



HAL
open science

COMPARAISON DES POUVOIRS IMMUNOGENES DE PREPARATIONS PURIFIEES DE VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE (TYPE O) A TENEURS CONTROLEES EN PROTEINE EXTERNE VP1

Serge Bernard, Jeanne Grosclaude, Ph. Adamowicz, J. Guerche

► **To cite this version:**

Serge Bernard, Jeanne Grosclaude, Ph. Adamowicz, J. Guerche. COMPARAISON DES POUVOIRS IMMUNOGENES DE PREPARATIONS PURIFIEES DE VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE (TYPE O) A TENEURS CONTROLEES EN PROTEINE EXTERNE VP1. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1977, 8 (1), pp.79-94. hal-00900916

HAL Id: hal-00900916

<https://hal.science/hal-00900916>

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.

COMPARAISON DES POUVOIRS IMMUNOGENES DE PREPARATIONS PURIFIEES DE VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE (TYPE O) A TENEURS CONTROLEES EN PROTEINE EXTERNE VP1

S. BERNARD *, Jeanne GROSCLAUDE *, Ph. ADAMOWICZ ** et J. GUERCHE **

*Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, INRA *,
78850 THIVERVAL-GRIGNON, France*

*Laboratoire Roger-Bellon, Centre de Recherches Vétérinaires **
(sous la direction du Dr P. PRUNET), Villaines-les-Rochers, 37190 Azay le Rideau, France*

Summary

COMPARISON OF THE IMMUNOGENIC POTENCIES OF PURIFIED INACTIVATED FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS PARTICLES WITH VARIABLE AMOUNTS OF VP1 PROTEIN. — The immunogenic protein VP1 in Foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O is sensitive to incubation with cellular lysate, mainly through the proteolytic activities elicited after cell lysis. An early harvest of the virus or the use of protease inhibitors like Trasylol[®] prevents damages to the viral antigen, which may thus be obtained with a higher amount in VP1 and a marked increase in infectivity. Vaccination experiments with identical doses of purified GDA-inactivated viral particles with variable amounts of protein VP1 were carried out in guinea pigs; a virulent challenge was performed twenty-one days after inoculation of the vaccines. The protective effect from equal doses of particles is quite parallel to their amounts in VP1. Furthermore, the specificity of the neutralizing antibodies elicited by the different inactivated antigens is dependant on their contents in VP1: the "low VP1" particles (i.e. with a molar ratio of ca. one VP1 for one VP2 and one VP3) elicit a neutralizing activity directed against the low VP1 particles only; the "high VP1" particles (two VP1 for one VP2 and one VP3) elicit neutralizing antibodies directed against both low and high VP1 particles. The role of proteases in modulating the immunogenicity and the infectivity of FMDV is discussed, and some theoretical and practical consequences of these observations are presented, relevant to the concept of immunological dominance and to the efficiency of inactivated vaccines.

Introduction

Le rôle d'une protéine particulière de la capsid du virus de la fièvre aphteuse est bien démontré dans l'induction de la synthèse d'anticorps neutralisant le pouvoir infectieux du virus (Laporte *et al.*, 1973) et même dans l'établissement d'un effet protecteur chez le porc et le cobaye au cours d'une épreuve

virulente (Bachrach *et al.*, 1975). Bien que la masse moléculaire de la protéine en cause varie quelque peu selon le type sérologique de ce picornavirus très polymorphe dans sa structure capsidiale, la protéine immunogène est toujours, sur le virion, la protéine la plus sensible aux enzymes protéolytiques et la plus accessible aux marquages radiochimiques, ce qui témoigne de sa position externe

à la surface de la capsid. Cette position lui confère, outre son rôle dans l'initiation de la défense immunitaire de l'hôte, un rôle privilégié dans les interactions entre le virus et la cellule sensible, ce qui explique que son intégrité soit nécessaire au maintien d'un bon pouvoir infectieux de la particule virale, pour le type O du moins (Wild et Brown, 1967).

Or cette protéine, support de propriétés biologiques majeures, est labile : elle est clivée par les protéases, les peptides résultants demeurant plus ou moins ancrés dans la structure capsidiale (Burroughs *et al.*, 1971), ou décapée de la capsid virale par des traitements physiques (Bernard *et al.*, 1974), sans qu'apparemment soit compromise la cohésion du reste de la particule virale. On peut donc supposer que le degré de préservation de cette protéine dans les préparations d'antigène viral inactivé est une cause de fluctuation de leur pouvoir immunogène dont ne rendent pas compte les critères basés sur le seul nombre de particules « 140 S ».

Aussi, dans la perspective de définir un critère biochimique de la « qualité immunogénique » d'une préparation virale, avons-nous cherché à comparer les pouvoirs immunogènes, sur cobaye, de doses identiques de particules purifiées inactivées de type O à teneurs variables en protéine VP1 (la classe de protéine de masse moléculaire 34 000 immunogène pour ce type sérologique). Nous avons déjà décrit (Bernard et Grosclaude, 1975) l'obtention d'un « virus précoce » deux fois plus riche en protéine VP1 que le « virus tardif » laissé en contact avec les protéases du lysat cellulaire de production ; nous décrivons ici l'obtention d'un virus aussi riche en protéine VP1 que le virus précoce, malgré une incubation prolongée avec le lysat cellulaire, grâce à l'introduction d'inhibiteurs de protéases dans le milieu de production (le Trasylol). Les pouvoirs immunogènes de ces trois types de virus purifiés ont été comparés par une expérience de détermination de la dose protectrice 50 p. 100 sur cobaye (DP50) selon le protocole habituel de comparaison de lots de vaccins, et par l'analyse des anticorps neutralisants présents dans les sérums des animaux au moment de l'épreuve par la souche virale d'étude.

Bien que le niveau de notre comparaison se situe à la limite du pouvoir séparateur de l'épreuve de DP50, les résultats observés sont en faveur d'une relation directe entre la

teneur en protéine VP1 des particules virales et leur pouvoir immunogène ; de plus, l'analyse sérologique révèle une très nette différence entre les préparations vaccinales utilisées : les anticorps induits par le virus précoce (ou produit sous Trasylol) neutralisent le virus précoce et le virus tardif ; par contre les anticorps induits par le virus tardif sont spécifiques du virus tardif ; une hypothèse sur les fondements moléculaires de la dominance est déduite de ces observations et discutée.

Matériel et techniques

Le virus

Le virus utilisé est une souche de type O du laboratoire de Thiverval multipliée sur tapis de cellules BHK 21 dans les conditions décrites par Bernard et Grosclaude (1975). Cette souche s'est révélée pathogène pour le cobaye ce qui permet de l'utiliser pour l'épreuve virulente ; le développement de la généralisation est très progressif et s'étale sur près d'une semaine pour des animaux non prémunis.

Préparation de virus précoce et de virus tardif

Le virus précoce est le virus que l'on peut extraire par des moyens mécaniques des cellules (et de leur surnageant) infectées en conditions de cycle unique, avant toute lyse spontanée des cellules, au stade « cellules arrondies », 3 h 30 après le début de l'infection (le plateau de production des particules infectieuses est atteint en 5 heures avec cette souche) ; le virus tardif est le virus produit dans les mêmes conditions mais récolté dans le surnageant et les débris cellulaires après une incubation à 37° prolongée pendant 24 heures après le début de l'infection. La production, la concentration et la purification par centrifugation isopycnique en chlorure de césium de ces suspensions virales ont été décrites dans le travail précité. Pour chaque lot une partie aliquote de la préparation est produite en présence d'acides aminés marqués radioactivement afin de pouvoir contrôler l'évolution de la structure protéique à tous les stades de la purification. Le virus radioactif et le virus « froid » destiné à l'immunisation des cobayes sont soumis strictement aux mêmes manipulations et conditions de conservation.

Préparation de virus en présence d'un inhibiteur des enzymes protéolytiques

Le Trasylol[®], produit par la firme Bayer,

commercialisé en France sous le nom de Zymofren par la société Specia, est un polypeptide naturel, extrait du poumon de bœuf, de masse moléculaire 6 500, doué d'un large spectre d'activité antiprotéolytique ; sa faible mais réelle toxicité vis-à-vis des cellules BHK 21 qui nous servent à produire le virus au laboratoire, a dicté les modalités d'utilisation suivantes : au stade du cycle viral où la synthèse du virus précoce est achevée, nous ajoutons au surnageant cellulaire 500 UKI/ml de Trasylol (unités d'inhibition de la kallikréine) et nous poursuivons l'incubation dans les mêmes conditions que pour le virus tardif. Le virus produit sous Trasylol est purifié selon le même protocole que le virus précoce et le virus tardif, mais en maintenant à tous les stades de la préparation et du stockage une concentration de 500 UKI/ml de Trasylol.

Préparation de virus traité à la trypsine

Ce virus sert de préparation témoin aussi bien pour l'expérience de détermination de DP50 que pour l'analyse sérologique ; il est obtenu dans les conditions de Wild et Brown (1967) : un mélange de virus précoce et tardif purifié par centrifugation isopycnique, est incubé en agitation 1 h 30 à 37° et pH 7,6 en présence de trypsine (1 mg/ml de trypsine Calbiochem, B grade, débarrassée de toute contamination chymotrypsique) ; l'action de la trypsine est interrompue par l'addition de 2 mg/ml d'inhibiteur du soja (Calbiochem, B grade, 3 fois cristallisé) puis le mélange subit une nouvelle centrifugation isopycnique pour obtenir une préparation purifiée de virus trypsiné ; la structure protéique est contrôlée par comparaison avec une préparation de virus identique marqué radioactivement et trypsiné dans les mêmes conditions.

Contrôle de la structure protéinique des préparations purifiées

L'analyse des protéines virales en gel de polyacrylamide - SDS et l'estimation des quantités de protéines capsidaires, en particulier la teneur relative en protéine VP1, sont effectuées selon la technique décrite précédemment (Bernard et Grosclaude, 1975). Le contrôle est pratiqué de manière répétée, et en dernier lieu, au moment de l'utilisation après inactivation et stockage.

Conservation des préparations purifiées

Les suspensions virales sont conservées à 4° telles qu'elles ont été recueillies sur gradient de chlorure de césium, c'est-à-dire à une concentration saline élevée, en tampon

Tris-HCl 0,08 M pH 7,6 NaCl 0,2 M ; d'après la densité optique des préparations à 260 nm (turbidité déduite), la concentration en matériel viral purifié est voisine de 0,6 mg/ml ; les préparations injectées aux cobayes correspondent à des dilutions de l'ordre de 1/1 000 des solutions stockées, aussi l'élimination du chlorure de césium a-t-elle été jugée inutile.

Inactivation du virus purifié. Tests d'innocuité

Les solutions de virus purifié sont inactivées en présence de glycidaldéhyde (GDA) selon la technique de Martinsen (1964) dans les conditions suivantes : virus dilué à 2,5 µg virus/ml, dans un milieu de pH 8,2 ; incubation 16 heures à 30° en présence de 0,05 p. mille de GDA, sous agitation.

L'innocuité des préparations inactivées est contrôlée par deux passages successifs sur cellules IBR S2 en monocouche et par inoculation intra-péritonéale sur souris.

Le virus trypsiné est soumis comme les autres lots au processus d'inactivation ; la présence de Trasylol à la concentration initiale n'est pas maintenue dans les dilutions successives du virus produit sous Trasylol.

Conditions d'immunisation et d'épreuve

Les animaux sont des cobayes albinos, mâles, de souche Hartley, pesant 500 g environ, issus d'un seul élevage (Serbel), choisis de manière à constituer une population aussi homogène que possible ; ils sont répartis en lots de 7 ou 8 pour chaque type d'antigène inactivé et chaque dose de vaccination. Pour chaque virus (précoce, tardif, trypsiné, produit sous Trasylol) 4 doses d'antigène en progression géométrique de raison 4 sont choisies après vérification lors d'une expérience préliminaire partielle qu'elles permettaient d'encadrer la DP50 ; elles correspondent aux quantités suivantes de particules purifiées et inactivées : 0,025, 0,1, 0,4, 1,6 µg ; les animaux les reçoivent en injection sous-cutanée sous des volumes de 0,05 à 3,2 ml de milieu tamponné à pH 8,0.

L'épreuve virulente a lieu 21 jours après l'immunisation par inoculation dans le coussinet plantaire de 0,1 ml d'une préparation brute, diluée au 1/10°, de la souche virale ayant servi à préparer les virus purifiés. La souche a été titrée juste avant l'épreuve à la fois sur souris (titre 6,5), sur culture de tissu IBR S2 (titre 7,1) et sur un lot de cobayes choisis parmi les animaux destinés à l'expérience (titre 3,5). La lecture des aphtes podaux de généralisation est pour-

Tableau 1

Virus produit	Virus précoce	Virus tardif	Virus produit sous Trasylol
Particules physiques (a) (microgrammes)	100	170	200
Particules infectieuses (production totale) (b)	$1,2 (1-1,5) \times 10^{10}$	$1,8 (0,8-2) \times 10^9$	$2,5 (1,8-2,8) \times 10^{10}$
UFP/Particules physiques (c)	1/600	1/7 400	1/600

Quantités absolues de virus produit par une unité de 500 millions de cellules BHK 21. Les quantités (en microgrammes) de particules physiques (a) sont déduites de la densité optique à 259 nm du pic correspondant aux virions sur le gradient isopycnique de purification en attribuant au virus un coefficient d'extinction spécifique $E_{259}^{1\%} = 75$. Le nombre de particules physiques correspondant à ces quantités pondérales est déduit de l'équivalence : 1 microgramme de virus purifié correspond à $7,4 \times 10^{10}$ particules physiques. La quantité de particules infectieuses (b) est mesurée par la moyenne du titrage de six préparations indépendantes, suivie entre parenthèses par les valeurs extrêmes observées. Le rapport UFP/Particules physiques (c) est déduit des valeurs précédentes par la relation

$$c = \frac{b}{a \times 7,4 \times 10^{10}}$$

suivie pendant une semaine après inoculation du virus d'épreuve.

Détermination de la DP50 pour chaque type d'antigène inactivé

Le tableau de généralisation est interprété par la méthode de Lietchfield et Wilcoxon (1949) qui permet de calculer la DP50 et la limite de confiance de la DP50 ($p = 0,05$) pour chaque type d'antigène inactivé.

Analyse des sérums individuels

Des prélèvements de sérum par ponction intracardiaque ont été effectués au 21^e jour après l'immunisation, quelques heures avant l'épreuve virulente.

L'activité neutralisante est recherchée dans les sérums de chaque animal, dont le devenir au cours de l'épreuve a été noté. Le pouvoir neutralisant est mesuré *in vitro* par la technique d'inhibition des plages, les titrages s'opérant selon la méthode de La Bonnardière (1971) sur les cellules BHK 21 du clone S13 en suspension dans du milieu gélinifié à l'Indubiose^R (Agarose A grade de l'Industrie Biologique Française). Des dilutions successives de chaque sérum sont mises en contact pour la séroneutralisation avec un nombre déterminé d'Unités Formant Plages soit de virus précoce, soit de virus tardif (deux épreuves indépendantes de neutralisation de 100 UFP de chaque type de virus pour chaque dilution de sérum). Le pouvoir neutralisant est exprimé en pourcentage de réduction du nombre de plages vis-à-vis de chaque type de virus, en fonction de la dilution du sérum.

Résultats

1. — Caractéristiques des suspensions virales utilisées pour l'immunisation

1.1. — Influence des conditions d'incubation sur les quantités et le pouvoir infectieux du virus récolté.

On a comparé les productions virales d'une population définie de cellules BHK 21 (environ 500 millions de cellules) selon la manière de conduire l'incubation en système précoce, tardif ou sous Trasylol. Les résultats présentés sont la moyenne d'au moins six préparations indépendantes pour chaque protocole. Sur le tableau 1 sont présentées les quantités absolues de virus produites dans chaque cas, mesurées d'une part en particules physiques (microgrammes de virus purifié)*, d'autre part en particules infectieuses (titrées sur cellules BHK 21 dans l'extrait brut clarifié du surnageant et des débris cellulaires avant toute concentration ou purification). Sur la figure 1 la présentation en échelle relative de toutes les caractéristiques comparées des diverses préparations permet les constatations suivantes : le prolongement de l'incubation au-delà du stade précoce permet d'augmenter significativement le rendement en

* Les « particules physiques » de densité voisine de 1,43 sur gradient de chlorure de césium sont assimilées aux « particules 140 S » ou « particules 22 à 25 nm » ou « particules fixant le complément après traitement par le fluorocarbène ».

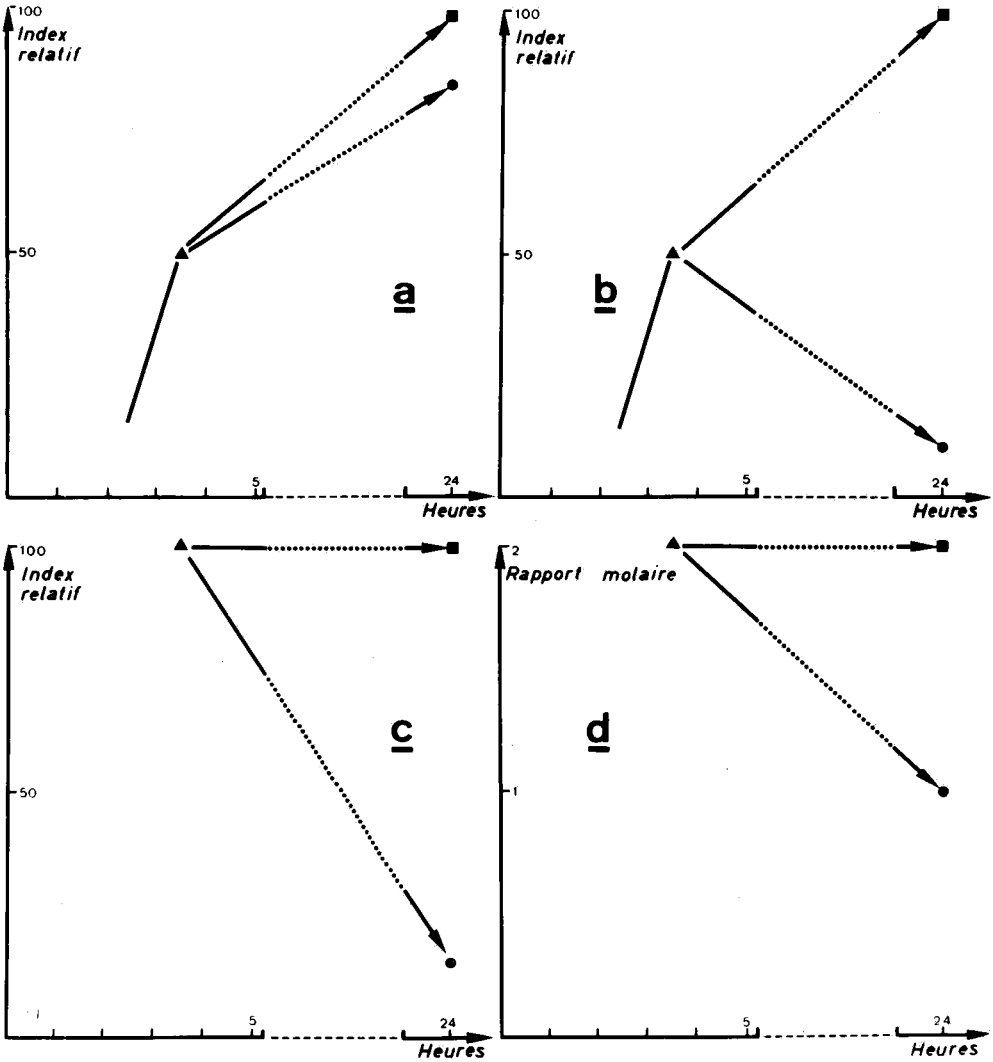


Fig. 1. Caractéristiques des préparations de particules de virus précoce (▲), de virus produit sous Trasyol (■) et de virus tardif (●).
 a : quantité de particules physiques produites ;
 b : quantité de particules infectieuses produites ;
 c : pouvoir infectieux spécifique des particules ;
 d : teneur moyenne en protéine VP1 des particules.

particules physiques (1a) ; par contre si la production de virus est mesurée en particules infectieuses (1b), l'addition de Trasyol permet de doubler la quantité obtenue au stade précoce, alors que l'incubation prolongée en absence d'anti-enzymes provoque un effondrement du pouvoir infectieux de la préparation récoltée. Par suite, si l'on compare le pouvoir infectieux spécifique des

différentes préparations, défini par le rapport entre les index mesurant les particules infectieuses et les particules physiques (1c), il est manifeste que le virus précoce et le virus produit sous Trasyol représentent des populations virales près de dix fois plus riches que le virus tardif en particules infectieuses pour une quantité donnée de particules physiques. A titre indicatif, l'estimation du

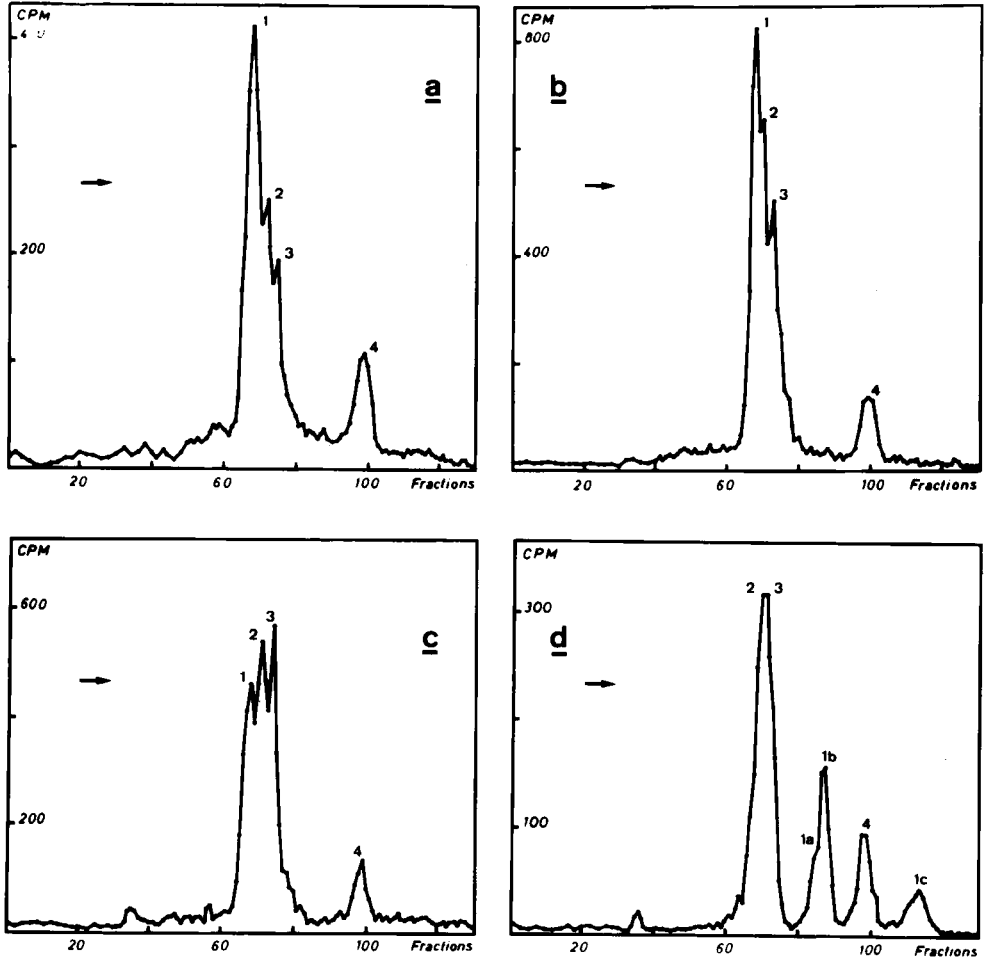


Fig. 2. Structure peptidique des quatre types de suspensions virales utilisées pour l'immunisation (analyse après inactivation au GDA et stockage). a : antigène précoce ; b : antigène produit sous Trasylol ; c : antigène tardif ; d : antigène trypsiné. Gels de polyacrylamide (10%) - SDS ; migration dans le sens de la flèche. Les protéines virales 1, 2, 3 et 4 ont respectivement pour masses moléculaires 34 000, 30 000, 26 000 et 14 000 daltons ; les peptides 1a, 1b et 1c sont des produits du clivage de la classe de protéine VP1 par la trypsine.

rapport Unités Formant Plages/Particules Physiques est présentée au tableau 1 mais elle est entachée de l'imprécision inhérente à la mesure de ce paramètre.

Enfin, puisque l'addition de Trasylol permet de maintenir le pouvoir infectieux spécifique, on peut conclure que la dégradation observée dans le système tardif s'explique dans une large part par une activité enzymatique plutôt que par une dégradation thermodynamique due à l'exposition prolongée à 37°.

1.2. — Comparaison des structures protéiques des différentes préparations purifiées.

Sur la figure 2 sont représentées les analyses en gel de polyacrylamide-SDS des préparations radioactives homologues des préparations utilisées pour l'immunisation, après stockage et inactivation.

Nous avons pu vérifier que la série de manipulations n'altère en rien la structure révélée dès la première purification ; en particulier le virus inactivé au GDA peut être dégradé dans les mêmes conditions que le

Tableau 2

Type du virus d'immunisation	Trypsiné	Tardif	Précoce	Produit sous Trasylol
Dose d'immunisation (microgrammes)				
0,025	5/7	6/8	6/7	5/8
0,100	4/7	5/7	3/8	4/7
0,400	6/8	0/7	0/7	0/8
1,600	5/8	0/8	0/8	0/8
DP50 (microgrammes)	> 1,600 incalculable	0,115	0,072	0,075
Limites de l'intervalle de confiance (à P = 0,05)	—	0,050	0,026	0,031
Paramètres de calcul	S	—	4,6	2,8
	f _d	2,3	2,8	2,4

Bilan des généralisations observées au septième jour après l'épreuve (nombre d'animaux ayant généralisé / nombre d'animaux éprouvés). Calcul de la dose protectrice 50 p. 100.

virus non traité, et analysé sans que le profil des protéines soit perturbé, ce qui confirme que cet agent alkylant n'agit pas au niveau des interactions des protéines entre elles, à la concentration utilisée. Ce procédé d'inactivation comporte une exposition prolongée à 30° : notre observation confirme que l'effet thermique seul n'altère pas la structure du virus s'il est débarrassé de contaminations protéolytiques.

Ainsi qu'il apparaît en 2a et 2b, la présence d'un inhibiteur des protéases permet de maintenir la structure protéique décelée au stade précoce et le rapport molaire de 2 VP1 pour 1 VP2 et 1 VP3. Ce résultat est corroboré par le maintien de la densité du virus produit sous Trasylol à la même valeur (1,4350) que celle du virus précoce, alors que nous estimons la densité du virus tardif à 1,4500 et celle du virus trypsiné à 1,4900 d'après la mesure des indices de réfraction des fractions contenant les particules virales sur les gradients de chlorure de césium.

En conclusion, le lysat cellulaire agit sur le produit viral par des protéases sensibles à des inhibiteurs tels que le Trasylol ; le contrôle de cette activité protéolytique soit avant sa manifestation, par une récolte précoce, soit par l'utilisation d'un inhibiteur approprié, conduit à l'obtention de préparations virales intrinsèquement différentes : à

nombre égal de particules 140 S, la teneur en protéine VP1 varie du simple au double et le pouvoir infectieux spécifique de 1 à 10. 2. — *Détermination du pouvoir protecteur des différents antigènes inactivés*

Le tableau 2 présente le bilan des généralisations au 7^e jour après l'épreuve virulente, pour chaque dose et chaque sorte de préparation vaccinnante, et l'estimation de la DP50 qui en a été déduite, avec l'intervalle de confiance, par l'interprétation statistique de Lietchfield et Wilcoxon.

Cinq animaux témoins, n'ayant reçu aucun vaccin, ont généralisé progressivement sous la même dose d'épreuve dans une proportion de 2/5 au 3^e jour et de 5/5 au 7^e. Pour les animaux immunisés le pourcentage de 100 % de généralisation n'est jamais atteint, même avec le virus trypsiné. Ces conditions particulières de l'épreuve ont une répercussion sur la précision de l'interprétation statistique, ce qui explique la largeur de l'intervalle de confiance sur chaque estimation.

De plus, la manifestation du pouvoir pathogène du virus d'épreuve est lente : sur les 54 animaux présentant une généralisation à 7 jours (témoins non vaccinés compris) 32 cobayes seulement manifestaient cette généralisation dès le troisième jour suivant l'épreuve. Cette lenteur du développement du pouvoir pathogène, y compris chez les

animaux non immunisés, est imputable à la souche d'épreuve (souche multipliée sur cellules de hamster, non « adaptée » au cobaye) ; elle peut introduire une ambiguïté sur le mécanisme de la résistance à l'épreuve virulente, laissant cours au développement d'une réponse secondaire protectrice. Tous les facteurs individuels affectant l'amplitude de la réponse secondaire viennent donc se surimposer aux variations de la réponse primaire, reflet du pouvoir immunogène des préparations injectées, émoissant d'autant le pouvoir séparateur de l'expérience.

Néanmoins, sous cette double réserve, on peut, des résultats observés, tirer l'indication que l'antigène tardif se différencie de l'antigène précoce et de l'antigène produit sous Trasylol dans le sens d'une dose protectrice plus élevée ; des quantités identiques de particules physiques 140 S inactivées de différentes préparations contiendraient donc des nombres de doses protectrices différentes, ce nombre variant dans le même sens que la teneur en VP1.

3. — Analyse sérologique

Les prélèvements de sérum ont été effectués pour chaque type d'antigène purifié dans les deux lots correspondant aux doses de 0,1 µg et de 1,6 µg de virus, supposées, d'après l'expérience préliminaire, encadrer la DP50 ; deux animaux par lot ont été étudiés ; les seize sérums ont été analysés individuellement ; l'activité, exprimée en pourcentage d'inhibition des plages, a été analysée en fonction de la dilution du sérum vis-à-vis d'une dose constante de 100 UFP de deux préparations brutes de virus, l'une de type tardif, l'autre de type précoce, celle-ci additionnée de Trasylol pour le contact à 37°.

Les résultats des séroneutralisations sont présentés sur la *figure 3*. Notre choix du virus trypsiné comme virus de référence est pleinement justifié, puisqu'aucune activité neutralisante n'est décelable dans les sérums des cobayes immunisés par ce type de virus, si ce n'est, faiblement, à la dose maximum d'immunisation et vis-à-vis du virus tardif. Les activités sont en général faibles, puisque même à la dilution de 1/20° nous observons souvent moins de 50 % d'inhibition des plages. Néanmoins, l'homogénéité de réponse entre deux animaux ayant reçu le même antigène inactivé à la même dose d'immunisation est bonne, ce qui permet de considérer comme significatives les différences entre lots, même aux faibles pourcentages d'inhibi-

tion. Pour les trois préparations dont la comparaison nous intéresse, trois observations peuvent être formulées : pour une même préparation l'effet de dose est bien répercuté sur le taux d'anticorps neutralisants décelables ; aux deux niveaux de dose étudiés, il semble que l'on puisse classer les trois préparations dans le même ordre sur la base de la quantité globale d'anticorps décelés au 21° jour : virus produit sous Trasylol \geq virus précoce $>$ virus tardif. Enfin, l'effet produit par l'injection de virus tardif se différencie très nettement au niveau sérologique de l'effet immunogène du virus précoce (ou produit sous Trasylol) si l'on compare les activités neutralisantes vis-à-vis de virus précoce ou de virus tardif. Alors que les anticorps induits par le virus précoce ou le virus produit sous Trasylol ne distinguent pas les deux types de virus, l'activité neutralisante induite par le virus tardif est sélective : le virus tardif est mieux reconnu dans la séroneutralisation que le virus précoce*. Or le virus précoce a un pouvoir infectieux spécifique dix fois plus élevé que le virus tardif, pour une teneur en VP1 double : 100 UFP de virus précoce, qui correspondent à dix fois moins de particules physiques que 100 UFP de virus tardif, contiennent cinq fois moins, globalement, de protéine VP1 que 100 UFP de virus tardif ; comme il semble bien établi que les anticorps neutralisant le pouvoir infectieux reconnaissent spécifiquement la protéine VP1, ce résultat est paradoxal d'un point de vue strictement quantitatif. Nous n'avons pas d'indices qualitatifs sur l'identité des molécules VP1 des particules de virus précoce et de virus tardif puisque nous ne repérons que la quantité globale de la classe de protéine de masse moléculaire 34 000. Cependant, les résultats des séroneutralisations conduisent à la conclusion que le virus précoce et le virus tardif sont différents antigéniquement au niveau de la configuration des sites impliqués dans l'infectiosité, proposition que l'on pouvait déjà émettre pour expliquer leur différence de pouvoir infectieux spécifique. De plus

* La reproductibilité de ce résultat a été contrôlée par une répétition partielle du plan expérimental, avec des lots d'antigènes inactivés issus de préparations virales indépendantes, sur une population de cobayes différente : les sérums des animaux immunisés par l'antigène tardif se différenciaient de la même manière des sérums des animaux immunisés par l'antigène précoce ou produit sous Trasylol.

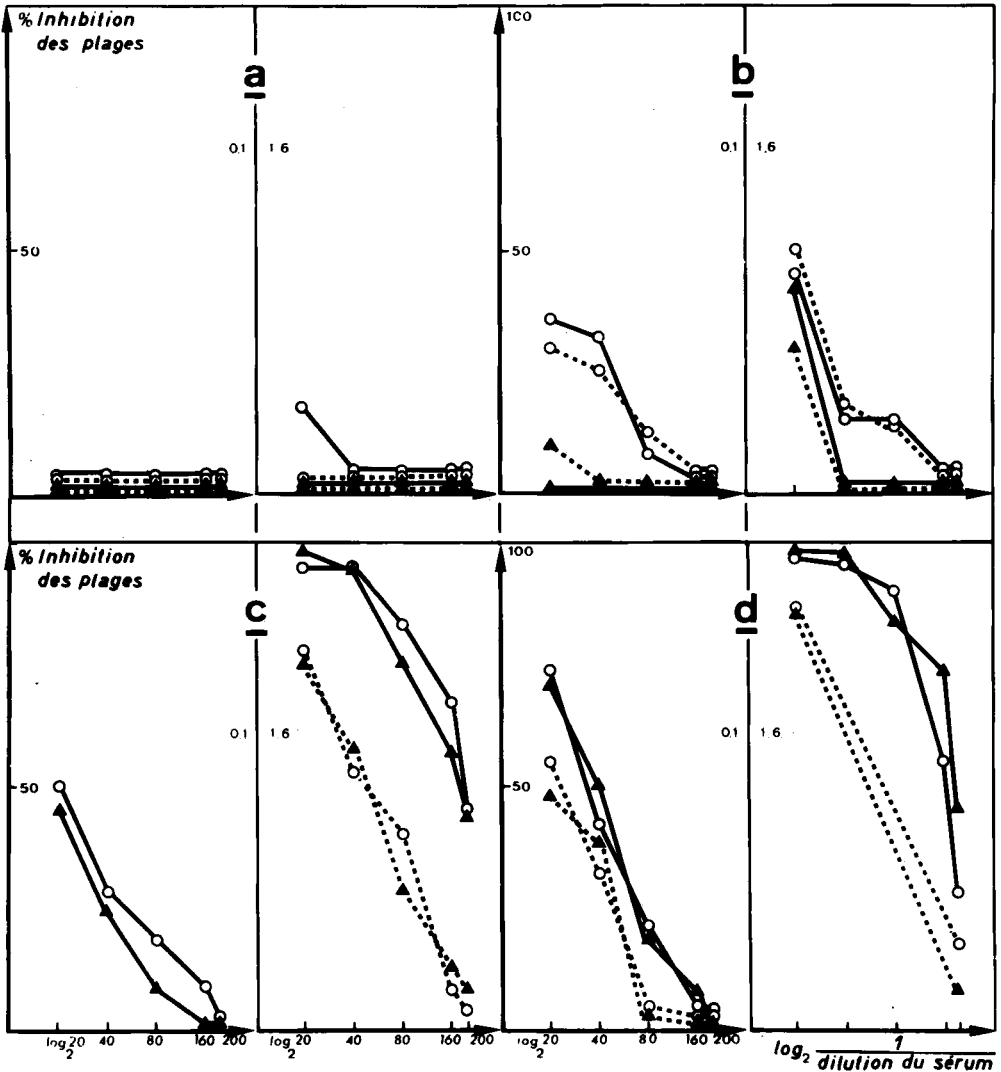


Fig. 3. Activité neutralisante des sérums de cobayes vis-à-vis de virus précoce (▲) et de virus tardif (○). a : sérums des animaux immunisés par l'antigène trypsiné; b : sérums des animaux immunisés par l'antigène tardif; c : sérums des animaux immunisés par l'antigène précoce; d : sérums des animaux immunisés par l'antigène produit sous Trasylol. La dose d'immunisation est indiquée « 0,1 » ou « 1,6 » microgramme d'antigène inactivé purifié. Les sérums des deux animaux étudiés dans chaque lot sont analysés séparément (— : premier cobaye; ---- : deuxième cobaye).

les résultats de l'immunisation indiquent une différence qualitative d'immunogénicité entre les deux types de particules inactivées : les anticorps neutralisants suscités par l'antigène précoce ou produit sous Trasylol reconnaissent aussi bien les sites infectieux de type tardif que de type précoce alors qu'inversement les anticorps neutralisants

induits par l'antigène tardif ne reconnaissent que le site de type tardif.

En conclusion, l'analyse sérologique révèle une différence conformationnelle au niveau des sites impliqués dans l'infectiosité entre les particules de type précoce ou produites sous Trasylol et les particules de type tardif. Que cette différence soit due à une variation

quantitative de la teneur en VP1 ou à une modification qualitative de la classe de molécules identifiées comme VP1, elle est d'importance majeure pour la spécificité des anticorps neutralisants induits par les deux types de particules inactivées.

Discussion

Notre propos était d'examiner la corrélation entre la teneur en protéine externe du virus de type O et son immunogénicité, et de répondre à la question : peut-on expliquer par ce critère biochimique la part de variabilité du pouvoir immunogène que les critères basés sur le nombre de particules infectieuses, ou le nombre de particules 140 S, ne permettent pas de prévoir ? Disposant de protocoles nous permettant d'obtenir des préparations de virus purifié à teneurs variables en protéine VP1, nous avons choisi de comparer leurs pouvoirs immunogènes dans les conditions mêmes où sont habituellement comparés des lots de vaccins.

1. — La comparaison des pouvoirs protecteurs

Les déterminations de DP50 sur cobaye pour chaque type de virus se révèlent à la limite du pouvoir séparateur du plan expérimental. Nous avons souligné la lenteur de la généralisation lors de l'épreuve par la souche O de Thiverval. Eût-il été préférable de choisir une autre souche d'épreuve ? Une expérience préliminaire avait montré que l'immunisation par la souche O de Thiverval vaccine contre le virus O Lausanne (souche adaptée au cobaye par six passages). Néanmoins, en l'absence de comparaisons antigéniques plus précises entre les deux souches, nous n'avons pas voulu prendre le risque d'utiliser à l'épreuve un virus différent du virus d'immunisation, craignant que la distance immunologique entre les deux souches ne diminue la sensibilité de la comparaison.

Quoi qu'il en soit, malgré la signification limitée des valeurs calculées, il apparaît qu'à doses égales de particules physiques 140 S on peut mettre en évidence une variation du nombre de DP50 parallèle à la variation de la teneur en protéine VP1.

L'absence de corrélation stricte entre le pouvoir immunogène et le nombre de particules virales a déjà été signalée, en particulier par Mackowiak *et al.* (1969) qui, dans la mise au point de la technique de multiculture sur épithélium lingual de bovin, ont

noté, sans l'expliquer, qu'à titre égal en particules 140 S fixant le complément, le virus récolté dans le premier temps a un meilleur pouvoir immunogène que le virus récolté dans le deuxième temps. Ces auteurs ont également noté que le virus extrait par broyage de l'épithélium, à pouvoir immunogène égal, correspond à des titres fixant le complément après traitement au fluorocarbure beaucoup plus élevés que pour le virus récolté dans le surnageant. On peut remarquer que, dans les deux cas, la préparation de pouvoir immunogène spécifique le plus faible a vraisemblablement subi un contact plus sévère avec les protéases cellulaires que l'autre. Il est tentant d'en conclure que, comme dans notre expérimentation, ce sont en fait des particules virales à structures protéiques différentes qui sont comparées.

La convergence de ces observations nous autorise à conclure qu'une variation de teneur en protéine externe a une répercussion directe sur le pouvoir immunogène, effet que les critères basés sur le nombre de particules physiques 140 S ne permettent pas de déceler.

2. — Les implications de l'analyse sérologique

2.1. — Relation entre la teneur en protéine immunogène des particules virales inactivées et la spécificité des anticorps neutralisants induits.

Nos observations démontrent qu'une variation de la teneur des particules virales en protéine VP1, définie par le seul critère de sa masse moléculaire, a une répercussion non seulement sur la quantité d'anticorps neutralisants induits lors d'une immunisation par ces particules inactivées, mais aussi sur leur spécificité. Les anticorps neutralisants induits ne titrent pas la quantité absolue de VP1 dans une population de particules virulentes, mais reconnaissent une certaine configuration des sites infectieux, caractéristique du type précoce ou du type tardif. Nous ne pouvons exclure, parmi les éléments contribuant à modifier la conformation des sites infectieux, une hétérogénéité moléculaire à l'intérieur de la classe de protéine VP1 qui se traduirait par une sensibilité différente aux protéases. Quoi qu'il en soit, le pouvoir immunogène que l'on mesure par son effet protecteur sur l'animal est la résultante de la quantité d'anticorps neutralisants induits mais aussi de leur spécificité.

L'absence de corrélation rapportée parfois

entre le taux d'anticorps neutralisants sérique et le comportement de l'animal à l'épreuve pourrait ici trouver un élément d'explication. Bien que nous ignorions quels sont les rôles respectifs, dans la stratégie de l'infection et de la généralisation, des particules de type tardif et de type précoce, l'acquisition d'une défense immunitaire préférentielle contre l'un ou l'autre type peut déterminer la résistance à l'épreuve. Par ailleurs la longévité de l'activité neutralisante décelable dans le sérum d'un animal vacciné peut ne pas être homogène pour les anticorps de spécificités différentes ; cela expliquerait qu'une même dose apparente d'anticorps, sans distinction de la spécificité, soit protectrice lors d'une épreuve proche de la vaccination et se révèle inefficace lors d'une épreuve plus tardive.

2.2. — Relation entre le pouvoir infectieux et le pouvoir immunogène.

Nos observations font apparaître comme indissociables les supports moléculaires du pouvoir infectieux et du pouvoir immunogène : la configuration des sites infectieux importe autant pour l'efficacité des mécanismes liés à l'infection que pour la spécificité des anticorps neutralisants induits. Nos résultats expliquent la confiance longtemps accordée à une corrélation entre la dose de particules infectieuses incorporées dans la dose vaccinante et le pouvoir immunogène. Ils expliquent aussi en quoi le pouvoir infectieux est une mesure fallacieuse de l'immunogénicité : de par la sensibilité différente des systèmes biologiques qui servent à les mesurer, le pouvoir infectieux répond de manière beaucoup plus élastique que le pouvoir immunogène à une altération de l'intégrité de la protéine externe. Tel qui croit manipuler des doses vaccinales variant de 1 à 10, sur la base des doses infectieuses absolues incorporées, compare en fait des préparations dont la teneur en protéine externe peut ne varier que de 1 à 2, c'est-à-dire, ainsi que nous le montrons, à peine différenciables par une comparaison de pouvoir protecteur.

2.3. — Comparaison des propriétés immunologiques des particules précoces et tardives avec celles du virus trypsiné.

Dans notre expérimentation le virus trypsiné se révèle peu immunogène ; néanmoins vingt sur trente seulement des cobayes immunisés par les particules trypsinées traitées au GDA ont manifesté une généralisation,

alors que cinq sur cinq des témoins non vaccinés présentaient une généralisation. De plus, une légère activité neutralisante est décelable dans le sérum d'un animal immunisé par la dose maximum d'antigène trypsiné. Cette activité est dirigée contre le pouvoir infectieux du virus de type tardif, indice qu'une partie de la population des particules tardives partage certains caractères avec le virus trypsiné.

Or précisément, la distinction révélée dans notre expérience entre le virus tardif et le virus précoce n'est pas sans rappeler la comparaison par Rowlands *et al.* (1971) des propriétés infectieuses et immunogènes du virus trypsiné et du virus intact : après avoir estimé à 1 000 : 1 le rapport entre les pouvoirs infectieux spécifiques du virus intact et du virus trypsiné, et comparé les anticorps neutralisants induits par les deux types de particules, ces auteurs concluent à l'existence de deux types d'anticorps neutralisants, les uns actifs sur les sites infectieux « intacts », les autres sur les mécanismes infectieux propres au virus trypsiné. Le virus intact induit les deux types d'anticorps, le virus trypsiné n'induit que des anticorps spécifiques du virus trypsiné. Il y a donc un parallélisme étroit avec les propriétés du virus précoce (ou produit sous Trasylol) et du virus tardif. Une action protéolytique est dans les deux cas à l'origine de l'altération ; la modification est plus sélective dans les liaisons peptidiques clivées, et d'effet probablement plus uniformes sur toutes les particules, dans le cas de la trypsination, qui laisse persister des fragments de la protéine VP1 liés à la particule virale. Les protéases cellulaires ne laissent pas subsister de peptides de la protéine VP1 décelables dans nos conditions d'électrophorèse, de telle sorte que la stœchiométrie du virus tardif ne le distingue pas du virus intact de Rowlands *et al.*

Dans les deux cas nous pouvons résumer les relations sérologiques entre les différents types de virus par la proposition suivante : la dégradation protéolytique de l'antigène contribue à rétrécir le spectre d'activité neutralisante des anticorps induits. Il est tentant de formuler ce résultat en termes de relations de dominance, telles qu'on les déduit d'épreuves de protection croisée entre deux souches virales A et B où A domine B (figure 4).

3. — *Le rôle des protéases*

dans la modulation de l'immunogénicité.

Hypothèse sur les fondements moléculaires

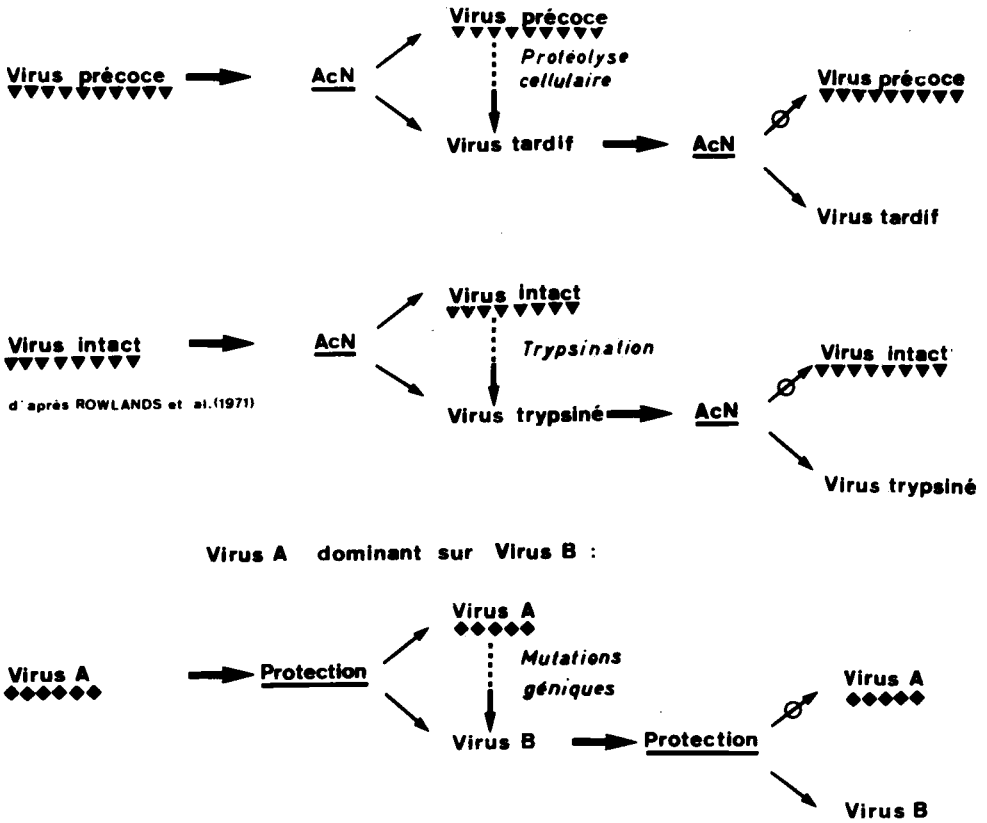


Fig. 4. Relations immunologiques entre le virus précoce et le virus tardif. Comparaison avec la relation de dominance.

AcN : anticorps neutralisant le pouvoir infectieux du virus.
 ————— : induit ;
 ————— : actif ;
 ○———— : inactif.

de la dominance

3.1. — Les effets du contrôle de l'activité protéolytique.

L'efficacité d'un inhibiteur des protéases à maintenir les propriétés de l'antigène précoce confirme l'influence du milieu cellulaire de production sur les caractéristiques du produit viral. Ainsi que nous l'avons discuté précédemment (Bernard et Grosclaude, 1975), le passage du virus précoce au virus tardif correspond bien à une altération phénotypique, contrôlable par le Trasylol, et non à une dérive génétique de la population virale.

Nous n'avons analysé que l'effet du Trasylol sur les particules virales 140 S et n'avons pas d'informations sur son action possible au niveau des autres composants du lysat cellulaire ; la contribution immuno-

génique d'éléments libres non incorporés dans des structures capsidaires reste problématique. Toutefois, nous avons pu constater, lors d'essais préliminaires comparatifs avec des doses de virus purifié ou de lysat concentré, que l'effet des composants non encapsidés ne devait pas être majeur.

Le blocage par le Trasylol de certains clivages *in situ* opérés par les protéases cellulaires nous a permis d'obtenir un antigène aux propriétés immunogéniques élargies par rapport au virus tardif, mimant une relation de dominance entre l'antigène précoce et l'antigène tardif. La dominance est ici phénotypique et conditionnelle : elle peut être préservée chez le virus tardif par l'addition d'antiprotéases. La relation de dominance entre deux souches virales est le résultat de

l'accumulation de différences au niveau génétique ; pouvons-nous faire l'hypothèse que les gènes déterminant le caractère dominant ont un effet au niveau de la sensibilité aux protéases ?

3.2. — Hypothèse sur les fondements moléculaires du caractère de dominance.

D'après nos résultats, les virions porteurs des protéines les moins clivées induisent les anticorps neutralisants à spectre d'activité le plus large : une plus grande résistance aux protéases des sites jouant un rôle dans l'immunogénicité de la particule virale serait alors le fondement physicochimique de la dominance.

Tout clivage peptidique des protéines capsidaires n'affecte pas l'immunogénicité de la particule. Rowlands *et al.* (1971) sur une souche de type C, Bachrach *et al.* (1975) sur une souche de type A, ont signalé que l'immunogénicité des particules 140 S n'était guère affectée par la trypsination, à la différence des souches de type O étudiées par Wild et Brown (1967) et de la souche O que nous utilisons dans cette expérience. Une certaine variabilité dans la sensibilité des sites immunogènes aux protéases se manifeste donc dans le groupe du virus de la fièvre aphteuse.

La recherche de l'existence de formes précoces enrichies en protéine externe dans différentes souches d'un même type donnerait des indications sur les différences de sensibilité aux protéases cellulaires. Un élément de vérification de notre hypothèse serait la comparaison, sur deux souches en relation de dominance, des relations immunologiques établies entre particules de type précoce (ou produites en présence d'un inhibiteur des protéases) aux relations établies entre particules à stœchiométrie classique ou de type tardif. Enfin la recherche systématique d'une liaison entre la dominance et la résistance aux protéases cellulaires, permettrait de décider si ces deux caractères sont bien, ainsi que nous le proposons, l'expression des mêmes gènes.

3.3. — Les implications théoriques et pratiques de notre hypothèse.

L'hypothèse que nous formulons pose le problème de la stabilité du caractère de dominance : si l'environnement cellulaire de multiplication est modifié dans son équipement enzymatique, un virus dominant peut-il perdre son caractère ? En particulier, la relation établie dans une espèce animale

demeure-t-elle valable pour une autre espèce ? L'ubiquité de la relation de dominance exige que deux conditions soient remplies : d'une part, au niveau de l'antigène inactivé d'immunisation — les systèmes immunitaires des deux espèces animales doivent être sensibilisés aux mêmes déterminants — d'autre part, au niveau de l'antigène virulent d'épreuve — les systèmes cellulaires de multiplication virale doivent produire des particules porteuses des mêmes déterminants antigéniques que l'antigène d'immunisation. Or des spécificités différentes des protéases d'une espèce à l'autre peuvent conduire à des antigènes distincts : Korant (1972), analysant le clivage des précurseurs polypeptidiques des protéines du poliovirus dans différentes lignées cellulaires, signale une différence entre les lignées HeLa humaine et LLCMK2 de rein de singe au niveau de la spécificité des sites de clivage. La règle empirique que l'antigène d'immunisation doit être « adapté », c'est-à-dire produit dans l'espèce même que l'on veut vacciner, trouve ici son fondement.

On peut poser dans les mêmes termes la question de la stabilité des propriétés antigéniques d'une souche virale utilisée à des fins de vaccination lors d'un changement du système cellulaire de production du vaccin. La malléabilité de la structure capsidaire du virus de la fièvre aphteuse, tributaire des protéases cellulaires, peut se manifester au hasard d'un changement de lignée de production ou même lors d'une dérive génétique non contrôlée de la lignée de production.

4. — La malléabilité de la structure capsidaire du virus de la fièvre aphteuse

4.1. — Les particules enrichies en protéine immunogène.

Les résultats présentés ici confirment que la structure de la capsidite du virus de la fièvre aphteuse est malléable. Les informations tirées de l'analyse sérologique renforcent l'assertion que la mise en évidence de particules virales à teneur moyenne en protéine VP1 deux fois plus élevée que celle du modèle proposé par Talbot et Brown (1972) n'est pas un artefact ; ces particules sont stables en absence de protéases.

Ainsi que l'ont discuté Bachrach *et al.* (1975), le succès de l'obtention d'un effet immunogène induisant la synthèse d'anticorps neutralisant le virus avec des préparations de protéine externe purifiée et isolée (Laporte *et al.*, 1973 ; Bachrach *et al.*, 1975), prouve que les contraintes exercées sur la protéine

VP1 ne doivent pas être beaucoup plus strictes sur la capsidie qu'en phase liquide. Un lien aussi lâche entre la protéine externe et le reste de la capsidie peut très bien favoriser l'agrégation de molécules identiques en surnombre, en une structure micellaire captée ici par la capsidie et qui, dans les solutions de protéine isolée, se reconstitue aisément. Dans cette hypothèse, il n'est pas surprenant non plus que les protéases ne laissent subsister au stade tardif aucun peptide de taille décelable ancré dans la capsidie. Un examen en microscopie électronique par coloration négative n'a fait apparaître aucune différence entre les différents types de particules.

4.2. — Comparaison avec d'autres picornavirus.

A notre connaissance, seul le Rhinovirus humain de type 1A a donné lieu, chez les Picornavirus, à des estimations fluctuantes des rapports stœchiométriques entre les différentes protéines capsidières (Medappa *et al.*, 1971 et Stott et Killington, communication rapportée par Talbot et Brown, 1972); la variation portait sur les produits du dernier clivage de maturation de la particule.

Rhinovirus et virus de la fièvre aphteuse ont été classés, au sein des Picornaviridae, en un groupe distinct des Enterovirus dont ils se différencient par leur acidolabilité; (Melnick *et al.*, 1974). Korant *et al.* (1975) ont lié l'inactivation du Rhinovirus (type 2) par les acides à des remaniements conformationnels décelables par les antisérums spécifiques des virions natifs. Ce virus témoigne donc d'une certaine malléabilité structurale affectant le pouvoir infectieux spécifique des particules et dont l'effecteur est le pH du milieu. Nous avons montré que le virus de la fièvre aphteuse manifeste une malléabilité analogue, dont l'effecteur est la protéolyse cellulaire. Ces fluctuations possibles de structure seraient donc une propriété commune des virus de ce groupe. La constance des observations rapportées pour les autres Picornaviridae peut être due à la configuration plus stable du « noyau » viral étudié, résistant aux protéases et aux protocoles de purification employés. Dans le cas des virus à structure malléable, les résultats contradictoires entre divers auteurs peuvent s'expliquer par des sensibilités différentes des souches virales étudiées, et par des protocoles de purification respectant diversement la structure native des virions. Bernard *et al.* (1974) ont montré

que des centrifugations répétées en chlorure de césium « décapaient » en quelque sorte la protéine externe du virus de la fièvre aphteuse de la surface capsidière. Le virus O de Thiverval, qui a permis les observations rapportées ici, avait lui-même été sélectionné à partir d'un clone du laboratoire sur une modification de sa charge externe (Stœssel, 1974). La configuration sélectionnée par cette voie correspond peut-être à une moindre exposition de liaisons sensibles aux protéases, ce qui a favorisé la mise en évidence de l'antigène de type précoce.

4.3. — Malléabilité de la structure capsidière et sélection virale en cours d'épizootie.

Nous avons souligné que toute modification par protéolyse de la configuration des virions avait un retentissement sur l'efficacité de leurs mécanismes d'infection. La protéolyse cellulaire qui s'exerce sur les virions constitués apparaît donc comme une sorte de mécanisme élémentaire de défense contre la propagation de l'infection dans la population cellulaire; Fiszman (1972) avait interprété de la même manière les effets des nucléases cellulaires lysosomiques sur l'acide nucléique viral non encapsidé. Sous cet angle, la résistance à la protéolyse peut apparaître comme un facteur positif de sélection en cours d'épizootie.

Simultanément, la protéolyse a pour effet de dégrader la structure immunogène, de telle sorte que la sensibilisation du système immunitaire de l'animal qui développe l'infection n'est pas dirigée contre l'agent le plus infectieux. Par une sorte d'éclipse immunologique, le virus peut alors se maintenir dans un milieu propre à assurer sa multiplication sans alerter les défenses immunitaires d'une population animale sensible. La « clivabilité » peut être ainsi, entre deux périodes de développement d'une épizootie, un facteur positif de sélection.

Deux pressions contraires de sélection peuvent donc s'exercer par le biais de la malléabilité structurale du virus de la fièvre aphteuse, ce qui contribue à maintenir le polymorphisme de ce virus. Le rôle important des protéases dans le façonnage de la particule virale et dans l'orientation de la sélection, est à rapprocher du fait que les Picornavirus dépendent, pour l'utilisation de leur information génétique, des protéases cellulaires qui assurent les clivages primordiaux des précurseurs polypeptidiques (Korant, 1972). Aussi n'est-il pas surprenant

que, dans les cellules sensibles, ait été simultanément sélectionnée une activité protéolytique qui se prolonge au niveau du virion. Le produit viral terminal est dans ces conditions difficile à définir, et les modèles stœchiométriques proposés par les structuralistes (Rueckert *et al.*, 1969 ; Talbot et Brown, 1972 ; Laporte, 1973) ne peuvent être considérés comme absolus.

5. — *Les implications pratiques au niveau de la fabrication des vaccins*

Le contrôle de la protéolyse peut constituer un élément important de la maîtrise du « rendement immunogénique » des fermenteurs. On peut dire que, dans les techniques de production du virus de type Frenkel sur épithélium lingual de bovin, la technique de multiculture de Mackowiack *et al.* (1969) avait déjà empiriquement mis en œuvre le principe de la récolte précoce.

Dans les productions en lignée cellulaire qui tendent à prévaloir actuellement, où il est malaisé matériellement de jouer sur la précocité de la récolte, l'instrument privilégié de contrôle de l'activité protéolytique serait l'utilisation d'inhibiteurs de protéases.

L'inhibiteur approprié ne devrait pas avoir d'effet cytotoxique, ni enrayer la morphogénèse virale intracellulaire. De plus il ne devrait pas altérer les propriétés biologiques du vaccin en introduisant un effet allergène, immunodépresseur, ou toxique. Enfin il devrait répondre à des critères économiques.

A défaut de l'inhibiteur idéal, le choix de la souche cellulaire de production peut être orienté par l'activité protéolytique développée en fin de cycle viral. Ghendon *et al.* (1972) ont rapporté que, dans une lignée de cellules

dérivée d'amygdales de *Macacus Rhesus*, la morphogénèse du poliovirus est différente de celle décrite en système de cellules HeLa, à un stade où les structures membranaires intracellulaires semblent impliquées. On peut concevoir qu'il existe des souches cellulaires à membranes lysosomiques plus résistantes, où l'effet cytopathogène responsable de l'ouverture des lysosomes serait minimisé, et le produit viral préservé d'autant.

La protéolyse doit également être contrôlée au niveau des lysats cellulaires bruts à tous les stades de l'inactivation et du stockage. Il est à noter que les agents inactivants réputés agir au niveau de l'acide nucléique viral doivent vraisemblablement préserver, autant que la structure des protéines virales, l'intégrité des protéases et leur activité.

Enfin, des effets protéolytiques imprévus peuvent se manifester lors de la constitution d'un vaccin mixte : des activités enzymatiques peu gênantes pour l'efficacité d'un des composants peuvent se révéler néfastes pour le virus exogène qu'on leur associe.

Au stade actuel de nos expériences, nous ne saurions proposer de solutions techniques concrètes ; nos résultats, néanmoins, en démontrant l'importance de la protéolyse cellulaire, viennent éclairer des observations de la pratique qui n'avaient jusqu'alors pu être interprétées.

(Accepté pour publication en novembre 1976.)

Remerciements

Nous exprimons notre gratitude au Docteur P. Prunet pour l'intérêt qu'il a témoigné à ce travail et les moyens qu'il a mis à notre disposition pour sa réalisation.

Résumé

La teneur en protéine externe VP1 des particules complètes (140 S) du virus de la fièvre aphteuse (type O) est affectée par l'activité des protéases cellulaires libérées sous l'effet cytopathogène du virus. Cette activité peut être contrôlée par une récolte précoce (avant cytolyse) ou par l'usage d'inhibiteurs des protéases tels que le Trasylol[®], ce qui permet d'obtenir des particules virales enrichies en protéine VP1, dont le rôle majeur dans l'induction des anticorps neutralisant le pouvoir infectieux du virus est bien démontré. Le pouvoir infectieux spécifique des particules obtenues dans ces conditions est près de dix fois supérieur à celui des particules altérées par la protéolyse cellulaire. La comparaison sur cobaye des pouvoirs immunogènes de doses identiques de particules 140 S purifiées, inactivées au glycidaldéhyde et à teneur en VP1 variant du simple au double, démontre : d'une part, le pouvoir protecteur (exprimé en nombre de doses protégeant 50 % des animaux lors de l'épreuve virulente) varie dans le même sens que la teneur en VP1 ; d'autre part, la spécificité des anticorps neutralisants induits est influencée par la teneur des particules en protéine

VP1. Le virus altéré par la protéolyse induit des anticorps neutralisant le virus de même composition, mais non le virus riche en protéine externe, alors que celui-ci induit des anticorps neutralisant les deux types de particules virulentes. Une discussion des implications théoriques et pratiques de ces résultats est présentée pour la compréhension de la notion de dominance et l'amélioration de la qualité immunogénique des vaccins inactivés.

Références

- BACHRACH H.L., MOORE D.M., McKERCHER P.D., POLATNICK J., 1975. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of Foot-and-mouth disease virus. — *J. Immunol.*, **115**, 1636-1641.
- BERNARD S., WANTYGHEM J., GROSCLAUDE J., LAPORTE J., 1974. Chromatographic preparation of purified structural proteins from Foot-and-mouth disease virus. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **58**, 624-632.
- BERNARD S., GROSCLAUDE J., 1975. Influence des conditions de production du virus de la fièvre aphteuse sur sa composition en protéines. — *Ann. Rech. Vétér.*, **6**, 83-91.
- BURROUGHS J.N., ROWLANDS D.J., SANGAR D.V., TALBOT P., BROWN F., 1971. Further evidence for multiple proteins in the Foot-and-mouth disease virus particle. — *J. gen. Virol.*, **13**, 73-84.
- FISZMAN M., 1972. Mode d'action de quelques effecteurs du développement du Poliovirus : les températures supraoptimales et l'état physiologique de la cellule hôte. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles, Université Paris VII.
- GHENDON Y., YAKOBSON E., MIKHEJEVA A., 1972. Study of some stages of Poliovirus morphogenesis in MiO cells. — *J. Virol.*, **10**, 261-266.
- KORANT B.D., 1972. Cleavage of viral precursor proteins in vivo and in vitro. — *J. Virol.*, **10**, 751-759.
- KORANT B.D., LONBERG-HOLM K., YIN F.H., NOBLE-HARVEY J., 1975. Fractionation of biologically active and inactive populations of Human Rhinovirus Type 2. — *Virology*, **63**, 384-394.
- LA BONNARDIERE C., 1971. Application de la technique de Cooper à l'isolement de mutants thermosensibles du virus de la fièvre aphteuse. — *Ann. Rech. Vétér.*, **3**, 231-237.
- LAPORTE J., 1973. Etude biochimique de la capsid d'un virus du groupe des Picorna : le virus de la fièvre aphteuse. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles, Université Paris VII.
- LAPORTE J., GROSCLAUDE J., WANTYGHEM J., BERNARD S., ROUZE P., 1973. Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés à l'aide d'une protéine virale purifiée. — *C.R. Acad. Sci. Paris*, **276**, 3399-3401.
- LIETCHFIELD J.T., WILCOXON F., 1949. — *J. Pharmacol.*, **96**, 99-113.
- MACKOWIAK C., DUBOUCLARD C., FAVRE H., ROUMIANTZEFF M., FONTAINE J., TERRE J., BORNAREL P., 1969. Etude de la culture du virus de la fièvre aphteuse sur épithélium lingual bovin en survie. Perspectives actuelles. — *Bull. Off. int. Epiz.*, **71**, 3-45.
- MARTINSEN J.S., 1964. Inactivation of Foot-and-mouth disease virus by glycidaldehyde. — *Am. J. vet. Res.*, **25**, 1417-1423.
- MEDAPPA K.C., McLEAN C., RUECKERT R.R., 1971. On the structure of Rhinovirus 1A. — *Virology*, **44**, 259-270.
- MELNICK J.L., AGOL V.I., BACHRACH H.L., BROWN F., COOPER P.D., FIERS W., GARD S., GEAR J.H.S., GHENDON Y., KASZA L., LA PLACA M., MANDEL B., MCGREGOR S., MOHANTY S.B., PLUMMER G., RUECKERT R.R., SCHAFFER F.L., TAGAYA I., TYRRELL D.A.J., VOROSHILOVA M. and WENNER H.A., 1974. — *Picornaviridae*. — *Intervirology*, **4**, 303-316.
- ROWLANDS D.J., SANGAR D.V., BROWN F., 1971. Relationship of the antigenic structure of Foot-and-mouth disease virus to the process of infection. — *J. gen. Virol.*, **13**, 85-93.
- RUECKERT R.R., DUNKER A.K., STOLTZFUS C.M., 1969. The structure of Mouse-Elberfeld virus : a model. — *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 912-919.
- STOESSEL F., 1974. Etude d'un variant résistant au sulfate de dextrane du virus de la fièvre aphteuse (type O). Thèse de Doctorat d'Université, Paris-Sud.
- TALBOT P., BROWN F., 1972. A model for Foot-and-mouth disease virus. — *J. gen. Virol.*, **15**, 163-170.
- WILD T.F., BROWN F., 1967. Nature of the inactivating action of trypsin on Foot-and-mouth disease virus. — *J. gen. Virol.*, **1**, 247-250.