

COMMUNICATIONS

Etude préliminaire d'un virus hémadsorbant-hémagglutinant isolé d'une lésion de pneumonie du veau

A. CHARTON, P. FAYE, J. LECOANET,
Cl. Le LAYEC et F. PATTE.

Les recherches consacrées au rôle étiologique des Myxovirus en pathologie bovine se sont multipliées au cours des dernières années. L'isolement, par OZAWA et CHOW (1958), de bovins atteints de « Shipping fever », d'un Myxovirus du type Newcastle (souche Padlock) a été rapidement suivi de celui, par REISINGER, HEDDLESTON et MANTHEI (1959), d'un Myxovirus Para-influenzae 3 (souche SF 4) présent dans les sécrétions nasales de bovins atteints, également, de fièvre des transports. La souche SF 4 a été largement utilisée, dans plusieurs pays, comme antigène, et a permis d'effectuer de nombreuses enquêtes sérologiques dans les troupeaux de Bovins, avec des résultats fréquemment positifs. Un certain nombre de souches de Myxovirus (assez restreint, d'ailleurs, comparativement à la fréquence des réponses sérologiques positives ci-dessus) ont été isolées depuis, dans d'autres pays que les U. S. A., à partir d'organes ou de sécrétions nasales prélevés sur des bovins de tous âges, les uns atteints de « shipping fever », les autres de Pasteurellose, de pneumo-entérites, de « maladie des muqueuses ». Pour ne rappeler que les plus connues de ces souches, citons : le Virus « Umea » (BAKOS et DINTER, 1960), en Suède ; le virus R 2V isolé en 1961 par BÔGEL en Allemagne de l'Ouest ; le virus T 1 de DAWSON et CRUICKSHANK (1961), en Angleterre ; la souche BN 1 isolée au Japon par INABA et Coll. en 1963, etc... Pour la plupart, les Myxovirus isolés de bovins appartiennent au sous-groupe Para-Influenzae, type 3.

La présence d'un virus hémadsorbant-hémagglutinant, dans une lésion de pneumonie du veau, n'avait pas encore été signalée en France.

Origine et culture du virus.

La souche PV 4 a été isolée d'une lésion d'hépatisation pulmonaire prélevée au cours de l'examen nécropsique d'un veau de 6 jours.

Le sujet provenait d'une exploitation dans laquelle sévissait, au cours de l'hiver 1964-1965, une enzootie de « Septicémie des veaux », avec un taux de morbidité élevé et une mortalité importante. Les examens bactériologiques pratiqués d'après les différents organes ont donné lieu par ailleurs à l'isolement d'*Escherichia coli* (foie) et de *Providencia* (poumon).

Un fragment de lésion pulmonaire (2 grammes environ) a été broyé au sable, mis en suspension 1/10 P/V en solution de HANKS, additionnée de pénicilline (200 U. O./ml) et de streptomycine (50 µg/ml). Le surnageant, récolté après centrifugation à 6.000 tours/minute, 40 minutes à + 4° C, a été utilisé comme inoculum, sur voiles monocellulaires de rein de veau embryonnaire de première explantation, avec deux heures d'incubation, à raison de 2 ml par flacon de pharmacie standard de 60 ml.

A la 36^e heure suivant l'inoculation, au moment de l'apparition des premiers effets cytopathogènes, les voiles cellulaires montraient un pouvoir d'hémadsorption intense (Fig. 1) pour les hématies humaines du groupe O Rh +, après quelques minutes à + 4°. Le phénomène était réversible, les hématies se libérant en une heure à 37°. Cette propriété a été utilisée, selon une technique adaptée de celle de CHANOCK et Coll. (1958) et basée sur la méthode de VÖGEL et SHELOKOV (1957), pour une première purification du virus : le deuxième passage a été effectué avec, pour inoculum, le surnageant obtenu par centrifugation d'une suspension d'hématies hémadsorbées, puis reprises après élution en soluté physiologique stérile additionné de tampon phosphates 0,05 M.

Le liquide de culture, récolté lors du 3^e passage en boîtes de Roux de 600 ml, congelé à — 35° puis décongelé, débarrassé des débris cellulaires par centrifugation à 3.000 tours/minute, 30 minutes à + 4°, a constitué une première réserve (300 ml environ) de virus.

— Le titre cytopathogène de ce liquide (TC 50 calculé selon la méthode des bilans cumulatifs, après dilutions en série 1/10) est de — 4.

— Son titre hémagglutinant, pour les hématies humaines O Rh +, après dilution en série 1/2, atteint 1/64.

Caractères morphologiques en microscopie optique.

L'effet cytopathogène, au 3^e passage, observé au microscope inversé, est brutal aux dilutions inférieures ou égales à 10⁻². Il se manifeste dès la 36^e heure ; les cellules atteintes, arrondies, fortement réfringentes, se détachent en quelques heures et passent en suspension dans le milieu. Aux dilutions — 3 et — 4, à partir du

2^e jour, apparaissent des lésions, très caractéristiques, de type syncytial, nombreuses, certaines cellules géantes atteignant une taille 20 à 30 fois supérieure à la taille moyenne des cellules saines (Fig. 2). Les voiles sont, en général, complètement détruits en 4 jours.

Après culture du virus sur cellules de rein de veau en tubes de LEIGHTON, la coloration des lamelles à l'Hémalum-éosine sur fixation au Bouin montre, au niveau des lésions syncytiales, une disparition complète des parois cellulaires, avec coalescence des cytoplasmes; les noyaux, apparemment indemmes, se groupent en amas irréguliers ou, plus souvent, en couronne, ou en fer à cheval. Le cytoplasme syncytial, granuleux, est fortement éosinophile (Fig. 3).

La coloration par l'acridine orange après fixation à l'alcool, fait apparaître au niveau de ces lésions, en éclairage U. V., une fluorescence rouge qui suggère la présence, d'une quantité d'ARN sans commune mesure avec celle qui confère normalement au cytoplasme des cellules saines une fluorescence rougeâtre.

Sensibilité aux agents physico-chimiques.

La même suspension virale, obtenue au 3^e passage selon le protocole défini ci-dessus, a été utilisée pour l'étude de la sensibilité du virus à la chaleur, aux variations de pH, à l'action de l'éther éthylique et du chloroforme.

— Après séjour de 30 minutes au bain-marie à 56° C, le virus a perdu tout pouvoir cytopathogène. Il résiste, par contre, à un séjour de 30 minutes à 50°.

— Mélangée à parties égales avec l'éther éthylique, à + 4° C, sous agitation permanente pendant 3 heures puis au repos au réfrigérateur à + 4° C pendant 12 heures, la suspension virale, débarrassée de l'éther par évaporation sous vide n'a plus d'effet cytopathogène. Son titre, par contre, ne baisse que d'un Log après traitement, dans les mêmes conditions de temps et de température, par le chloroforme à 10 p. 100.

— L'inoculation, après contact de deux heures à la température du laboratoire, du mélange, à parties égales, de la suspension virale avec des solutions de Mc ILVAINE tamponnées à pH 3, pH 5, pH 7, montre que, résistant à pH 5, le virus est détruit à pH 3.

Conclusions.

Cytopathogène dès les premières cultures pour les cellules de rein de veau embryonnaire de première explantation, mais sans effet cytopathogène apparent pour les cellules KB, BHK, de testicule d'agneau embryonnaire, actuellement entretenues au Laboratoire, le virus PV 4 est (au moins pour les hémathies humaines O Rh+)

hémadsorbant et hémagglutinant. L'élu­tion en soluté physiologique tamponné ne peut s'obtenir, d'ailleurs, sans un certain degré d'hémo­lyse.

Il est sensible à l'éther éthylique, ce qui suggère fortement l'exis­tence, dans sa constitution, d'une enveloppe. Sa résistance partielle au chloroforme n'est pas contradictoire avec cette hypothèse : cette différence de comportement, vis-à-vis des deux solvants des lipi­des, peut s'expliquer par une particularité de structure chimique des lipo-protéines entrant dans la composition de l'enveloppe virale.

Il se comporte, à l'observation en fluorescence après imprégnation des lésions par l'acridine orange, comme un ribovirus. Les lésions syncytiales, fréquentes, certaines englobant jusqu'à une cinquantaine de noyaux sont presque aussi volumineuses que les cellules géantes provoquées par le virus syncytial. Si ces divers caractères ne suffisent pas, en l'absence des résultats de l'étude sérologique actuellement en cours, à définir avec certitude le virus PV 4 comme membre du groupe des Myxovirus, ils constituent cependant une très forte présomption de l'appartenance de la souche à ce groupe. Cette présomption est d'ailleurs confirmée par l'étude, au microscope électronique, des caractères morphologiques des virions.

Deux faits paraissent devoir être soulignés : d'une part, le veau chez lequel le virus PV 4 a été isolé, atteint de « septicémie des veaux » était très jeune (6 jours) ; d'autre part, la seule bactérie isolée de la même lésion de pneumonie qui contenait le virus était du genre *Providencia* et seul a pu être isolé, des divers autres organes, un Colibacille à partir du foie. Il semble donc que le virus PV 4 ait joué un rôle prépondérant dans l'apparition de la lésion locale pulmonaire, et peut-être un rôle dans l'étiologie de la maladie générale mortelle.

*Laboratoire de la Chaire de Pathologie du bétail
de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (I.N.R.A.).*

BIBLIOGRAPHIE

- BAKOS (K.) et DINTER (Z.) (1960). — Identification of a bovine mucosal-disease virus isolated in Sweden as Myxovirus para-influenzae 3. *Nature*, London, **185**, 549-550.
- BÖGEL (K.) (1961). — Virologische Untersuchungs Befunde bei Kälbern mit respiratorischem Syndrom unter besonderer Berücksichtigung der Parainfluenza-3-virusinfektion. *Monatsh. Tierheilk*, **13**, 129-135 et 162-174.
- CHANOCK (R. M.), PARROTT (R. H.), COOK (K.), ANDREWS (B. E.), BELL (J.), REICHELDERFER (T.), KAPIKIAN (A.), MASTROTA (F. M.) et HUEBNER (R. J.) (1958). — Newly recognized Myxoviruses from children with respiratory disease. *New England J. Med.*, **258**, 207-213.

- INABA (Y.), OMORI (T.), KONO (M.) et MATUMOTO (M.) (1963). — Parainfluenza 3 virus isolated from Japanese cattle. I. Isolation and Identification. *Jap. J. exp. med.*, **33**, 313-329.
- OZAWA (Y.) et CHOW (T. L.) (1958). — A study and identification of Newcastle disease virus (NDV) from ranch cattle affected with shipping fever. *Poult. Sci.*, **37**, 802-809.
- REISINGER (R. C.), HEDDLESTON (K. L.), MANTHEI (C. A.) (1959). — A Myxovirus (SF 4) associated with shipping fever in cattle. *J. A. V. M. A.*, **135**, 147-152.
- VÖGEL (J.) et SHELOKOV (A.) (1957). — Adsorption — Hemagglutination Test for Influenza virus in Monkey Kidney tissue culture. *Science*, **126**, 358-359.
-