

Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile

II. — Etude anatomo-clinique

par J. OUDAR*, L. JOUBERT*, M. LAPRAS et J. C. GUILLON

L'étude virologique et sérologique de la méningo-encéphalomyélite expérimentale du cheval par l'Arbovirus West Nile (OUDAR et coll., 5) a été complétée par une étude anatomoclinique approfondie et les nuances de l'infection expérimentale suggèrent la grande variabilité des modalités de l'infection naturelle, cliniquement exprimée ou infraclinique, une seule fois décrite, en 1963, en Egypte (SCHMIDT et EL MANSOURY, 7).

Ce travail résume les descriptions antérieures, orientées d'une part sur l'histopathologie des lésions névrauxiques spontanées et expérimentales (GUILLON et coll., 1), d'autre part sur l'évolution clinique et l'électroencéphalographie de l'infection expérimentale (LAPRAS et coll., 4).

I. — MATÉRIEL, MÉTHODES, TECHNIQUES

1) **VIRUS.** — La souche, les dilutions et le titrage du virus inoculé ont été déjà décrits (OUDAR et coll., 5).

1) *Souche.* — La souche de virus West Nile utilisée a été isolée en septembre 1965 de la moelle lombaire d'une pouliche atteinte d'encéphalomyélite, et fut dénommée « Halima II » du nom de l'animal malade (JOUBERT et coll., 2, PANTHIER et coll., 6).

Groupe d'Etudes sur les Arbovirus : *Ecole Vétérinaire de Lyon, I. N. R. A. ; Laboratoire des Arbovirus Institut Pasteur de Paris ; Ecole d'Application du Pharo de Marseille, D. R. M. E. ; O. R. S. T. O. M. Entomologie Médicale de Bondy.

Nous remercions l'I. N. R. A. d'avoir mis des fonds spéciaux à la disposition de notre groupe d'études sur les Arbovirus, ainsi que l'Institut Mérieux (Lyon) pour ses dons en poulains d'expériences.

Bull. Acad. Vét. — Tome XLIV (Mars 1971). — Vigot Frères, Editeurs.

Cette souche est entretenue régulièrement par passage sur cerveau de souris blanche (Swiss Rockfeller) ; sa conservation entre les passages s'effectue au congélateur à -70°C en ampoules scellées. Dans toutes les expériences ici rapportées, nous avons utilisé le virus au niveau de passage le plus faible possible : la préparation inoculée était le 3^e passage sur la souris. Seule, une expérience (G) a été réalisée pour comparaison avec la souche « Sambuc 1 » isolée en 1964 du moustique *C. modestus*.

2) *Dilutions*. — Les dilutions destinées aux inculcations sont effectuées dans la solution de Hanks additionnée de 10 p. 100 de sérum de veau ne contenant pas d'anticorps contre le virus West Nile.

3) *Titrage*. — Le virus est titré à nouveau, au moment de l'inoculation au cheval, par inoculation intracérébrale à la souris (R. A. P. de 20 g) à raison de 6 souris par dilution à la dose de 0,03 ml, de manière à préciser le nombre exact d'unités virulentes inoculées. Les souris sont observées tous les jours et la DL 50 souris est calculée à partir de ces résultats.

2) ANIMAUX D'EXPÉRIENCE.

Neuf animaux au total ont été inoculés : une ânesse de 3 ans (A), un cheval adulte de 3 ans (B) et sept poulains barbes andalous d'un an environ et des deux sexes (D, E, F, G, H, I, J), vierges d'anticorps spécifiques et en équilibre thermique initial. L'état de santé et les conditions d'élevage de ces animaux marquaient de notables différences : l'ânesse A, le cheval B et les poulains G, H, I, J, se montraient en bonne santé apparente et présentaient un excellent état d'embonpoint. En revanche, les poulains, D, E, F, montraient un état général initial assez médiocre, associé à une importante manifestation parasitaire (strongylose).

Les inoculations ont été réalisées :

— en un temps : six animaux ont reçu simultanément par les voies sous-cutanée et intra-veineuse, à la dose de 1,5 ml par inoculation, soit 3 ml au total, des dilutions contenant des quantités différentes de virus (A, B, D, E, F et G). Un septième sujet, J, en revanche, a été inoculé par la voie intracérébrale à l'aide d'une suspension de virus, à la dose de 0,5 ml ;

— en deux temps : 2 poulains (H et I) ont été inoculés par voies sous-cutanée et intraveineuse, puis réinoculés, 70 jours plus tard, l'un par la même voie (H2), l'autre par voie intracérébrale (I2).

3) MÉTHODES D'EXAMEN.

Outre les examens virologiques (étude de la virémie et réisolement du virus à partir du névraxe) et sérologiques (réaction de fixation du complément et inhibition de l'hémagglutination) déjà décrits (OUDAR et coll., 5), les examens anatomocliniques ont porté sur quatre domaines :

— *l'examen clinique* : les chevaux ont été soumis à un examen clinique quotidien avec prises de température, étude de l'état général (comportement alimentaire, attitude, vivacité, locomotion), examen neurologique particulier (motricité, réflexivité, examen ophtalmologique du fundus) ;

— *l'hématologie* : des numérations globulaires et des formules leucocytaires ont été effectuées tous les deux jours après inoculation et jusqu'au 10^e jour ;

— *l'électroencéphalographie* : des électroencéphalogrammes ont été pratiqués chez tous les animaux avant l'inoculation, puis tous les deux jours jusqu'au 10^e jour après l'inoculation et au moment de l'apparition des différents symptômes. L'appareil type Regga 4 Alvar, à 4 plumes, était disposé sur chariot et réglé pour 100 μ V (1 cm sur le tracé). Les électrodes ont permis deux montages transverses (frontal et occipital) et deux montages longitudinaux fronto-occipitaux (gauche et droit) ;

— *l'étude histopathologique* : les quatre animaux sacrifiés (sujets D, E, I2 et J) ont été autopsiés, puis, parallèlement aux essais de réisolement du virus, l'encéphale et différents segments de la moelle épinière, ainsi que le foie et la rate ont été fixés au formol à 10 p. 100, neutralisé par du carbonate de calcium ; les pièces ont été incluses en paraffine et les coupes systématiquement étagées sur l'ensemble du névraxe, puis colorées à l'hémalun-éosine. Cette étude a été également déjà publiée (GUILLON et coll., 1).

II. — RÉSULTATS

A) ANALYSE CLINIQUE ET ÉLECTROENCÉPHALOGRAPHIQUE (Tableau n° 1 et tracés n° 2).

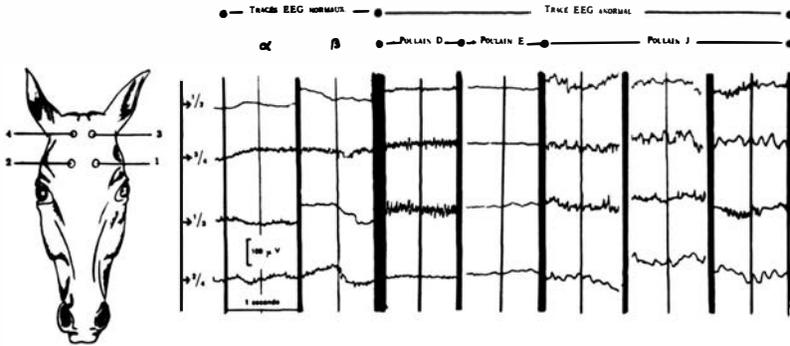
Les résultats se sont révélés très variables suivant les animaux et les formes cliniques suivantes peuvent être décrites.

1^o *Forme aiguë mortelle* : Elle se traduit chez 3 poulains (D, E et J) par l'apparition de symptômes généraux marqués et de

TABLEAU 1

Etude anatomoclinique : T = température ; M = Médullaire ; E = Encéphalitique ; C = Cortex ; Cm = Cerveau moyen ;
Mc = Moelle cervicale ; Md = Moelle dorsale ; Ml = Moelle lombaire

Animaux			Inoculations		E. E. G.			Symptômes									Histopathologie				
Espèce et sexe	Age	Etat général	Voie	Dose (DL ₅₀ souris)	jours			Jours									C	Cm	Mc	Md	Ml
					2 à 6	6 à 10	11 et plus	2 à 6			6 à 10			11 et +							
								T	M	E	T	M	E	T	M	E					
A ânesse	3 ans	Bon	SC + IV	100	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B cheval	3 ans	Bon	SC + IV	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D	1 an	Médiocre	SC + IV	500.000	—	+ activité rapide	—	—	—	+	—	—	+	+	±	±	±	+	—	—	
E	1 an	Médiocre	SC + IV	5.000	—	—	+ tracé plat	+	—	—	—	+	—	—	+	±	—	±	+	+	+
F	1 an	Médiocre	SC + IV	50	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
G	1 an	Bon	SC + IV	450.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
H	1 an	Bon	SC + IV	200.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
				200.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I	1 an	Bon	SC + IV	200.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
				25.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	±	±	+	+
J	1 an	Bon	IC	25.000	+ Ondes lentes	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—



Tracés 2. — Tracés EEG normaux et anormaux

Dérivations bipolaires.

- 1 : Electrode frontale gauche.
- 2 : Electrode frontale droite.
- 3 : Electrode occipitale gauche.
- 4 : Electrode occipitale droite.
- 1/2 : Montage transverse frontal.
- 3/4 : Montage transverse occipital.
- 1/3 : Montage longitudinal fronto-occipital gauche.
- 2/4 : Montage longitudinal fronto-occipital droit.

Tracés normaux.

- En α : sujet calme.
- En β : sujet excitable.

Tracé anormal.

Poulain D (6^e jour), activité rapide avec hypersynchronisme (vitesse 30 mm/sec).

Poulain E (21^e jour), activité lente, amplitude non mesurable.

Poulain J (4^e jour), activité lente (rythme thêta), quelques pointes isolées (à gauche), ondes lentes et irrégulières (au centre), décharges d'ondes lentes en région occipitale droite avec activité rapide simultanément en région frontale (à droite).

symptômes neurologiques de type méningo-encéphalomyélitique avec des perturbations électroencéphalographiques importantes.

— *Poulain D* : Chez cet animal, inoculé par voies sous-cutanée et intra-veineuse, la maladie débute, le 7^e jour après l'inoculation, par une élévation thermique (38°8). Au même moment, l'E. E. G. montre une activité hypersynchrone, indice d'un foyer irritatif précoce circonscrit, à localisation occipitale, avec quelques pointes isolées d'amplitude moyenne. L'hyperthermie demeure étale en plateau pendant 15 jours. Puis, une paraplégie survient brusquement le 22^e jour coïncidant avec une baisse de la température rectale, accompagnée d'une mydriase importante et d'une paralysie du réflexe photomoteur. La sensibilité est, par ailleurs, en partie conservée. L'animal est abattu à la phase agonique le 23^e jour.

— *Poulain E* : Chez ce poulain inoculé par les mêmes voies, mais avec une dose de virus très inférieure à celle reçue par le poulain D, l'élévation de température est constatée dès le 3^e jour. L'allure de la courbe est diphasique, avec deux clochers thermiques les 6^e (38°5) et 18^e jours (38°2), séparés par un retour à la normale vers le 13^e jour. Les symptômes nerveux sont caractérisés par des troubles à la fois moteurs et sensitifs. Ils débutent par une incoordination motrice dès le 5^e jour, avec installation progressive d'une paraplégie puis d'une quadriplégie, de type spastique aux membres antérieurs et de type flasque aux postérieurs, avec extension de la tête et de l'encolure. L'animal se débat de temps à autre avec des mouvements de pédalage et des essais de relever, pour reprendre ensuite une attitude pseudotétanique. Les troubles sensitifs se traduisent par une insensibilité à la douleur limitée aux régions postérieures et par l'abolition des réflexes tendineux. Plus tardivement, à la phase agonique de la maladie, environ 3 semaines après l'inoculation, l'examen ophtalmologique révèle une diminution des réflexes d'occlusion palpébrale et photomoteur et un œdème au fond de l'œil. L'E. E. G., normal jusqu'au 11^e jour, montre ensuite progressivement une diminution dans la fréquence et l'amplitude des éléments graphiques et rythmiques, jusqu'à la phase agonique, où un tracé plat traduit une hypoactivité générale du cerveau.

— *Poulain J* : Inoculé par voie intra-cérébrale, cet animal présente une hyperthermie progressive de 38°8 à 40°6 du 6^e au 8^e jour, après l'inoculation. Les symptômes nerveux apparaissent le 8^e jour, à la poussée thermique maximale. Ils se traduisent tout d'abord par des troubles locomoteurs (ataxie avec athétose,

hypermétrie, vacillement du train postérieur et paralysie des muscles extenseurs de la jambe). Très rapidement l'animal reste en décubitus latéral complet, en dépit des efforts réitérés de relever. Des phases d'abattement extrême alternent avec des périodes d'excitation motrice localisée, se traduisant par des gestes anormaux (mouvements céphaliques de dénégation ou de self-auscultation, contractures violentes des muscles de l'encolure), des mouvements de mastication avec salivation ou des contractures de la lèvre supérieure, des paupières et des globes oculaires, animés, par ailleurs, de nystagmus. Plus rarement, surviennent des crises convulsives toniques et cloniques violentes, suivies d'une phase post-critique stertoreuse. La sensibilité est abolie dans les régions postérieures, les réflexes tendineux, supprimés. L'animal est abattu à la phase agonique le 9^e jour. L'E. E. G. est modifié dès le 4^e jour avec l'apparition d'ondes lentes, démontrant une souffrance cérébrale diffuse, intense et précoce.

2^o *Forme fruste* : Elle est observée chez 3 animaux (A, F et I) et se caractérise soit par une légère élévation thermique immédiate, accompagnée ou non d'un syndrome fébrile discret, sans troubles locomoteurs, soit tardivement par des troubles généraux et des troubles locomoteurs peu importants, sans hyperthermie. Les tracés E. E. G. demeurent normaux.

— *Anesse A* : La température marque 38°8 le 6^e jour après l'inoculation, avec anorexie, constipation, abattement, congestion des muqueuses oculaires et larmolement.

— *Poulain F* : On enregistre 38°2 de température rectale, le 6^e jour après l'inoculation.

— *Poulain I* : Cet animal, primo-inoculé par voie sous-cutanée et par voie intraveineuse (I1), comme les deux animaux précédents, puis réinoculé par voie intracérébrale (I1), présente, 15 jours après cette réinoculation tardive, une légère diminution de l'appétit, une certaine torpeur et quelques troubles ataxiques, sans modification de la température.

3^o *Forme inapparente* : Limitée à des stigmates sérologiques, elle se caractérise par l'absence de troubles fonctionnels, de manifestations pathologiques et de perturbations de l'E. E. G. chez le cheval adulte B et les poulains G et H, inoculés par voies sous-cutanée et intraveineuse.

B) ANALYSE HÉMATOLOGIQUE ET HISTOPATHOLOGIQUE.

1^o *Analyse hématologique* : L'hématologie est demeurée sans variations notables sauf pour deux animaux D et E, chez lesquels une anémie (2^e au 10^e jour) et une leucopénie (8^e jour) légères sont observées.

2^o *Analyse histopathologique* : L'étude des lésions a été effectuée sur les trois animaux ayant présenté la forme aiguë de la maladie et abattus à la phase agonique (D, E et J), et sur le poulain I2, atteints de troubles locomoteurs après réinoculation intracérébrale du virus.

— *Poulain D* : Une leucopolionévrauxite sur l'ensemble du névraxe est observée ; les lésions semblent plus anciennes dans l'encéphale que dans la moelle, où l'atteinte se révèle de type inflammatoire poliomyélitique, surtout dans le segment thoracique.

— *Poulain E* : Les lésions, discrètes ou nulles dans l'encéphale, s'affirment au contraire dans la moelle cervicale, thoracique et lombosacrée, traduisant une myélite aiguë, affectant surtout la substance grise.

— *Poulain J* : L'atteinte du système nerveux est caractérisée par une méningo-encéphalomyélite atteignant principalement la partie postérieure du cerveau et le début de la moelle épinière. La méningite ne s'observe que dans le cervelet et dans la zone de l'encéphale correspondant au point d'inoculation.

— *Poulain I* : Des lésions leuconévrauxiques, sans atteinte des neurones, apparaissent dans la moelle épinière et, dans une moindre mesure, dans l'encéphale (Photomicrographies n° 4).

Photomicrographies n° 4. — *Histopathologie du névraxe*

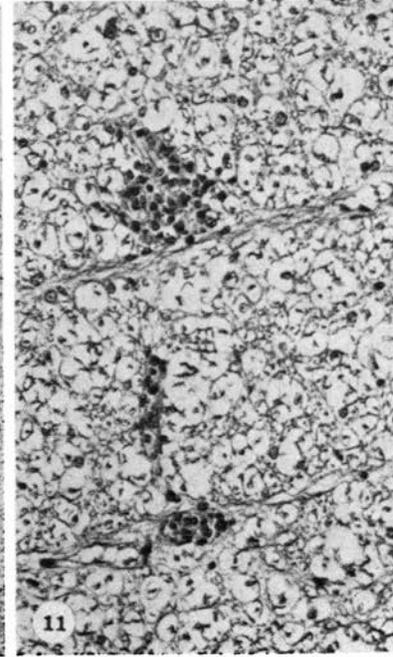
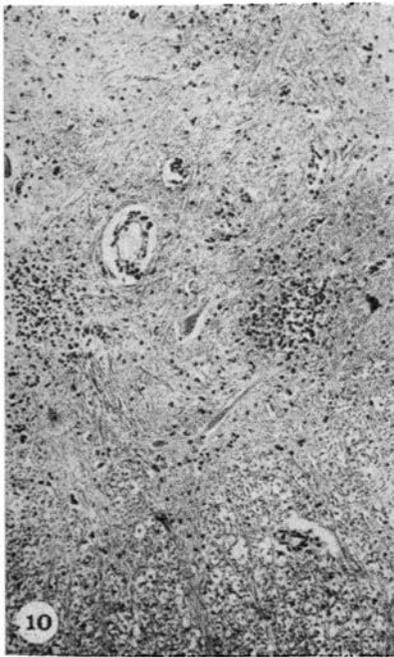
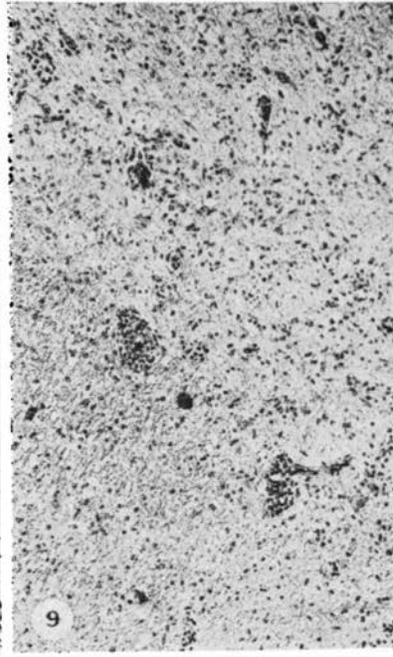
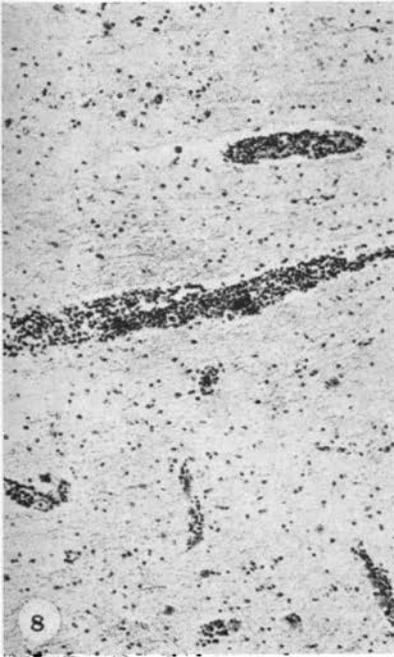
En 8. — Poulain J. Point d'inoculation en région fronto-temporale. Méningite (G × 72).

En 9. — Poulain J. Couches optiques. Intense réaction encéphalitique (G × 72).

En 10. — Poulain J. Corne ventrale du renflement cervical de la moelle épinière (G × 72).

En 11. — Cheval I. Substance blanche de la moelle cervicale. Leucopolyomyélite (G × 160).

(Colorations hémalum-éosine safran. Clichés GUILLON, Institut Pasteur de Paris N° BH 1539 et BH 1540).



C) INTERPRÉTATION GÉNÉRALE.

Il ressort de cette étude analytique d'un nombre restreint d'animaux inoculés trois informations principales.

1° La diversité des formes évolutives de la maladie expérimentale confirme l'observation des aspects de la maladie naturelle, qui peut ainsi évoluer sous trois formes cliniques aiguë, fruste et inapparente, celle-ci probablement beaucoup plus fréquente que celles-là dans les conditions spontanées.

2° La constance, dans les formes aiguës, de l'évolution d'un syndrome méningo-encéphalomyélitique fébrile, à la suite d'une incubation de 2 à 8 jours, se traduit par des symptômes généraux et des symptômes nerveux, encéphalitiques et myélitiques, caractérisés surtout par un syndrome parétique postérieur.

Les symptômes généraux demeurent le plus souvent discrets et consistent en une réaction thermique, dont l'évolution se révèle souvent diphasique avec deux clochers thermiques maximaux de 1 °C. En revanche, les examens hématologiques ne révèlent pas, en général, de modifications importantes.

Les symptômes nerveux se séparent en des troubles myélitiques beaucoup plus révélateurs et réguliers et des symptômes d'encéphalite plus discrets, comme le prouvent par ailleurs les lésions neurohistopathologiques, surtout chez les animaux inoculés par les voies sous-cutanée et intraveineuse proches de l'inoculation naturelle de virus par le moustique vecteur.

Les manifestations encéphalitiques évoluent sous la forme de troubles corticaux, accompagnés de perturbations électroencéphalographiques, traduisant la souffrance du cerveau.

Les troubles myélitiques se manifestent par une parésie et de l'ataxie avec incoordination motrice, puis une paraplégie ; l'examen des réflexes montre de nettes perturbations et la sensibilité cutanée peut être partiellement ou totalement affectée.

Dans les autres formes, les manifestations sont souvent très discrètes ; elles se limitent à une légère élévation thermique, du larmolement et quelques signes parétiques avec vacillement inconstant du train postérieur.

3° L'unicité des lésions névraxiques dans les formes aiguës se définit par une poliomyélite avec atteinte des cornes ventrales, motrices, de la moelle épinière, surtout intense dans les segments postérieurs. En revanche, le cerveau présente en général des lésions discrètes, constituées soit par de l'œdème en région méningée et sous-méningée, ainsi que dans la couche des cellules de Purkinje du cervelet, soit par une périvascularite lymphocytaire.

III. — DISCUSSION

Les résultats anatomocliniques et électroencéphalographiques appellent un certain nombre de remarques.

1° L'apparition de la maladie clinique paraît liée en partie à des facteurs d'espèce, d'âge et surtout à des facteurs individuels de réceptivité (état de santé, mode d'élevage, entretien). Ainsi, les poulains de demi-sang en mauvais état d'embonpoint, atteints d'infestations parasitaires (strongylose massive) se sont montrés beaucoup plus réceptifs que les animaux plus rustiques ou âgés.

2° L'importance et la gravité de la maladie expérimentale semblent en rapport avec l'inoculation d'une dose suffisante de virus.

3° La voie d'inoculation est déterminante puisque l'infection intracérébrale constitue un témoin de sévérité maximale par la brièveté de son évolution fatale et par la gravité des symptômes neurologiques et des lésions névraxiques. Cependant, une encéphalomyélite mortelle peut aussi apparaître à la suite d'une inoculation par les voies sous-cutanée et intraveineuse « en mode naturel » avec une évolution plus lente (3 semaines), des symptômes et des lésions surtout d'ordre poliomyélitique.

4° La discrétion et l'évolution diphasique de la courbe thermique permettent de comprendre la rareté apparente de la maladie spontanée, difficilement décelable chez les sujets entretenus en liberté à l'état demi-sauvage.

5° Le parallélisme entre la clinique, l'histopathologie et les perturbations électroencéphalographiques de cette infection respecte certes le cadre général des arboviroses encéphalitogènes, mais s'en sépare au moins sur le plan histopathologique. En revanche, le mode d'expression électroencéphalographique de cette méningo-encéphalomyélite équine offre d'intéressants points de comparaison avec celui des encéphalomyélites européennes à tiques d'une part, celui de l'encéphalite japonaise B de l'Homme d'autre part, dans lesquelles on retrouve ces trois modalités principales : activités rythmiques rapides hypersynchrones, ondes lentes irrégulières, décharges d'ondes lentes épisodiques.

6° L'évolution diphasique générale — et souvent thermométrique — de la maladie comporte une phase fébrile initiale contemporaine de la virémie et une phase à expression neurologique sans diffusion virale générale, séparées par une période silencieuse, au cours de laquelle seul l'électroencéphalogramme permet de déceler des anomalies cérébrales, témoins de la localisation cérébrale du virus et des lésions névraxiques.

CONCLUSIONS

1° *L'infection expérimentale* par le virus West Nile est possible chez le cheval sous certaines conditions.

2° L'infection se résume en une *méningo-encéphalomyélite* descendante antéropostérieure, où la poliomyélite, surtout lombaire, domine le tableau clinique, électroencéphalographique et histopathologique.

3° Ce syndrome neurologique se révèle très semblable au syndrome parétique postérieur spontané, dénommé en Camargue « lourdiges » ou « démarche ébrieuse » d'étiologie multiple et incertaine, bactérienne, virale, toxique, parasitaire, nutritionnelle, surtout après inoculation sous-cutanée et intraveineuse assez comparable à la *piqûre* contaminante du vecteur.

4° Les nuances de la maladie expérimentale en rapport avec les doses virales, les voies d'inoculation et l'état initial des sujets suggèrent l'éventail très large des *formes cliniques* naturelles aiguës, frustes ou inapparentes.

BIBLIOGRAPHIE

1. GUILLON (J. C.), OUDAR (J.), JOUBERT (L.), HANNOUN (C.), 1968. — Lésions histologiques du système nerveux dans l'infection à virus West Nile chez le cheval. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **114**, 539-550.
2. JOUBERT (L.), OUDAR (J.), HANNOUN (C.), BEYTOUT (D.), CORNIU (B.), GUILLON (J. C.), PANTHIER (R.). 1970. — Epidémiologie du virus West Nile : Etude d'un foyer en Camargue IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **118**, 239-247.
3. JOUBERT (L.), OUDAR (J.), 1969-1970. — Les zoonoses arbovirales. Leur présence en France. *Rev. Méd. Vet.*, **120**, 737-764 ; **121**, 221-246.
4. LAPRAS (M.), FLORIO (R.), JOUBERT (L.), OUDAR (J.), GUILLON (J. C.), HANNOUN (C.), 1968. — L'électro-encéphalogramme normal du cheval. Ses variations pathologiques dans la méningo-encéphalomyélite virale West Nile. Relations avec la clinique, la virologie, l'histopathologie. *Rev. Méd. Vet.*, **119**, 673-693.
5. OUDAR (J.), JOUBERT (L.), HANNOUN (C.), CORNIU (B.), 1971. — Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'Arbovirus West Nile. I. Etude virologique et sérologique. *Bull. Acad. Vét. France*, **44**, p. 115-127.
6. PANTHIER (R.), HANNOUN (C.), OUDAR (J.), BEYTOUT (D.), CORNIU (B.), JOUBERT (L.), GUILLON (J. C.), MOUCHET (J.), 1966. — Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**, 1308-1310.
7. SCHMIDT (J. R.), EL MANSOURY (H. K.), 1963. — Natural and experimental infection of Egyptian equine with West Nile virus. *Ann. Trp. Med. Parasit.*, **57**, 415-427.