

COMMUNICATION

Pathogénicité résiduelle d'une souche de virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (Indiana) de culture cellulaire

III. — Histopathologie des lésions cutanéomuqueuses et cytologie cellulaire

par

L. JOUBERT, P. TUAILLON, M^{lle} Françoise CHABROUTY
M. FEDIDA, Ph. DESMETTRE et M. PRAVE

La forte pathogénicité résiduelle d'une souche de virus de la stomatite vésiculeuse contagieuse (Indiana), entretenue exclusivement sur cellules L souris pendant de nombreux passages en laboratoire de virologie fondamentale, sans retour à l'animal, a été prouvée *in vivo* sur animal réceptif (cheval, bovin, porc, mouton, chèvre, cobaye) et chez l'homme (L. JOUBERT et coll. (3, 4).

L'étude des lésions spécifiques, très semblables à celles déterminées par le virus aphteux (JOUBERT et MACKOWIAK (6), MOHEB el NIMZ (8), méritait d'être effectuée comparativement sur les plans histopathologique sur l'animal et cytologique sur culture cellulaire.

I. — HISTOPATHOLOGIE DES LÉSIONS CUTANÉO-MUQUEUSES

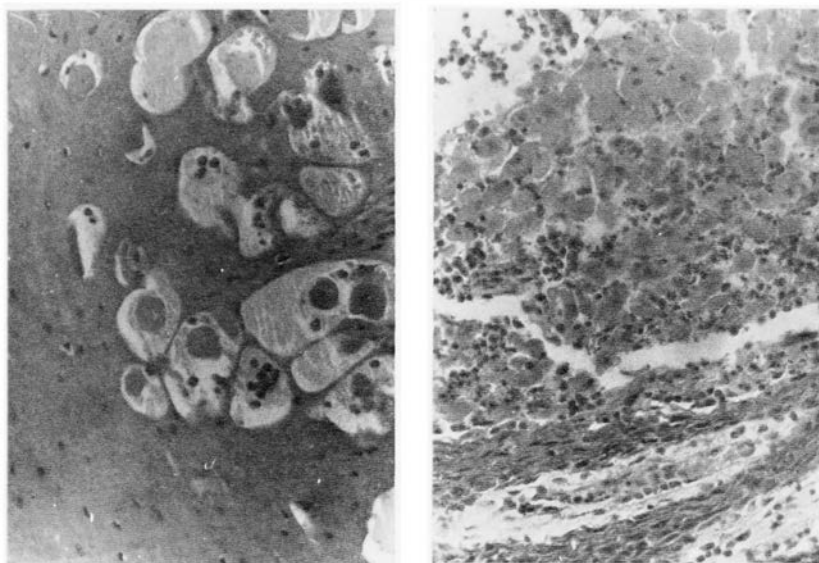
Les lésions macroscopiques et microscopiques dues au virus de la S. V. C. se rapprochent de celles dues au virus aphteux (WAGENER (13), SCHUBODE (10), CHOW et coll. (1), RIBELIN (9), SEIBOLD et SHARP (11).

Les examens ont porté sur la maladie expérimentale déterminée par un virus de culture chez le cheval, le bovin, le mouton, la chèvre (muqueuse linguale), le porc (bourrelet coronaire) et le cobaye (derme plantaire).

Bull. Acad. Vét. — Tome XLVI (Mars 1973). — Vigot Frères, Editeurs.

BULLETIN ACADEMIE VÉTÉRINAIRE

3 *



PHOTOS N° 1 et 2 . — Histopathologie des lésions de fièvre aphteuse de la muqueuse linguale du mouton (Hémalun phloxine safran $\times 250$)

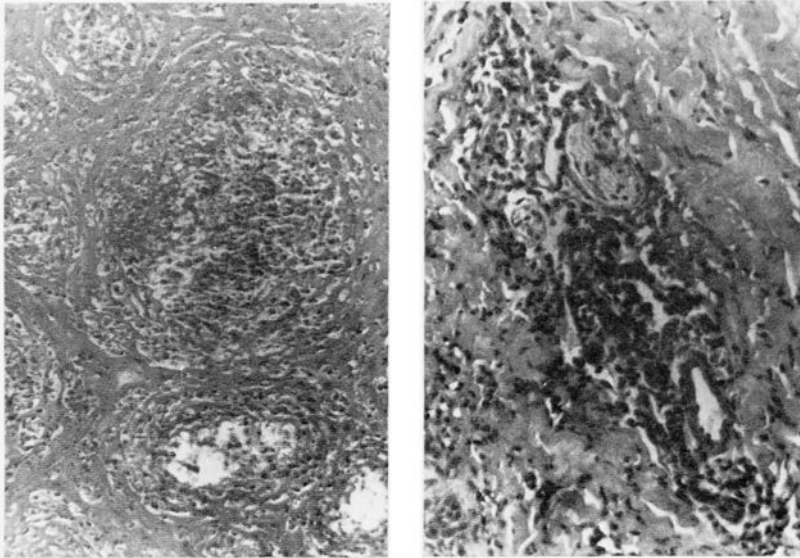
A gauche, bulles liées à une acantholyse. Lésions parcellaires voisinant un épithélium sain.

A droite, lésion plus étendue et plus évoluée en voie de nécrose. Infiltration par les éléments figurés à l'intérieur de la bulle, qui repose sur un plancher non lésé, avec respect de la couche génératrice.

Les lésions de la S. V. C. (photo n° 3) doivent être décrites par comparaison avec celles de la fièvre aphteuse (photos n° 1, 2, 4), sur la base d'une évolution assez semblable, avec dégénérescence ballonnante et réticulée, formation d'une vésicule, qui s'abrase ultérieurement en mettant à nu le chorion sous-jacent. Quatre caractères individualisent les lésions de la S. V. C. au point d'en définir un diagnostic histopathologique différentiel d'orientation précoce avec les lésions aphteuses.

En effet, en accord avec la rapidité et la sévérité plus grandes de l'action cytopathogène cellulaire *in vitro* du virus de la S. V. C. (6 h contre 24 à 48 h), les lésions de la stomatite vésiculeuse se révèlent, à la fois, plus rapides, plus nécrotiques, plus diffuses et plus profonde.

A) *Plus rapides*, car le stade de la vésicule est franchi très vite et on accède directement au stade de la nécrose : les titrages sur animal



3

4

PHOTO N° 3. — Histopathologie des lésions de la stomatite vésiculeuse contagieuse du bourrelet unguéal de porc (Hémalun phloxine safran $\times 250$). Juxtaposition de lésions d'emblée nécrotiques, sans passage par différents stades intermédiaires. La membrane basale est rompue.

PHOTO N° 4. — Histopathologie des lésions de fièvre aphteuse de la muqueuse linguale de mouton (Hémalun phloxine safran $\times 250$). Infiltration inflammatoire autour du plexus vasculo-nerveux superficiel dans le chorion, en regard d'une lésion constituée. De telles lésions semblent absentes dans la stomatite vésiculeuse contagieuse, mais très importantes dans la maladie vésiculaire du porc.

réceptif exigeant du reste une lecture avant 24 h (contre 24 à 48 h pour le virus aphteux).

Alors que, dans la fièvre aphteuse, les divers stades évolutifs s'observent sur une même coupe, avec élargissement progressif du foyer initial, à l'emporte-pièce, dans le stratum granulosum, tant latéralement que vers la couche cornée, en revanche, dans la S. V. C., la vésiculation est brutale, sidérante. Elle entraîne la disparition très rapide de toutes les assises cellulaires au-dessus du stratum granulosum, sans progression stade à stade. Enfin, si le « plancher » initial de la lésion semble se situer à un étage superficiel, il s'abaisse rapidement et tend à gagner d'emblée la couche génératrice.

B) *Plus nécrotiques*, car la desmolyse et l'acantholyse, constantes dans la fièvre aphteuse, ne sont ici pas interprétables. L'atteinte périphérique initiale des cellules épineuses est remplacée d'emblée par une lyse cellulaire totale et une nécrose quasi immédiate. Après un stade fugace de turgescence cytoplasmique, la destruction très rapide des cellules laisse apparaître une nécrose de liquéfaction, qui entraîne en quelques heures l'abrasion des assises supérieures et la mise à nu du chorion.

C) *Plus diffuses*, car aucune image focalisée n'est observable, à l'inverse de la fièvre aphteuse ; au contraire la totalité des assises cellulaires est touchée simultanément. Le virus de la S. V. C. paraît ainsi montrer une pathogénicité plus brutale vis-à-vis de l'ensemble des cellules du revêtement cutanéomuqueux.

D) *Plus profondes*, car, à l'inverse du virus aphteux, qui n'intéresse jamais l'assise génératrice, le virus de la S. V. C. inflige des lésions au corps muqueux de MALPIGHI. Aussi, certaines cicatrices indélébiles tendent-elles à constituer des séquelles de l'infection. Toutefois, les signes inflammatoires sous-jacents semblent plus discrets que dans la fièvre aphteuse, où des infiltrations progressives de polynucléaires, surtout éosinophiles, se manifestent, en particulier au niveau des plexus vasculo-nerveux superficiels du derme (Photo n° 4) (*).

Par ailleurs, aucune image spécifique cytoplasmique ou nucléaire, en particulier aucune inclusion ne se manifeste dans les cellules au cours de ces deux infections virales.

II. — CYTOLOGIE DES CELLULES INFECTÉES EN CULTURE

La recherche des lésions a été opérée sur deux systèmes cellulaires : lignée de cellules de reins hamster (BHK21) et lignée de cellules de moustiques (*Aedes albopictus*), choisis parmi l'éventail considérable des systèmes cellulaires reconnus sensibles au virus, depuis le travail initial de Cox et coll. (2) sur cellules d'embryon de poulet.

(*) Lésions très majorées dans l'actuelle maladie vésiculaire du porc, et qui légitimeraient un diagnostic histopathologique différentiel d'orientation précoce vis-à-vis de la S. V. C. et de la fièvre aphteuse. Nous remercions vivement les Docteurs L. et L. DHENNIN (Laboratoire Central de Recherches vétérinaires à Maisons-Alfort) de nous avoir adressé les prélèvements de vésicules podales de la maladie vésiculaire du porc.

A) *Cultures cellulaires.*

1) *La lignée BHK21* a été cultivée à 37 °C en milieu de croissance de STOCKER-Mc PHERSAN, dilué à 1/5 avec 10 à 15 p. 100 de sérum de veau inactivé. Les subcultures s'opèrent tous les 3 ou 4 jours par trypsination.

L'inoculation des cellules a utilisé des dilutions en PBS à 1/10, 1/20 et 1/50 du virus titrant $6,6 \cdot 10^8$ DICT 50/ml sur cellules L. Elle s'est opérée en flacons Falcon plastiques de 30 ml, puis rinçage au PBS. Chaque flacon a reçu 3,6 ml du milieu de survie de STOCKER à 4 p. 100 de sérum de veau inactivé et tamponné et 0,2 ml des dilutions virales. En 6 h, l'effet cytopathique s'étend à 75 p. 100 de la couche cellulaire et le virus titre $10^{8,9}$ DICT 50/ml sur souriceaux de 24 à 36 h après inoculation intracérébrale.

Après 4 passages avec témoins non inoculés et mise en réserve en congélateur, la cytologie est étudiée en tubes de LEIGHTON à temps multiples, toutes les 1/2 heures, en raison de l'extrême rapidité du développement viral et par comparaison avec les témoins.

Deux séries d'examen ont été réalisés. La première comprend l'inoculation de 0,1 ml de virus pur pour 1,9 ml de milieu de survie; les lamelles sont rincées au PBS, fixées à l'alcool méthylique pendant 30 mn, stockées en alcool à 80 p. 100, enfin colorées au May Grunwald Giemsa (technique de SCOTT).

La seconde comprend l'inoculation de 0,2 ml de virus à 10^{-1} pour 1,8 ml de milieu de survie; les lamelles, après rinçage, sont fixées au formol acide pendant 45 s, puis colorées à l'hématoxyline-phloxine.

L'E. C. P. est total après 8 h pour la première série, après 20 h pour la seconde série.

2) *La lignée de cellules de moustiques Ae. albopictus.* de SINGH (12) a été choisie parmi les nombreuses lignées comparables disponibles (WEISS) (14). Elle fut utilisée, en particulier, par MIR CHAMSY (*) et coll. (7) pour la culture de virus de la peste équine et par JOUBERT et coll. (5) pour celle du virus WEST NILE.

Etablie au VIRUS RESEARCH CENTER POONA (Inde), elle se trouve au 244^e passage en milieu YLE.

Les trypsinations, à 25 °C, s'opèrent tous les 4 jours et les splits s'effectuent à 1/2.

(*) Qui nous a adressé cette lignée et à qui nous adressons notre vive gratitude.

Les impératifs de culture sont *thermiques* (température maximale de 25 °C) et *biologiques* (proportion maximale de 5 p. 100 de sérum de veau et pH inférieur à 6,4).

L'inoculation du virus pur et à 10^{-1} s'effectue sur une culture de 3 jours en tubes de LEIGHTON avec du milieu YLE à pH 6,9, contenant 2 p. 100 de sérum de veau inactivé, à raison de 1,8 ml de milieu pour 0,2 ml de suspension virale.

Aucune lyse n'apparaît dans les 5 jours et, chaque jour, les lamelles sont fixées dans le méthanol et colorées au May Grunwald Giemsa. Trois passages sont ainsi opérés dans les mêmes conditions et avec les mêmes résultats, c'est-à-dire l'absence totale d'E. C. P.

Toutefois, la multiplication du virus est certaine, bien que l'infection demeure latente, comme l'indique la réussite de l'inoculation de retour au souriceau de 24 heures par voie cérébrale (mort en paralysie) et à la culture en BHK21 ; (ECP total en 24 heures) par ailleurs, l'antigénicité se révèle très faible.

B) *Etude cytologique.*

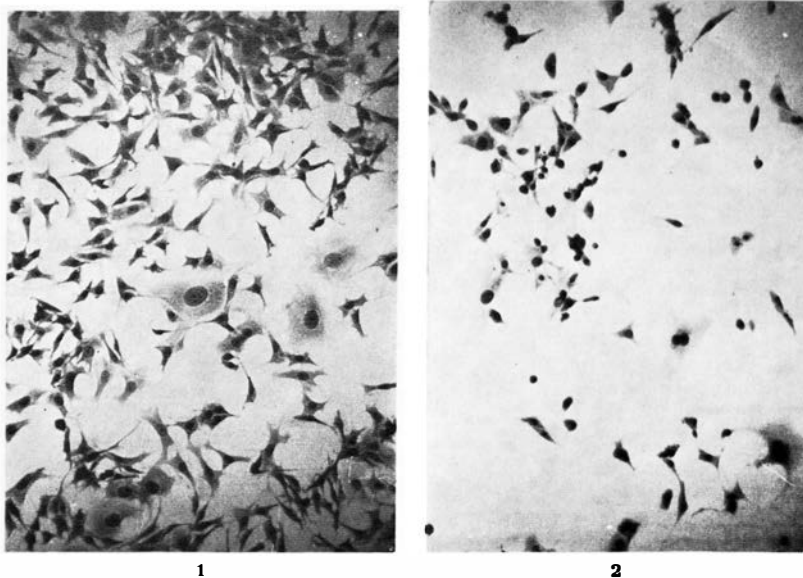
A l'inverse des cellules de moustiques, de morphologie inchangée par rapport aux témoins (photo n° 6), les cellules de BHK21 montrent des lésions rapides et peu spécifiques (photo n° 5).

Elles peuvent être comparées à un vieillissement très accéléré de la culture cellulaire : de nombreuses cellules disparaissent avant 8 heures, le noyau devient picnotique, le cytoplasme acidophile. Aucune inclusion, n'apparaît, non plus que les stades progressifs révélateurs de la souffrance cellulaire, à l'inverse de la fièvre aphteuse (JOURBERT et MACKOWIAK, 6).

DISCUSSION

1) *Virologie.*

A. — Sous réserve de l'ingérence des multiples facteurs éco-épidémiologiques fondamentaux dans les transmissions virales par vecteur, à étudier sur le terrain, sous réserve également de l'extrapolation contestable d'une espèce de moustique à l'autre et d'une culture virale sur cellules à une infection de l'insecte lui-même, les résultats ici obtenus semblent corroborer les observations réalisées dans les territoires d'épizootie, de climat subtropical sans saisons marquées.



PHOTOS N° 5. — *Effet cytopathique du virus de la S. V. C. (type Indiana) sur cellules BHK 21* (Fixation au méthanol, coloration au May Grunwald-Giemsa. Scott, G \times 100).

En 1 : Témoin après 10 heures.

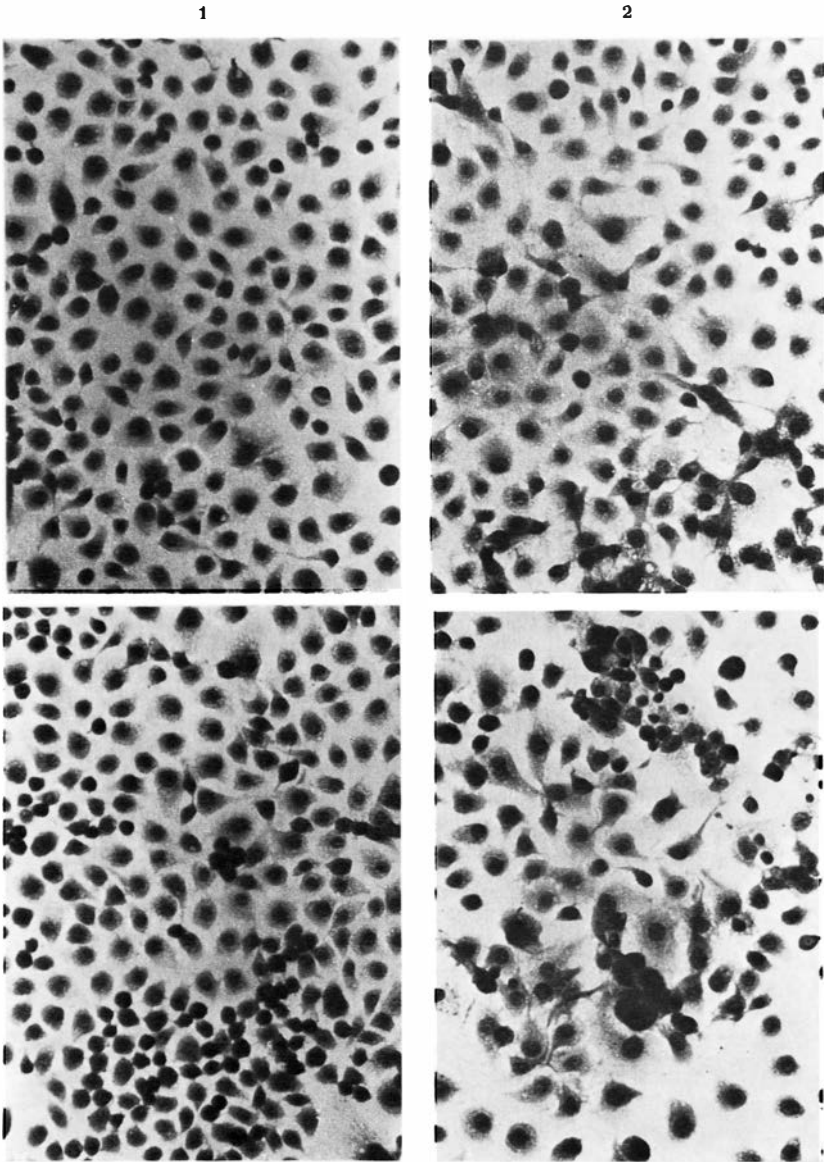
En 2 : culture après 10 heures. Lyse de nombreuses cellules, picnose, cytoplasme altéré, absence d'inclusions.

En effet, l'infection persistante sans lésion des cellules de moustiques confirme :

— d'une part, *en phase épizootique*, les modalités de la transmission virale de type biologique chez le vecteur, c'est-à-dire une incubation de une à deux semaines sans infectiosité immédiate, suivie d'une infectiosité prolongée par multiplication virale active durant toute la vie de l'arthropode ;

— d'autre part, *en phase inter-épizootique*, l'élargissement du rôle de vecteur à celui de réservoir entomologique de l'insecte infecté hibernant.

B. — Par ailleurs, la sensibilité conjointe des cellules de moustiques cultivés à 25 °C permettent de confirmer en partie l'appartenance du Rhabdovirus de la S. V. C. au groupe épidémiologique-



PHOTOS N° 6. — *Effet cytopathique virus de la S. V. C. (type Indiana) sur cellules de moustiques Ae. albopictus. (G × 250)*

En 1 : Témoin après 4 jours.

En 2 : Culture après 4 jours.

En haut : 1^{er} passage. En bas : 3^e passage. Absence d'effet cytopathique, raréfaction cellulaire peu significative.

ment dénommé « arbovirus », à transmission vectorielle de type biologique.

A l'inverse, les virus à transmission vectorielle de type seulement mécanique — tel le virus myxomateux — cultivent mal à températures infraoptimales, si ce n'est après entraînement en vue de l'obtention de souches « froides ».

C. — Enfin, la conjonction de la sensibilité (culture virale possible) et de la résistance (absence de cycle lytique et de lésion cytologique) des cellules de moustiques inciterait à considérer les Arboviroses comme des maladies initialement entomologiques, l'insecte infectable ayant acquis une résistance suffisante pour, de victime, se muer en vecteur de type biologique, la sensibilité des vertébrés au virus n'ayant été que secondaire.

Les vecteurs obligatoires pour un virus fragile pourraient alors diminuer la virulence des souches transmises et favoriser l'émergence des virus « froids » en les contraignant à l'adaptation thermique en zone infraoptimale.

2) *Histopathologie et cytologie.*

Les lésions cellulaires cutanéomuqueuses infligées *in vivo* et *in vitro* par le virus de la S. V. C. apparaissent plus rapides, plus lytiques, plus massives et plus profondes que celles obtenues après inoculation du virus aphteux.

Elles tendent à assigner au virus de la S. V. C. un tropisme épidermique d'un degré beaucoup plus brutal que celui du virus aphteux, qui paraît nanti, en revanche, d'un tropisme élargi vers les éléments du derme et aussi vis-à-vis du mésenchyme (lésions cardiaques en particulier).

CONCLUSIONS

1) Les lésions histopathologiques cutanéomuqueuses de la stomatite vésiculeuse contagieuse, de même que les lésions macroscopiques, se rapprochent de celles dues au virus aphteux, mais s'en séparent par certains caractères propres à définir un diagnostic histopathologique différentiel entre les deux infections.

2) Elles paraissent plus rapides, plus nécrotiques, plus diffuses et plus profondes que dans la fièvre aphteuse. Sans desmolyse initiale, elles entraînent l'abrasion immédiate, non progressive, des assises superficielles et tendent à atteindre la couche génératrice.

3) La brutalité des lésions se vérifie sur culture cellulaire BHK 21 en moins de 19 heures, sans laisser apparaître d'inclusion ni de signes précurseurs de la mort cellulaire, comme en histopathologie.

4) L'infection latente, sans lésion cytopathique, des cellules de moustiques *Aedes albopictus* suggère la sensibilité et la résistance conjointes de cette lignée cellulaire, ainsi que certaines conséquences épidémiologiques.

*Ecole Nationale Vétérinaire
Service des Maladies Contagieuses, I. N. R. A.
69337 Lyon Cédex 01
(Professeur Joubert)*

et

*Laboratoire de Virologie Animale
de la Direction des Services Vétérinaires
au Ministère de l'Agriculture
69342 Lyon Cédex 02
(Directeur : Professeur Lucam).*

BIBLIOGRAPHIE

1. CHOW (T. L.), HANSON (R. P.), MC NUTT (S. H.). — Proc. 88th Ann. Meet. Am. Vet. Med. Assoc., 1951, p. 119.
2. COX (H. R.), SYVERTON (J. T.), OLITZKY (P. K.). — Proc. Soc. Exp. Med., **30**, 1933, p. 896.
3. JOUBERT (L.), FEDIDA (M.), PRAVE (M.), DESMETTRES (Ph.), M^{lle} Myriam PEILLON. — Bull. Acad. Vét., France, 1973, p. 101.
4. JOUBERT (L.), FEDIDA (M.), PRAVE (M.), M^{me} Colette FAVIER, M^{lle} Myriam PEILLON. — Bull. Acad. Vét., France, 1973, p. 129.
5. JOUBERT (L.), TUAILLON (P.), PRAVE (M.), M^{lle} Françoise CHABROUTY. — Bull. Soc. sci. Vét., Lyon **74**, 1972, p. 312.
6. JOUBERT (L.), MACKOWIAK (C.). — La fièvre aphteuse. Exp. Sci. Fr. Paris, 1968.
7. MIRCHAMSY (H.), HAZZATI (A.), BAHRAMI (S.), SHAFYI (A.). — Am. J. Vet. Res., **31**, 1970, p. 1755-61.
8. MOHEB EL-NIMR (M.). — Contribution à la virologie et à l'histopathologie de la fièvre aphteuse chez le mouton. Thèse Doct. Spéc. Sci. Biol. Un. Cl. Bernard, Lyon 1972.
9. RIBELIN (W. E.). — Diss. Univ. Wisconsin, 1957, plol.
10. SCHUBODE (H. K.). — Thèse Doct. Hanovre 1934.
11. SEIBOLD (H. R.), SHARP (J. B.). — Am. J. Vet. Res., **21**, 1960, p. 35.
12. SINGH (K. R. P.). — Curr. Sci. **36**, 1967, p. 506; **37**, 1968, p. 65.
13. WAGENER (K.). — Arch. Tierhkd., **66**, 1933, p. 173, 301 et 363.
14. WEISS (E.). — Arthropod cell cultures and their application to the study of viruses. Springer-Verlag. N. Y. 1971. Current topics in Microbiology and Immunology, Vol. 55.

Le Gérant : C. BRESSOU