

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 220ème et 221ème 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 10^3 DECP₅₀.

● Cobaye :

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

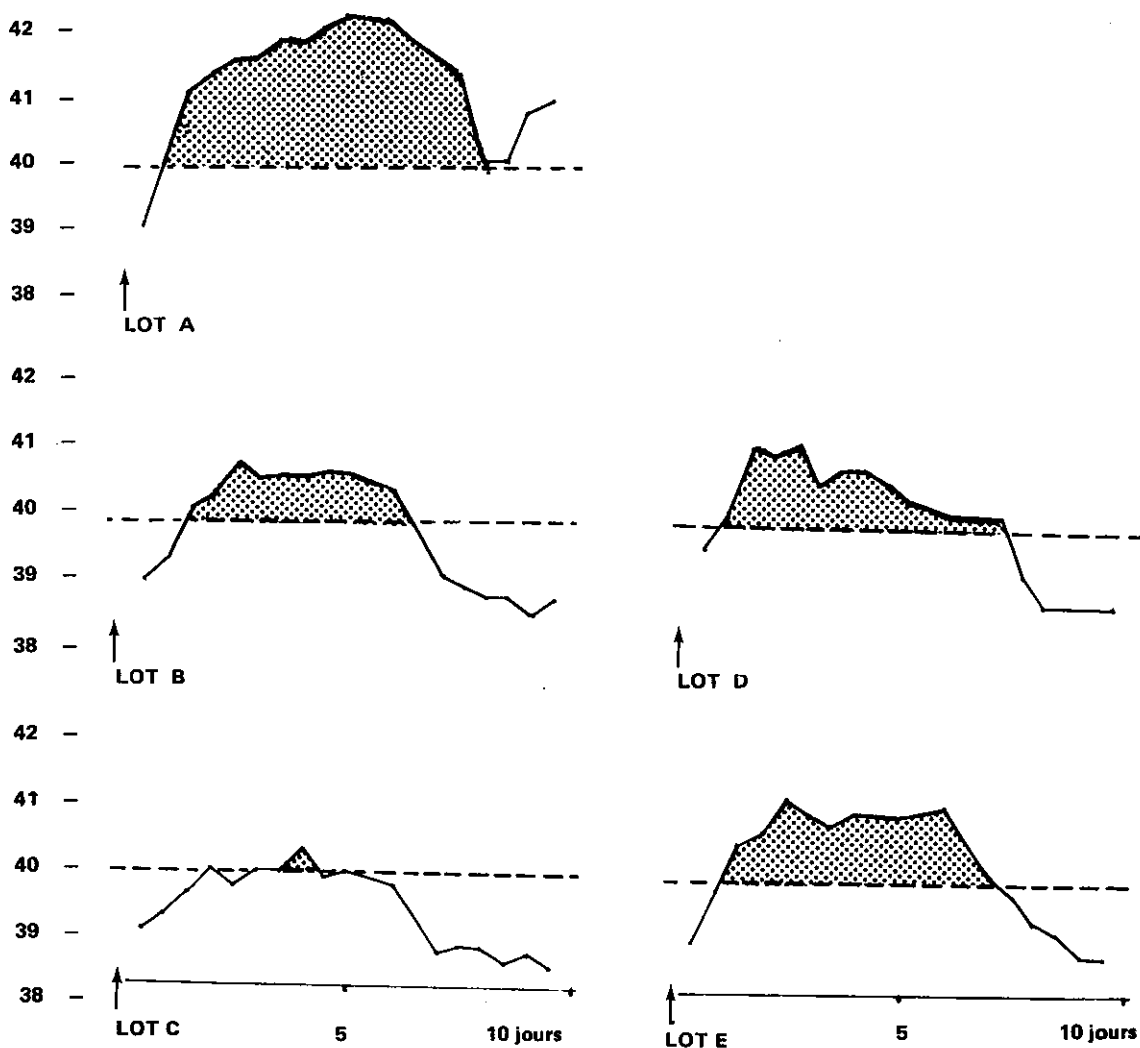
Tous les animaux ont été éprouvés au jour 62 par voie nasale à l'aide de 1 ml par narine de la souche virale hongroise (10⁸ DECP₅₀/ml).

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.