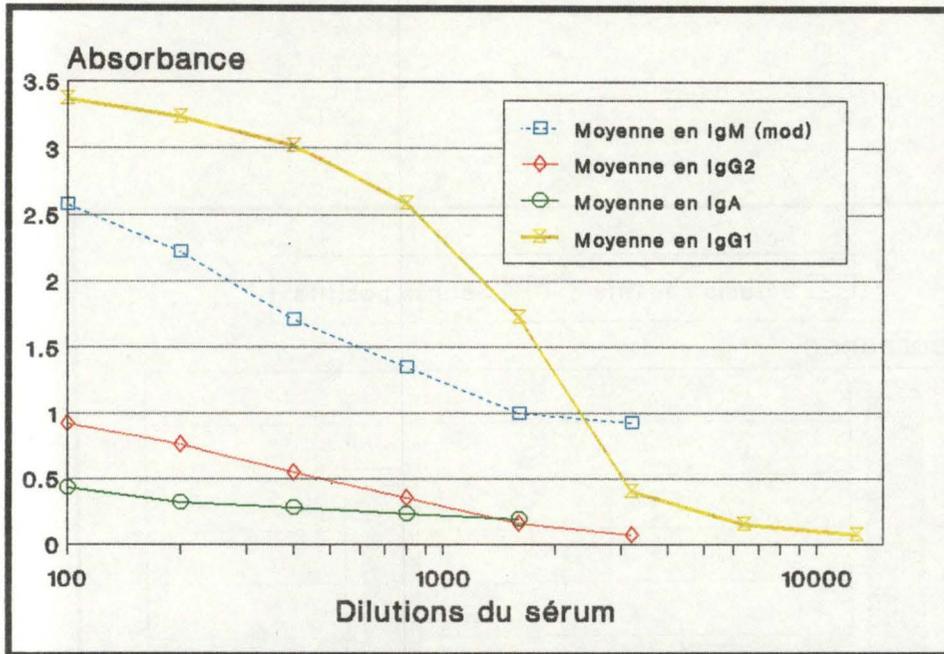


Fig. 29: Evolution des différentes Ig. anti BHV-4

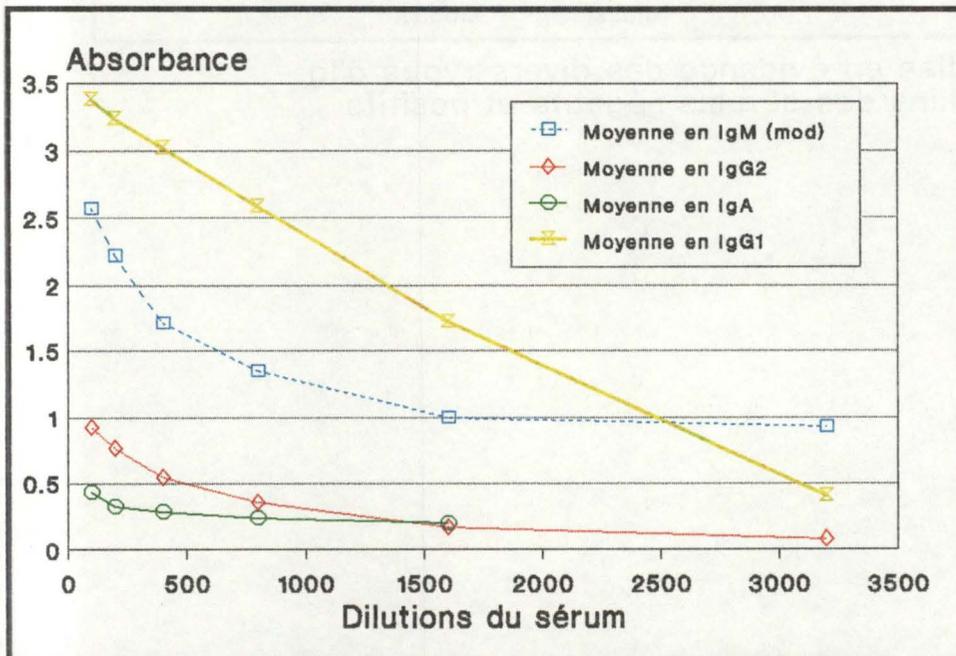


Fig. 30: Evolution des différentes Ig. anti BHV-4

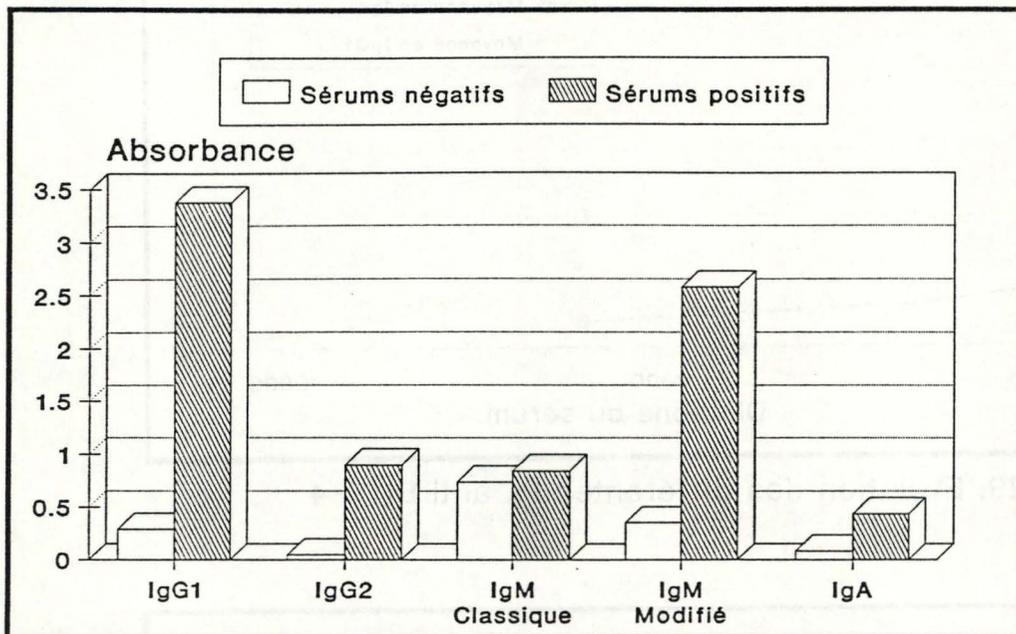


Fig. 31: Mise en évidence des divers types d'Ig. dans des sérums négatifs et positifs

2.2.5. Synthèse des résultats.

De toute évidence, il apparaît sur la figure 29 que la synthèse des IgG1 est préférentielle et nettement supérieure aux autres Ig. Nous n'accorderons pas une importance fondamentale au faible taux d'IgA, car outre le fait que l'anti-IgA n'était apparemment pas spécifique, il est normal dans un sérum provenant de sang bovin de trouver cet isotype d'Ig. en faible quantité vu sa localisation préférentielle au niveau des muqueuses.

De l'observation des courbes des figures 29 et 30, on distingue que l'allure de celle correspondant aux IgG1 diffère très fortement de toutes les autres. En effet, si on laisse l'axe des abscisses en échelle linéaire (figure :30), on obtient aux erreurs expérimentales près, une fonction exponentielle décroissante pour toutes les Ig. sauf pour l'IgG1 qui est représentée par une droite. Ceci bien sûr pour des valeurs de dilution ne dépassant pas le seuil de négativité. Nous en avons présenté une explication au paragraphe précédent (2.2.4.c): pages 32 et 33).

Comme les animaux ont été infectés naturellement, nous sommes dans la presque impossibilité de dire si le sérum que nous avons utilisé, correspond à une phase primaire ou secondaire de la réponse immunitaire. Nous pouvons néanmoins supposer, vu le taux supérieur d'IgG totaux (IgG1 + IgG2) obtenu par rapport au taux des IgM, que les animaux se trouvaient soit en phase tardive de la réponse primaire (phase stationnaire ou déclin métabolique), soit en phase de production de la réponse secondaire.

A la figure 31, on compare la moyenne des absorbances obtenues sur le sérum positif et les sérums négatifs, dilués chacun au 1/100. On peut observer sur cette figure l'aberration des résultats obtenus pour les IgM en ELISA classique. La moyenne des divers sérums négatifs, nous a permis d'établir le seuil de négativité pour chaque classe d'Ig. (voir figures: 22,23,24,25,26,27 et 28), seuil en-dessous duquel on considère les résultats comme faisant partie du bruit de fond.

Les nombreux problèmes rencontrés lors de la mise au point du test nous ayant pris énormément de temps, il nous était impossible dans le cadre de ce mémoire, de compléter notre étude par des tests de recherche isotypique supplémentaires sur d'autres sérums bovins. Nous sommes

parfaitement conscient qu'il est pratiquement impossible de généraliser une synthèse préférentielle d'un isotype d'Ig. sur base d'un seul sérum positif. Cependant on ne peut nier la positivité de ce sérum puisqu'il a été choisi comme sérum de référence (BELDICO).

Il faut noter également qu'il aurait été peut-être intéressant de quantifier le taux des IgE dans ce sérum, les herpèsvirus entraînant parfois des réactions allergiques chez leurs hôtes. Malheureusement, il n'existe aucun anti-IgE perox commercial.

3. DEUXIEME PHASE DU TRAVAIL.

3.1. Introduction.

Dans cette deuxième phase, nous avons travaillé sur des sérums fournis par Dubuisson et son équipe. Ils furent prélevés chronologiquement, sur 4 taureaux différents:

- * deux animaux ont été infectés expérimentalement par voie intratesticulaire, au moyen de 10^5 ufp de BHV-4 par testicule.
- * le troisième, a été inoculé de la même façon, mais a été traité à la dexaméthasone entre les jours 51 et 55 après l'injection.
- * l'animal restant sert de témoin et a reçu du surnageant de culture par voie intratesticulaire. Il a été également traité à la dexaméthasone entre les jours 51 et 55.

Les 4 animaux provenaient de 4 exploitations agricoles différentes.

Il est important de signaler que chaque animal fut contrôlé à l'aide d'un test en immunofluorescence indirecte (DUBUISSON et al., 1989c), afin d'établir qu'il n'avait pas été préalablement infecté par le BHV-4.

3.2. Buts du test.

Notre objectif reste à confirmer la synthèse préférentielle des IgG1 obtenues précédemment. Cette fois nous ne travaillerons plus sur un seul sérum, mais bien sur une série de sérums prélevés dans le temps après l'inoculation du BHV-4. Nous pourrons ainsi mesurer l'évolution des IgG1 en fonction du temps et cela respectivement pour chacun des taureaux testés.

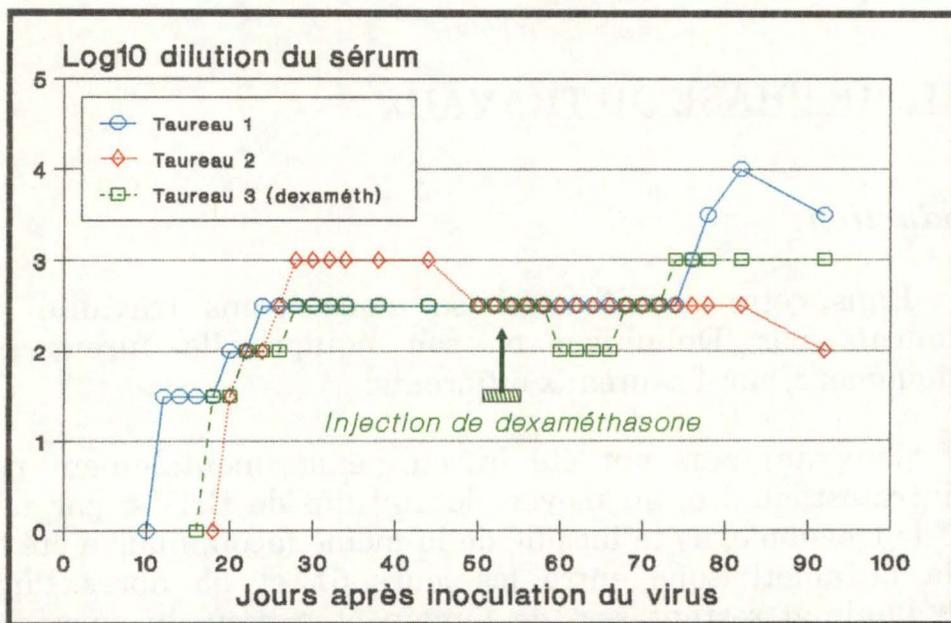


Fig.32: Evolution du titre en Ac. anti BHV-4 mesuré en immunofluorescence indirecte (DUBUISSON et al, 1989)

DUBUISSON et al. (1989c) ont effectués des tests en immunofluorescence sur ces mêmes sérums, afin de déterminer leur taux en Ac. totaux. Dans la figure 32 on constate qu'il faut à l'animal 1 plus de 10 jours après l'infection expérimentale pour commencer à percevoir un taux d'Ac. décelable en Immunofluorescence indirecte. Cet animal présente également une réponse secondaire aux environs du jour 74. Comme il n'a pas été traité à la dexaméthasone, on peut supposer que la réactivation du virus se serait faite par une voie naturelle. Quant à l'animal 2, il présente un type de réponse tout à fait normal. On remarque néanmoins un début de synthèse d'Ac. un peu plus tardive que pour le taureau 1. L'animal 3 présente une réponse secondaire une quinzaine de jours après le traitement à la dexaméthasone. Cette réponse secondaire semble néanmoins un peu moins forte que celle de l'animal 1. La dexaméthasone est un corticoïde, ce qui pourrait expliquer une réponse moins forte que pour l'animal 1, car les glucocorticoïdes sont connus pour avoir un effet inhibiteur sur la réponse immunitaire. Comme il s'agit, d'une injection expérimentale, il est aussi possible que le taux de synthèse des Ac. diffère quelque peu de celui d'un animal infecté naturellement. Il faut souligner, que dans l'étude de Dubuisson, le but recherché n'était pas de caractériser des classes d'Ac., mais bien de mettre en évidence des dommages cliniquement décelables suite à une réactivation virale par la dexaméthasone. La figure 32, démontre que la réactivation a bien eu lieu.

Sur base de ces résultats, nous avons tenté d'identifier les différentes classes d'Ig. contenues dans les sérums. Nous avons accordé un intérêt tout particulier à la synthèse préférentielle entre les IgG1 et les IgG2, qui représentaient une partie intéressante lors de la première phase du travail.

3.3. Evolution des IgG1, mesurées en ELISA, en fonction du temps après l'infection expérimentale.

3.3.1. Problèmes rencontrés.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'établir un "cut off" (seuil de négativité), qui nous permettrait de déterminer l'évolution d'un titre en IgG1 anti-BHV-4, comme l'avait fait Dubuisson et al. sur les Ig. totales en Immunofluorescence indirecte. Pour chaque sérum, il faut placer sur le graphique la valeur de la plus forte dilution qui présente un signal supérieur à celui du "cut off". Celui-ci a été établi grâce aux 5 sérums négatifs qui nous ont servi lors de la première phase du travail. Nous les avons dilués à 1/100 comme précédemment, et avons calculé la

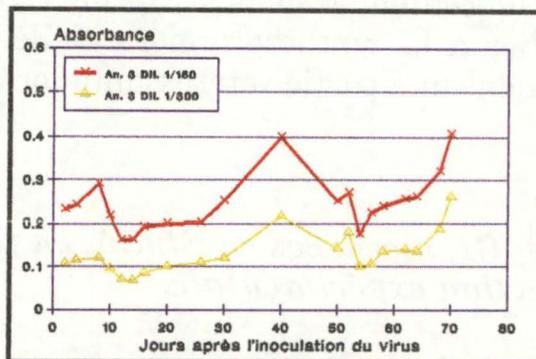
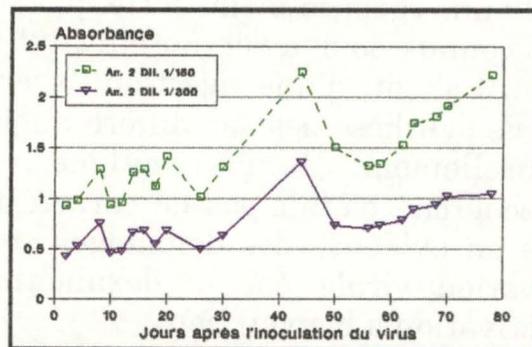
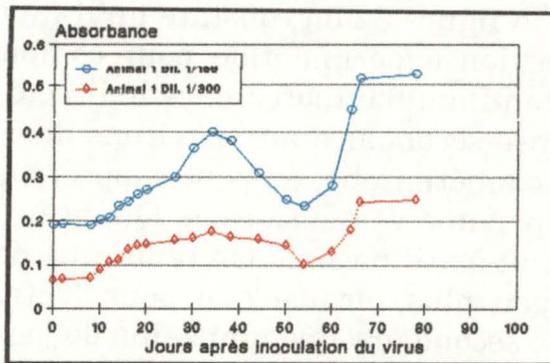


Fig. 33: Evolution des IgG1 anti BHV4 mesurées en ELISA

moyenne + 3σ des absorbances ainsi obtenues, donnant comme valeur 0,250. Cette valeur ferait donc office de "cut off". Puisqu'il fallait le reproduire sur chaque boîte, nous avons décidé de rechercher la dilution du sérum positif qui donnerait un signal équivalent à ce "cut off". Une fois cette dilution établie, nous la disposerions sur chaque boîte, comme seuil de négativité, de même que les sérums positifs et négatifs de référence qui feraient office de témoin. Malheureusement, il ne fut pas possible d'employer cette méthode, car dans le cas de l'animal 2 (figure 32), aux dilutions de 1/150 et 1/300, nous nous trouvions au-dessus du seuil de négativité. Ce qui est tout à fait impossible dans le cas d'une réponse primaire, notre cas en l'occurrence.

Dans un second temps, puisqu'il était impossible d'établir un "cut off" que l'on aurait pu utiliser pour les trois animaux, nous avons mesuré l'absorbance de la réaction en fonction du temps après inoculation, pour 4 dilutions des sérums allant de 1/150 à 1/1200 de 2 en 2, essais réalisés en duplicate.

3.3.2. Résultats et interprétation.

Seules les dilutions 1/150 et 1/300, dans le cas de l'animal 2, nous donnèrent des résultats supérieurs au seuil de négativité. C'est pourquoi, nous avons décidé d'omettre les deux autres dilutions. En outre, nous avons déposé sur chaque boîte, les sérums positifs et négatifs de référence qui serviront à nouveau de témoin.

La figure 33 illustre l'évolution des IgG1 pour les trois animaux aux deux dilutions choisies. On remarque que quelle que soit la dilution, les courbes obtenues pour les trois animaux suivent le même type d'évolution.

L'animal 1 semble montrer une réactivation virale naturelle, avec une absorbance atteignant plus de 0,5 unité après 80 jours, alors qu'au préalable, le maximum atteint était de 0,4 au jour 35.

Contrairement aux deux autres taureaux, l'animal 2 se distingue par un signal très élevé dès le jour 0 et ceci jusqu'au jour 78. Ce signal est pratiquement 5 fois plus important. Au vu des résultats élevés obtenus au jour 0, on pourrait penser, que ce taureau 2 était préalablement infecté et que l'injection du virus n'aurait fait que renforcer l'effet de la première infection. Cette hypothèse doit être rejetée puisque un test de dépistage du virus en Immunofluorescence indirecte avait été réalisée avant l'injection du BHV-4 chez chaque animal.

Pour l'animal 3, il aurait été intéressant de disposer des sérums après le jour 72, afin de vérifier une éventuelle réaction du système immunitaire après l'injection de dexaméthasone. Il semble tout de même que passé le jour 65, la synthèse d'IgG1 présente une tendance à l'augmentation; mais de toute évidence cette synthèse paraît être moins forte que dans le cas du taureau 1.

Nous insistons également sur le fait qu'aucun animal n'a présenté une absorbance aussi élevée que celle atteinte par le sérum positif de référence. Nous avons déposé ce dernier sur chaque boîte, et avons calculé la moyenne et l'écart type dont les valeurs respectives sont 3,232 et 0,032.

D'autre part, nous observons également une différence conséquente entre nos résultats et ceux obtenus par Dubuisson et al. En effet, même s'ils travaillèrent sur des Ig. totales, alors que de notre côté nous dirigeons nos recherches vers les IgG1 seules, ils obtinrent des valeurs supérieures au seuil de négativité pour des dilutions de 1/1000 et une fois, même, de 1/10000 dans le cas de l'animal 1. Quant à nous, la dilution 1/150 semblait être la seule qui nous donnait des résultats positifs, à l'exception de l'animal 2 dont les valeurs d'absorbance pour une dilution de 1/300 restaient toujours significatives. Ceci nous laisse supposer que les sérums reçus avaient déjà été utilisés avant nous, et qu'il s'en est suivi un nombre relativement important de congélations et décongélations. Celles-ci pourraient éventuellement provoquer l'agrégation de certaines Ig sur l'antigène entraînant soit une moins bonne fixation sur ce dernier, soit une adsorption non spécifique plus importante.

Il aurait été intéressant de vérifier lors de ces constatations, le titre en Ac. anti-BHV-4, par une méthode différente de l'ELISA, comme par exemple la séroneutralisation. Mais pour des raisons de temps, cette vérification n'a pu être apportée.

Nous avons tenté la même expérience avec l'anti-IgG2 perox commercial, utilisé lors de la première phase du travail. Malheureusement, les résultats présentèrent des absorbances tellement faibles, qu'il était impossible de les représenter graphiquement. En outre, l'écart entre les replicates, était de loin plus important que dans le cas des IgG1. Ce type de résultats, nous fait penser de nouveau à une synthèse préférentielle des IgG1, confortant ainsi ceux obtenus lors de la première phase de travail.

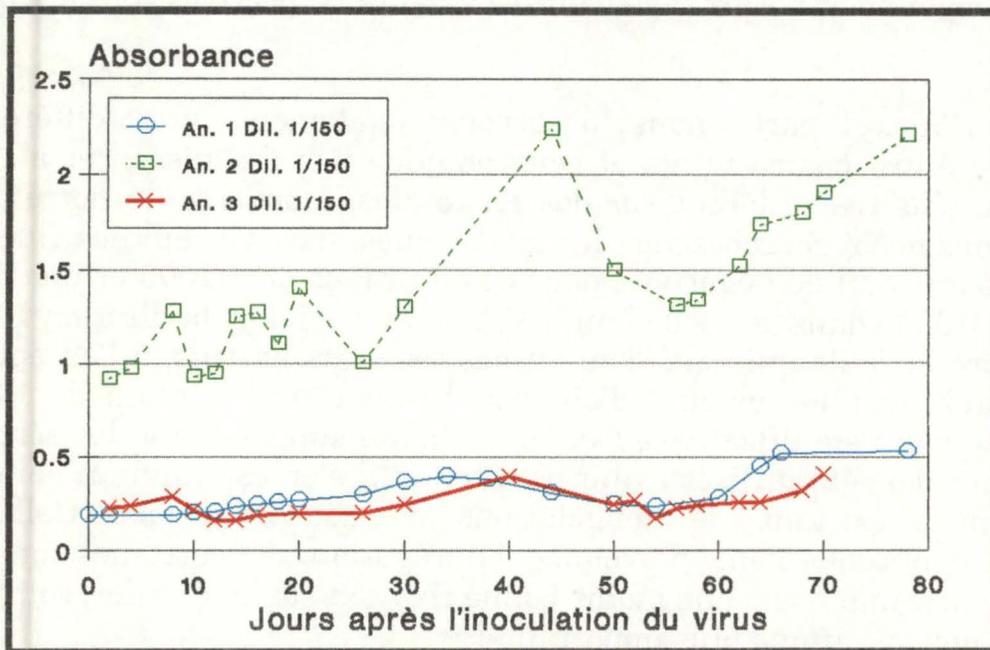


Fig.34: Evolution des IgG1 anti BHV-4 mesurées en ELISA

Comment justifier, maintenant, l'importance quantitative, chez l'animal 2, du taux d'IgG1 au jour 0 puisque, apparemment, la figure 32 ne montrait aucune synthèse d'Ac. (totaux) avant le jour 10 après l'infection ? Le seuil de négativité avait été calculé sur nos boîtes et donnait la valeur de $\pm 0,250$ unité d'absorbance. Dans le cas du taureau 2 à une dilution de 1/150 comme à 1/300, nous nous trouvons bien au-dessus de ce seuil. Les variations d'absorbance pour les animaux 1 et 3 du jour 0 au jour 10 ne dépassent que rarement les 0,250 (voir figure 34). Nous pourrions supposer l'existence dans le sérum, d'IgG1 résultant d'une infection préalable par un autre virus peut-être apparenté au BHV-4. Ces IgG1 resteraient en quantité importante dans le sang de l'animal et se trouveraient également dans le sérum au jour 0. Dès lors, il serait peut-être possible que les IgG1 non anti-BHV-4 se fixent par réaction croisée sur les antigènes adsorbés sur la boîte.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Tout au long de ce travail, nous nous sommes efforcés de vérifier, si lors d'une infection virale par le BHV-4, le système immunitaire bovin répond par la synthèse préférentielle d'un isotype particulier d'immunoglobuline.

Outre la mise au point des divers tests ELISA, notre travail s'est déroulé en deux phases, à savoir:

- * la caractérisation des classes d'Ig. contenues dans un sérum positif provenant d'une infection **naturelle** d'un seul animal.
- * l'évolution dans le temps des IgG1 contenues dans des sérums prélevés sur 4 taureaux provenant d'un élevage et infectés **expérimentalement**.

1. Mise au point du test ELISA.

Nous avons testé trois chromogènes: le TMB, l'OPD et l'ABTS afin de déterminer le plus performant. Il s'est avéré, que le TMB donnait un signal nettement supérieur et a été retenu pour nos différents tests.

Quant à la solution de lavage, nous avons utilisé deux solutions différentes: le PBS 1X et le PBS 1X Tween 1/1000. Les résultats étaient pratiquement identiques, mais pour des raisons de facilité de préparation, nous avons choisi d'utiliser le PBS 1X.

2. Caractérisation des classes d'Ig. sur un sérum positif témoin.

En ce qui concerne les IgM, les résultats aberrants obtenus par l'ELISA classique nous obligèrent à modifier la technique utilisée auparavant, en ajoutant une étape supplémentaire à savoir le RAMperox qui est un anticorps anti-espèce.

Quant aux IgA, IgG1 et IgG2, la technique de l'ELISA classique donna des résultats amplement suffisants. De toute évidence, il apparaît que la synthèse des IgG1 est nettement supérieure aux autres Ig. Le taux d'IgA est particulièrement faible, ce qui semble logique étant donné leur localisation préférentielle au niveau des muqueuses.

Les diverses immunoglobulines varient en fonction de la dilution selon une exponentielle décroissante, excepté les IgG1 qui varient linéairement. La diminution plus rapide des IgG2, IgA et IgM avec la dilution, exprime peut-être une plus faible affinité de ces classes d'Ig. vis-à-vis de l'antigène, soit encore l'existence d'une compétition avec un autre isotype (IgG1) qui serait en faveur de ce dernier lorsque la dilution augmente.

3. Evolution des IgG1 sur des sérums prélevés chronologiquement sur 4 taureaux d'élevage.

Notre objectif était de confirmer la synthèse préférentielle des IgG1 mise en évidence précédemment. Au vu des résultats acquis par Dubuisson et al. sur des Ig. totales en immunofluorescence indirecte, nous espérions suivre l'évolution des IgG1 et IgG2 anti-BHV-4 sur des animaux inoculés expérimentalement.

Nous avons réussi à mettre en évidence des IgG1 chez tous les animaux testés, bien que leur taux était nettement moins important que dans le sérum utilisé lors de la première phase du travail. Quant aux IgG2, elles étaient en quantité tellement faible qu'il était pratiquement impossible de les mettre en graphique. Ces résultats, confortèrent l'idée d'une synthèse préférentielle des IgG1 soupçonnée précédemment.

Il aurait été également intéressant, si le temps l'avait permis, de tester des sérums positifs plus frais que ceux que nous avons reçus de Liège, ainsi qu'expérimenter une autre méthode comme par exemple la séroneutralisation.

Néanmoins, nous pensons que notre modeste contribution en utilisant la technique de l'ELISA, permettra une connaissance complémentaire de la réponse immunitaire quant aux isotypes d'immunoglobulines synthétisées vis-à-vis du BHV-4.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- BARTHA A., JUHASZ M., and LIEBERMANN H., (1966)
Acta Vet. Hung., **16**, 357-358.
- BARTHA A., FADOL A.M., LIEBERMANN H., LUDWIG H., MOHANTY S.B.,
OSORIO F.A., REED D.E., STORZ J., STRAUB O.C., Van der MAATEN M.J.,
and WELLEMANS G., (1987)
Intervirology, **28**, 1-7.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., CILLI V., DONNELLI G., FERRARI M., CHICCHINI
V. and BORDINI V., (1986)
Comp. Immunol. Infect. Dis., **9**, 13-21.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., FERRARI M., PEDINI B., ALDROVANI V., CILLI V.,
RAMPICHINI L., and GATTI R., (1987)
Microbiologica, **10**, 37-45.
- COUTELIER J.P., van der LOGT J.T.M., HEESSEN F.A., WARNIER G.,
VAN SNICK J., (1987)
J. Exp. Med., **165**, 64-69.
- DEPELCHIN A., (1987)
Notes du cours de Microbiologie générale, éléments de Virologie FUNDP.
- DUBUISSON J., THIRY E., THOMAS I., COIGNOUL F., BUBLLOT M.,
VAN HEULE G., DEKEGEL D., and PASTORET P.P., (1987)
Annales de médecine vétérinaire., **131**, 37-48.
- DUBUISSON J., THIRY E., BUBLLOT M., SNEYERS D., BOULANGER D.,
GUILLAUME J., PASTORET P.P., (1989b)
Vet. Microbiol., **19**, 305-315.
- DUBUISSON J., THIRY E., BUBLLOT M., THOMAS I., VAN BRESSEM M.F.,
COIGNOUL F., and PASTORET P.P., (1989c)
Veterinary Microbiology, **21**, 97-114.
- EDWARDS S., and NEWMAN R.H., (1984-1985)
Vet. Microbiol., **10**, 149-154.

- EHLERS B., BUHK H.-J., and LUDWIG H., (1985)
J. Gen. Virol., **66**, 55-68.
- HOMAN E.J., and EASTERDAY B.C., (1981)
Am. J. Vet. Res., **42**, 1811-1813.
- HONESS R.W., (1984)
J. Gen. Virol., **65**, 2077-2107.
- JANEWAY C.A.Jr, CARDING S., JONES B., MURRAY J., PORTOLES P.,
RASMUSSEN R., ROJO J., KAIZAWA K., WEST J., BOTTOMLY K., (1988)
Immunol. Rev., **101**, 39-80.
- JOASSIN L., SOMZE A., and REGINSTER M., (1989)
Journal of Clinical Microbiology, **27**, N°1, 139-144.
- KIT S., KIT M., ICHIMURA H., CRANDELL R., and McCONNELL S., (1986)
Virus Research, **4**, 197-212.
- KROGMAN L.A., and McADARAGH J.P., (1982)
Am. J. Vet. Res., **43**, 336-338.
- LIEBERMANN H., SCHULZE P., KOKLES R., and HANTSCHHEL H., (1967)
Arch. Exp. Veterinaermed. , **21**, 761-776.
- LINDE G.A., HAMMARSTRÖM L., PERSSON M.A.A., SMITH C.I.E., SUNDQVIST
V., and WAHREN B., (1983)
Infection and Immunity, **42**, N°1, 237-243.
- LETESSON J.-J., LOSTRIE-TRUSSART N., DEPELCHIN A., (1985)
Ann. Méd. Vét., **129**, 131-141.
- LUDWIG H., (1983)
"In *The Herpesviruses.*" **2**, 135-214.
Edited by B. Roizman. New York & London: Plenum Press.
- LUTHER P.D., BRADLEY P.G., and HAIG D.A., (1971)
Res. Vet. Sci., **12**, 496-498.
- Mc COY S.B., MOHANTY S.B., and ROCKEMAN D.D., (1985)
Zentralbl. Veterinaermed., **B32**, 368-374.
- METZLER A.E., and WYLER R., (1986)
Schweiz. Arch. Tierheilk., **128**, 459-467.

- MOHANTY S.B., LILLIE M.G., INGLING A.L., and HAMMOND R.C., (1972)
J. Am. Vet. Med. Assoc., **35**, 1343-1346.
- MOHANTY S.B., (1973)
Zentralbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. A **224**, 61-64.
- MOHANTY S.B., ROCKEMANN D.D., and SNYDER D.B., (1984)
Microbiologica, **7**, 179-186.
- MOSMANN T.R. and COFFMAN R.L., (1989)
Ann. Rev. Immunol., **7**, 143-173.
- MUNZ E., GOEDEL E., and RWEYEMAMU M.M., (1974)
J. Comp. Path., **84**, 485-494.
- MURRAY H.W., SPITALNY G.L., NATHAN C.F., (1985)
J. Immunol., **134**, 1619-1622.
- NAKANE, KAWAOI A., (1974)
J. Histochem. Cytochem., **22**, 1084-1091.
- OSORIO F.A., and REED D.E., (1983)
American Journal of Veterinary Research, G, **44**, 975-980.
- OSORIO F.A., REED D.E., Van Der MAATEN M.J., & METZ C.A., (1985)
American Journal of Veterinary Research., **46**, 2104-2109.
- PACE J.L., RUSSELL S.W., THORRES B.A., JOHNSON H.M., GRAY P.W., (1983)
J. Immunol., **130**, 2011-13.
- POTGIETER L.N.D., and MARE C.J., (1974)
Arch. Gesamt. Virusforsch., **46**, 238-247
- ROIZMAN B., CARMICHAEL L.E., DEINHARDT F., de-THE G., NAHMIAS A.J.,
PLOWRIGHT W., RAPP F., SHELDRIK P., TAKAHASHI M., and WOLFF K.,
(1981)
Intervirology, **16**, 201-217.
- ROIZMAN B., (1982)
Edited by B. Roizman. New York: Plenum Press.
- ROSSITER P.B., GUMM I.D., MIRANGI P.K., (1988)
Vet. Microbiol., **16**, 211-218.
- SASS B., MOHANTY S.B., and HETRICK F.M., (1974)
Am. J. Vet. Res., **35**, 1343-1346.

- SAUTES C., FRIDMAN W.H., (1987)
Médecine/Sciences, **3**, 143-149.
- SCHULZE P., LIEBERMANN H., HANTSCHHEL H., BARTHA A., and JUHASZ M.,
(1967)
Arch. Exp. Veterinaermed., **21**, 747-759.
- SMITH P.C., CUTLIP R.C., RITCHIE A.E., and YOUNG J.K., (1972)
J. Am. Vet. Med. Assoc., **161**, 1134-1141.
- STORZ J., EHLERS B., TODD W.J., and LUDWIG H., (1984)
J. Gen. Virol., **65**, 697-706.
- THIRY E., PASTORET P.P., DESSY DOIZE C., HANSEN C., CALBERG-BACQ C.M.
DAGENAIS L., VINDEVOGEL H, and ECTORS F., (1981)
Annales de Médecine Vétérinaire., **125**, 207-214.
- THIRY E., BUBLOT M., DUBUISSON J., and PASTORET P.P., (1989)
Virology, Edited by G. Wittmann. Norwell: Kluwer Academic Publishers.,
Boston, 96-115.
- THIRY E., DUBUISSON J., BUBLOT M., VAN BRESSEM M.-F., and PASTORET
P.P., (1990)
Dtschr. tierärztl. Wschr., **97**,
- TODD W.J., and STORZ J., (1983)
J. Gen. Virol., **64**, 1025-1030.
- Van der MAATEN M.J. and BOOTHE A.D., (1972)
Arch. Gesamt. Virusforsch., **37**, 85-96.
- WARREN M.K., VOGEL S.N., (1985)
J. Immunol., **134**, 2462-69.
- WELLEMANS G., Van OPDENBOSCH E., and MAMMERICKX M., (1986)
Ann. Rech. Vét., **17**, 89-94.