

COMMUNICATIONS

Culture du virus aphteux sur le lapin nouveau-né. Modification des pouvoirs pathogène et antigène.

par Jean VERGE, Alain PARAF, LOUIS DHENNIN,
Léone DHENNIN et Jean ASSO

Le virus aphteux est, selon la classification de LEVADITI, de type ecto-dermotrope et semble de ce fait pouvoir être transformé en virus neurotrope.

Jusqu'en ces dernières années, en dehors des espèces animales naturellement sensibles, bovins, ovins, caprins, porcins, seul le cobaye (1) avait permis entre les mains de HECKER le développement du virus par injection intra-plantaire. NAGEL (2), par inoculation intracérébrale chez la souris adulte, était parvenu à obtenir à la suite de nombreux passages une souche neurotrope.

Cependant en 1951, grâce aux travaux de SKINNER (3), les recherches se sont orientées sur l'adaptation du virus aphteux à des animaux nouveau-nés. Cet auteur réussit en effet les passages en série sur le souriceau ou le raton, âgés de moins de huit jours, par inoculation intra-péritonéale.

En 1955, LIKHACHJEV et GRIBANOV (4) en Russie, sans préciser leur protocole expérimental, constatent la culture du virus aphteux chez le lapin âgé de moins de 45 jours.

En 1954, CUNHA et EICHHORN (5) ont pu transmettre au lapin nouveau-né une souche de virus aphteux adaptée au souriceau pendant seize passages.

CIACCIO et GIROUD (6) en 1954 montraient que le virus cultive dans l'organisme du mériion jeune et adulte ou du lapin nouveau-né.

Cependant dans ce dernier cas sur 6 passages effectués avec une souche C adaptée au cobaye, 3 ne permirent pas de reproduire des aphtes sur le cobaye — ceci tenant vraisemblablement au fait

que les auteurs ont utilisé des animaux de plus de huit jours pour certains essais.

En 1957 (7), PALMA a pu réaliser quelques passages sur hamster nouveau-né d'une souche C adaptée au cobaye.

Il ressort de tous ces travaux que, hormis les expériences de SKINNER chez le souriceau et le raton nouveau-né, il n'a pas été possible d'adapter n'importe quelle souche durant un grand nombre de passages sur les animaux nouveau-nés.

L'un de nous (8), ayant pu mettre en lumière certaines lois quantitatives de la tolérance immunitaire, nous avons pensé qu'il serait possible d'adapter le virus aphteux aux animaux nouveau-nés âgés de moins de huit jours. C'est ainsi que nous avons pu cultiver n'importe quelle souche de virus aphteux sur le furet et sur le lapin.

Nous n'avons pas poursuivi cette étude au delà du quatrième passage sur le jeune furet, ce matériel de travail étant trop onéreux. Nous ne ferons donc que relater ici les expériences concernant l'adaptation du virus aphteux au lapin.

Nous exposerons successivement quatre séries d'expériences :

1° l'adaptation du virus aphteux au lapin nouveau-né et modification du pouvoir pathogène ;

2° l'adaptation directe du virus aphteux au lapin adulte ;

3° l'adaptation du virus aphteux au lapin adulte par passages alternés sur lapin nouveau-né ;

4° l'étude par la méthode de fixation du complément des propriétés antigéniques du virus adapté au lapin nouveau-né.

1° Adaptation du virus aphteux au lapin nouveau-né et modification du pouvoir pathogène.

Le virus à l'origine est représenté par une suspension en sérum physiologique tamponné à pH 7,6 d'épithélium lingual de bovin artificiellement infecté.

Les animaux d'expériences sont des lapins nouveau-nés de diverses lignées allaités naturellement.

La voie d'introduction est intrapéritonéale car nous voulions obtenir une souche pantrope, sans tendance au neurotropisme.

Chaque passage est contrôlé, par inoculation dans le derme plantaire de trois cobayes, d'une suspension d'organes de lapins

nouveau-nés morts de l'infection aphteuse. Les tissus de lapereau utilisés sont un mélange de muscle, de foie et de cœur.

Nous avons réalisé actuellement cinquante cinq passages avec le virus de type O₂ d'origine bovine, douze avec le type A₅ et quinze avec le type C.

Chacun de ces virus a subi vis-à-vis du lapereau une adaptation marquée par un pourcentage de plus en plus élevé d'animaux atteints. La mort de tous les animaux inoculés est observée dès le premier passage avec le virus C souche Loupaigne et seulement à partir du quatrième pour les souches de type O et A. Vingt quatre à trente six heures après l'inoculation (le délai étant le plus bref pour les animaux âgés de moins de six jours) les premières manifestations cliniques apparaissent : flaccidité des muscles abdominaux, difficulté du déplacement. Puis les signes de paralysie surviennent au niveau des membres postérieurs et s'étendent aux parties antérieures du corps.

Après six ou huit heures le lapereau est atteint d'une asthénie profonde, il ne peut plus lever la tête du sol et présente l'attitude d'un crucifié, membres antérieurs en croix et postérieurs dans le prolongement du corps ; la respiration est dyspnéique et la mort survient à cette phase de l'évolution environ quarante-huit heures après l'inoculation.

A l'autopsie on observe toujours une paralysie de la vessie et nous avons pu noter parfois des pétéchies sur les muscles fessiers et les cuisses. Jamais nous n'avons observé de lésion pulmonaire malgré la dyspnée, que l'on peut vraisemblablement rapporter à une paralysie des muscles respiratoires.

Les animaux présentent le maximum de sensibilité entre le troisième et le sixième jour après la naissance ; ils ne meurent que si l'injection de virus est effectuée avant le neuvième jour. Pratiquée entre le neuvième et le treizième jour, l'inoculation provoque seulement une flaccidité des muscles abdominaux et après le treizième jour l'injection du virus ne suscite aucune réaction apparente. Après un nombre de passages variable selon les souches, l'inoculation pratiquée entre le neuvième et le onzième jour entraîne la mort du lapereau nouveau-né.

La recherche du virus dans différents organes du lapereau, par inoculation au lapereau nouveau-né et au cobaye, a permis d'observer que durant les cinq premiers passages la virulence du cerveau est marquée puis disparaît, tandis que la richesse en virus des muscles et du foie suit une courbe inverse, ce qui marque

l'absence de neurotropisme de la souche obtenue. Le muscle cardiaque semble toujours très virulent.

Le sacrifice précoce de l'animal est à déconseiller car les tissus se montrent moins riches en virus que ceux d'un animal tué *in extremis* ou même autopsié immédiatement après la mort.

Le virus provenant du lapereau nouveau-né inoculé par voie intraplantaire au cobaye provoque, en règle générale, un aphte local en vingt-quatre heures et la généralisation après quarante-huit heures. Cependant certaines fluctuations de ce pouvoir pathogène ont pu être observées : c'est ainsi que les aphtes locaux sont mal développés avec absence de généralisation entre le vingtième et le trentième passage et que, par contre, la généralisation est plus rapide entre les trentième et cinquantième passages qu'entre les premier et vingtième passages.

Le virus provenant du lapereau nouveau-né garde pratiquement toute sa virulence pour les bovins : la souche bovine de type O utilisée, dont la dose minima infectante était de $10^{-7,5}$ (titrage par la méthode de Henderson) possédait une virulence de 10^{-7} au quinzième passage et de $10^{-7,1}$ au cinquantième passage. Les bovins inoculés manifestent ultérieurement tous les signes d'une fièvre aphteuse généralisée.

*
* *

2° Essai d'adaptation directe au lapin adulte d'une souche de virus adaptée au cobaye.

HOBMAIER (9), NICOLAU et GALLOWAY (10), GINS et FORTNER (11) ont montré la sensibilité relative du lapin à l'action pathogène du virus aphteux. Nous avons cherché à adapter le virus au lapin adulte comme nous l'avions réalisé vis-à-vis du lapereau nouveau-né.

Une souche de virus aphteux de type O adaptée au cobaye est inoculée par voie intra-muqueuse (lèvres et langue) au lapin adulte. Après quarante-huit heures on observe les aphtes primaires aux points d'inoculation et souvent, durant les jours qui suivent, de petits aphtes secondaires prennent naissance dans la cavité buccale et dans le nez, jamais en d'autres points du corps. Les lapins ne présentent pas de signes généraux (une forte élévation thermique fut notée chez un seul animal, quatre jours après l'inoculation). Dix passages en série ont pu être ainsi réalisés.

Les aphtes récoltés sur le lapin, inoculés au cobaye, permettent d'obtenir un gros aphte local suivi de l'apparition de lésions aux quatre membres et à la bouche. En revanche, l'inoculation de broyats de différents organes (rate, foie, poumon, cœur, sang) des lapins infectés ne suscite pas l'apparition chez le cobaye de lésions révélant la présence du virus

Nous avons pu observer un cas de contamination naturelle directe de lapin à lapin par simple contact ; cette aphtisation peut être reproduite en frottant le museau d'un lapin présentant des aphtes primaires contre celui d'un animal sain.

*
* *

3° Essais d'adaptation du virus aphteux au lapin adulte par passages obtenus sur lapin nouveau-né.

Nous avons tenté d'obtenir la multiplication du virus aphteux adapté au lapereau de huit jours chez le lapin adulte.

Nous fondant sur le dermatropisme du virus aphteux, nous avons épilé et sacrifié les flancs des adultes préalablement à l'inoculation intraveineuse d'un broyat d'organe provenant de lapereau infecté.

Deux jours après l'injection de virus on observe une congestion et un œdème marqués de la zone scarifiée. Un fragment de cette lésion est broyé et inoculé par voie péritonéale à des lapereaux âgés de 6 à 8 jours. Ceux-ci meurent quarante-huit heures plus tard en présentant des signes de paralysie identiques à ceux provoqués par une inoculation de virus aphteux. Les organes de ces lapereaux sont utilisés pour infecter par voie veineuse un nouveau lapin adulte, sacrifié et épilé.

Il ne semble pas que le virus se soit multiplié chez le lapin adulte : dès le 3^e passage du lapin adulte la peau inoculée au jeune ne provoque l'apparition de signes paralytiques qu'après un délai prolongé (3 à 4 jours). La peau prélevée chez le cinquième lapin adulte n'infecte plus ni le lapereau, ni le cobaye. Tout se passe comme si le virus aphteux se localisait chez les adultes au niveau des lésions cutanées sans y proliférer. Notre suspension de virus subit ainsi un appauvrissement progressif. Jamais les adultes infectés n'ont présenté de lésion buccale ou de signes généraux. Nous pouvons donc conclure de cet essai que le virus aphteux adapté au lapereau nouveau-né ne se multiplie pas ou peu dans l'organisme du lapin adulte.

* * *

4^o *Etude des propriétés antigéniques du virus aphteux adapté au lapin nouveau-né (par la méthode de la fixation du complément).*

Nous avons cherché à mettre en évidence par une technique sérologique le virus aphteux dans les tissus du lapereau nouveau-né mort de l'infection. Des études en cours nous permettront de préciser si la méthode de précipitation en gélose d'Ouchterlony est valable. Nous ne relaterons ici que les recherches ayant trait à la fixation du complément.

La technique est celle préconisée par CAMAND. Au cours de nos premiers essais nous avons été amenés à modifier successivement la concentration du sérum, de l'antigène et de l'alexine.

A la fin de nos expériences, hormis les études quantitatives. l'alexine est utilisée à raison de deux unités par tube réactif, l'antigène au 1/5 et au 1/10 et le sérum à concentration variable de 1/10 à 1/80.

Le virus de lapereau, que le type soit O₂, A₃ ou C, n'est pas directement révélablé par cette technique.

Nous avons eu l'idée d'ajouter alors du virus aphteux d'origine bovine, la réaction étant réalisée de la façon suivante : le mélange de virus de lapereau, de sérum spécifique et d'alexine est placé vingt minutes à la température de 37°, puis on ajoute du virus d'origine bovine quelqu'en soit le type et on laisse encore les tubes pendant vingt minutes à 37°, enfin on réalise le dernier temps classique de la fixation du complément par adjonction du couple hémolytique. Le tableau ci-dessous synthétise les résultats ainsi obtenus :

Virus O lapereau + sérum anti O	0
Virus O lapereau + sérum anti O + virus O vache	++++
Virus O lapereau + sérum anti O + virus A vache	+++
Virus O lapereau + sérum anti O + virus C vache	++
Virus A lapereau + sérum anti A	0
Virus A lapereau + sérum anti A + virus A vache	++++
Virus A lapereau + sérum anti A + virus O vache	++
Virus A lapereau + sérum anti A + virus C vache	++

Virus C lapereau + sérum anti C	0
Virus C lapereau + sérum anti C + virus C vache	++++
Virus C lapereau + sérum anti C + virus O vache	++++
Virus C lapereau + sérum anti C + virus A vache	++++
<hr/>	
Virus O lapereau + sérum anti O + épithélium lingual de vache saine	++++
Virus O lapereau + sérum anti O + coussinet plantaire de cobaye sain	0

Un seul essai fut réalisé avec l'épithélium de langue de vache saine, de sorte que nous ne pouvons conclure de façon absolue ; mais il semble que le virus adapté au lapereau nouveau-né ait perdu un facteur non spécifique d'ordre tissulaire, présent dans l'épithélium lingual de bovin et absent dans le coussinet plantaire de cobaye. De plus, inoculé à la vache ou au cobaye, le virus adapté au lapereau récupère son pouvoir de fixer le complément.

Poussant plus loin nos investigations, nous avons recherché si cette perte antigénique ne pouvait pas correspondre à une perte de spécificité de type et à un retour vers un virus non typable. Nos expériences ne sont pas encore assez nombreuses pour que nous puissions en tirer des conclusions solides, mais si le virus C ne présente jusqu'à présent aucune réaction croisée avec les sérums anti O et anti A, par contre le virus O fixe légèrement le complément en présence du sérum anti A et le virus A fixe légèrement le complément en présence du sérum anti O.

CONCLUSIONS

Toutes les souches de virus aphteux d'origine bovine appartenant aux types O, A et C peuvent être directement adaptées au lapin nouveau-né âgé de moins de 9 jours. Il provoque chez cet animal des paralysies suivies de mort, quarante-huit heures environ après l'inoculation effectuée par voie intra-péritonéale. Le virus a conservé après cinquante passages toute sa virulence pour les animaux de l'espèce bovine et pour le cobaye.

Le virus aphteux adapté au cobaye inoculé au lapin adulte ne fait apparaître que des lésions locales.

Le virus aphteux adapté au lapereau nouveau-né perd progres-

sivement sa virulence au cours des passages alternés chez le lapin adulte. Ceci semble corroborer notre hypothèse selon laquelle il existerait une relation entre l'immunité naturelle et le phénomène de tolérance immunitaire.

Le virus aphteux adapté au nouveau-né ne semble pas révélable dans les conditions classiques par la méthode de fixation du complément. Mais l'adjonction d'une substance non spécifique, vraisemblablement contenu dans l'épithélium lingual de bovin, permet alors de réaliser la réaction.

BIBLIOGRAPHIE

1. HECKER. — *Congrès international de Médecine Vétérinaire*, Baden-Baden, 1899, 356.
 2. NAGEL. — *Deutsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1937, **45**, 624.
 3. SKINNER. — *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1951, **44**, 15.
 4. LICKHACHJEV et GRIBANOV. — *Congrès de la commission de l'O.I.E.*, Bruxelles, 1954.
 5. CUNHA et EICHHORN. — *Amer. J. of Vet. Res.*, 1954, **15**, 149.
 6. GIACCIO et GIROUD. — *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1975.
 7. PALMA. — *Congrès argentin de la fièvre aphteuse*, Buenos-Aires, 1957.
 8. DUBERT et PARAF. — *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **344**, 686.
 9. HOBMAIER. — *Deutsch. Med. Wochenschr.*, 1920, **47**, 616.
 10. NICOLAU et GALLOWAY. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1283.
 11. GINS et FORTNER. — *Session 19 janvier 1925*, für Mikrob. Berlin. Gesell.
 12. CAMAND. — *Thèse de Médecine Vétérinaire*, Lyon, 1953.
-