

Etude préliminaire de la synergie des variantes en matière de fièvre aphteuse

Influence sur la qualité immogène des vaccins antiaphteux

par FONTAINE J., ROUMIANTZEFF M., DUBOUCARD C.,
MACKOWIAK C. (*) (**)

A chaque apparition d'une épizootie de fièvre aphteuse provoquée par une nouvelle « variante » du virus, se pose le problème du barrage immunologique à opposer à la maladie, en complément des mesures sanitaires. Depuis longtemps, de nombreux auteurs (UBERTINI, MOOSBRUGGER, GIRARD, MACKOWIAK, WILLEMS, etc...) ont préconisé soit l'adoption de la nouvelle souche, soit l'emploi d'une « dominante » pour la fabrication du vaccin. Mais ces changements ne sont pas toujours possibles ou demandent des délais assez longs.

Lors de l'apparition de la fièvre aphteuse à la frontière franco-espagnole en juillet-août 1964, ce problème nous fut posé. L'application de mesures sanitaires, associée à un rappel de vaccination de tous les animaux sensibles vivant autour de la zone infectée, jugula cette enzootie. Mais il fallait prévenir une nouvelle apparition de ce virus, et une solution possible consistait à l'ajouter au virus « O Flandres », jusque-là seul utilisé pour la préparation de la valence « O » du vaccin trivalent.

Les premiers résultats nous encouragèrent à adopter le mélange des souches « O Espagne 64 » et « O Flandres » pour notre production courante.

Une étude systématique par établissement des doses vaccinales 50 p. 100 sur cobayes (DVC 50) (4) confirma l'intérêt présenté par cette association.

(*) Les auteurs remercient M. DUPASQUIER pour sa collaboration.

(**) Travail de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse, Lyon, Directeur Dr Vre C. MACKOWIAK.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. VACCINS.

Les vaccins sont préparés à partir de virus obtenu par culture soit sur cellules BHK 21 de Macpherson et Stoker (3), soit sur épithélium lingual d'origine bovine, en survie. Le virus est inactivé par action ménagée de la chaleur et du formol, adsorbé sur hydroxyde d'alumine et additionné de saponine.

Pour les expériences rapportées ici, les vaccins correspondant à chaque variante sont préparés séparément et toujours à partir d'une souche unique, pure, de virus ; les mélanges sont réalisés par addition, à volume égal, de deux vaccins.

2. COBAYES.

Ce sont des cobayes de race albinos (race Pirbright) de 450 à 500 grammes, élevés dans notre ferme expérimentale dans des conditions constantes.

3. VIRUS.

A. Liste des souches « O » utilisées.

- O Flandres : souche d'origine belge qui nous est parvenue en 1957.
- O Espagne 64 : souche isolée en juillet-août 1964 à la frontière franco-espagnole (exploitation Grau à Osseja, Pyrénées-Orientales).
- O Sicile 58 : souche isolée en 1958 par Nobili au cours d'une enzootie en Sicile.
- O Normandie : souche isolée en décembre 1950 par Girard et Mackowiak en Normandie.
- O Guadeloupe : souche isolée en 1964, à la Guadeloupe, remise par le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort.
- O Lausanne 65 : souche isolée au cours de l'épidémie qui a sévi en Europe en 1965 et 1966.

Ces virus « O » se sont révélés différents au cours d'études par réaction de fixation du complément ou vaccinations croisées, dont nous avons exposé les résultats par ailleurs (1, 2, 5).

B. — *Préparation du virus pour l'épreuve des cobayes.*

Chacune de ces 6 souches a été passée à l'origine sur bovin, puis adaptée au cobaye par inoculation intradermoplantaire et récolte des aphtes. Le virus, parfaitement adapté (5^e au 7^e passage), permet la préparation d'un virus-stock conservé à — 70° C pour les épreuves virulentes.

Ce virus d'épreuve adapté est titré sur cobayes et le titre 50 p. 100 est calculé en fonction du nombre de cobayes montrant une généralisation pour chaque dilution inoculée.

Les titres obtenus sont les suivants :

Souche	Nombre de passages sur cobayes	Titre sur cobaye (unités généralisantes 50 %)	Titre du virus initial sur bovins (unités infectieuses 50 %)
O Flandres.....	8	10 ^{6,7} /ml	10 ^{5,7} /g
O Espagne 64.....	7	10 ^{6,5} /ml	10 ^{5,5} /g
O Sicile 58.....	8	10 ^{7,3} /ml	10 ^{6,7} /g
O Normandie.....	7	10 ^{6,6} /ml	10 ^{5,9} /g
O Guadeloupe.....	7	10 ^{7,1} /ml	10 ^{6,8} /g
O Lausanne 65.....	7	10 ^{7,6} /ml	10 ⁸ /g

4. — DOSE VACCINANTE 50 p. 100 ET DOSE VACCINANTE 50 p. 100 CROISÉE.

A. *Etablissement de la dose vaccinante 50 p. 100 sur cobayes (DVC 50).*

4 ou 5 groupes de 8 cobayes sont vaccinés par voie intramusculaire avec des dilutions progressives de vaccins (1/4, 1/16, 1/32 et 1/64 de dose moyenne bovine par exemple). Ces dilutions de vaccin sont réalisées dans un tampon inerte et le volume injecté est constant : 1,6 ml par cobaye (4).

Dix jours plus tard, tous les cobayes vaccinés (ainsi que 8 cobayes témoins) sont éprouvés par l'inoculation de 10.000 UG 50 (unités généralisantes 50 p. 100) par voie intradermoplantaire.

Au 7^e jour, les cobayes présentant une maladie généralisée sont dénombrés et la dose vaccinante 50 p. 100 est calculée par la méthode de LITCHFIELD (7), méthode de calcul simplifiée, dérivée des probits.

B. *Etablissement des doses vaccinales 50 p. 100 croisées.*

a) *Etude d'immunité croisée.*

Les cobayes immunisés avec un vaccin préparé à partir d'une souche donnée sont éprouvés d'une part avec cette souche (épreuve homologe), d'autre part avec la ou les autres variantes (épreuves hétérologues). On établit alors le rapport :

$$\frac{\text{DVC 50 homologue}}{\text{DVC 50 hétérologue}}$$

Lorsque les variantes sont différentes, il est évident que la dose vaccinale 50 p. 100 sera plus élevée avec l'épreuve hétérologue qu'avec l'épreuve homologe. Ce rapport définit la différence immunologique existant entre les deux variantes considérées (2) ; plus il est proche de 1, plus les variantes sont semblables ; au contraire, plus il tend vers 0, plus elles sont éloignées.

b) *Etude de l'influence des mélanges de deux variantes.*

Les cobayes sont immunisés dans les mêmes conditions, mais avec une préparation réalisée par le mélange à parties égales de deux vaccins. Les dilutions et les volumes restant semblables à ceux utilisés avec les vaccins purs, on peut donc dire, par exemple, que la dilution 1/4 du mélange O Flandres + O Sicile comporte 1/8 de O Flandres et 1/8 de O Sicile.

II. RÉSULTATS

1. — *Etude immunologique croisée des vaccins « O Flandres », « O Espagne 64 » et « O Sicile 58 » et de leur association 2 à 2 par Etablissement des Doses Vaccinales 50 p. 100 sur Cobayes.*

Le tableau n° 1 récapitule les valeurs des rapports

$$\frac{\text{DVC 50 homologue}}{\text{DVC 50 hétérologue}}$$

obtenus dans plusieurs séries d'expériences et montre que nous avons bien affaire à trois souches différentes, la souche « O Espagne 64 » étant intermédiaire entre les souches « O Flandres » et « O Sicile 58 ».

Le tableau n° 2 rapporte une série complète d'expériences avec les vaccins « O Flandres », « O Espagne 64 » et « O Sicile 58 » et leurs mélanges réciproques.

TABLEAU N° 1

*Valeur relative des vaccins homologues et hétérologues
virus O Flandres, O Sicile 58, O Espagne 64, O Normandie*

Vaccins Virus d'épreuve	O Flandres	O Espagne 64	O Sicile 58	O Normandie
O Flandres . .	1	0,14 à 0,30 (5 essais)	0,20 à 0,25 (4 essais)	0,50 (1 essai)
O Espagne 64.	0,5 à 1 (6 essais)	1	0,5 à 1 (2 essais)	1 (1 essai)
O Sicile 58 . . .	0,20 à 0,25 (4 essais)	0,25 à 0,5 (4 essais)	1	1 (1 essai)
O Normandie .	0,1 à 0,4 (2 essais)	0,5 (1 essai)	0,06 (1 essai)	1

légende : Valeur relative = $\frac{\text{DVC 50 homologue}}{\text{DVC 50 hétérologue}}$

A. Des groupes de cobayes sont immunisés avec les vaccins préparés à partir d'une souche unique : on retrouve les différences immunologiques voisines de celles rapportées au tableau n° 1.

B. Des groupes de cobayes sont vaccinés avec des mélanges à parties égales de deux vaccins préparés à partir d'une souche unique.

— Les valeurs des deux doses vaccinales 50 p. 100 homologues (les épreuves sont faites avec l'un ou l'autre des deux virus qui ont servi à préparer les deux vaccins du mélange) montrent que le pouvoir immunogène du mélange de 2 variantes est toujours égal ou supérieur au pouvoir immunogène du vaccin préparé à partir de la souche homologue unique.

— Les valeurs des doses vaccinales 50 p. 100 hétérologues (les épreuves sont faites avec des virus qui ne correspondent pas aux deux variantes qui ont servi à préparer les deux vaccins du mélange) montrent que le pouvoir immunogène du mélange de deux variantes est généralement supérieur au pouvoir immunogène du vaccin préparé à partir des souches uniques hétérologues.

TABLEAU N° 2

Epreuves croisées O Flandres, O Espagne 64, O Sicile 58, par établissement de la dose vaccinante 50 % chez le cobaye

Virus d'épreuve	Vaccins fabriqués à partir d'une souche unique			Vaccins constitués par le mélange de 2 vaccins fabriqués à partir d'une souche unique (x)		
	DVC 50 vaccin O Flandres n° 5128	DVC 50 vaccin O Espagne 64 n° 5129	DVC 50 vaccin O Sicile 58 E 2080	DVC 50 mélange O Sicile 58 + O Flandres	DVC 50 mélange O Flandres + O Espagne 64	DVC 50 mélange O Espagne 64 + O Sicile 58
O Flandres	0,33 ml	0,50 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,18 ml	0,30 ml
O Espagne 64 . . .	0,60 ml	0,09 ml	0,10 ml	0,20 ml	0,20 ml	0,07 ml
O Sicile 58	1,60 ml	0,38 ml	0,06 ml		0,29 ml	

(x) Les DVC 50 sont exprimées par le volume total constitué par le mélange à parties égales de chacun des deux vaccins.

Au surplus, il faut remarquer que, quel que soit le mélange et quelle que soit l'épreuve, les valeurs des DVC 50 obtenues avec les mélanges sont beaucoup plus rapprochées que les valeurs des DVC 50 des vaccins préparés avec une souche unique.

2. — « Spectre » antigénique de l'Association « O Espagne 64 » + « O Flandres » vis-à-vis de six souches de type « O ».

Nous avons ensuite recherché les doses vaccinales 50 p. 100 sur cobayes du mélange « O Flandres » + « O Espagne 64 » contre 4 autres variantes : « O Sicile 58 », « O Normandie », « O Guadeloupe », « O Lausanne 65 » afin de déterminer le « spectre » antigénique de ce mélange (tableau n° 3).

TABLEAU N° 3
Doses vaccinales 50 % sur cobayes

Virus d'épreuve	Vaccin		Mélange
	O Flandres n° 2103	O Espagne 64 n° 2106	O Flandres + O Espagne n° 2103 + n° 2106
O Flandres	0,035	0,075	0,095
O Espagne 64	0,14	0,065	0,034
O Sicile 58	0,45	0,07	0,07
O Normandie	0,30	0,10	0,22
O Guadeloupe			0,02
O Lausanne 65	0,28	0,12	0,095

Nous pouvons constater que s'il n'y avait qu'un simple phénomène de dilution des vaccins, nous n'obtiendrions une protection valable que pour les deux variantes du mélange (les variations apparentes ne dépassent pas les limites d'erreur de la méthode d'évaluation de la DVC 50 (4)). Les valeurs des DVC 50 prouvent au contraire que nous obtenons une protection correcte contre quatre autres variantes de même type.

III. — DISCUSSION

Les résultats exposés ci-dessus montrent que le mélange de deux vaccins préparés avec deux variantes différentes de type « O », permet de protéger aussi bien ou mieux, à volume total injecté égal, contre chacune des variantes du mélange.

Le mélange de deux vaccins préparés respectivement avec la souche « O Flandres » et la souche « O Espagne 64 », permet d'augmenter le « spectre » immunologique du vaccin vis-à-vis d'autres variantes de type « O ».

Notre travail se poursuit actuellement par l'étude du mélange « O Flandres » et « O Sicile 58 ». Or « O Sicile 58 » est plus éloigné sérologiquement et immunologiquement de « O Flandres » que « O Espagne 64 » (6-2). Nous espérons tirer ainsi des indications précieuses sur la nécessité d'employer des mélanges de vaccins fabriqués soit à partir de deux variantes proches, soit à partir de deux variantes éloignées pour augmenter le « spectre » antigénique d'un vaccin.

Il faut cependant être très prudent avant de tirer des conclusions définitives, car de nombreux éléments interviennent dans l'interprétation des faits. En effet, si nous avons pu faire un travail assez important sur cobayes, il est toutefois nécessaire de confirmer ces résultats sur animaux de l'espèce bovine.

Si par une étude en doses vaccinantes 50 p. 100 croisées sur cobayes, nous avons réellement une réponse immunologique quantitative, valable et comparable dans l'absolu lorsque l'on travaille avec une seule souche de virus, il n'en est pas de même dans une épreuve croisée, car interviennent alors les propriétés propres à chacune de ces souches, en dehors de leur pouvoir immunogène : certaines souches sont plus « agressives » et peuvent vaincre alors une immunité relativement forte. Un virus peut être également plus « adapté » à une espèce donnée : pour obtenir une protection équivalente des bovins contre le virus « O Espagne 64 » par une vaccination homologue, il faut inoculer une quantité beaucoup plus importante de « doses vaccinantes 50 p. 100 » cobayes, que pour protéger les bovins par vaccination homologue « O Flandres » contre une épreuve « O Flandres ».

Nous abordons actuellement, dans de nouveaux travaux, ces problèmes de complexes afin de déterminer le rôle du plus grand nombre possible de facteurs.

IV. — CONCLUSIONS

Une préparation constituée par un mélange de deux vaccins préparés à partir de deux variantes permet de protéger aussi bien ou mieux contre chacune de ces variantes. Les mélanges constitués par les souches « O Espagne 64 » et « O Flandres » permettent d'augmenter le « spectre » antigénique de ces variantes.

Il faut évidemment poursuivre ces essais préliminaires par des expériences sur bovins, dont la réalisation sera plus longue. Mais nous pouvons déjà noter les excellents résultats obtenus avec le vaccin constitué dans sa valence « O » par le mélange « O Flandres » + « O Espagne 64 » : ce vaccin a été employé avec succès au cours de l'épidémie européenne à virus « O » qui, quoique plus proche de « O Espagne 64 » que de « O Flandres », n'en est pas moins une variante sérologique et immunologique.

Ceci a une très grande importance pour constituer éventuellement un stock de vaccin en cas d'apparition d'une nouvelle souche de virus aphteux.

BIBLIOGRAPHIE

1. FONTAINE J., ROUMIANTZEFF M., TERRE J., DUBOUCARD C., GILBERT H., DHENNIN L. et MACKOWIAK C. — Etudes immunologique et sérologique de types et variantes du virus aphteux.
I — Etude comparative de deux souches de virus aphteux de type « O » : virus O Flandres et virus O Sicile 58. Bull. O. I. E., (9-10), 1964, p. 1143.
2. FONTAINE J., TERRE J., ROUMIANTZEFF M., DUBOUCARD C., BORNAREL P. et FAVRE H. — Méthodes d'étude immunologique des variantes du virus aphteux.
— Epreuve d'immunité croisée sur bovins.
— Doses vaccinales 50 p. 100 croisées sur cobayes.
— Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon 1966 **68**, p. 161.
3. LANG R., DUBOUCARD C., STELLMANN G., LEFTHERIOTIS E., ROUMIANTZEFF M., PETERMANN H. G., FONTAINE J. et BRANCHE R. — Emploi des cellules BHK 21 en virologie. C. R. Association Française des vétérinaires microbiologistes et spécialistes des maladies infectieuses (mars 1966).
4. MACKOWIAK C., FONTAINE J., TERRE J., STELLMANN C., ROUMIANTZEFF M. et PETERMANN H. G. — Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. Etude de la loi dose-effet et corrélation entre les doses vaccinales 50 p. 100 chez les cobayes et les bovins.
— Commission européenne de lutte contre la Fièvre Aphteuse, F. A. O., IFFA Lyon, 28 sept-1^{er} oct. 1965.
5. ROUMIANTZEFF M., STELLMANN C. et DUBOUCARD C. — Technique de fixation quantitative du complément appliquée à l'étude du virus de la fièvre aphteuse. Bull. Soc. Sci. Vét., Lyon, **67**, 1965 (3).
6. ROUMIANTZEFF M., DUBOUCARD C., FONTAINE J. et GILBERT H. — Méthodes sérologiques utilisées pour l'étude des variantes du virus aphteux.
— Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon 1966 **68**, p. 41.
7. STELLMANN C., TERRE J., ROUMIANTZEFF M. et BORNAREL P. — Contrôle quantitatif du vaccin antiaphteux. III — Analyse statistique par la méthode de Litchfield.
— Rev. Méd. Vét. **116** (8-9), 1965, p. 609-615.