

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

IV. — Recherche des réservoirs de virus. Inoculation au Mouton et au Porc.

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

Les enquêtes épidémiologiques, poursuivies depuis 8 ans en France dans le Midi méditerranéen, ont démontré la présence, en Camargue, de l'arbovirus West Nile chez l'homme (PANTHIER et coll., 6), le cheval (JOUBERT et coll., 2) et l'arthropode vecteur *Culex modestus* (MOUCHET et coll., 3). En outre, la maladie a été reproduite expérimentalement chez le cheval (OUDAR et coll., 4, 5, JOUBERT et coll., 1), avec l'établissement d'un schéma pathogénique révélant les diverses nuances enregistrées dans la maladie naturelle et suggérant de multiples enseignements dans le diagnostic, l'épidémiologie et la prophylaxie de l'infection spécifique.

Toutefois, si l'on excepte le relais amplificateur occasionnel représenté par le cheval, le réservoir naturel du virus demeure inconnu. Aussi la recherche expérimentale des réservoirs possibles devait-elle intervenir, en particulier chez le mouton et le porc, espèces présentes dans la région infectée et recelant parfois des anticorps spécifiques ou de groupe B.

Ce travail se propose de reproduire la maladie chez ces deux espèces et, comme chez le cheval, d'en préciser le mécanisme pathogénique à la suite d'une étude complète, anatomo-clinique d'une part, virologique et sérologique d'autre part.

(*) Groupe d'Etudes sur les Arbovirus : Ecole Vétérinaire de Lyon, I. N. R. A.

(**) 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 ce groupe d'étude.

I. — MATÉRIEL, MÉTHODES ET TECHNIQUES

1. — *Virus.*

A) *Souche.*

La souche de virus West Nile utilisée a été isolée en 1965 de la moelle lombaire d'une pouliche camarguaise « Halima II », atteinte d'encéphalomyélite spontanée. Elle est entretenue régulièrement par passages sur cerveau de souris albinos (Swiss Rockfeller). Après le troisième passage, le virus est stocké, en ampoules scellées, au congélateur à -70°C . La limitation au troisième passage est nécessaire pour éviter le risque d'une adaptation murine.

B) *Dilutions.*

Les dilutions destinées aux inoculations sont effectuées à l'aide d'une solution de Hanks, additionnée de 10 p. 100 de sérum de veau ne contenant pas d'anticorps anti-West Nile.

C) *Titrage.*

Le titre initial de la solution est connu. Mais la sécurité exige le retitrage du virus, particulièrement fragile, au moment de l'expérimentation, grâce à l'inoculation intra-cérébrale sur souris albinos (lignée R. A. P., poids moyen de 20 g), à raison de 6 souris par dilution, à la dose de 0,03 ml par animal. L'observation journalière du taux de mortalité permet de déterminer avec précision le titre des dilutions exprimé en DL 50/souris.

2. — *Animaux.*

Un total de 13 animaux ont été mis en expérimentation, soit 8 moutons et 5 porcs *, vierges d'anticorps anti-West Nile et en équilibre thermique initial. Ils présentaient les caractéristiques différentes de poids, de sexe, d'âge et d'état de santé (tableau).

(*) Dont 3 miniporcs (n° 1, 2 et 3), de poids réduit et de comportement relativement proche de celui du sanglier.

3. — *Protocole expérimental.*

A) *Inoculations.*

1° *Inoculations sous-cutanées et intra-veineuses.*

Les inoculations, exprimées en DL 50/souris (tableau), ont été pratiquées à raison de 0,5 ml par voie sous-cutanée (SC) et 0,5 ml par voie intra-veineuse (IV) chez deux moutons (n° 7 et 8 : 2.10^5) et un seul porc (n° 3 : 10^5).

Ce mode d'inoculation tend à reproduire artificiellement le mode naturel d'inoculation par le vecteur.

2° *Inoculations intra-cérébrales.*

Le protocole expérimental des inoculations intracérébrales (IC) est identique pour tous les animaux (6 moutons n° 1 à 6 et 4 porcs n° 1, 2, 4 et 5) : à la suite d'une diète préalable de 24 heures, anesthésie au Nesdonal à 0,5 p. 100, précédée par une pré-anesthésie par de l'acépromazine base ; incision cutanée et trépanation en regard de l'hémisphère droit, inoculation d'une dilution virale, sous volume de 0,5 ml ; enfin, suture cutanée, sans pansement protecteur. L'intervention est beaucoup plus délicate chez le porc que chez le mouton, en raison de la conformation particulière des sinus frontaux dans cette espèce.

Différentes dilutions virales ont été utilisées pour les inoculations, exprimées en DL 50 souris (tableau) :

— *Chez les moutons :*

N° 1 et 2 : 5.10^4 ; n° 3 et 4 : 5.10^3 ; n° 5 et 6 : 2.10^5 .

— *Chez les porcs :*

N° 1 et 2 : 10^5 ; n° 4 et 5 : 5.10^5 .

B) *Méthodes d'examen.*

1° *Clinique.*

Tous les animaux ont été soumis à un contrôle bi-quotidien, comportant : prises de température à heures fixes, examen général, état des muqueuses, auscultation, examens neurologiques particuliers (étude du comportement, de la motricité, de la sensibilité, de la réflectivité et examen ophtalmologique).

2° *Electro-encéphalographique.*

L'appareil utilisé est un électroencéphalographe (E. E. G.) de type « Alvar Regga IV portable », disposant de quatre pistes. Les quatre électrodes, de type « anestho », sont constituées par

des aiguilles fines à contact périosté transcutané. Elles sont implantées en carré dans les fosses temporales symétriquement par rapport à la ligne médiane de la tête, suivant des repères définis pour chaque espèce, et permettent d'obtenir quatre tracés d'enregistrements, en dérivations bipolaires, des différences de potentiel entre elles. L'électrode « terre » est placée indifféremment en un point considéré comme inactif (encolure).

L'étalonnage de l'appareil enregistreur est en général réglé sur 25, 50 ou 100 microvolts. L'amplitude des grapho-éléments est calibrée pour ne pas dépasser 1 cm.

L'opération doit s'effectuer dans un local sombre ; l'animal est placé dans une caisse spéciale étroite afin d'empêcher tout mouvement. Après implantation des électrodes, particulièrement délicate chez les sujets trépanés, un délai d'une demi-heure au moins est nécessaire avant d'enregistrer un tracé.

3° *Virologie.*

Elle se divise en deux séries d'examen : étude de la virémie précoce chez tous les animaux d'expérience, d'une part, d'autre part, en cas de réaction clinique, isolement tardif du virus après autopsie, à partir des centres nerveux.

a) *Virémie précoce.*

Elle a été étudiée par inoculation intra-cérébrale, à des lots de 6 souris, de sérum pur ou dilué à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , provenant des animaux en expérience. La virémie est exprimée en logarithme du nombre de DL 50 souris par ml de sérum.

b) *Isolement du virus à partir du névraxe.*

Le réisolement du virus par inoculation intra-cérébrale à des souriceaux nouveau-nés a été tenté chez les animaux morts ou sacrifiés, à partir de divers prélèvements, soit des fragments de tissus nerveux prélevés aux divers étages névraxiques (cortex cérébral CC, cerveau moyen CM, moelle cervicale MC, thoracique MT, lombaire et sacrée ML + S), soit des fragments d'organes (foie, rate, poumon et rein).

4° *Sérologie.*

Les anticorps inhibant l'hémagglutination (I. H. A.) avec l'antigène homologue West Nile ont été recherchés et titrés dans les prélèvements de sérums aux 7°, 23° et 60° jours.

5° *Histopathologie.*

Les animaux morts (mouton n° 6) ou sacrifiés (moutons

n° 1, 2, 3, 4) ont été autopsiés avec prélèvement de l'encéphale, de moëlle à différents niveaux et de viscères. Après fixation par le formol, inclusion en paraffine, les coupes histologiques ont été colorées par l'hémalum-éosine-safran et examinées.

II. — RÉSULTATS

Ils sont résumés dans le tableau général.

A) Moutons.

1. — *Etude anatomo-clinique.*

Les résultats cliniques permettent de séparer les animaux en deux groupes.

1° Groupe I.

Absence de troubles fonctionnels et de manifestation pathologique.

Cette absence de réponse clinique à l'inoculation expérimentale a été constatée chez les moutons n° 1, 2, 3 et 4 inoculés par voie intra-cérébrale et chez les moutons n° 7 et 8, inoculés par voie sous-cutanée et intra-veineuse.

2° Groupe II.

Maladie expérimentale aiguë se traduisant par des symptômes neurologiques d'ordre méningo-encéphalomyélitique.

Ces résultats ont été observés chez deux animaux (n° 5 et 6), inoculés par voie intra-cérébrale.

● Mouton n° 5.

Chez cet animal, en excellent état au moment de l'inoculation, la courbe thermique s'est élevée assez brusquement à partir du 5° jour, pour atteindre 41 °C le 6° jour et 42 °C le 7° jour. Elle décroît ensuite régulièrement jusqu'au 10° jour et redevient normale. Les premiers symptômes, à partir du 6° jour, consistent dans des tremblements dus, sans doute en partie, à la fièvre, accompagnés de myoclonies des muscles temporaux et de mâchonnements désordonnés.

Des crises plus sérieuses surviennent le 7° jour et se poursuivent à intervalles irréguliers jusqu'au 10° jour. D'intensité variable, elles se traduisent par des tremblements et des myoclonies très accusés, des mâchonnements désordonnés, avec des

phénomènes d'aberration du goût accompagnés d'un ptyalisme prononcé, parfois des réactions d'agressivité aux stimulations extérieures. Au cours de certaines crises, les 8^e et 9^e jours, on peut observer une perte totale de sensibilité, et une absence de réaction aux excitations (bruits, lumière...).

Le 11^e jour, les crises s'estompèrent et disparurent le 12^e jour. L'état de l'animal s'améliore alors rapidement, sans séquelle : la guérison peut donc être considérée comme totale.

● *Mouton n° 6.*

L'animal était maigre, fortement parasité, son poil piqué. Les 2^e et 3^e jours après l'inoculation, en dépit de la conservation de l'appétit, la courbe thermique s'est élevée progressivement pour atteindre 42 °C le 6^e jour et redécroître ensuite.

Les 4^e et 6^e jours, le sujet montre un abattement progressif ; la tête basse, il mange peu, mais boit normalement.

De même que pour le mouton n° 5, les premiers symptômes apparaissent le 6^e jour et consistent dans des tremblements et des myoclonies de la tête et des membres.

Le 7^e jour, se manifestent des crises similaires à celles décrites pour le sujet n° 5, mais d'une gravité plus prononcée. Elles se résument dans :

— des tremblements et des myoclonies, en particulier des peuciers et des muscles de la tête, qui ont exclu toute observation E. E. G. (sauf le 7^e jour au cours d'une crise) ;

— des mâchonnements désordonnés, l'animal se mordant les antérieurs, léchant le sol, montrant une aberration totale du goût, ingérant sans discernement, papier, bois, métal... ;

— un ptyalisme prononcé ;

— de faibles phénomènes d'agressivité et, par instants, une perte quasi-totale de sensibilité, l'animal ne répondant plus aux excitations (bruits, lumière...).

Le même jour, au cours d'un enregistrement E. E. G., l'animal a manifesté une crise plus intense, avec une phase de coma « convulsif », nettement traduite sur le tracé, d'une durée de 30 secondes environ, l'animal restant étendu sur le sol, les pattes en extension, la tête et l'encolure renversées.

Les 8^e et 9^e jours, les crises, plus nombreuses, s'accompagnent des mêmes manifestations, auxquelles se surajoutent des piétinements, une insensibilité totale à la douleur, une amaurose complète, des défécations répétées avec émission d'une diarrhée fétide et, entre les crises, une prostration profonde.

Le 10^e jour, les crises s'espacent, mais s'accompagnent d'irrégularité, voire de blocage respiratoire.

Le 11^e jour, l'animal meurt au cours d'une crise.

2. — *Electroencéphalographie.*

Dans le premier groupe d'animaux, aucun tracé anormal n'a été enregistré. Dans le deuxième groupe, pour les moutons n^o 5 et 6, l'E. E. G. a posé de sérieux problèmes, au cours de l'évolution de la maladie expérimentale, car les tremblements et les myoclonies des muscles de la tête, ainsi que les mâchonnements perturbaient profondément l'enregistrement des tracés. A une seule reprise, pour le mouton n^o 6, le 7^e jour, au cours d'une crise, nous avons obtenu un tracé significatif : tracé plat correspondant cliniquement à une assez brève phase de coma, suivie du reste de la reprise progressive de l'activité corticale annonçant le réveil de l'animal.

3. — *Virologie.*

1^o *Virémie.*

La virémie s'est vérifiée chez les moutons n^o 5 et 6 : elle a duré du 2^e au 4^e jour chez le sujet n^o 5 et du 2^e au 6^e jour chez le n^o 6.

En revanche, aucune virémie n'a pu être constatée chez les autres animaux. Il semble que la dose de virus inoculée procure une virémie d'intensité parallèle au titre de l'inoculat, et que, seules, sont aptes à la provoquer des doses importantes (200.000 DL/50 souris), introduites par voie intra-cérébrale.

Il ressort de l'étude systématique de la virémie à temps multiples les 2^e, 4^e, 6^e et 10^e jours après l'inoculation :

— la constance de la phase virémique chez les animaux inoculés à forte dose par voie intracérébrale, mais de courte durée (du 4^e au 6^e jour chez le sujet n^o 5, du 2^e au 6^e jour chez le sujet n^o 6) et de degré relativement peu élevée (de 1 à 2, 3 DL 50 souris/ml de sérum) ;

— l'absence de virémie au contraire chez les animaux inoculés par voies sous-cutanée et intraveineuse, quelle que soit la dose, ou par voie intracérébrale, à dose faible.

2^o *Réisolement du virus.*

Le virus n'a pu être réisolé à tous les étages du névraxe que chez le mouton n^o 6, qui a présenté une encéphalomyélite aiguë mortelle.

4. — *Sérologie.*

Les moutons n° 5 et 6 ont montré une légère élévation du taux des anticorps I. H. A., qui ont persisté deux mois chez le mouton n° 5.

Chez les moutons n° 7 et 8, l'apparition fugace d'anticorps au 7° jour, avec négativation sérologique ultérieure, semble signifier que le virus ne s'est pas multiplié chez l'animal, et n'a joué qu'un rôle transitoire et limité de stimulus antigénique.

5. — *Histopathologie .*

Chez le mouton n° 6, les différentes sections du névraxe ont révélé, exclusivement dans la substance grise, une encéphalomyélite d'égale intensité à tous les niveaux : infiltrats périvasculaires, volumineux foyers de gliose, neuronophagie et quelques hémorragies dans la moelle (surtout dans les cornes dorsales) ; l'encéphale présentait, en outre, des lésions de méningite lymphocytaire. Enfin, un volumineux foyer de ramollissement hémorragique en voie de déblaiement semblait correspondre au point d'inoculation.

6. — *Discussion.*

Les résultats anatomocliniques, virologiques et sérologiques appellent un certain nombre de remarques.

— La maladie clinique peut être reproduite chez le mouton, mais la voie d'inoculation et l'importance de la dose sont déterminantes, puisque, seuls, les deux animaux inoculés par voie intracérébrale, avec 200.000 DL/50 souris ont présenté une encéphalomyélite. L'un d'entre eux, en mauvais état de santé, est mort, mais l'influence des facteurs de réceptivité sur l'évolution de la maladie ne peut être démontrée sur un nombre aussi restreint d'animaux et mériterait d'être recherchée sur un effectif plus important.

— A la différence des résultats observés chez le cheval, la courbe thermique présente une évolution monophasique, avec un seul pic le 6° ou le 7° jour.

— L'évolution de la maladie expérimentale est diphasique avec une période fébrile initiale, suivie d'une période d'expression neurologique, au cours de laquelle des anomalies cérébrales électriques ont pu être décelées.

— La virémie, toujours faible et de courte durée (2 à 3 jours), n'apparaît que chez les animaux malades et ne saurait statistiquement servir à la recharge du vecteur.

— L'élévation du taux des anticorps I. H. A. chez les animaux

malades est faible, mais ils persistent plus de 2 mois. En revanche, chez les animaux inoculés par voie sous-cutanée et intraveineuse, ils disparaissent très rapidement et ne peuvent plus être mis en évidence dès le 23^e jour.

— Le parallélisme entre la clinique, l'histopathologie et les perturbations électroencéphalographiques respecte le cadre général des arboviroses encéphalitogènes.

— L'absence de réponse chez les animaux inoculés par les voies sous-cutanée et intra-veineuse, proches de l'inoculation naturelle par le moustique, tant du point de vue clinique que virologique, la faiblesse et la brièveté de leur réponse sérologique concourent à réfuter l'hypothèse du rôle de réservoir joué par le mouton dans l'épidémiologie de l'arbovirose West Nile.

B) *Porc.*

Aucun animal n'a réagi cliniquement et virologiquement à l'inoculation expérimentale, même aux doses très élevées (500.000 DL 50 souris) et au mode d'inoculation de sévérité maximale (voie intracérébrale). Du point de vue sérologique, des anticorps I. H. A. apparaissent chez tous les sujets, à des taux variables (1/40 à 1/300^e) dès le 7^e jour, mais ne persistent pas chez 3 animaux sur 5, quelle que soit la voie d'inoculation.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus en Camargue dans un élevage porcin, où un pourcentage élevé d'animaux à sérologie positive fut décelé lors d'une enquête épidémiologique, mais sans vérification ultérieure de la persistance des anticorps ; or, les enquêtes sérologiques effectuées précédemment dans cette espèce, et, en particulier, chez des porcs sentinelles, étaient toujours restées négatives.

La conjonction exceptionnelle d'un certain nombre de facteurs pourrait éventuellement expliquer la réactivité immunologique de ce troupeau de porcs et de quelques sangliers : pullulation vectorielle intense, source de virus importante, coïncidence entre le moment des prélèvements et l'intensité maximale de cette sérologie éphémère.

Cependant l'absence de maladie clinique, dans les conditions naturelles et expérimentales, et surtout de virémie, engage à éliminer le porc comme animal réservoir de virus, de même que le sanglier, dont la harde est d'une forte densité en Camargue.

Dans l'ensemble, les constatations expérimentales, enregistrées chez le mouton et le porc, confirment donc les observations épidémiologiques effectuées sur le terrain et s'accordent, dans

cette région, avec la rareté du porc d'élevage et l'absence, au cours de la période estivale de pullulation vectorielle, des moutons transhumants.

CONCLUSIONS

1° La reproduction expérimentale de la méningoencéphalomyélite naturelle à virus West Nile (groupe B des arbovirus) a été étudiée sur 8 moutons et 5 porcs, sous différentes conditions, après inoculation d'une souche virale isolée chez le cheval en Camargue (souche Halima II).

2° La maladie clinique n'est reproductible que chez le mouton, seulement après inoculation par voie intra-cérébrale et à des doses très importantes de virus (200.000 DL 50 souris).

3° L'infection se résume en une méningoencéphalomyélite avec atteinte de la substance grise. La courbe thermique présente un seul pic, le 6^e ou le 7^e jour. Cette maladie expérimentale peut évoluer vers la mort vers le 12^e jour ou vers la guérison sans aucune séquelle neurologique. L'évolution est diphasique, avec une phase fébrile initiale et une phase d'expression neurologique, au cours de laquelle on peut déceler des anomalies électriques, témoins de la localisation cérébrale du virus et des lésions névraxiques qu'il entraîne.

4° La virémie n'apparaît que chez les animaux malades et demeure toujours faible et brève.

5° Le réisolement du virus à partir du névraxe est possible.

6° La réponse sérologique est précoce chez les deux espèces, mais le plus souvent faible et très fugace.

La preuve de la non-sensibilité expérimentale et probablement la non-réceptivité naturelle est fournie par l'absence de réponse chez les moutons inoculés simultanément par les voies sous-cutanées et intra-veineuse, reproduisant très artificiellement la piqûre du vecteur infecté et chez les porcs par toutes les voies ; elle permet d'infirmer l'hypothèse d'un rôle de réservoir de virus joué par ces espèces dans l'épidémiologie de l'arbovirose à virus West Nile en Camargue.

BIBLIOGRAPHIE

1. JOUBERT (L.), OUDAR (J.), HANNOUN (C.) et CHIPPAUX (M.). — Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. III. Relations entre la virologie, la sérologie et l'évolution anatomo-clinique. Conséquences épidémiologiques et prophylactiques. *Bull. Acad. Vét. France*, 1971, **44**, 159-167.
 2. JOUBERT (L.), OUDAR (J.), HANNOUN (C.), BEYTOUT (D.), CORNIOU (B.), GUILLON (J.-C.) et PANTHIER (R.). — Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. IV. La méningo-encéphalomyélite du cheval. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1970, **118**, 239-247.
 3. MOUCHET (J.), RAGEAU (J.), LAUMOND (C.), HANNOUN (C.), BEYTOUT (D.), OUDAR (J.), CORNIOU (B.) et CHIPPAUX (A.). — Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. V. Le vecteur *Culex modestus Ficalbi Diptera culicidae*. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1970, **118**, 839-855.
 4. OUDAR (J.), JOUBERT (L.), HANNOUN (C.) et CORNIOU (B.). — Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. I. Etude virologique et sérologique. *Bull. Acad. Vét. France*, 1971, **44**, 107-122.
 5. OUDAR (J.), JOUBERT (L.), LAPRAS (M.) et GUILLON (J.-C.). — Reproduction expérimentale de la méningo-encéphalomyélite du cheval par l'arbovirus West Nile. II. Etude anatomo-clinique. *Bull. Acad. Vét. France*, 1971, **44**, 147-158.
 6. PANTHIER (R.), HANNOUN (C.), BEYTOUT (D.) et MOUCHET (J.). — Epidémiologie du virus West Nile : étude d'un foyer en Camargue. III. Les maladies humaines. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1968, **115**, 435-445.
-