

## Observations sur le mode d'action des vaccins tués Vaccin solubilisé immunigène contre le rouget du Porc

par L.-P. DELPY et E. HARS

En 1938 L.-P. DELPY et R. RASTEGAR ont fait connaître à l'Académie la possibilité de vacciner des bovins contre la septicémie hémorragique par l'emploi d'une solution saponinée de *Pasteurella septica*. Cette méthode a permis de supprimer en Iran le barbone et les pasteurelloses qui n'étaient nullement influencées par l'emploi des divers vaccins bactériens tués.

Les recherches poursuivies par la suite ont porté aussi bien sur les diverses variétés de *P. septica* que sur des germes très différents : *Cl. chauvoei*, *Malleomyces mallei*, *Salmonella*, *Brucella*, *E. rhusiopathia*. Ce travail, même s'il n'a pas toujours permis des applications pratiques, nous a appris les conditions qui permettent d'obtenir des antigènes immunisants en partant de bactéries tuées. Ces antigènes, que nous avons nommés immunigènes sont constitués par les produits de bactériolyse détoxiqués et additionnés d'une substance capable de retarder leur élimination. Notre intervention se borne à favoriser l'autolyse, à la compléter, et à supprimer en cas de besoin la toxicité, en évitant toute altération des fractions antigéniques. La nature chimique de ces fractions ne peut d'ailleurs être précisée, car aucun des groupements qui constituent la substance microbienne ne possède, après isolement, le pouvoir immunisant que possède le complexe intégral. Les immunigènes renferment également les cytosquelettes vidés de leur substance, de sorte qu'après injection, les antigènes internes aussi bien que les antigènes de surface, sont portés au contact des tissus. Ces vaccins sont donc bien différents, dans leur principe et dans leur nature, des vaccins bactériens préparés de manière à assurer l'intégrité morphologique des microbes tués.

La confiance accordée à ces vaccins bactériens tués est rarement justifiée par la démonstration expérimentale de leur pouvoir protecteur. On sait, en effet, que l'injection à des sujets neufs, de bactéries tuées, provoque la production de divers anticorps facilement décelables *in vitro*. Ces anticorps existent aussi chez les sujets immunisés à la suite d'une infection naturelle ou de l'ino-

culatation de microbes vivants. La corrélation de ces deux faits a conduit à la conclusion erronée que les anticorps de surface (agglutinines, précipitines) décelables *in vitro*, ont un rôle essentiel dans la défense antimicrobienne, et on a cru pouvoir apprécier la résistance des individus en mesurant, par des réactions faciles et rapides, le taux des anticorps présents dans leur sérum.

Pour les immunochimistes, l'état d'immunité n'implique pas nécessairement l'état de résistance à l'infection, et un animal sera qualifié d'immunisé vis-à-vis d'un certain antigène, si son sérum acquiert la propriété de précipiter ou d'agglutiner cet antigène.

Précisons donc que le terme « immunité » est employé ici pour qualifier l'état de résistance à l'infection bactérienne homologue.

Dans toute culture en évolution, les bactéries non sporulées sont vouées à une mort relativement rapide, suivie d'autolyse enzymatique. Des cultures en bouillon, vieilles à peine de quarante-huit heures, renferment donc des bactéries vivantes, des bactéries mortes, mais intactes, et des cytosquelettes, c'est-à-dire des enveloppes cellulaires vides de leur substance. Il en est de même pour les suspensions non stérilisées de bactéries cultivées sur gélose. Or, dans tous les cas, que nous avons étudiés, si on stabilise par l'action de la chaleur ou d'un antiseptique coagulant, une culture ou une suspension partiellement lysée, le pouvoir immunisant, s'il existe, est lié à la phase liquide, tandis que la phase solide en est dépourvue.

Cette affirmation entraîne évidemment le rejet des techniques classiques de préparation des vaccins tués qui visent à éviter la bactériolyse. Ces techniques ne doivent, selon nous, leur succès, qu'à des raisons immunologiquement accessoires. Tout d'abord, nous l'avons vu, l'injection de corps bactériens tués fait apparaître divers anticorps facilement décelables, considérés à tort comme témoins d'un état de résistance.

Ensuite, beaucoup de bactéries renferment des endotoxines qui sont libérées par autolyse. Au lieu de neutraliser cette toxicité sans altérer l'antigène immunisant, ce qui serait souvent possible, on préfère fixer les bactéries par l'action ménagée de la chaleur ou des antiseptiques qui détruisent ou paralysent les enzymes bactériolytiques, et détruisent les toxines libérées. Les bactéries ainsi traitées et introduites dans l'organisme, ne libèrent certainement pas de toxines, mais ne libèrent pas davantage leurs antigènes internes.

Enfin, la croyance étant établie que l'activité d'un vaccin tué est fonction du nombre de bactéries intactes qu'il renferme, le

préparateur s'attache à stabiliser les bactéries afin que ce vaccin garde pendant toute la durée de sa validité, la teneur en microbes jugée indispensable. Cette précaution est parfaitement légitime puisque divers vaccins, notamment en médecine humaine, doivent, au terme des règlements de plusieurs pays, renfermer par unité de volume un nombre déterminé de bactéries.

Tout ce passe, en définitive, comme si le facteur essentiel dans la production de l'immunité protectrice, était la forme des bactéries et non leur substance. Fort heureusement, à l'insu du préparateur et en vérité, malgré lui, une bactériolyse partielle est inévitable et il est rare qu'un vaccin soit assez bien préparé pour être totalement inactif.

L'immunisation contre le rouget du porc dont nous nous occupons depuis 1951, apporte une nouvelle confirmation de cette théorie. On sait que la séro-infection étant considérée par beaucoup d'auteurs comme dangereuse, le vaccin tué proposé par TRAUB (1947) et plus ou moins modifié par d'autres, a été accueilli avec d'autant plus d'empressement que son efficacité n'est pas contestable. Ce vaccin dont l'un de nous (E.H.) prépare depuis quatre ans une variante, est une suspension de bacilles du rouget provenant de souches dites « immunigènes » spécialement choisies et additionnée de gel d'alumine qui est supposé adsorber les bactéries, d'où le nom de vaccin adsorbé. Le complexe est stérilisé par le formol. Pour avoir une activité suffisante, il doit renfermer environ 100 milliards de microbes par dose. Ce résultat ne peut être atteint que par l'emploi d'un milieu spécial additionné de sérum frais et par une concentration secondaire des cultures.

TRAUB a cependant observé que la phase liquide des cultures séparée des bactéries, possède un certain pouvoir immunisant. Il a suggéré en conséquence, l'existence d'une *substance soluble immunisante*, mais sans en expliquer l'origine.

Au cours de recherches précédentes, nous avons constaté que certaines souches d'*E. rhusiopathiae* s'autolysent facilement, en libérant un antigène soluble non toxique et immunisant.

Plus tard l'étude de la technique des vaccins adsorbés nous a permis de voir que si les bactéries sont finalement fixées par le formol, divers temps antérieurs de la préparation sont très favorables à une bactériolyse, variable d'un lot à l'autre, mais toujours notable.

En d'autres termes, l'activité des vaccins adsorbés ne provient pas, selon nous, de leur extraordinaire concentration micro-

bienne, ni de l'adsorption alléguée des bactéries sur le gel d'alumine, mais seulement de conditions techniques favorables à une bactériolyse partielle et à la présence du gel, adjuvant de l'immunité.

La vérification de cette hypothèse, à plus d'un titre, intéressante, a été réalisée par des expériences que nous résumerons ici :

Nous avons étudié comparativement :

- A) des souches sélectionnées comme immunisantes en vue de la préparation de vaccin adsorbé;
- B) des souches peu ou pas virulentes (endocardites);
- C) des souches banales virulentes.

Les souches des groupes A et B présentent une aptitude très nette à l'autolyse, tandis que celles du groupe C sont résistantes.

L'autolyse se traduit par les phénomènes suivants : alors que dans des cultures de moins de vingt-quatre heures on ne trouve que des germes Gram positifs, les cultures de trente-six heures ou plus présentent des éléments Gram négatifs de plus en plus nombreux. En même temps, se forme un dépôt qui est constitué par un magma de cytosquelettes et de substance amorphe qui se colore en rose par le Gram.

L'éclaircissement optique des cultures est souvent inapparent pendant plusieurs jours, en raison de la multiplication de nouvelles générations. Il devient très net si on inhibe cette multiplication en ajoutant un bactériostatique, tel que le merthiolate, qui n'altère pas les diastases autolytiques.

Grâce à cet artifice, complété par des numérations, nous avons constaté que pour les souches des groupes A et B, des cultures merthiolatées à la 24<sup>e</sup> heure ont perdu, par autolyse à la 48<sup>e</sup> heure, 18 à 40 pour cent de leurs éléments figurés. En outre, environ 20 pour cent des germes reconnaissables sont Gram négatifs et très déformés.

Si des cultures identiques sont formolées, les germes sont fixés et l'autolyse est supprimée.

Il y a une relation évidente entre les progrès de l'autolyse et la production de l'antigène.

a) Si une culture de vingt-quatre heures qui ne renferme que des éléments Gram positifs est formolée et centrifugée, la phase liquide ne possède aucun pouvoir immunisant. Si une culture identique est merthiolatée et abandonnée à l'autolyse, ou solubilisée artificiellement, on constate que le produit se révèle immunisant.

b) En centrifugeant une culture de quarante-huit heures en voie d'autolyse après l'avoir bien agitée, on peut constater que le pouvoir immunisant est lié à la phase liquide, tandis que la phase solide en est presque entièrement dépourvue.

c) Si cette phase solide est solubilisée artificiellement, le produit se révèle immunisant. Si au contraire elle est formolée, son pouvoir protecteur est à peu près nul.

Ceci confirme bien que, dans les vaccins adsorbés, le pouvoir immunisant est fonction de l'autolyse qui a pu se produire avant l'addition de formol.

L'énorme quantité de germes formolés que renferment ces vaccins, est spécifiquement inactive et joue tout au plus un rôle adjuvant. L'autolyse spontanée que nous venons de décrire n'est que partielle et il est avantageux de la compléter artificiellement. Les digestions trypsiques ou pepsiques recommandables pour certaines bactéries (*P. septica*, *Cl. chauvoei*) altèrent considérablement l'antigène immunisant du bacille du rouget. Par contre, l'action ménagée des alcalis provoque une désintégration rapide sans altération sensible de l'antigène.

Ces observations permettent de penser que l'antigène immunisant d'*E. rhusiopathiae* détruit par les diastases protéolytiques, est de nature protéinique, tandis que ceux d'autres bactéries ne le sont pas.

L'antigène immunisant d'*E. rhusiopathiae* n'est pas altéré après trente minutes à 56° ou dix minutes à 60°. Il n'est pas toxique, et injecté pur il est rapidement résorbé et vraisemblablement éliminé. Les propriétés vaccinales ne se manifestent pleinement que s'il est associé à une substance capable d'entraver sa résorption.

En cherchant l'influence du milieu de culture, nous avons vu que quel que soit le milieu, un même poids de bactéries de même souche et du même âge donne un même nombre de doses immunisantes d'immunigène.

Les vaccins adsorbés sont préparés de telle sorte qu'une faible quantité de produit d'autolyse immunologiquement actif est nécessairement accompagnée d'une énorme quantité de bactéries fixées et inactivées.

D'après nos calculs, une *unité vaccinale* pour souris, de vaccin adsorbé, renferme une moyenne de 900 à 1.000 millions de germes figurés, et le produit d'autolyse de 200 millions de bacilles. Le vaccin pour porcs doit renfermer 20 *unités vaccinales* souris par centimètre cube, soit environ 20.000 millions de

bacilles. La dose vaccinale qui est de 5 cm<sup>3</sup> renferme donc environ 100.000 millions de bacilles figurés et l'équivalent de 20.000 millions de bacilles solubilisés.

Il est évident qu'une telle concentration n'est pas aisément obtenue d'où la nécessité d'utiliser des milieux additionnés de sérum frais et de peptones spéciales, qui sont coûteux et de préparation fastidieuse. Selon la richesse initiale obtenue et les techniques, les cultures sont ensuite concentrées un nombre variable de fois. DINTER et BAKOS (1951) concentrent quatre fois, HAUSMANN (1949) quatre à huit fois, GLEDHILL (1952) dix fois.

En ce qui concerne l'immunigène, l'unité vaccinale souris correspond à environ 200 millions de bactéries, et la dose vaccinale porc à 20.000 millions. Il y a donc intérêt à utiliser des milieux simples, autoclavables, qui donnent environ 5.000 millions de bactéries par centicube. Après solubilisation des bactéries ces milieux renferment dans 5 cm<sup>3</sup> la même dose d'antigène actif que les vaccins adsorbés les plus concentrés. Pour obtenir un antigène plus concentré, il suffit de centrifuger les cultures et de solubiliser la phase solide.

Le choix de la substance adjuvante justifie quelques remarques. Dans les vaccins adsorbés, le gel d'alumine est supposé « adsorber » les bactéries. Il a été suggéré que cette adsorption aurait pour effet de soustraire les germes à l'action léthale du formol (qui est ajouté à un stade ultérieur), de sorte qu'ils conserveraient leur vitalité tout en perdant leur virulence.

Cette hypothèse a été avancée en supposant que le bacille du rouget se comporte en la circonstance comme le virus aphteux dans le vaccin de Waldmann. La pertinence de cette supposition est infirmée par l'expérience. Il est en effet impossible de déceler, *in vivo* ou *in vitro*, une trace de vitalité dans les bactéries libérées du complexe aluminé.

Le rôle du gel est, au cours de la préparation, de rendre plus rapide la précipitation des bactéries, et peut-être d'adsorber l'antigène soluble, puis, *in vivo*, de produire une action d'adjuvant. Cette opinion est confirmée par le fait qu'un adjuvant soluble, la saponine, qui n'a aucun rôle adsorbant, nous a donné d'aussi bons résultats que le gel. La saponine présente l'avantage d'agir à faible dose (1 pour mille), donc de permettre la réduction de la dose vaccinale. En outre, le vaccin saponiné peut sans inconvénient, être congelé et lyophilisé.

Les observations qui viennent d'être exposées nous dispensent d'insister sur les caractéristiques de l'immunigène qui est ici

proposé. Il s'agit d'une solution neutre, renfermant par centimètre cube la substance d'environ 10 milliards de bactéries et additionnée de 1 pour mille de saponine brute et de 1 pour cinq mille de merthiolate.

Injecté sous la peau, en arrière de l'oreille, et à la dose de 2 cm<sup>3</sup>, ce vaccin détermine la formation d'un nodule ovoïde de 10 à 30 mm de long, qui se résorbe lentement et sans complications à condition que l'injection soit bien faite sous la peau et non dans la peau. Il n'y a aucune réaction générale, et par conséquent, la vaccination en milieu infecté ne soulève aucune objection.

Les épreuves du vaccin dans sa forme finale ont donné les résultats suivants :

*Sur souris* : 320 souris blanches divisées en 8 lots, ont été vaccinées, moitié avec l'immunigène, moitié avec un vaccin adsorbé commercial. La dose d'immunigène renfermait la substance de 250 millions de germes, la dose du vaccin adsorbé la substance de 1.000 à 1.200 millions de germes. Toutes ces souris éprouvées par la méthode habituelle ont présenté une immunité totale.

*Sur porcs* : Au laboratoire, 60 porcs, représentant 9 portées d'origine connue, ont été mis en expérience. 45 ont été vaccinés avec 2 cm<sup>3</sup> d'immunigène. 18 sont réservés pour contrôler la durée de l'immunité. 22, divisés en 4 lots, correspondant à 4 portées, ont été éprouvés après vaccination, en même temps que cinq témoins, par notre méthode intradermique. Les témoins ont reçu une dose sûrement réactionnelle. 4, des mêmes portées que les vaccinés, ont fait en trente-six heures une réaction typique locale, avec fièvre puis généralisation.

Bien que traités par la pénicilline, le troisième jour, 3 sont morts par la suite avec des lésions d'endocardite. Un témoin d'origine inconnue, n'a présenté qu'une faible réaction locale sans généralisation.

Les 22 vaccinés ont été éprouvés avec 1.000 doses sûrement réactionnelles. Un seul a présenté une légère réaction cutanée, qui a disparu en quarante-huit heures, sans fièvre ni complications.

Sur les 18 animaux réservés pour contrôle de durée de l'immunité, 6 éprouvés après trois mois avec 1.000 doses sûrement mortelles, n'ont fait aucune réaction, tandis que 2 témoins de même portée ont fait une réaction typique avec une dose.

Grâce à l'obligeance de notre confrère, le docteur STAHL de

Montbrison, un essai intéressant a été réalisé dans les conditions de la pratique.

Dans un élevage, où 10 animaux étaient morts de rouget aigu, et où diverses circonstances rendaient la contagion inévitable, 150 porcs dont certains avaient 2 mois et d'autres pesaient 100 kg, ont été vaccinés, le 13 juin 1953.

Dans la semaine suivante, 4 présentèrent le rouget, mais furent guéris, puis aucun cas ne fut constaté.

Dans d'autres élevages, le docteur STAHL a vacciné environ 250 porcs avec des résultats qu'il juge pleinement satisfaisants.

L'innocuité et l'efficacité du vaccin semblent donc établies, et sa conservation semble pouvoir être fixée à 3 mois à la température ordinaire.

Il reste à connaître la durée de l'immunité que nous savons seulement être encore entière après quatre mois.

En effet, 10 des porcs vaccinés le 13 juin par le docteur STAHL, ont été éprouvés le 28 octobre avec 1.000 doses sûrement réactionnelles. Ils n'ont présenté aucune réaction, alors que 2 témoins inoculés avec 1 dose présentèrent la lésion cutanée typique suivie de généralisation.

(*Institut Mérieux, laboratoires de Marcy-l'Etoile, Rhône.*)

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BAKOS (K.) et NORDISK. — *Vét. Méd.*, 1951, 3, 109-126.
  2. DELPY (L.-P.) et RASTEGAR (R.). — *Bull. Ac. Vét.*, T. 9, n° 4, 1938 ou *Arch. Inst. Hessarek*, Fasc. 1, 67.
  3. GLEDHILL (A.-W.). — *J. of Gen. Microbiol.*, 1952, 1-2, 179-191.
  4. HARS et DELPY (L.-P.). — *Bul. Ac. Vét.*, 1953, T. 26, n° 5, 267.
  5. HAUSMANN (W.). — *Habilitationsschrift*, 1949, München, 1949.
  6. TRAUB (E.). — *Mh. Vet. Med.*, 1947, 165.
- 
-