

Recherches sur l'immunisation anticlaveuse

II. — Sur un nouveau vaccin tissulaire formolé

par L.-P. DELPY, A. RAFYI et H. Mir CHAMSY

L'inoculation aux races ovines de réceptivité normale, de virus-vaccin claveux, expose à un fort pourcentage d'accidents, et à la dissémination du virus. Cette notion classique s'est trouvée confirmée en Iran lorsque des vaccins destinés à la race syrienne, particulièrement résistante à l'infection expérimentale, furent employés sur des moutons de race mazanderany (1), dont la réceptivité est normale.

L'adsorption du virus dilué soit sur gel d'alumine (BALOZET 1938), soit sur spores charbonneuses (L.-P. DELPY et H. Mir CHAMSY 1947), supprime le danger de généralisation, mais si l'antigène employé est assez actif pour conférer une forte immunité, les réactions locales se compliquent souvent d'ulcération et de nécrose de la peau.

La faible durée de conservation et le prix de revient du vaccin sensibilisé (BRIDRÉ et BOQUET 1942), limitent les applications pratiques de cet excellent antigène.

Les mélanges de claveau et de virus selon la méthode de KOLAÏLY et Nikolaï MAVRIDÈS (1934) peuvent être titrés avec précision par la technique de BLANC et MARTIN (1937), et nous avons signalé (1947) que leur pouvoir antigénique peut être stabilisé par cryo-dessiccation. Il est cependant difficile de doser les quantités de virus et de sérum pour obtenir régulièrement une réaction locale modérée et une immunité solide.

Enfin, l'inactivation du virus par addition de formol au taux de 1 p. 1.000 ou davantage — DUCLOUX et CORDIER (1926), FORGEOT et Nikolaï MAVRIDÈS (1929) — affaiblit considérablement le pouvoir antigénique, de sorte qu'il faut de fortes doses de claveau formolé pour conférer une immunité de 2 à 3 mois.

Mentionnons un nouveau vaccin contre la clavelée, proposé par MANNINGER, et dont nous avons connaissance par une analyse du *Bulletin de l'Office international des épizooties* (1948). L'auteur emploie « l'action désinfectante du formol sur le virus adsorbé par le gel d'alumine », mais nous ignorons la technique de pré-

(1) Pour la description de ces races, voir le travail de S. SOHRABY (1937).

paration et particulièrement la quantité de virus que renferme la dose immunisante, ainsi que le taux de formolisation.

Les recherches ici relatées ont été inspirées par les travaux de RAMON et de ses collaborateurs (1942) qui ont montré « *la possibilité de provoquer chez le cheval l'élaboration d'anticorps anti-infectieux spécifique... à l'aide du virus de la vaccine transformé grâce à l'action du formol en une sorte d'anavirus et additionné immédiatement avant l'injection de substances adjuvantes de l'immunité* ».

NEILIS et LAFONTAINE (1948) ont précisé « *qu'il est possible d'atténuer le virus vaccinal par l'action du formol à 0,1 p. 1.000 pendant 2 à 6 jours à 20°, sans lui enlever ses propriétés immunisantes* ».

Nous avons cherché par analogie, si la réduction du taux de formol aux environs de 1 p. 10.000 aurait sur le virus claveleux la même action que sur le virus vaccinal.

Dans nos expériences, les claveaux utilisés pour préparer les antigènes ou éprouver les sujets vaccinés sont obtenus par la technique de BORREL. Ils sont congelés à -20° , desséchés dans le vide puis titrés *in vivo* par la méthode intradermique de BLANC et MARTIN (1937), pour déterminer la dose minima réactionnelle (D. M. R.).

*
**

EXPÉRIENCE 1 (avril 1948).

On prépare 12 antigènes dosés comme suit, et additionnés de 3 p. 100 de gel d'alumine.

N° DES ANTIGÈNES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Claveau : DMR par cc.	1.000	20	10	5	1.000	20	10	5	1.000	20	10	5
Formol pour 10.000...	1	1	1	1	3	3	3	3	5	5	5	5

Le claveau est mélangé au gel par agitation mécanique, puis après 3 heures à $+4^{\circ}$, on ajoute le formol et on laisse 24 heures à 20° . Chaque antigène est inoculé à la dose de 0,2 cc. dans le derme de moutons neufs. Ces moutons sont éprouvés 12 jours plus tard par inoculation i.d. de 50 D.M.R. et deux témoins reçoivent 1 D.M.R.

Résultats : Chez tous les vaccinés, les réactions locales sont comparables nodule de 10 à 15 millimètres de diamètre qui, vers le 8^e jour, commence à se résorber sans complications.

A l'inoculation d'épreuve, seuls les moutons vaccinés avec l'antigène 12 présentent une réaction de gravité moyenne.

Les témoins font des réactions locales inflammatoires.

Cette expérience d'orientation indique :

- a) l'innocuité de 200 D. M. R. de virus formolé à 1 p. 10.000 ;

b) l'efficacité de 2 D. M. R. de virus formolé à 5 p. 10.000.

EXPÉRIENCE 2 (juin 1948).

Cette expérience est faite dans un troupeau mazanderany, sur des agneaux de 4 à 6 mois qui n'ont jamais eu la clavelée. Les mères n'ont pas été vaccinées précédemment, mais certaines ont pu être atteintes de cette maladie.

On utilise les antigènes 1 et 5 de l'expérience précédente, de sorte que 0,2 cc. renferment 200 D.M.R.

30 agneaux reçoivent 0,2 cc. i. d. de l'antigène 1 (formolé à 1 p. 10.000), et 57 agneaux, la même dose d'antigène 5 (formolé à 3 p. 10.000).

12 jours plus tard, les vaccinés et 17 témoins sont éprouvés avec une dose vaccinale de vaccin D.C.C. (vaccin mixte contre le charbon et la clavelée). Ce vaccin réservé aux moutons de race syrienne, provoque chez les mazanderany une grosse réaction inflammatoire le plus souvent compliquée de nécrose et de la fièvre.

Résultats : Les réactions vaccinales sont du type observé dans l'expérience n° 1. Tuméfactions de 10 à 15 millimètres de diamètre, sans complications. Aucun des sujets vaccinés ne réagit à l'épreuve. 15 témoins sur 17 présentent des réactions graves ou très graves.

EXPÉRIENCE 3 (juillet 1948).

Même expérience que la précédente, mais effectuée sur 14 moutons adultes qui n'ont jamais été atteints de clavelée. Aucun des vaccinés ne réagit à l'épreuve. 9 témoins présentent la réaction habituelle au D.C.C.

EXPÉRIENCES 5, 6, 7, 8 (août-septembre 1948).

Le but de ces expériences était de rechercher s'il était possible de réaliser chez les moutons mazanderany l'immunisation en un seul temps contre la fièvre charbonneuse et la clavelée, avec un complexe renfermant le vaccin charbonneux sporulé et le virus claveleux inactivé.

Il fut employé deux groupes d'antigènes. Le premier ne renfermait pas de gel d'alumine et était soumis à la cryo-dessiccation. Le second, additionné de gel d'alumine, en proportions variables, était laissé à l'état liquide.

Dans chaque groupe nous avons fait varier le nombre de D.M.R. de claveau.

Les moutons comprenaient soit des sujets neufs, soit des animaux vaccinés l'année précédente contre le charbon et la clavelée.

Ces expériences ont porté sur 577 sujets avec 240 témoins. Nous nous bornons à reproduire les conclusions générales. Les spores charbonneuses utilisées comme adjuvants du virus claveleux inactivé, ont une action inconsistante, qui varie considérablement d'un sujet à l'autre, et ne peuvent pas remplacer le gel d'alumine. Le complexe spores-claveau inactivé ne confère une immunité suffisante que si la quantité de claveau est élevée (au moins 500 D.M.R.), ce qui rend la méthode trop coûteuse.

L'addition de gel d'alumine au complexe liquide, renforce nettement l'action immunisante, à condition que la proportion de gel atteigne 30 à 50 p. 100, mais le complexe ne peut pas être lyophilisé, et il est difficile d'obtenir une dispersion uniforme et stable des spores charbonneuses.

Chez les animaux vaccinés un an auparavant, le renforcement de l'immunité est douteux, et il est préférable d'employer un complexe renfermant du claveau non formolé, tel que le D.C.C.

EXPÉRIENCE 9 (octobre 1948).

Les essais déjà effectués avaient permis de conclure : que le taux optimum de formol est 1 p. 10.000 et que l'immunité est plus forte si la proportion de gel est élevée (30 à 50 p. 100).

Le but de l'expérience 9 était de rechercher :

- a) le taux optimum de gel d'alumine;
- b) la dose optima de claveau inactivé;
- c) la possibilité d'injecter le vaccin sous la peau;
- d) la durée de l'immunité.

On prépare les antigènes suivants qui sont formolés à 1 p. 10.000.

N° DES ANTIGÈNES	1	2	3	4	5	6	7	8
Claveau : DMR par cc..	1.000	100	40	20	1.000	100	40	20
Gel d'alumine p. 100....	50	50	50	50	30	30	30	30

Chacun des 8 antigènes est inoculé sous la peau de 9 moutons mazarandery, à la dose de 1 cc. sous-cutanée. Un lot identique renferme 9 témoins. Il y a donc en tout 81 moutons.

Résultats : Le vaccin provoque une réaction nodulaire de 10 à 20 millimètres de diamètre, qui atteint son maximum vers le 10^e jour, puis se résorbe sans complications.

12 jours après vaccination, 6 moutons de chaque lot sont éprouvés par inoculation sous-cutanée de 1.000 D.M.R. de claveau. 1 mouton vacciné avec l'antigène 4, et 2 vaccinés avec l'antigène 6 présentent une faible réaction à l'épreuve, 6 témoins inoculés avec 1 D.M.R. font de volumineuses réactions inflammatoires, dont certaines sont grosses comme une mandarine, avec nécrose de la peau.

140 jours après vaccination, les 24 moutons restants sont éprouvés avec 1.000 D.M.R. Seuls présentent des réactions, d'ailleurs bénignes : 2 vaccinés avec l'antigène 4, 1 vacciné avec l'antigène 6 et 3 vaccinés avec l'antigène 8. Les 3 témoins font des réactions très graves (1 D.M.R.).

Cette expérience suggère que l'antigène doit renfermer au moins 40 D.M.R. de claveau et 50 p. 100 de gel. Dans ces conditions, l'inoculation sous-cutanée est recommandable et l'immunité est entière après 4 mois.

EXPÉRIENCE 10 (décembre 1948).

Les antigènes employés dans les expériences 1 à 10 étaient préparés avec le claveau liquide, que laissent exsuder les tissus provenant des pustules Borrel. Ce matériel se prête bien à la conservation par cryo-dessiccation et à un titrage suffisamment précis, mais il est coûteux.

Appliquant les procédés techniques utilisés pour la préparation du vaccin tissulaire formolé contre la peste bovine, nous avons cherché à utiliser le tissu claveux qui reste après exsudation de la lymphe.

Voici la technique actuellement adoptée.

Les tissus exprimés sont conservés aseptiquement au frigorifique à + 4°, pendant le temps nécessaire au titrage du claveau.

Ces tissus ne seront utilisés que si la D.M.R. du claveau est inférieure à 0,2 cc. de la dilution à 1 p. 1.000.

1.000 grammes de tissus sont broyés au Latapie en ajoutant la quantité de solution de merthiolate à 1 p. 10.000, nécessaire pour faciliter le broyage.

Le volume est complété à 20 litres par addition de la même solution de merthiolate, et on incorpore 20 litres de gel d'alumine par agitation mécanique.

Le mélange est parfaitement liquéfié par passage dans le broyeur colloïdal

Eppenbach pendant 10 minutes, et on laisse 12 heures au frigorifique à + 4°.

On ajoute 40 cc. de formol Lambiotte à 40 p. 100 (1 p. 10.000) et on laisse 48 heures à 20°.

Les essais effectués avec ce vaccin, sur des moutons mazanderany ou mérinos autorisent jusqu'à ce jour les conclusions suivantes :

Innocuité : Des doses de 0,5 à 2 cc., injectées sous la peau du thorax, causent un nodule de 1 à 2 centimètres de diamètre qui, à partir du 10^e jour, se résorbe sans complications. Il n'y a pas d'hyperthermie ni de réaction générale appréciable.

Efficacité : Une dose vaccinale de 0,5 cc. rend les moutons réfractaires à l'inoculation de 1.000 D.M.R. faite après 12 jours.

Le vaccin employé par les vaccinateurs dans des régions où les réactions causées par le virus-vaccin, ou par le vaccin mixte D.C.C., provoquaient des plaintes justifiées, a été très bien accepté. Nous savons actuellement que l'immunité reste entière après au moins 6 mois.

Conservation : En raison de la présence du gel, ce vaccin ne doit pas être congelé. La durée de conservation à la température ordinaire qui est de plusieurs mois, sera ultérieurement précisée.

*
**

Il est en tout cas acquis, que le virus claveleux, sous forme de claveau liquide, ou lié aux tissus de pustules BORREL, peut être, comme le virus vaccinal, transformé en anavirus, sous l'action du formol au taux de 1 p. 10.000.

Dans le vaccin tissulaire où le virus reste pour la plus grande part inclus dans les tissus finement broyés, le gel d'alumine n'est pas destiné à adsorber ce virus, mais à favoriser la production d'une réaction locale précoce et durable. Il joue le même rôle dans le vaccin formolé contre la peste bovine, où nous l'avons remplacé avec avantage par la saponine. Cette substitution n'est pas possible dans les vaccins destinés aux moutons qui tolèrent très mal les antigènes saponinés.

Institut d'Etat des sérums et vaccins, Hessarek, Iran.

BIBLIOGRAPHIE

- BRIDRÉ (J.) et BOQUET (A.), 1912, 154, 1256.
 DUCLOUX (E.) et CORDIER (G.), 1926. *C. R. Ac. des Sciences*, 183, 486.
 FORGEOT (P.) et NICOLAÏ MAVRIDÈS, 1929. *Bull. Ac. Vétérinaire*, 2, 390.
 KOLAYLI (A.-C.) et NICOLAÏ MAVRIDÈS, 1934. *Rec. d'Alfort*, p. 669.
 BLANC (G.) et MARTIN, 1937. *Arch. I. P. du Maroc*, 1, 721.
 SOHRABY (S.), 1937. Les races de moutons et la laine de l'Iran, Paris.
 BALOZET (A.), 1938. *C. R. Ac. des Sciences*, 207, 349.

- RAMON (G.), BENARD (H.), BOQUET (P.), RICHOU (R.), Mlle TISSIER et RATNER, 1942. *Bull. Ac. de Médecine*, 126, 314.
- DELPY (L.-P.) et RAFYI (A.), 1947. *C. R. Ac. des Sciences*, 225, 58.
- NÉLIS (P.) et LAFONTAINE (A.), 1948. *Revue d'Immunologie*, 12, 289.

Discussion

M. FORGEOT. — Avec la collaboration de Nicolai MAVRIDÈS, nous avons, dès 1926, commencé à l'Institut bactériologique vétérinaire de Stamboul-Pendik, des essais d'immunisation de moutons contre la clavelée par virus formolé; ces recherches ont, d'ailleurs, fait l'objet de deux communications à notre Société (*Bull. Ac. Vétér. de France*, I, II, 1929, n° 10, p. 390). La dose de formol à laquelle nous nous étions arrêtés, après de nombreux essais, était de 1 p. 1.000; le claveau utilisé était dilué au 1/10^e dans l'eau physiologique. A la dose de 1/4 cc., voie intradermique, ce vaccin donnait une forte immunité contre le virus claveleux inoculé 13 jours plus tard; mais un essai effectué dans la pratique nous montrait que l'immunité ne dépassait pas 60 jours. Reprenant la question, nous avons alors soumis nos moutons à deux inoculations (la première de 1/4 cc., la deuxième de 1/2 cc.) de ce vaccin, espacées de 18 à 20 jours. L'immunité alors obtenue dépassait 90 jours. Ayant quitté la Turquie avant qu'un large emploi de ce vaccin ait été fait, nous avons appris ultérieurement que la durée de l'immunité avait encore été trouvée trop courte pour en généraliser l'emploi. Il semble probable que l'adjonction de gel d'alumine au virus formolé selon le procédé qui nous est indiqué a permis de lever cette objection.
