

Caractérisation des anticorps inhibant la Fixation du Complément dans les sérums de bovins immunisés à l'aide d'un vaccin antiaphteux (*)

par

M. HESSAMI, M. ROUMIANTZEFF, J. SALVATORI
et F. CAILLÈRE

I. — INTRODUCTION

Deux classes principales d'immunoglobulines sont connues pour leur activité anticorps :

— Les immunoglobulines 7 S (IgG), habituellement résistantes au mercaptoéthanol ;

— Les immunoglobulines 19 S (IgM).

Les réponses primaires et secondaires en anticorps au virus de la Fièvre aphteuse (VFA), après infection ou après vaccination, ont été nettement démontrées (1, 2, 3, 5, 7).

De plus, au cours de la dernière décennie, de nombreuses recherches ont montré la valeur du test de l'inhibition de la fixation du complément (IFC) pour détecter les anticorps anti-virus aphteux (8, 10, 11, 13).

Les qualités de cette technique : détection rapide, valeur épidémiologique et avantage économique ont été confirmées.

Le but que nous nous proposons est d'obtenir davantage d'informations concernant la nature et l'évolution des anticorps IFC chez des bovins vaccinés.

II. — MATERIEL ET METHODES

A. Vaccination et programme de saignées.

Nous avons choisi 5 vaches de race normande, âgées de deux ans, très sensibles au virus aphteux et ne possédant aucun anticorps anti-aphteux après analyse des sérums par les méthodes de l'inhibition de la fixation du complément et de séro-neutralisation.

Ces animaux sélectionnés ont reçu 5 ml de vaccin inactivé monovalent A.

Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux sont maintenus loin de tout contact avec un virus aphteux.

(*) Bull. Off. int. Epiz., 1969, 71 (3-4), 443-462.

Les prises de sang sont effectuées aux jours : 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 20, 24, 28, 35, 42, 49, 56, 86, 116, après vaccination.

A chaque prise de sang, les sérums des 5 animaux sont stockés à -30°C , une partie individuellement, l'autre sous forme de mélange à volume égal.

B. — Traitement par le 2-mercaptoethanol.

La méthode classique d'analyse des anticorps par le traitement au 2-mercaptoéthanol (2 ME) est utilisée (1, 2, 7).

Un volume de sérum est traité au 2 ME utilisé à 1/40 de volume préparé en tampon phosphate 0,04 M (pH = 7,6).

La concentration finale du 2 ME est 0,05 M. Le mélange est mis en incubation 18 heures à la température du laboratoire, puis dialysé contre une solution saline de tampon phosphate.

Cette dialyse est nécessaire pour supprimer l'activité anti-complémentaire des sérums traités. Avec 0,1 M de 2 ME, la réduction est optimale, mais une gélification du mélange produit (2).

C. — Méthodes de fractionnement et de concentration.

1. Filtration sur Gel Séphadex G 200.

Les conditions utilisées sont celles décrites par Flodin et Killander (4). 3 ml de chaque pool des 5 sérums inactivés sont déposés sur la colonne de gel Séphadex G 200 ($2,5 \times 45$ cm) préalablement équilibrée à l'aide du tampon véronal (pH = 7,6), normalement utilisé dans le test IFC.

L'éluion est faite avec le même tampon, pour obtenir des fractions. L'absorption de chaque fraction est mesurée par spectro-photométrie à $278\text{ m}\mu$, puis titrée pour déceler les activités d'inhibition de fixation du complément et neutralisantes. Ces fractions de 3 ml peuvent être rassemblées en pools, correspondant aux différentes zones d'activités sérologiques. Chacun de ces pools est concentré par dialyse contre du polyéthylène glycol, de façon à obtenir le volume initial de sérum entier (3 ml) (7).

2. Centrifugation par gradient de densité en sucrose.

Le sérum des bovins est concentré deux fois par traitement au Carbowax (1) et dialysé contre du tampon véronal. 2 ml de sérum sont placés au-dessus du gradient de sucrose (20-35 p. 100 en tampon véronal), qui est centrifugé dans un rotor SN 25 à 24.000 tours par minute pendant 20 heures. 15 fractions de 2 ml sont récoltées à partir du fond jusqu'au sommet du tube.

D. — Titrage biologique.

1. Test de neutralisation.

Le test de neutralisation s'effectue sur des cultures cellulaires primaires de

(1) Carbowax 20.000.

reins de porcs; chaque tube (14 × 180 mm) renferme 150.000 cellules par millilitre. La méthode consiste à mettre en présence différentes dilutions d'un sérum inconnu et une quantité constante du virus, soit 10 DECP₅₀. La dilution des sérums est une progression géométrique avec intervalle de 0,6 log. Le mélange sérum-virus est conservé 2 heures 30 minutes à la température du laboratoire. Les titres neutralisants sont calculés 72 heures après inoculation des tubes de cultures, suivant la formule de Karber. Pour chaque épreuve de neutralisation on effectue les témoins suivants :

- Titrage du virus ayant servi dans la réaction de neutralisation pour confirmer l'apport de 10 DECP₅₀ ;
- Titrage d'un sérum référence positif;
- Titrage d'un sérum référence négatif;
- Témoins des cultures cellulaires.

2. Test d'inhibition de la fixation du complément (IFC).

Les détails du test d'inhibition de la fixation du complément (IFC) ont déjà été décrits (11, 13).

La réaction est divisée en trois temps :

a) L'inhibition des anticorps bovins est obtenue par mélange en quantités égales de sérum et de virus maintenu à 37° C pendant 1 heure. Le virus de type A est obtenu par inoculation de cellules BHK²¹.

b) La fixation du complément est réalisée à 37 ° C pendant 40 minutes, en ajoutant au mélange précédent du sérum hyperimmun homologue de cobaye et du complément.

c) Des globules rouges de mouton et du sérum hémolytique sont ajoutés et maintenus en présence à 37° C pendant 20 minutes.

Les mêmes lots d'antigènes, de sérum hyperimmun de cobaye et de complément convenablement titrés sont utilisés pendant toute la durée de l'expérience (11).

E. — Résultats.

1. Figure 1.

Elle montre la réaction de 5 sérums individuels au test d'inhibition de fixation du complément depuis le jour 0 jusqu'au jour 146 après vaccination.

Ces courbes retracent les variations individuelles des réponses en anticorps IFC après vaccination.

La valeur maximum de la réaction IFC se situe entre le seizième et le vingt-quatrième jour.

2. Figure 2.

Elle montre la réaction de ces mêmes sérums individuels au test de neutralisation du jour 0 au jour 56 après vaccination.

Ces courbes indiquent les variations individuelles de la réponse en anticorps neutralisants.

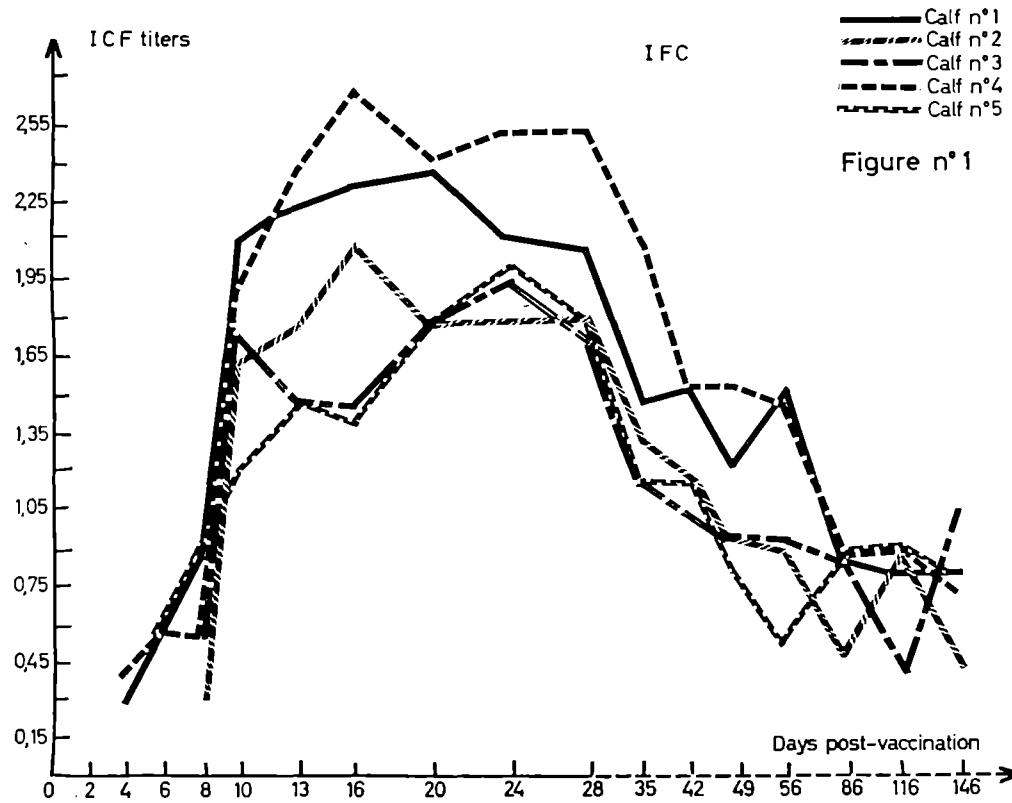


Fig. 1. - Anticorps IFC de 5 sérums individuels du jour 0 au jour 146 après vaccination. L'échelle des temps n'est pas régulière : la partie la plus intéressante du jour 0 au jour 28 est linéaire ; après cette période, l'échelle a été réduite afin de faire figurer sur le graphique toute la période étudiée.

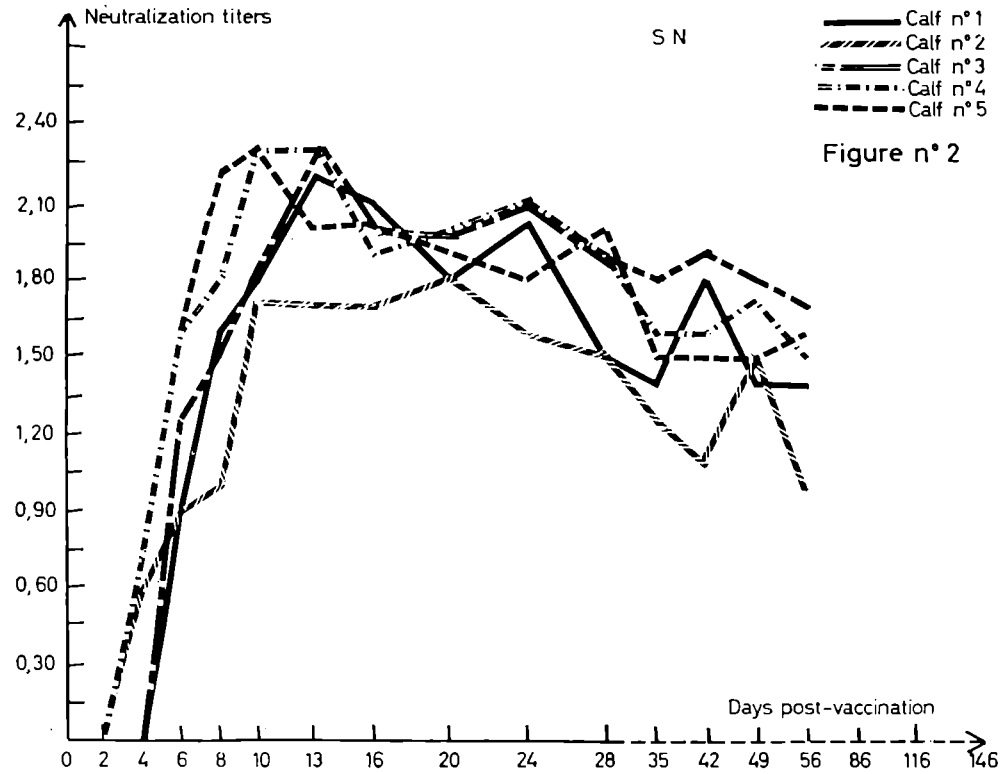


FIG. 2. --- Anticorps neutralisants de 5 sérums individuels du jour 0 au jour 56 après vaccination. L'échelle des temps est identique à celle de la Figure 1.

La valeur maximum en anticorps neutralisants est de 1,8 à 2,3 et se situe entre le dixième et le vingtième jour.

3. *Figure 3.*

Elle montre les moyennes de la réaction de neutralisation du jour 0 au jour 56 et celles du test IFC, du jour 0 au jour 146. La valeur maximum de la moyenne en anticorps IFC est de 2,0 et se situe au jour 20 ou 24 après vaccination.

4. *Figure 4.*

Elle montre la réaction de neutralisation effectuée sur le pool des 5 sérums du jour 0 au jour 56 après vaccination et celle d'IFC sur les mêmes pools du jour 0 au jour 146.

La valeur maximum du titre en anticorps neutralisants obtenue au jour 10 est de 2,3.

Pour le test IFC, elle est de 2,05 et se situe au jour 16 ou 20.

5. *Figure 5.*

Elle compare les résultats de fractionnement, par filtration sur gel, des pools de sérums précoces, moyens et tardifs, 6, 10 et 24 jours après vaccination.

Sur cette figure, la courbe de densité optique à 278 m μ révèle toujours 3 pics. Chaque fraction est titrée par la réaction d'IFC.

— Le pool des sérums précoces (6 jours après vaccination) montre une zone de réactions sérologiques correspondant au premier pic d'absorption. Ces anticorps sont appelés IgM.

— Le pool de sérums de 10 jours montre deux zones de réaction sérologique, l'une correspondant au premier pic représentant les mêmes anticorps IgM, l'autre correspondant approximativement au deuxième pic, anticorps dénommés IgG à ce stade de travail : ce problème sera discuté plus loin.

— Sur le pool des sérums tardifs (24 jours après vaccination), la première zone de réaction sérologique a presque disparu, alors que la seconde a augmenté.

6. *Figure 6.*

Le pool des sérums obtenu à chaque saignée, du jour 0 au jour 116, est filtré sur colonne Séphadex G 200. Les fractions qui présentent une réaction positive au test IFC (voir Figure 5) sont mélangées et réunies en 2 pools :

Le premier correspondant à la première zone de la réaction IFC (pool IgM) et le second à la seconde zone de la réaction IFC (pool IgG).

Les anticorps IgM apparaissent au quatrième jour, augmentent jusqu'à un titre maximum au dixième jour puis diminuent lentement jusqu'au vingt-huitième jour pour disparaître complètement.

Les anticorps IgG apparaissent au huitième jour, augmentent et persistent

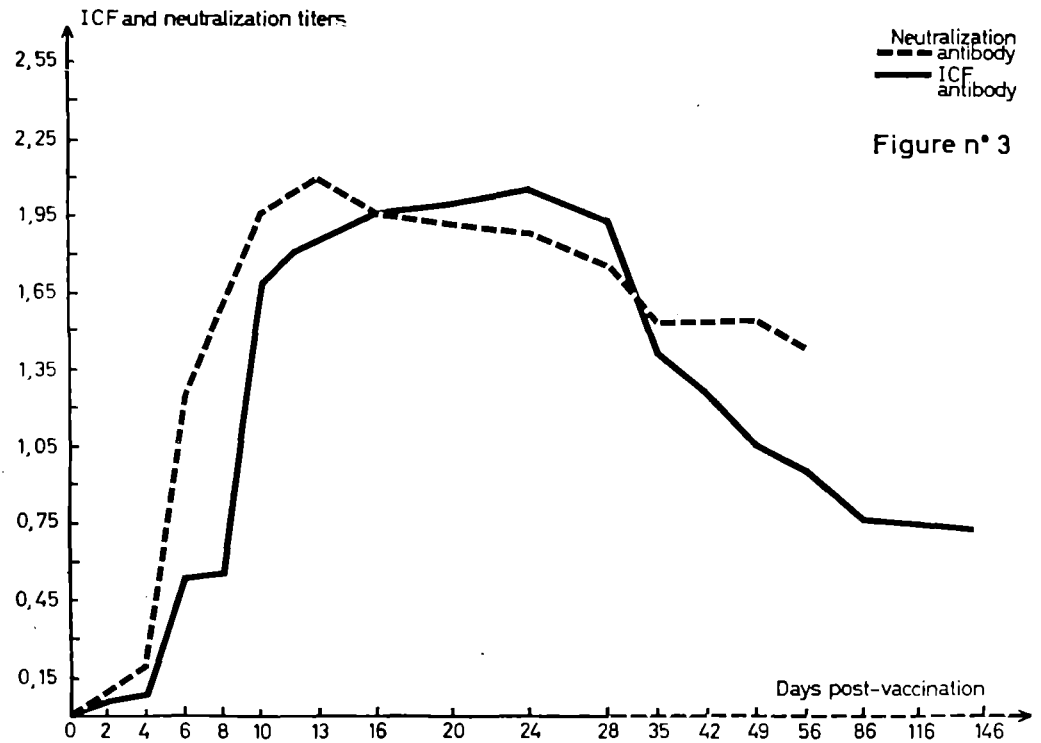


FIG. 3. — Courbe comparative des moyennes des anticorps ICF et neutralisants des 5 sérums
L'échelle des temps est identique à celle des Figures 1 et 2.

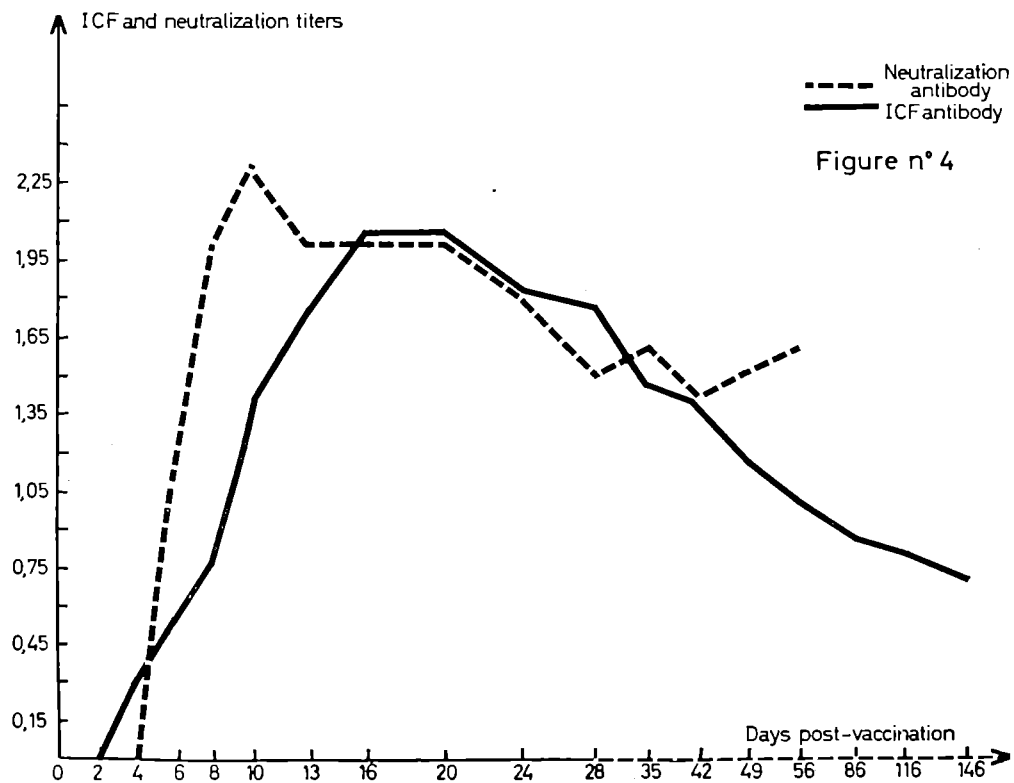


FIG. 4. — Courbe comparative des titrages des pools par les tests de neutralisation et IFC. L'échelle des temps est identique à celle des Figures 1, 2, 3.

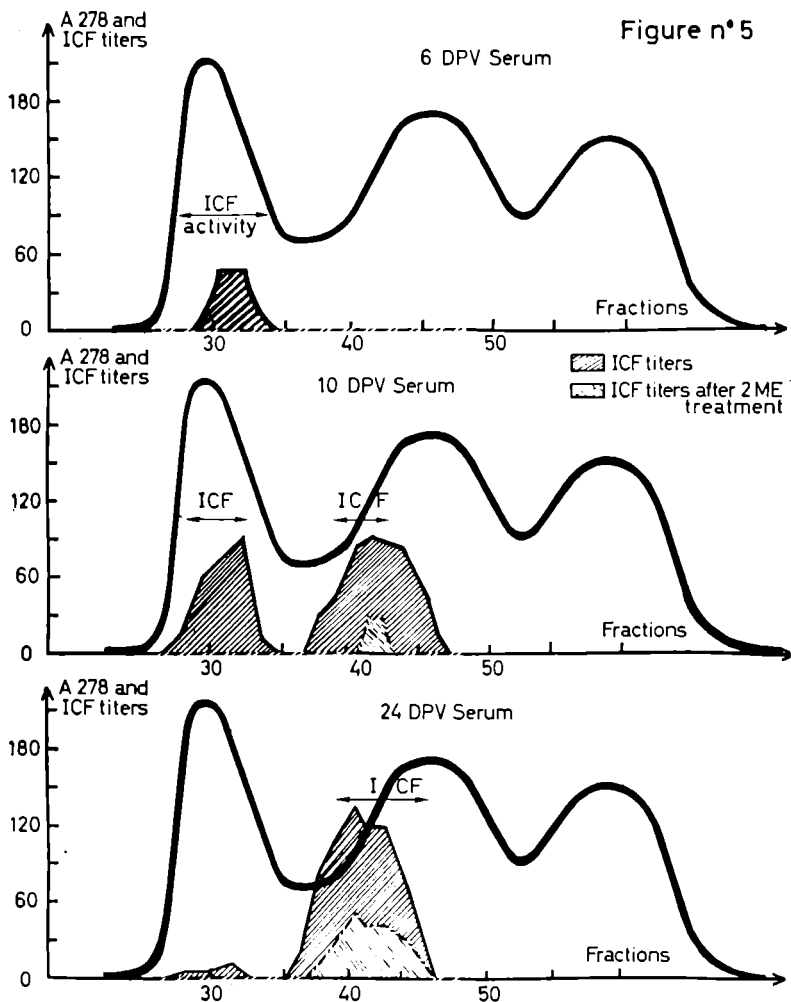


Fig. 5. — Filtration sur gel Sephadex G 200 de 3 pools différents : 6, 10 et 24 jours après vaccination.

— Densité optique lue à 278 m μ .

▨ Réaction IFC des différentes fractions.

▩ Réaction IFC après traitement au 2 ME des fractions précédentes.

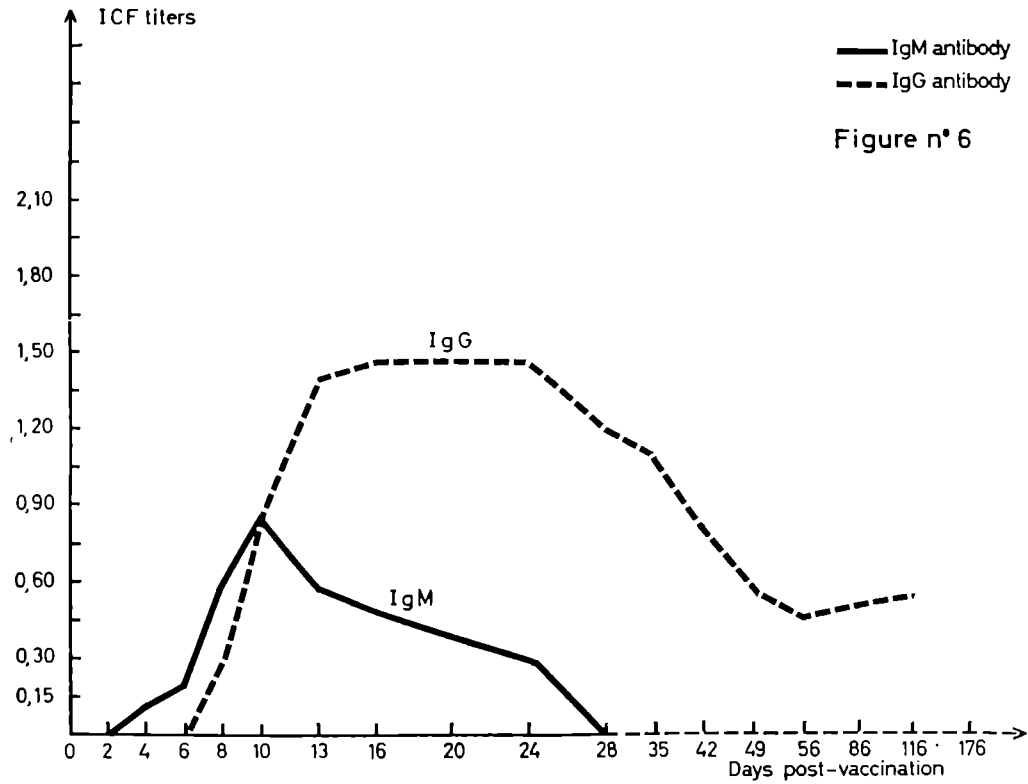


Fig. 6. — Réaction d'ICF de 2 séries de pools, IgM et IgG, préparée par concentration des fractions sérologiques positives après filtration sur Séphadex G 200.

jusqu'au cent sisième jour, une quantité significative d'anticorps IgG pouvant encore être révélée à ce moment.

7. *Figure 7.*

Elle indique les résultats du traitement au 2 ME sur deux pools différents.

Le premier pool de sérums (10 jours après vaccination) révèle une quantité maximale d'IgM et l'apparition des IgG.

Le second pool de sérums tardifs (20 jours après vaccination) renferme des IgM et une quantité maximum d'IgG.

Ces résultats montrent la réduction des IgM par le traitement au 2 ME et une réduction partielle des IgG.

8. *Tableau I.*

Une expérience préliminaire de séparation des IgG, des IgM par centrifugation en gradient de sucrose complète notre travail. Nous observons deux types d'anticorps dans les différents pools du jour 6 au jour 28 après vaccination.

Malgré l'aspect non quantitatif, ces résultats confirment la double réponse en anticorps après vaccination.

III. — DISCUSSION

Nos résultats contribuent à une nouvelle confirmation des avantages et de la valeur du test (11, 13).

Ce test IFC est utilisé dans notre expérience pour suivre l'évolution des anticorps dans le sérum de bovins vaccinés contre la Fièvre aphteuse. Le but de cet article est de trouver une méthode simple pour révéler et mesurer le degré d'immunité (11).

Une telle méthode n'est valable que si les anticorps révélés correspondent à l'immunité, les anticorps inhibant la fixation du complément étant semblables aux anticorps neutralisants.

Ce test IFC présente différents avantages: rapide, simple, économique, il nous permet de contrôler les anticorps d'un nombre important de lots de sérum. Sa reproductibilité est excellente ainsi que sa sensibilité qui est équivalente à celle du test de neutralisation.

Par le test IFC, nous avons mis en évidence les deux classes d'anticorps:

Le premier type d'anticorps IFC apparaît précocement 4 jours après vaccination; les anticorps augmentent jusqu'au dixième jour, puis diminuent et disparaissent au vingt-huitième jour.

Ces anticorps présentent certaines des propriétés classiques des IgM 19 S: élimination par filtration sur Séphadex G 200, localisation dans la fraction inférieure obtenue par centrifugation en gradient de sucrose et sensibilité au traitement par le 2 ME.

Le second type d'anticorps IFC apparaît 8 jours après vaccination; le taux augmente jusqu'au vingtième jour environ et se maintient jusqu'au cent quarante-sixième jour. Dans cette expérience nous avons démontré ces anticorps

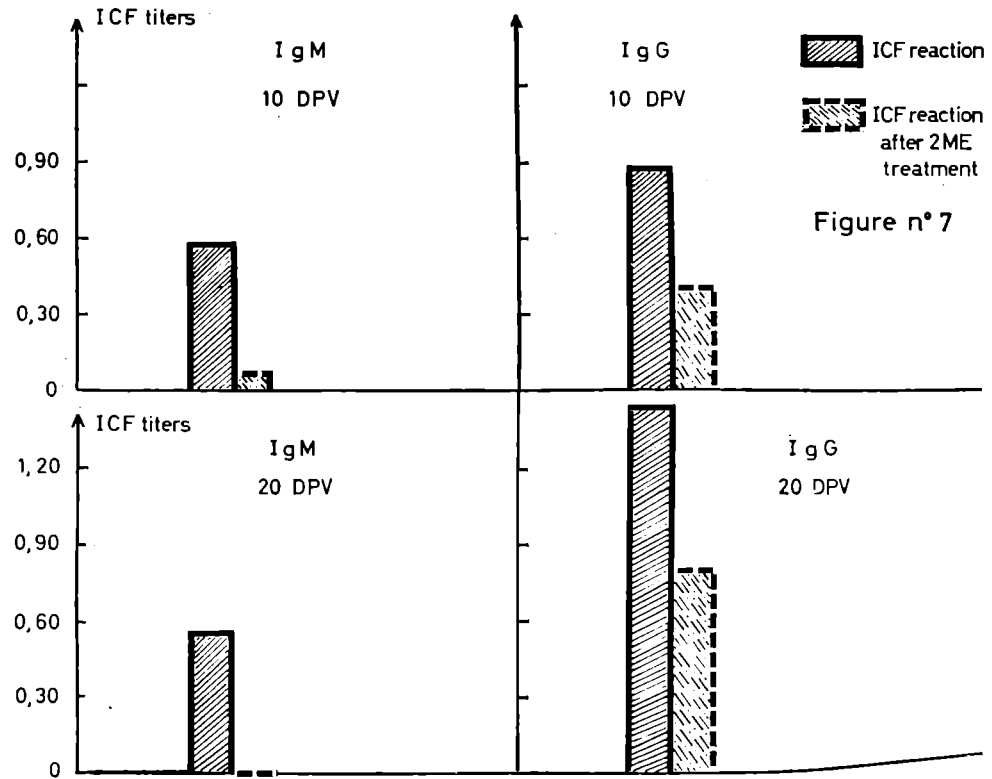


Fig. 7. -- Anticorps IgM et IgG préparés par concentration des fractions sérologiques positives après filtration sur Séphadex G 200 de 2 pools : dixième et vingtième jour après vaccination.
 -- Titre IFC avant et après traitement au 2 ME.

TABLEAU I

Réaction IFC avec 5 pools différents du jour 6 au jour 28 après vaccination. La réaction IFC maximum est donnée par la fraction maximum correspondant au n° 6 IgM et au n° 11 IgG.

POOL.	Jours après Vaccination	Réaction I.C.F. maximale en fraction n° 6	Réaction I.C.F. maximale en fraction n° 11
6 D P V ..	6	+	0
8 D P V ..	8	+	0
13 D P V ..	13	+	+++
20 D P V ..	20	0	++++
28 D P V ..	28	0	+++

IgG, mais leur nature exacte sera discutée plus loin.

Ils sont bien distincts des IgM, sont fractionnés de manière régulière et localisés dans les fractions supérieures, obtenues par centrifugation en gradient de saccharose, mais sont sensibles au traitement par le 2 ME. Ces deux vagues d'anticorps correspondent à l'aspect classique de la réponse en anticorps après infection virale ou vaccination, en accord avec les résultats obtenus par différents auteurs, après infection par le virus, ou vaccination anti-aphteuse : Graves *et coll.* (1), puis Cowan (1) confirment, par les tests de précipitation et de neutralisation, les deux vagues d'anticorps chez des bovins infectés.

D'autre part, Schmidt *et coll.* (12) montrent qu'après une infection à virus Coxasackie, les anticorps inhibants (inhibition de l'hémagglutination) se développent parallèlement aux anticorps neutralisants et confirment les propriétés physico-chimiques de ces deux types d'anticorps.

Contrairement à nos essais utilisant une méthode d'inhibition de fixation du complément, les auteurs travaillant avec le test direct de la fixation du complément ne peuvent trouver, après infection par le virus de la Fièvre aphteuse ou la vaccination, la double réponse en anticorps : MacKercher et Giordano, sur des porcs infectés par le virus de la Fièvre aphteuse ou vaccinés (6); Brown *et coll.* (1) et Cowan et Trautman (2), sur des cobayes.

Seul Cowan (3), par un test de fixation du complément modifié par addition de sérum de bovins non chauffé, révèle des anticorps fixant le complément dans des sérums de bovins infectés par le virus de la Fièvre aphteuse, mais les anticorps précoces 19 S ne fixent pas le complément dans ces conditions.

Les test IFC est capable de détecter les différents types d'anticorps dans les sérums de bovins vaccinés.

Cependant, nos résultats montrent que les anticorps IFC ne sont pas exactement semblables aux anticorps neutralisants.

Les anticorps neutralisants et ceux inhibant la fixation du complément apparaissent approximativement au même moment, mais l'activité neutralisante est légèrement plus précoce que celle inhibant la fixation du complément. La valeur maximum du titre neutralisant se situe au dixième ou treizième jour après vaccination, alors que celle du titre IFC est seulement observée entre le seizième et le vingt-quatrième jour. L'évolution des anticorps neutralisants et celle des anticorps IFC sont approximativement identiques pendant la période intéressante pour l'immunité entre le seizième et le cinquante-sixième jours après vaccination (Fig. 1 à 4).

La nature exacte des anticorps tardifs présents dans le sérum de bovins vaccinés est un des problèmes que nous voulons étudier. Ces anticorps ont été appelés IgM, mais dans nos conditions ils présentent quelques propriétés particulières.

Tout d'abord, la notion que les anticorps antiviral apteux présents dans les sérums de bovins ne peuvent fixer le complément est classique (10). Nous avons été surpris d'observer de manière régulière, avec différentes concentrations de 2 ME et dans des conditions différentes de traitement, que les anticorps tardifs n'étaient pas complètement résistants au traitement par le 2 ME (voir Fig. 5 et 7). Nous avons obtenu ces résultats avec des sérums de bovins vaccinés, alors que les IgG classiques, résistantes au 2 ME, étaient révélées par différents auteurs (1, 2, 3) dans les sérums d'autres espèces. Mais MacKercher et Giordano (7), "sur des sérums de porcs inoculés avec du virus produit sur cultures cellulaires BHK additionné d'un adjuvant huileux", indiquèrent la production d'anticorps tardifs et démontrèrent que l'activité neutralisante des sérums au septième, seizième et vingt-huitième jour après infection était complètement détruite, la plupart du temps, par le mercaptoéthanol.

De plus, nous avons déterminé le poids moléculaire (par filtration ascendante sur gel) des anticorps (24^e et 35^e jours après vaccination) présentant une activité IFC. L'activité maximum fut rattachée à certaines fractions, d'un poids moléculaire moyen de 220.000, qui semble différent de celui attribué classiquement aux IgG de différentes espèces (9).

Ces observations doivent être comparées à celles de Cowan (3), qui montre l'existence de trois variétés différentes par l'électrophorèse dans les anticorps des sérums de bovins. D'autres informations doivent être recherchées pour établir la nature des différents anticorps bovins par comparaison des bovins vaccinés et infectés.

IV. — CONCLUSION - RESUME

Nous avons étudié la nature et l'évolution des deux classes d'anticorps, les immunoglobulines précoces et les immunoglobulines tardives dans les sérums de 5 vaches vaccinées.

Nous avons montré qu'il existait très peu de différence dans la révélation des anticorps par le test IFC et par celui de neutralisation. Il est possible de proposer le test rapide d'inhibition du complément pour l'étude et la mesure de l'immunité des bovins vaccinés.

Nous avons remarqué certaines propriétés particulières des anticorps persistant dans le sérum de bovins vaccinés contre la Fièvre aphteuse; la nature exacte de ces immunoglobulines sera examinée dans d'autres expériences.

* * *

IV. — CONCLUSION AND SUMMARY

We examined the nature and development of the two kinds of antibodies, early formed immunoglobulins and late formed immunoglobulins, in the sera of 5 vaccinated cows.

We showed that there is very little difference in revealing the antibodies by the IFC test and by the neutralisation test. The rapid test for inhibition of complement fixation can be proposed for the study and the measuring of immunity in vaccinated cattle.

We noted some particular properties of the antibodies which continued to persist in the serum of cattle vaccinated against Foot-and-Mouth Disease; the exact nature of these immunoglobulins will be examined in other experiments.

* * *

IV. — CONCLUSION Y RESUMEN

Hemos estudiado la naturaleza y la evolución de ambas clases de anticuerpos, las inmunoglobulinas precoces y las inmunoglobulinas tardías en los sueros de cinco vacas vacunadas.

Hemos demostrado que existían muy escasas diferencias en la revelación de los anticuerpos por la prueba IFC y por la de neutralización. Se puede proponer la prueba rápida de inhibición de fijación del complemento para estudiar y medir la inmunidad de los bovinos vacunados.

Hemos observado algunas propiedades especiales de los anticuerpos que persisten en el suero de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa y en otras experiencias se examinará la naturaleza exacta de estas inmunoglobulinas.

* * *

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements à Mlle M. T. Fayet et M. Aymé pour leurs conseils et leur aide précieuse.

Nous remercions M. Martinand pour son excellente assistance technique.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

1. Brown (F.), Cartwright (B.) & Newman (J.F.G.). — Further studies of early antibody in the sera of cattle and guinea pigs infected with F.M.D. Virus. *J. Immunol.*, 1964, **93**, 397-402.
2. Cowan (K. M.) & Trautmann (R.). — Antibodies produced by guinea pigs infected with Foot-and-Mouth Disease virus. *J. Immunol.*, 1965, **94**, 858-867.
3. Cowan (K. M.). — Heterogeneity of antibodies produced by cattle infected with Foot-and-Mouth Disease virus. *Amer. J. vet. Res.*, 1966, **27**, (120), 1217-1227.
4. Flodin (P.) & Killander (J.). — Fractionation of human serum proteins by gel filtration. *Bioch. Biophys.*, 1962, **63**, 403.
5. Graves (J. G.), Cowan (K. M.) & Trautmann (R.). — Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated F.M.D. antigen. *J. Immunol.*, 1964, **92**, 501.
6. Mac Kercher (P. D.) & Giordano (A. R.). — Foot-and-Mouth Disease in swine. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1967, **20**, 39.
7. Mac Kercher (P. D.) & Giordano (A. R.). — Foot-and-Mouth Disease in swine. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1967, **20**, 54.
8. Palacios (P.) & Rodriguez (R.). — L'épreuve de déviation du complément dans l'étude des virus aphteux. *Bull. Off. int Epiz.*, 1949, **31**, 75-84.
9. Raynaud (M.). — Nature chimique des anticorps. *Cours d'Immunologie Générale de l'Institut Pasteur*, Paris, 1967.
10. Rice (C. E.) & Brooksby (J. B.). — Studies of the complement fixation reaction in virus system. V. In Foot-and-Mouth Disease using direct and indirect methods. *J Immunol.*, 1953, **71**, 300-310.
11. Roumiantzeff (M.), Salvatori (J.) & Caillère (F.). — Méthode d'inhibition de la fixation du complément utilisable pour le titrage des anticorps de bovins (En préparation, 1968).
12. Smith (N. J.), Lenette (E. H.) & Dennis (J.). — Characterization of antibodies produced in natural and experimental Coxsackie virus infections. *J. Immunol.*, 1968, **100**, 99.
13. Traub (E.), Hessami (M.) & Shafyi (A.). — Indirect complement fixation in Foot-and-Mouth Disease. I. Study of antibodies response in cattle and sheep. *Zbl. Ved. Med.*, 1968, **15**, (4), 421-432.