

P7702

IMMUNISATION DES PORCELETS DURANT LA PERIODE PERINATALE

Catherine BALLET (2), J. FEVRE (1), Monique HOUDAYER (2) et J.J. METZGER (2)

(1) I.N.R.A. - Station Centrale de Physiologie animale, C.N.R.Z. - 78350 Jouy-en-Josas

(2) I.N.R.A. - Station de Virologie et d'Immunologie - 78850 Thiverval-Grignon

La fonction surrénalienne foetale, par l'induction d'une hyper-corticostéroïdémie, joue un rôle essentiel dans le contrôle des mécanismes de la parturition. Cette parturition a pu être induite expérimentalement chez la plupart des espèces domestiques par l'administration à la mère de corticoïdes de synthèse. Chez la Truie, ce contrôle ne s'effectue qu'avec de fortes doses de Dexaméthasone (FIRST et STAGMILLER, 1972). Or, les corticoïdes ont une action inhibitrice sur les lymphocytes, cellules essentielles dans la fonction immunitaire (FAUCI 1975).

Connaissant les variations naturelles du taux de cortisol sérique chez le porcelet nouveau-né, nous avons cherché à savoir s'il existait une inhibition de l'induction d'une réponse immunitaire au cours des premiers jours de la vie du porcelet et si cette inhibition pouvait être liée à l'augmentation du taux des corticoïdes sanguins (FEVE, TERQUI et BOSCH, 1975).

MATERIEL ET METHODES

Trente-trois porcelets conventionnels, provenant de trois portées nées le même jour, ont été répartis au hasard en huit lots de quatre animaux (un lot en comportait 5) et un porcelet supplémentaire a été utilisé comme contrôle négatif. Ces animaux, (sauf le témoin) ont reçu une injection intramusculaire de 0,1 milligramme de Lysozyme de blanc d'oeuf de poule émulsionné avec de l'Adjuvant Incomplet de FREUND. Cette immunisation est réalisée, suivant les lots, à des moments différents après la naissance, à savoir le jour de la naissance pour le lot J0 et les jours 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10 après le part pour les lots J1, J2, J3, J4, J5, J7 et J10. Chaque injection est précédée d'une saignée en vue de la détermination du taux de cortisol circulant. Les animaux sont ensuite saignés chaque semaine et leur titre en anticorps anti-lysozyme est déterminé par hémagglutination passive (HOUDAYER et al. 1974). A l'âge de huit semaines, les animaux reçoivent une injection de rappel intra-musculaire de 0,5 milligramme de Lysozyme émulsionné en Adjuvant de FREUND. Les prélèvements de sang sont poursuivis pendant cinq semaines supplémentaires. Le taux de cortisol sérique a été déterminé par la méthode de la C.B.G.

RESULTATS

1/ Analyse du taux de cortisol :

Les résultats de l'analyse sont donnés dans le tableau 1. On peut noter que, même pour les saignées effectuées le jour de la naissance, les valeurs sont situées autour de la moyenne habituelle chez le porc (15 à 30 ng/ml). Les valeurs exceptionnellement élevées pouvant s'expliquer par la réaction à l'agression que constitue la manipulation des animaux. Ces résultats confirment donc la chute rapide du taux des corticoïdes plasmatiques dans les heures qui suivent la naissance du porcelet (FEVRE et al. 1975).

TABLEAU 1

TAUX DE CORTISOL SERIQUE CHEZ LES PORCELETS, LE JOUR DE L'IMMUNISATION
LE TITRE EST EXPRIME EN NANOGRAMME PAR MILLILITRE DE SERUM

TAUX DE CORTISOL SERIQUE			
N° DU LOT	INDIVIDUEL	MOYENNE	DEVIATION
J-0	30,7 85,8 27,2 17,9	40,4	30,7
J-1	18,5 22,2 21,4 11,5	18,4	4,9
J-2	17,7 17,8 14,8 23,9	18,5	3,9
J-3	27,8 25,1 12,3 7,9	18,2	9,7
J-4	30,5 10,6 20,8 10,0	18,0	9,7
J-5	53,9 19,9 25,8 8,7	27,0	19,3
J-7	13,4 6,8 18,6 17,3	14,0	5,3
J-10	26,9 26,1 56,4 56,2 57,9	44,7	16,6

2/ Cinétique de la réponse immunitaire humorale :

La cinétique de la réponse immunitaire primaire des différents lots de porcelets immunisés dans les jours qui suivent la naissance est présentée dans la figure 1. Il apparaît clairement deux types de réponses.

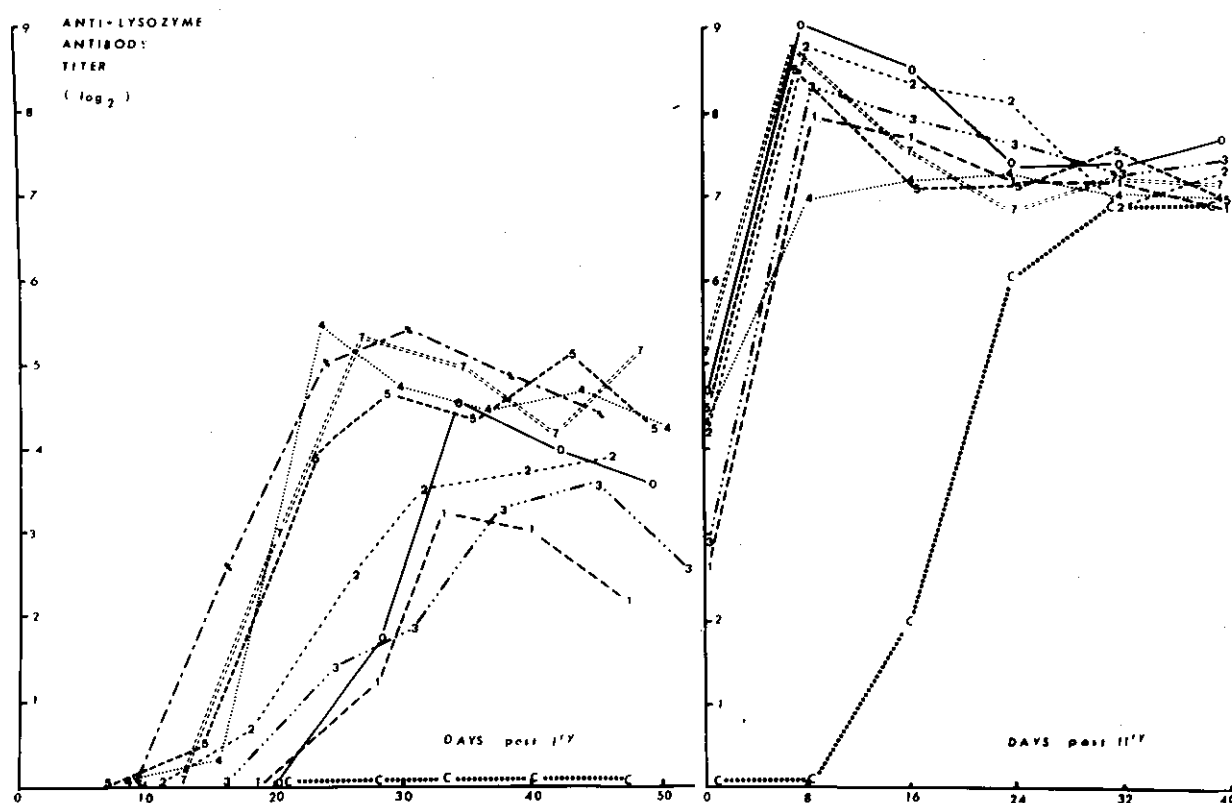
Chez les animaux immunisés avant le quatrième jour de la vie, les anticorps sériques apparaissent autour du 20ème jour après l'immunisation, leur titre maximum étant atteint vers le 35ème jour. Chez les animaux immunisés à partir du quatrième jour, les anticorps sériques sont décelés dès le 15ème jour qui suit l'immunisation et leur maximum est atteint vers le 25ème jour après la stimulation antigénique. Les titres maximums sont respectivement de 3,5 et de 5,0. Ces titres sont exprimés en logarithme de l'inverse de la dilution du sérum donnant la dernière réaction positive en hémataglutination passive.

En réaction secondaire, les deux groupes d'animaux ont présenté une réponse identique après l'injection de rappel à l'aide d'une dose plus élevée d'antigène, comparée à celle du témoin.

FIGURE 1

CINETIQUE DE LA REPOSE HUMORALE ANTI-LYSOZYME CHEZ LES PORCELETS IMMUNISES DURANT LA PERIODE PERINATALE.

—0—, —1—, —2—, —3—, —4—, —5—, —7—, —%— et C correspondent respectivement à la moyenne du titre des anticorps anti-lysozyme chez les animaux des lots immunisés le jour de la naissance, 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10 jours plus tard, ou gardé comme témoin négatif. L'origine 0 de l'abscisse représente le jour de l'immunisation. A 8 semaines d'âge, tous les animaux reçoivent une injection de rappel et sont saignés pendant les cinq semaines suivantes. On remarquera la différence entre les lots 0, 1, 2, 3, et les autres lots.



3/ Comparaison entre les portées

La comparaison des réponses individuelles à l'intérieur de chaque portée a révélé des différences entre les animaux suivant la portée. Le nombre trop faible d'animaux n'a pas permis une analyse statistique, cependant on note que les porcelets issus de la truie n° 1 ont donné des valeurs proches des moyennes de la figure n° 1. Les animaux provenant de la truie n° 11 ont présenté des titres en anticorps plus faibles mais que la différence entre les lots était très nette (3 log₂ lors du maximum, soit huit fois moins d'anticorps). Dans la troisième fratrie, les délais d'apparition des anticorps était encore plus importants alors que la différence des titres maximums atteints est restée faible.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que, dans nos conditions expérimentales, l'immunisation des porcelets avant l'âge de quatre jours conduit à une réponse immunitaire humorale plus faible que celle obtenue chez des animaux plus âgés. Les anticorps sériques apparaissent avec un retard d'une dizaine de jours et le titre maximum obtenu est environ deux fois plus faible. Par contre, la mémoire immunitaire est semblable chez les deux groupes d'animaux.

Donc, lorsque l'on veut obtenir une protection très précoce liée aux anticorps fabriqués par le porcelet, dans la pratique, il est préférable d'attendre le quatrième jour de la vie pour effectuer l'injection primaire.

La cause de ce retard dans l'apparition des anticorps sériques ne semble pas être le taux des corticoïdes sériques au moment de l'immunisation. Cependant une action retardée du taux élevé de ces hormones lors de la naissance sur la totalité ou sur une sous-population des lymphocytes ne peut pas être totalement exclue (UPCOTT et al. 1973, BALOW et al. 1975). La publication de travaux récents permettent de penser au rôle immunosuppresseur non-spécifique de diverses substances d'origine maternelle ou chorionique : l'alpha-foeto-protéine, dont l'évolution du taux sérique chez le porcelet (KARLSSON, 1972) ne permettrait pas d'expliquer l'inhibition que nous avons observée, (MURGITA et TOMASI 1975) ou des alpha-globulines chorioniques (FAUVE et al. 1974 ; STEIN-WERBLOWSKY 1975 ; BAUMINGER et al. 1976).

Enfin, si l'influence de la mère se révélait prépondérante, la sélection des truies pourrait également s'opérer en tenant compte de leur aptitude à conférer le caractère "réponse immunitaire précoce".

BIBLIOGRAPHIE

- J.E. BALOW, D.L. HURLEY et A.S. FAUCI - J. of Immunol. 1975, 114, 1072.
- S. BAUMINGER, S. PELEG, T. UMILE, L. ABEL et A. GLOBERSON - III^d European Immunology meeting, Copenhague Août 1976 (résumé n° W21).
- A.S. FAUCI - Immunology 1975, 28, 669.
- R.M. FAUVE, B. HEVIN, H. JACOB, J.A. GAILLARD et F. JACOB - Proc. Nat. Acad. Sci. N.Y. 1974, 71, 4052.
- J. FEVRE, M. TERQUI et M.J. BOSC - J. Rech. Porcine INRA-ITP, 1975, 393.
- N.L. FIRST et R.B. STAGMILLER - J. Anim. Sci. 1972, 35, 1118.
- M. HOUDAYER, P. ROUZE et J.J. METZGER - III^{ème} Congrès International de Médecine Vétérinaire Porcine, Lyon, juillet 1974, résumé 1-5.
- B.W. KARLSSON - Life Sciences 1972, vol. 11, part II, 169.
- R.A. MURGITA et T.B. TOMASI - J. Exp. Med. 1975, 141, 269.
- R. STEIN-WERBLOWSKY - Oncology, 1975, 32, 196.
- D.H. UPCOTT, C.M. HERBERT et M. ROBINS - Res. Vet. Sci. 1973, 15,8.

P 7703

ETUDE D'UNE SOUCHE DE VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY MODIFIEE EN CULTURE CELLULAIRE

*B. TOMA (1), A. BRUN (2), Ph. VANNIER (3) et G. CHAPPUIS (2) **

(1) Ecole Vétérinaire - 94701 Maisons-Alfort

(2) IFFA Mérieux - 69000 Lyon

(3) Station de Pathologie Porcine - 22440 Ploufragan

INTRODUCTION

Plusieurs souches sauvages de virus de la maladie d'Aujeszky ont été modifiées en vue de la préparation de vaccins à virus vivant (2) (4) (8) etc. En général, l'augmentation du nombre de passages (en œuf embryonné ou en culture cellulaire) conduit à une diminution parallèle de la virulence résiduelle de la souche et de son pouvoir immunogène. Le choix du stade d'atténuation, en vue de la préparation de vaccin, résulte donc d'un compromis et correspond au plus faible niveau possible de virulence résiduelle encore compatible avec un pouvoir immunogène satisfaisant.

Parmi les vaccins à virus vivant, la souche K61 de Bartha est sans doute l'une des plus largement utilisées.

Au laboratoire des maladies contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, une souche de virus isolée à partir d'un foyer breton de maladie d'Aujeszky a été passée en série en culture cellulaire, à basse température, à partir de 1973.

Au 220ème passage, une étude de sa virulence résiduelle et de son pouvoir immunogène a été commencée. Nous présentons ci-dessous les premiers résultats obtenus.

I - MODIFICATION DE LA SOUCHE

La souche Alfort 26 a été obtenue par passages en série en culture cellulaire d'une souche virulente isolée dans un foyer de maladie d'Aujeszky dans les Côtes-du-Nord en 1970. Les premiers passages ont été effectués à 37°C. A partir du 10ème passage on a utilisé la technique de la dilution limite qui consiste à choisir les tubes ayant reçu la plus forte dilution de virus entraînant encore un effet cytopathogène, pour infecter de nouvelles cellules. La température d'incubation a été progressivement réduite comme l'indique le tableau 1.

TABLEAU 1

TEMPERATURE D'INCUBATION DE LA SOUCHE DE VIRUS
DE LA MALADIE D'AUJESZKY AU COURS DES PASSAGES EN CULTURE CELLULAIRE

N° DU PASSAGE	TEMPERATURE
De l'isolement au passage 22	37°C
Passages 23 à 30	36°C
Passages 31 à 34	35°C
Passages 35 à 37	34°C
Passages 38 à 40	33°C
Passages 41 à 43	32°C
Passages 44 à 46	31°C
Passages 47 à 80	30°C
Passages 81 à 84	29°C
Passages 85 à 135	28°C
Passages 136 à 220	26°C

* Avec la collaboration technique de Martine PEZRON.

Au cours des passages, la souche a été clonée à trois reprises (passages 51, 57 et 61) en choisissant des plages de faibles dimensions.

Les cellules utilisées pour les passages étaient initialement des cellules de la lignée PK 15, puis de la lignée R.P.

Le matériel ayant servi aux expériences est constitué par les 220^{ème} et 221^{ème} passages.

II – VIRULENCE RESIDUELLE DE LA SOUCHE ALFORT 26

La virulence résiduelle de la souche Alfort 26 a été étudiée sur le porc et sur diverses espèces animales.

1/ Virulence résiduelle pour le porc :

Elle a été appréciée sur des porcs sevrés et sur des porcelets d'un ou 2 jours recevant la souche par voie intramusculaire, nasale ou intra-cérébrale.

● Porcs sevrés :

Des porcs sevrés (7 semaines) recevant 1 ml de suspension virale ($10^{6,8}$ DECP₅₀) par voie nasale ou intramusculaire ne présentent aucune modification de leur comportement dans les jours suivants.

L'augmentation de température est inconstante et ne dépasse pas, en général, un degré.

● Porcelets :

– L'inoculation par voie nasale ou intramusculaire de 1 ml de suspension virale ($10^{6,8}$ DECP₅₀) à des porcelets de deux jours, issus de mère dépourvue d'anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky, n'entraîne aucun signe clinique de maladie. La température est légèrement plus élevée que celle des porcelets témoins.

La souche se révèle également inoffensive pour des porcelets d'un jour qui reçoivent cette même dose par voie intramusculaire.

– L'inoculation par voie intra-cérébrale à des porcelets de deux jours ne provoque aucun trouble décelable et ne modifie pas la courbe de croissance par rapport à celle de porcelets témoins de la même portée.

Lors du sacrifice, 22 jours après l'inoculation, il n'a pas été possible d'isoler le virus à partir du cerveau des porcelets.

2/ Virulence résiduelle pour d'autres espèces animales :

● Lapin :

La souche Alfort 26 est pathogène pour le lapin qui meurt après avoir présenté du prurit au point d'injection. La dose létale 50 p. cent pour le lapin est de 10 DECP₅₀.

● Cobaye :

La souche est également pathogène et prurigène pour le cobaye. La dose létale 50 p. cent pour le cobaye est de 10^3 DECP₅₀.

● Rat :

La souche est pathogène pour le rat blanc après injection intramusculaire. Pour cette espèce, la dose létale 50 p. cent est de $10^{5,3}$ DECP₅₀.

- **Souris :**

La dose létale 50 p. cent pour la souris est de $10^{5,4}$ DECP₅₀.

- **Chien :**

L'injection par voie sous-cutanée de $10^{6,8}$ DECP₅₀ de virus souche Alfort 26 entraîne la mort de chiens après expression du prurit.

En revanche, l'administration par voie orale semble inoffensive ; un chien a été nourri pendant 45 jours à l'aide de carcasses de lapins ayant succombé à l'injection de la souche, sans présenter de trouble.

- **Chat :**

L'injection sous-cutanée de $10^{7,4}$ DECP₅₀ de virus souche Alfort 26 a entraîné la mort d'un chat, douze jours après.

L'injection de $10^{6,4}$ DECP₅₀ et de $10^{5,4}$ DECP₅₀ a rendu les animaux malades, mais la guérison est survenue après quelques jours d'inappétence.

- **Mouton :**

L'injection au mouton par voie sous-cutanée de $10^{6,8}$ DECP₅₀ de virus se révèle inoffensive.

III – POUVOIR IMMUNOGENE POUR LE PORC

Le pouvoir immunogène de la souche Alfort 26 a été étudié sur des porcs sevrés.

■ **Une première expérience** a porté sur quatre porcs de 7 semaines. Trois d'entre eux ont reçu 2 ml de suspension virale (par voie nasale pour le porc n° 28 et par voie intramusculaire pour les porcs n° 29 et 30). Le quatrième a servi de témoin.

Trente quatre jours après l'injection, les quatre animaux ont été éprouvés par voie nasale à l'aide de 1,5 ml d'une souche hongroise de virus.

Après l'épreuve, les trois animaux ayant reçu la souche Alfort 26 ont conservé un comportement normal ; la température a légèrement augmenté mais n'a pas atteint 40°C. Le porc témoin a présenté des troubles respiratoires et des troubles nerveux. Sa température a dépassé 41°C pendant trois jours. Il a été sacrifié après cinq jours de décubitus. L'évolution des anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky est mentionnée dans le tableau 2.

TABLEAU 2

EVOLUTION DES ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY CHEZ QUATRE PORCS

(J0 : jour de l'injection de la souche Alfort 26 aux porcs n° 28, 29 et 30 ; épreuve au jour 34). Les nombres correspondent au dénominateur de la dilution maximale de sérum neutralisant 100 DECP₅₀ de virus de la maladie d'Aujeszky.

	JOUR 0	JOUR 7	JOUR 14	JOUR 21	JOUR 29	JOUR 38	JOUR 65
Témoin . . .	0	0	0	0	0	0	
Porc n° 28 ..	0	0	2	32	16	8	32
Porc n° 29 ..	0	0	0	8	1	2	64
Porc n° 30 ..	0	0	1	16	4	4	64

■ Une seconde expérience a porté sur 10 porcs de 7 semaines, répartis en cinq lots de deux :

- Lot A : témoins
- Lot B : injection de 2 ml de vaccin huileux à virus inactivé (Geskyvac) (4) aux jours 0 et 14.
- Lot C : injection de 1000 DECP₅₀ de virus souche Alfort 26 au jour 0 et de 100.000 DECP₅₀ au jour 42.
- Lot D : injection de 10.000 DECP₅₀ de virus de la souche Alfort 26 au jour 0.
- Lot E : injection de 100.000 DECP₅₀ de virus souche Alfort 26 au jour 0.

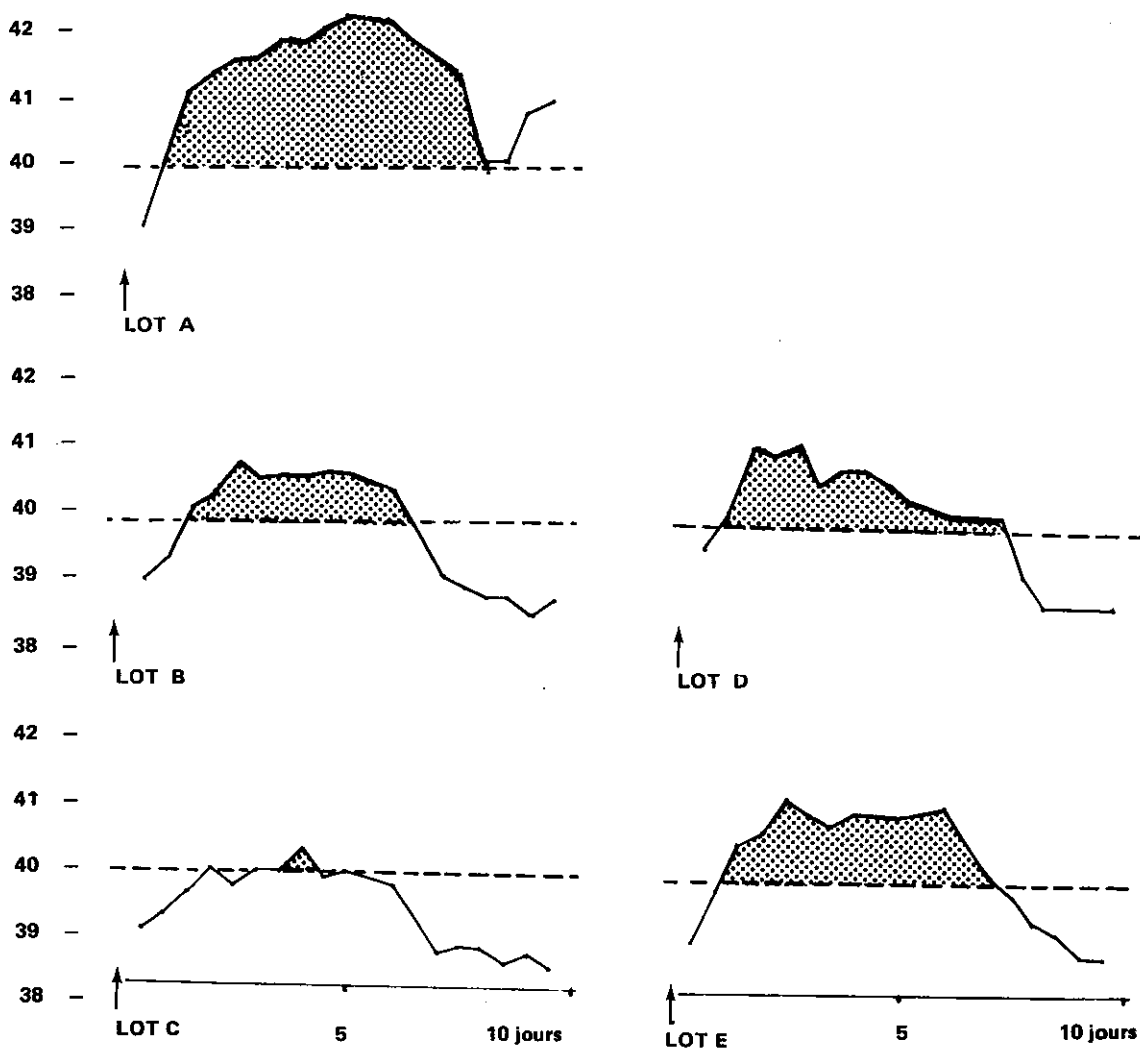
Tous les animaux ont été éprouvés au jour 62 par voie nasale à l'aide de 1 ml par narine de la souche virale hongroise (10⁸ DECP₅₀/ml).

Les porcs témoins (lot A) ont présenté une maladie sévère et une hyperthermie importante (cf. fig. 1). Ils sont restés sans manger pendant plusieurs jours mais ne sont pas morts et ont lentement retrouvé un comportement normal.

Les porcs des lots B (vaccin huileux, deux injections) et C (souche Alfort 26, deux injections) ont conservé un comportement normal après l'épreuve et leur réaction thermique a été faible comme le montre la figure 1.

FIGURE 1

COURBES DE TEMPERATURE DES PORCS DES DIFFERENTS LOTS APRES EPREUVE PAR LE VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY
(moyenne des températures des deux porcs de chaque lot) ; la flèche correspond à l'inoculation



Les porcs des lots D et E (souche Alfort 26, une injection) ont accusé une diminution passagère de l'appétit et leur température est restée supérieure à 40°C pendant plusieurs jours (figure 1).

Les anticorps neutralisant le virus de la maladie d'Aujeszky sont apparus chez les porcs du lot B au jour 17 et ont atteint leur maximum au jour 24 (titres de 8 et de 32).

Les sérums des porcs des lots D et E, ayant reçu une seule injection de la souche Alfort 26, ont fourni une réponse négative en séro-neutralisation jusqu'au moment de l'épreuve virulente. Les anticorps neutralisants ne sont apparus chez les deux porcs du lot C qu'après la seconde injection de la souche Alfort 26 (titres maximaux 32 et 64).

IV -- DISCUSSION

A son 220ème passage en culture cellulaire, la souche Alfort 26 a été l'objet d'un début d'étude de sa virulence résiduelle et de son pouvoir immunogène.

Les premiers résultats obtenus confirment son innocuité pour le porc, y compris le porcelet de deux jours infecté par voie intra-cérébrale.

Dans nos conditions d'expérience, elle se montre également inoffensive pour le mouton, et le chien qui la reçoit par voie buccale. Elle se révèle plus ou moins virulente pour le chat, le chien (par voie parentérale) et différentes espèces d'animaux de laboratoire.

Ces résultats sont à développer et à compléter par l'étude de la stabilité génétique de la souche, notamment après passages en série *in vivo*, ainsi que celles de son excrétion éventuelle chez le porc et de son action sur la truie gestante.

Le niveau d'atténuation de la souche Alfort 26 est voisin de celui de la souche K61 de Bartha (2). Cette dernière n'est pas pathogène pour le porc (y compris le porcelet nouveau-né), le mouton et le chien de plus de 4 mois ; elle l'est pour le chat, le chien de moins de 4 mois, les animaux à fourrure et le lapin de moins de 2 kg, mais sans entraîner de prurit.

Ces études préliminaires démontrent également l'existence du pouvoir immunogène de la souche Alfort 26 pour le porc. Comme pour d'autres souches de virus modifié de la maladie d'Aujeszky, en particulier la souche K 61, l'injection unique ne provoque qu'une synthèse modérée d'anticorps (1).

Cependant, même en l'absence d'anticorps sériques neutralisants, un certain degré d'immunité existe comme le confirment certains de nos résultats qui recourent des constatations antérieures (3) (6) (7). Il est vraisemblable qu'une composante cellulaire de l'immunité intervient dans ce cas.

Une seconde injection de la souche Alfort 26 détermine une synthèse d'anticorps neutralisants, à des taux au moins égaux à ceux rencontrés chez les porcs ayant reçu deux injections de vaccin huileux à virus inactivé et induit l'installation d'une résistance satisfaisante à l'épreuve virulente.

Ces résultats préliminaires encourageants doivent être largement complétés, en particulier, par l'étude de l'immunité transmise de la truie aux porcelets et par celle de la durée de la protection conférée.

BIBLIOGRAPHIE

1. AYNAUD J.M. et TOMA B. - Journées Rech. Porcine, 1977, ce volume.
2. BARTHA A. - Cah. Méd. Vét., 1974, **43**, 338-340.
3. BASKERVILLE A., Mc FERRAN J.B. et DOW C. - Vet. Bull., 1973, **43**, 465-479.
4. BRAN L. - Cah. Méd. Vét., 1974, **43**, 330-333.
5. DELAGNEAU J.F., TOMA B., VANNIER P., LOQUERIE R., PRUNET P. et TILLON J.P. - Rec. Méd. Vét., 1975, **151**, 567-575.
6. LEUNEN. Communication personnelle.
7. TATAROV G. - Cah. Méd. Vét., 1974, **43**, 347-352.
8. ZUFFA A. et GRUNERT Z. - Cah. Méd. Vét., 1974, **43**, 334-337.