



**HAL**  
open science

# MALADIE DES MUQUEUSES : MISE EN ÉVIDENCE DE VARIATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE DIVERSES SOUCHES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE SÉRONEUTRALISATION EN CULTURE CELLULAIRE

G. Corthier, J.-M. Aynaud

## ► To cite this version:

G. Corthier, J.-M. Aynaud. MALADIE DES MUQUEUSES : MISE EN ÉVIDENCE DE VARIATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE DIVERSES SOUCHES A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE SÉRONEUTRALISATION EN CULTURE CELLULAIRE. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1973, 4 (1), pp.79-86. <hal-00900745>

**HAL Id: hal-00900745**

**<https://hal.science/hal-00900745v1>**

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

**MALADIE DES MUQUEUSES :  
MISE EN ÉVIDENCE DE VARIATIONS ANTIGÉNIQUES  
ENTRE DIVERSES SOUCHES  
A L'AIDE DE LA TECHNIQUE DE SÉRONEUTRALISATION  
EN CULTURE CELLULAIRE**

G. CORTHER et J.-M. AYNAUD

*Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, I. N. R. A.,  
78850 Thiverval Grignon*

---

**RÉSUMÉ**

A l'aide d'un test de réduction du nombre d'unités formant des plages en culture cellulaire, il a été mis au point une technique de séroneutralisation à sérum constant (1/20) et virus variable qui a permis de comparer l'activité antigénique de 17 souches du virus de la maladie des muqueuses d'origines variées.

Des sérums, dirigés contre la souche Oregon C<sub>21</sub>V et la souche de référence NADL, présentent une activité neutralisante fonction de la souche de virus testée. Des différences sérologiques significatives entre les souches de virus étudiées ont été mises ainsi en évidence. Mais les valeurs des index de neutralisation ne permettent pas de classer les virus en groupes sérologiques distincts. La détermination du nombre exact de groupes est conditionnée par l'étude comparée de l'activité neutralisante d'un plus grand nombre d'antisérums spécifiques des variants sérologiques les plus représentatifs.

---

**INTRODUCTION**

La nature de l'agent viral de la maladie des muqueuses a été mise en évidence dès 1946 par OLAFSON. L'étude des propriétés structurales et antigéniques du virus a fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi la microscopie électronique a montré qu'il était constitué d'une nucléocapside entourée d'une enveloppe contenant des lipides (HAFEZ, 1968, HORZINEK, 1971). La nature de son génome (ARN) et sa morphologie le classent avec le virus de la peste porcine et celui de l'artérite équine parmi les togavirus (HORZINEK, 1971).

La production des différentes souches de virus de la maladie des muqueuses sur cultures de cellules de testicules ou de reins de veau a permis d'obtenir les quantités

d'antigènes nécessaires à des études d'immunodiffusion et de fixation du complément. Ces techniques associées avec celles de l'immunofluorescence ont montré l'existence de déterminants antigéniques communs. Les informations obtenues par ces trois techniques résultent des interactions entre les anticorps sériques et le matériel antigénique produit au cours du cycle intracellulaire du virus. Elles ne permettent pas de localiser avec précision, au niveau de la particule virale, le ou les antigènes communs aux différentes souches.

La technique de séroneutralisation en culture cellulaire révèle les antigènes localisés à la surface des virus infectieux. A partir de cinq souches de virus de la maladie des muqueuses étudiées par cette technique, FERNELIUS *et al.* (1971) ont mis en évidence des variations antigéniques et ont proposé de regrouper les virus en trois types sérologiques.

Cette technique a été utilisée dans notre laboratoire afin de déterminer l'activité neutralisante de sérums spécifiques de 2 souches de virus de la maladie des muqueuses, vis-à-vis de 17 souches différentes d'origines variées. Pour cela, nous avons mis au point un test *in vitro* de réduction du nombre d'unités formant plages après séroneutralisation. Dans ces conditions, nous avons pu préciser les relations sérologiques existant entre ces diverses souches de virus de la maladie des muqueuses. Les résultats ainsi obtenus indiquent une grande hétérogénéité dans les activités antigéniques des virus étudiés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Virus de la maladie des muqueuses*

Nous avons utilisé 17 souches isolées sur le terrain, d'origines diverses :

- 1° Souches fournies par le Dr GILBERT de l'École nationale vétérinaire de Toulouse ;
- 2° Souches fournies par le Dr FAYE de l'École nationale vétérinaire d'Alfort ;
- 3° Souches américaines : souches C<sub>21</sub>V et souches de référence NADL ;
- 4° Vaccin vivant commercial : « Diamond » ;
- 5° Souches fournies par le Dr WELLEMANS de l'Institut vétérinaire de Uccle, Bruxelles.

### *Production du virus*

Des cellules confluentes de testicules de veau de première explantation (cultivées dans un milieu Earle additionné de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, d'antibiotiques et de 10 p. 100 de sérum de veau normal, lavées ensuite trois fois avec du milieu sans sérum) sont placées en contact avec le virus à 37°C pendant 1 heure. Le milieu de maintien Earle contient 2 p. 100 de sérum fœtal de veau dépourvu d'inhibiteur de la croissance virale. Après l'apparition de l'effet cytopathogène, vers 48 h, les cellules infectées sont congelées et conservées à — 70°C.

### *Titrage du pouvoir infectieux du virus*

Pour chaque dilution logarithmique du virus, on dépose 0,2 ml sur 3 tubes de Leighton à grande fenêtre (55 × 13 mm), renfermant un tapis confluent de cellules primaires (préalablement rincées 3 fois avec un milieu sans sérum) de testicules de veau. Après une adsorption de 1 h à température ambiante, les cellules sont recouvertes par un gel d'agarose (grade A Calbiochem) à 1 p. 100 dans du milieu de Earle (contenant 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine et 2 p. 100 de sérum fœtal de veau), puis incubées à 37°C. Au bout de trois jours, en vue de la coloration on dépose 1 ml d'un second gel d'agarose (A<sub>47</sub> Indubiose) à 1 p. 100 dans un milieu Earle-Tris contenant 0,02 p. 100 de rouge neutre. Les tubes sont laissés à 28°C à l'abri de la lumière pendant

10 h environ. Les plages sont alors visibles à l'œil nu (fig. 1). Le total des plages comptées dans les 3 tubes d'une même dilution doit être d'environ 100 pour obtenir une précision statistique de 20 p. 100.

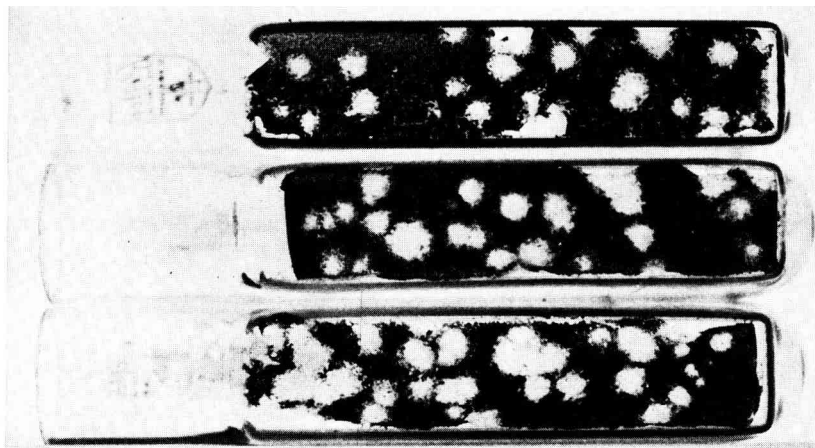


FIG. 1. — Plages produites par la souche NADL, diluée mille fois, sur cellules de testicules de veau

#### Les sérums

Le sérum fœtal de veau, dépourvu d'inhibiteur ou d'anticorps spécifiques, est utilisé comme sérum témoin. Les antisérums spécifiques de la maladie des muqueuses sont préparés sur moutons hyperimmunisés avec un surnageant clarifié de cellules infectées. Le sérum de veau spécifique de la souche C<sub>24</sub>V nous a été fourni par le Dr GILBERT.

#### Technique de séronéutralisation

On mélange, en quantités identiques, le sérum au 1/10 dans du milieu de Earle et la suspension virale aux différentes dilutions. Le mélange est incubé 1 h à 37°C, puis une nuit à 4°C. Les résultats obtenus avec les sérums décomplémentés ou non sont identiques.

#### Calcul de l'index de neutralisation

De façon à ne pas être gêné par une éventuelle variabilité dans la sensibilité des cellules, un témoin contenant du virus non neutralisé est fait à chaque expérience. Le titre du virus est calculé à partir du nombre de plages aux dilutions appropriées. La différence T-N, entre le titre

TABLEAU I

Exemple de calcul de l'index de neutralisation : virus TA

Sérums	Dilutions				Titre infectieux en log UFP/ml
	— 1	— 2	— 3	— 4	
Sérum fœtal de veau 1/20 final		trop nombreux	24-31 26	1-3 2	4,1 (T)
Sérum de mouton anti NADL 1/20 final	18-19 19	1-2 0			1,98 (N)

Index de neutralisation : T-N  $\approx$  2

en log du virus non neutralisé (T) et celui du virus mis en présence du sérum à tester (N) représente l'index de neutralisation (tabl. 1). Pour un virus et un sérum donnés, ce rapport est constant d'une expérience à l'autre.

## RÉSULTATS

### *Séronéneutralisation du virus de la maladie des muqueuses par un sérum de mouton spécifique de la souche NADL*

Lorsqu'on met en présence différentes souches du virus de la maladie des muqueuses et un sérum de mouton anti souche NADL, de la façon précédemment décrite, on observe des différences dans la valeur de l'index de neutralisation indiquant

TABLEAU 2  
*Séronéneutralisation des virus de la maladie des muqueuses par un sérum de mouton anti NADL (1/20)*

Virus		Index de neutralisation					
		0,5	1	1,5	2	2,5	3
(1)	T <sub>1</sub>			●			
	T <sub>2</sub>				●		
	T <sub>4</sub>				●		
	T <sub>6</sub>			●			
	T <sub>7</sub>					●	
	T <sub>8</sub>				●		
	TDVF						●
	TA				●		
	TP		●				
(2)	AR <sub>4</sub>			●			
	MM <sub>5</sub>		●				
(3)	I <sub>100</sub>			●			
	DK <sub>167</sub>				●		
	MQN		●				
(4)	Diam.						●
	NADL						●
	C <sub>24</sub> V						●

Virus isolés à : (1) Toulouse ; (2) Alfort ; (3) Belgique ; (4) U. S. A.

une hétérogénéité dans les propriétés antigéniques des virus. En effet, l'index de neutralisation varie de un à trois (tabl. 1).

Toutefois, il est à noter que bien qu'il existe des variations entre les souches vis-à-vis de la neutralisation par le sérum étudié, tous les virus sont neutralisés au moins partiellement par le sérum. Ce recouvrement indique une parenté antigénique entre la souche NADL et toutes les autres souches étudiées (tabl. 2).

La classification des virus par la valeur de leurs index de neutralisation ne permet pas de distinguer des groupes sérologiques vis-à-vis du sérum de mouton anti souche NADL.

*Séronéneutralisation du virus de la maladie des muqueuses  
par un sérum de veau spécifique de la souche C<sub>24</sub>V*

Les valeurs de l'index de neutralisation, vis-à-vis d'un sérum de veau anti souche C<sub>24</sub>V, de quelques souches de virus de la maladie des muqueuses montrent aussi une grande variabilité parmi les virus étudiés (tabl. 3) et un recouvrement sérologique.

Les virus NADL et C<sub>24</sub>V, bien que différents par leurs effets cytopathogènes, diffèrent peu par la valeur de leur index de neutralisation avec les sérums étudiés.

TABLEAU 3

*Séronéneutralisation des virus de la maladie des muqueuses  
par un sérum de veau anti C<sub>24</sub>V (1/20)*

Virus		Index neutralisation					
		0,5	1	1,5	2	2,5	3
(1)	T <sub>6</sub>				●		
	T <sub>7</sub>						●
	TDVF						●
(2)	MM <sub>5</sub>		●				
(3)	I <sub>100</sub>			●			
	DK <sub>167</sub>				●		
(4)	Diam.						●
	NADL						●
	C <sub>24</sub> V						●

Virus isolés à

- (1) Toulouse.
- (2) Alfort,
- (3) Belgique,
- (4) U. S. A.

## DISCUSSION

A. — *Méthodologie*a) *Titrage du pouvoir infectieux.*

Le titrage du pouvoir infectieux du virus par la méthode des plages a été préféré à celui par la méthode des dilutions limites. Ainsi, les résultats peuvent être obtenus au bout de quatre jours au lieu de huit. Les plages observées sont de grande taille, facilement lisibles à l'œil nu (fig. 1). D'autre part, pour obtenir une précision égale, la méthode des dilutions limites nécessite une quantité beaucoup plus importante de matériel.

b) *Mesure de l'activité neutralisante des sérums.*

Pour déterminer l'activité neutralisante des sérums étudiés, nous avons eu recours à la méthode à sérum constant et virus variable. Les avantages de cette méthode par rapport à celle à sérum variable et virus constant sont strictement techniques :

— le pouvoir infectieux des diverses souches étudiées diminue en fonction de la durée de stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à  $-70^{\circ}\text{C}$ . L'obtention avec exactitude d'un nombre prédéterminé d'unités formant des plages, dont dépend la précision des résultats de la méthode à virus constant et sérum variable, aurait difficilement été réalisable compte tenu du nombre élevé de souches étudiées ;

— la méthode (sérum constant, virus variable) exige un nombre inférieur de tubes de Leighton pour assurer une précision égale à la méthode à virus constant et sérum variable ;

— un contrôle de nos résultats a été réalisé sur deux virus différents à l'aide de la méthode à virus constant et sérum variable.

B. — *Variations sérologiques observées  
entre diverses souches de la maladie des muqueuses*

La séroneutralisation *in vitro* de 17 souches de virus de la maladie des muqueuses, par un sérum de mouton anti souche NADL et par un sérum de veau anti souche C<sub>24</sub>V, a permis de montrer que les souches de virus étudiées présentent toutes à un degré variable une parenté sérologique avec les souches NADL et C<sub>24</sub>V.

a) L'existence de groupes sérologiques distincts s'appuie sur l'observation de discontinuités significatives dans les valeurs de l'index de neutralisation. Dans notre cas, les variations dans les valeurs de l'index de neutralisation des diverses souches de la maladie des muqueuses n'ont pas permis de mettre en évidence de telles discontinuités, malgré la précision et la reproductibilité de nos mesures. Dans ces conditions, il nous paraît arbitraire de rassembler ces souches en un certain nombre de variants sérologiques.

L'absence de discrimination entre les souches NADL et C<sub>24</sub>V, étudiées avec nos deux sérums de référence peut être due à la préparation des anticorps à partir

de deux espèces animales différentes. FERNELIUS *et al.* (1971) ont observé une variation sérologique entre les deux souches, en utilisant deux sérums de veau.

b) Le recouvrement antigénique observé suggère qu'un ou plusieurs déterminants antigéniques sont portés par toutes les souches. La perte du pouvoir infectieux d'un virus, par l'action d'un antiserum, est due à la fixation de molécules d'anticorps à la surface du virus. Le ou les antigènes communs seraient donc situés au niveau de l'enveloppe.

Si l'intensité de la neutralisation d'un virus est fonction de la quantité d'anticorps fixés sur ce virus, les variations sérologiques entre les souches peuvent s'expliquer de deux façons différentes :

- l'accessibilité du ou des déterminants antigéniques communs à la surface du virus varierait selon les souches ;
- la quantité de ce ou ces antigènes pourrait ne pas être constante d'une souche à l'autre.

Des résultats obtenus par WELLEMAN et VAN ERT (communication personnelle) en immunodiffusion seraient en faveur de la seconde hypothèse.

## SUMMARY

### MUCOSAL DISEASE : EVIDENCE OF ANTIGENIC VARIATIONS BETWEEN DIFFERENT STRAINS DEMONSTRATED BY SERONEUTRALIZATION IN TISSUE CULTURE

Using a test which shows a reduction in the number of plaques in tissue culture, it has been possible to develop a technique of serum neutralization with a constant dilution of serum (1/20) and a variable amount of virus to compare the antigenic activity of 17 different strains of mucosal disease virus.

Sera against the strain Oregon C24V and the reference strain NADL show a neutralizing activity against the strain of virus tested. Evidence of some significant serological differences between the strains of virus studied has been put forward. The values of the neutralization indices don't allow the viruses to be classified in distinct serological groups. The determination of the exact number of groups is conditioned by a comparative study of neutralizing activity of a much greater number of specific antisera from a greater representation of serological variants

## РЕЗЮМЕ

Болезни слизистых оболочек : Выявление антигенических изменений между разными штаммами при помощи метода серонейтрализации в культуре клеток.

При помощи пробы сокращения числа единиц составляющих зоны в клеточной культуре, установили метод серонейтрализации с константной сывороткой (1/20), и вариабельным вирусом, который дает возможность сравнить антигеническую активность 17 штаммов вируса болезни слизистых оболочек разных происхождения.

Бараны сыворотки, употребленные против штамма Oregon C24 V и штамма реферата NADL, имеют нейтрализующее действие, которое зависит от подтипа штамма. Значительные серологические различия

между подопытными штаммами установлены. Показатели индексов нейтрализации позволили классифицировать вирусы в 3 серологические группы, с приблизительной точностью. Тем не менее определение точного числа групп, зависит от сравнительного исследования нейтрализующего действия более значительного числа, самых типичных, специфических сывороток серологических вариантов.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- FERNELIUS A. L., LAMBERT G., BOOTH G. D., 1971. Bovine Viral Diarrhoea Virus-Host Cell Interactions : Serotypes and their relationship to biotypes by cross neutralization. *Amer. J. veter. Res.*, **32**, 229-236.
- HAFEZ S. M., PETZOLDT K., RECZKO E., 1968. Morphology of bovine viral diarrhoea virus. *Acta virol.*, **12**, 471-473.
- KORZINEK M., MAESS J., LAUFS R., 1971. Studies on the substructure of togavirus II. Analysis of Equine Arteritis, Rubella, Bovine Viral Diarrhoea, and Hog Cholera Viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, **33**, 306-318.
- OLAFSON P., MACCALLUM A. D., FOX F. H., 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinarian*, **36**, 205.
-