

Contribution à l'étude de l'hépatite contagieuse du chien

III. — Essai de « diagnostic enzymatique » de l'infection expérimentale du chien

par M. COMPAGNUCCI, Ch. PILET, A. CHEVET et P. GORET.

Les difficultés de diagnostic de l'hépatite infectieuse du chien (Maladie de RUBARTH) d'une part, l'intérêt diagnostique que présente en Médecine humaine la mesure de certaines activités enzymatiques tissulaires d'autre part, nous a incités à appliquer au diagnostic de cette infection les méthodes de mesures enzymatiques déjà utilisées chez l'homme.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode est basée sur le fait que la nécrose des tissus libère les enzymes qui y sont présentes à l'état physiologique et provoque une augmentation de leur taux dans le sang. La libération de ces enzymes ne surviendrait pas seulement dans le cas de nécrose tissulaire morphologiquement évidente, mais également à la suite d'altérations légères de l'équilibre biochimique au niveau de la cellule, altérations suffisantes pour entraîner des modifications sensibles de l'activité enzymatique du sérum sanguin.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Chiens : 7 chiots âgés de 40 jours et 1 chien âgé de 3 mois et demi environ ont été utilisés, l'un des chiots a été gardé comme témoin.

Virus : Nous avons utilisé pour inoculer les animaux du virus de RUBARTH de culture (DCT 50 : 10^{-6}). Tous les animaux ont été inoculés par voie intrapéritonéale à l'aide de 2 ml d'une dilution au 1/10 de cette culture. A un chien adulte, nous avons inoculé en même temps que le virus de culture et 6 jours plus tard, 3 g de tissu hépatique provenant d'un chiot mort d'hépatite contagieuse (le tissu a été broyé au mortier, et mis en suspension dans 5 ml d'eau

physiologique stérile contenant 5.000 U/ml de pénicilline et 5 mg/ml de streptomycine).

Sérum : Les animaux ont été saignés à jeun, à la veine saphène externe. Le sérum a été prélevé après un séjour des tubes de sang de 2 heures à l'étuve (à 37° C) et de 4 heures au réfrigérateur (à + 4° C). Chaque chien a été saigné 3 jours avant l'inoculation du virus, le jour de l'inoculation (2 heures avant), puis tous les jours pendant 3 jours et enfin tous les 2 jours, jusqu'à la mort de l'animal. Seul le chien n° 8 a été saigné tous les 3 jours à partir de l'inoculation.

DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

1) *Transaminase glutamique oxalacétique et transaminase glutamique pyruvique.*

Le taux de ces enzymes a été déterminé par la méthode colorimétrique en suivant la technique de FRIEDMAN et HAUGEN modifiée par l'Institut Biologique Toscan (Sclavo) qui nous a fourni les réactifs. On met en présence le sérum, un substrat (acide L aspartique, acide α céto-glutarique ou L₁ alanine et acide α céto-glutarique) et un colorant. L'activité transaminasique est évaluée en mesurant l'extinction lumineuse produite par les hydrazones formées par les acides cétoniques présents en fin de réaction.

On prend pour unité d'activité des transaminases l'unité de WROBLEWSKI et LA DUE qui correspond à une diminution de la densité optique de 0,001/ml de sérum minute avec une lumière d'une longueur d'ondes de 340 millimicrons.

Les lectures ont été effectuées sur l'électrocolorimètre universel tricellule JOBIN et YVON, avec une lumière de longueur d'onde de 490 millimicrons et de l'eau distillée comme témoin.

2) *Aldolase.*

Le taux de l'aldolase a été déterminé par méthode colorimétrique suivant la technique de SIBLEY et LEHENINGER modifiée par MANNUCCI et TIEZZI et suivant les instructions données par l'Institut Biologique Toscan (Sclavo) qui nous a fourni les réactifs. Le principe de la méthode est le suivant : les deux trioses phosphates libérées par l'enzyme aldolase réagissent avec la 2-4-dinitro-phénylhydrazine et forment de la phénylhydrazone qui, en milieu alcalin, donne une coloration d'intensité mesurable au colorimètre.

On prend pour unité d'aldolase la quantité d'enzyme qui, dans 1 ml de sérum, et pendant 1 heure à 37° C, scinde 1 μ l de fructose 1-6 diphosphate en deux trioses.

Les lectures ont été faites avec une lumière de longueur d'ondes 550 millimicrons sur l'électrocolorimètre universel tricellule JOBIN et YVON en prenant comme solution témoin celle préparée selon les instructions fournies avec les réactifs.

3) *Déshydrogénase lactique.*

Le taux de la déshydrogénase lactique a été déterminé par la méthode colorimétrique suivant la technique mise au point par l'Institut sérovaccinogène Toscan « Selavo ». Le principe de la méthode est le suivant : l'acide pyruvique formé réagit avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine en formant de la phénylhydrazone, qui en milieu alcalin donne une coloration d'intensité mesurable colorimétriquement.

L'unité colorimétrique de la déshydrogénase lactique correspond à la quantité d'enzyme qui, dans 1 ml de sérum, à 37° C, réduit en 1 minute 1 γ de pyruvate de Na en lactate de sodium.

Les lectures ont été effectuées avec une lumière de longueur d'ondes 520 millimicrons sur l'électrocolorimètre universel tricellule JOBIN et YVON, avec de l'eau distillée comme témoin.

4) *Leucine-aminopeptidase.*

La teneur des sérums en leucine-aminopeptidase a été mesurée par la méthode colorimétrique selon une technique basée sur les données de GREEN et BRAUNFALCO et suivant les instructions accompagnant les réactifs fournis par BOEHRINGER.

Le principe de la méthode est basé sur la détermination de la quantité de β -naphtylamine qui se forme après 1 heure d'incubation à 37° C.

On prend pour unité de leucine-aminopeptidase la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de sérum qui libère 1 γ de β -naphtylamine en 1 heure à 37° C.

Les lectures ont été faites avec une lumière de longueur d'ondes 490 millimicrons sur électrocolorimètre universel tricellule JOBIN et YVON en prenant comme solution témoin celle préparée selon les prescriptions de la technique employée.

Fixation du complément : la réaction de fixation du complément a été pratiquée sur les sérums prélevés avant et après l'infection, comme il est dit à propos de chacun des chiens, selon la méthode de KOLMER modifiée, habituellement utilisée dans notre laboratoire pour le diagnostic de la maladie de CARRÉ, de la maladie de RUBARTH, et de la Rhino-Amygdalite contagieuse.

Examen histologique : le foie de tous les animaux en expérience ont été soumis à un examen histologique (*).

RÉSULTATS

Tous les animaux présentèrent des lésions microscopiques du foie identifiables aux lésions de l'hépatite infectieuse à virus.

Les résultats du titrage des différents enzymes sont consignés dans le tableau récapitulatif ci-joint.

CONCLUSION

Le nombre d'animaux utilisé dans cette expérience est trop peu élevé pour autoriser des conclusions certaines. Néanmoins dans l'hépatite infectieuse expérimentale du chien, on observe — dans les jours qui suivent l'inoculation virulente — une augmentation très sensible dans le sérum de certaines enzymes. L'enzyme dont l'augmentation du titre sérique semble être la plus significative est la glutamique oxalacétique transaminase, viennent ensuite la glutamique pyruvique transaminase et l'aldolase. L'augmentation de la leucine aminopeptidase et la déshydrogénase lactique est beaucoup moins sensible.

L'augmentation du titre sérique semble être à son maximum du troisième au cinquième jour après l'inoculation virulente.

Il y a lieu d'observer que les activités enzymatiques des 2 transaminases, à l'inverse de ce que l'on signale dans l'hépatite à virus de l'homme et dans l'hépatite expérimentale de la souris, augmentent presque parallèlement.

Une étude similaire est actuellement en cours non plus sur des chiens inoculés expérimentalement, mais dans les conditions naturelles (**).

*(Laboratoire de Microbiologie, Ecole Vétérinaire d'Alfort,
Professeur P. GORET.
et Istituto di Malattie Infettive Profilassi e Polizia veterinaria
dell' Università di Messina, Prof. A. BONADUCE).*

(*) Nous prions M. le Professeur TISSEUR qui a effectué cet examen de bien vouloir accepter nos vifs remerciements.

(**) Nous remercions vivement nos confrères qui voudraient bien accepter de nous adresser du sérum *frais* et *non hémolysé* de chiens suspects de maladie de RUBARTH.

| Chiens | Age | Enzymes | Valeur des enzymes en U/ml | | | | | | | | | | | | Observations |
|------------|-----------|---------|----------------------------|-----|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|---|
| | | | avant l'infection | | Après l'infection. Jours : | | | | | | | | | | |
| | | | 3 j. | 2h. | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 7 | 9 | 10 | 11 | 15 | |
| 1 (témoin) | 40 j. | GOT | 23 | 24 | 21 | 27 | 28 | 25 | | 29 | 22 | | 24 | | |
| 2 | " | " | 21 | 23 | 82 | 204 | 320 | | | | | | | | |
| 3 | " | " | 25 | 26 | 96 | 228 | 320 | 396 | | | | | | | |
| 4 | " | " | 27 | 24 | 82 | 184 | 206 | 260 | | 206 | 158 | | 98 | | |
| 5 | " | " | 28 | 27 | 64 | 168 | 230 | 342 | | | | | | | |
| 6 | " | " | 21 | 20 | 72 | 192 | 212 | 310 | | | | | | | |
| 7 | " | " | 22 | 25 | 104 | 212 | 342 | 404 | | | | | | | |
| 8 | 3 I/2 ans | " | 35 | 34 | | | 206 | | 102 | | | 55 | | 38 | mort au 5e jour mort au 6e jour mort au 12e jour mort au 6e jour mort au 6e jour mort au 6e jour sacrié au 40e jour |
| 1 (témoin) | 40 j. | GPT | 22 | 25 | 23 | 22 | 27 | 24 | | 20 | 26 | | 25 | | |
| 2 | " | " | 20 | 23 | 105 | 168 | 244 | | | | | | | | |
| 3 | " | " | 28 | 22 | 87 | 238 | 210 | 252 | | | | | | | |
| 4 | " | " | 28 | 25 | 64 | 129 | 198 | 206 | | 148 | 122 | | 86 | | |
| 5 | " | " | 23 | 23 | 90 | 148 | 254 | 386 | | | | | | | |
| 6 | " | " | 24 | 26 | 75 | 160 | 226 | 398 | | | | | | | |
| 7 | " | " | 22 | 25 | 94 | 152 | 236 | 368 | | | | | | | |
| 8 | 3 I/2 ans | " | 23 | 20 | | | 192 | | | 148 | | 80 | | 32 | mort au 5e jour mort au 6e jour mort au 12e jour mort au 6e jour mort au 6e jour mort au 6e jour sacrié au 40e jour |
| 1 (témoin) | 40 j. | ALD | 8 | 13 | 15 | 9 | 12 | 16 | | 13 | 13 | | 12 | | |
| 2 | " | " | 10 | 14 | 27 | 32 | 56 | | | | | | | | |
| 3 | " | " | 8 | 13 | 26 | 38 | 49 | 66 | | | | | | | |
| 4 | " | " | 12 | 16 | 22 | 42 | 68 | 76 | | 92 | 74 | | 62 | | |
| 5 | " | " | 9 | 14 | 32 | 55 | 74 | 112 | | | | | | | |
| 6 | " | " | 14 | 12 | 18 | 34 | 48 | 65 | | | | | | | |
| 7 | " | " | 15 | 13 | 44 | 64 | 87 | 106 | | | | | | | |
| 8 | 3 I/2 ans | " | 14 | 13 | | | 65 | | 75 | | | 88 | | 24 | mort au 5e jour mort au 6e jour mort au 12e jour mort au 6e jour mort au 6e jour mort au 6e jour sacrié au 40e jour |
| 1 (témoin) | 40 j. | LDH | 44 | 46 | 41 | 48 | 43 | 50 | | 40 | 46 | | 46 | | |
| 2 | " | " | 42 | 50 | 58 | 71 | 85 | | | | | | | | |
| 3 | " | " | 41 | 46 | 53 | 64 | 85 | 71 | | | | | | | |
| 4 | " | " | 54 | 43 | 62 | 85 | 86 | 71 | | 62 | 71 | | 72 | | |
| 5 | " | " | 51 | 41 | 71 | 85 | 85 | 106 | | | | | | | |
| 6 | " | " | 42 | 48 | 61 | 78 | 89 | 98 | | | | | | | |
| 7 | " | " | 58 | 52 | 62 | 85 | 95 | 102 | | | | | | | |
| 8 | 3 ans I/2 | " | 49 | 54 | | | 49 | | 76 | | | 85 | | 54 | mort au 5e jour mort au 6e jour mort au 12e jour mort au 6e jour mort au 6e jour mort au 6e jour sacrié au 40e jour |
| 1 (témoin) | 40 j. | LAP | 225 | 280 | 340 | 260 | 250 | 275 | | 300 | 225 | | 250 | | |
| 2 | " | " | 225 | 200 | 303 | 380 | 460 | | | | | | | | |
| 3 | " | " | 200 | 250 | 330 | 420 | 550 | 630 | | | | | | | |
| 4 | " | " | 260 | 300 | 340 | 420 | 500 | 520 | | 480 | 420 | | 420 | | |
| 5 | " | " | 300 | 330 | 380 | 510 | 620 | 610 | | | | | | | |
| 6 | " | " | 250 | 225 | 320 | 380 | 450 | 560 | | | | | | | |
| 7 | " | " | 300 | 240 | 420 | 530 | 620 | 640 | | | | | | | |
| 8 | 3 I/2 ans | " | = | = | | | = | | = | | | = | | = | mort au 5e jour mort au 6e jour mort au 12e jour mort au 6e jour mort au 6e jour mort au 6e jour sacrié au 40e jour |