

P8406

GASTROENTÉRITE TRANSMISSIBLE :

Sélection en culture cellulaire de souches du virus de la G.E.T., résistantes à pH 2 et aux enzymes digestives, et dépourvues de virulence pour le porcelet nouveau-né.

J.M. AYNAUD (1), E. BOTTREAU (1), A. BRUN (2), P. VANNIER (3)

(1) I.N.R.A. - Laboratoire de Pathologie Porcine - Nouzilly - 37380 MONNAIE

(2) Rhône-Mérieux - 254, rue Marcel Mérieux - 69007 LYON

(3) Direction de la Qualité - Station de Pathologie Porcine - B.P. n° 9 - 22440 PLOUFRAGAN

INTRODUCTION

Le développement de l'immunité lactogène chez la truie est conditionné par la multiplication du virus vaccinal dans l'intestin. Le virus de la G.E.T. est fragile dans les liquides digestifs (estomac et intestin) du porc (AYNAUD, 1982), dans les solutions acides et dans les solutions d'enzymes digestives (LAUDE *et al.*, 1981). Cette fragilité exerce vraisemblablement une influence sur les conditions du transit et, par voie de conséquence, sur celles de la multiplication du virus dans le tractus digestif du porc en raison de l'activité virulicide des sécrétions gastriques et pancréatiques (CORRING *et al.*, 1972 ; LAPLACE, 1974 ; LOW, 1982). A la lumière de ces données, tout vaccin vivant anti-GET sera soumis à un certain nombre de contraintes dont trois apparaissent déterminantes :

- a) l'absence de pouvoir pathogène pour le porcelet nouveau-né,
- b) la stabilité du virus dans les liquides digestifs du porc adulte : il faut en effet faire en sorte que la suspension de virus vaccinal délivrée au niveau de la cavité buccale de la truie subisse peu ou pas d'inactivation au cours du transit jusqu'à l'épithélium intestinal,
- c) la capacité de multiplication dans l'intestin du porc adulte, condition essentielle pour la production locale de matériel viral susceptible de provoquer la stimulation antigénique des tissus lymphoïdes (plaques de Peyer et ganglions mésentériques).

Dans la perspective de la mise au point d'un vaccin vivant anti-GET tenant compte de ces contraintes, nous avons entrepris de sélectionner en culture cellulaire une souche de virus GET présentant une meilleure résistance à l'inactivation par le pH acide et par les enzymes digestives, et par ailleurs dépourvue de virulence pour le porcelet nouveau-né. Les premiers résultats de ces recherches font l'objet de ce rapport.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 – Cultures cellulaires :

Les lignées de cellules de rein de porc RP.TG, RP.D, RP.J (LAUDE *et al.*, 1981) et la lignée de cellules testiculaires de porc ST McCLURKIN et NORMAN, 1966) ont été utilisées.

2 – Virus de la G.E.T. :

Les souches D.52, PURDUE. 115 et MILLER ont déjà été décrites (LAUDE *et al.*, 1981. Les souches 152-SG et 188-SG ont été isolées au laboratoire à partir des cellules RP.TG.

3 – Pouvoir infectieux du virus de la GET :

Il est titré par la méthode des plages, sous agarose en culture cellulaire (LAUDE *et al.*, 1981).

4 – Tests de stabilité du virus au pH :

La suspension virale est diluée au 1/10 (v/v) dans du tampon McILVAINE (0,1 M) à pH 2, 3 et 7. Après une incubation de 10 mn à 37 °C, les échantillons sont dilués dans du milieu MEM additionné de sérum de veau (20 %) et placés à la température de la glace fondante. Le titrage du virus est effectué immédiatement.

5 – Tests de stabilité du virus aux enzymes protéolytiques :

La suspension est diluée au 1/10 (v/v) soit dans du milieu de culture contenant la trypsine cristallisée (type IX) ou l'alpha-chymotrypsine cristallisée à des concentrations appropriées, soit dans du tampon McILVAINE (0,1 M ; pH 3) contenant la pepsine cristallisée. Après une incubation de 60 mn à 37 °C, les échantillons sont dilués dans du milieu MEM additionné de sérum de veau (20 %) et placé dans la glace fondante. Le titrage du virus est réalisé immédiatement.

6 – Infection expérimentale des porcelets :

Des porcelets SPF à la mamelle âgés de 4 jours sont retirés de la mère depuis 2 à 3 h. Ils sont inoculés par voie orale avec 2 ml de la suspension virale diluée dans 10 ml de milieu MEM. Une heure après, les porcelets sont remis sous la mère. La recherche du virus ou des anticorps neutralisants à partir des divers échantillons est réalisée selon des protocoles décrits précédemment (LAUDE *et al.*, 1981 ; TOMA et BENET, 1976).

RÉSULTATS

A – Sélection d'une souche du virus GET résistante à l'inactivation par le contenu stomacal.

A partir de la souche D.52, isolée en Bretagne dans un foyer de GET par VANNIER et ayant fait l'objet de 5 passages en culture cellulaire, nous avons réalisé des passages en série sur cellules RP.TG régulièrement alternés avec un séjour de 5 à 15 mn à 37 °C dans du contenu gastrique de porc adulte présentant un pH variant de 1,5 à 2,5 selon l'échantillon récolté à l'abattoir. Au bout d'un temps approprié la population virale résiduelle qui a survécu, est récoltée et placée sur des tapis de cellules RP.TG. Après deux ou trois jours d'incubation à 37 °C le virus produit est récolté et soumis de nouveau à une inactivation dans du contenu gastrique et ainsi de suite. La souche 152.SG et la souche 188.SG ont été obtenues, respectivement après 152 et 188 passages en cellules RP.TG alternés à chaque fois avec un cycle d'inactivation dans un échantillon

de contenu gastrique. Dans ces conditions, nous avons enrichi progressivement la population initiale en particules virales douées d'une plus grande stabilité vis-à-vis de l'activité virulicide du contenu stomacal. Les propriétés des deux souches ainsi sélectionnées sont présentées ci-dessous par comparaison avec deux autres souches : la souche d'origine D.52 et la souche PURDUE. 115 qui est en quelque sorte une souche de référence ayant fait l'objet de nombreux travaux publiés à ce jour, tant en France qu'à l'étranger.

B – Taille des plages sous agarose en culture cellulaire (tableau 1)

Sur les cellules testiculaires de la lignée ST, les souches 152.SG et 188.SG présentent le caractère « petite plage ». D'un diamètre environ 2 à 3 fois inférieur à celui des plages dites « normales » observées habituellement avec d'autres souches ou dans les autres lignées cellulaires, ces petites plages sont homogènes et stables. Ce caractère constitue donc un marqueur intéressant pour les deux souches que nous avons sélectionnés.

C – Stabilité du virus vis-à-vis du pH acide (tableau 2)

Les résultats révèlent qu'à pH 3 le virus GET est stable quelle que soit la souche. En revanche, à pH 2 les trois souches D.52, PURDUE. 115 et MILLER sont fragiles, tandis que les souches 152.SG et 188.SG sont peu ou pas inactivées.

TABLEAU 1

TAILLE DES PLAGES SOUS AGAROSE FORMÉES PAR LE VIRUS GET DANS 4 LIGNÉES CELLULAIRES DIFFÉRENTES (APRÈS 48 H D'INCUBATION A 37-38 °C)

Souches de virus GET	ST	RP.D	RP.TG	RP.J
152.SG 188.SG	petites ⁽¹⁾	normales ⁽²⁾	normales	normales
D.52 Purdue.115	normales normales	normales normales	normales normales	normales normales

(1) : petites : 0,5 mm en moyenne.

(2) : normales : \geq 1 mm.

TABLEAU 2

STABILITÉ DU VIRUS GET VIS-A-VIS DU pH ACIDE

Souches de virus GET	pH 3,0	pH 2,0
152.SG	0,2 ⁽¹⁾ (0,2 – 0,3)	0,3 ⁽¹⁾ (0,1 – 0,4)
188.SG	< 0,1 (< 0,1 – < 0,1)	0,2 (0,1 – 0,3)
D.52	0,1 (0,1 – 0,2)	1,2 (0,7 – 1,8)
Purdue.115	< 0,1 (< 0,1 – < 0,1)	3,2 (2,2 – 4,2)
Miller.13	< 0,1 (< 0,1 – < 0,1)	1,2 (1,1 – 1,3)

(1) : réduction du titre infectieux en log₁₀ après une incubation de 10 min à 37 °C.

D – Stabilité du virus vis-à-vis des enzymes protéolytiques

TRYPSINE (tableau 3)

Le virus GET est sensible à la trypsine et l'intensité de l'inactivation dépend de la concentration d'enzyme. Les résultats révèlent des différences entre souches. Ainsi les souches 152.SG

et 188.SG sont 5 à 10 fois moins sensibles à la trypsine si on considère l'influence de la concentration d'enzyme.

TABLEAU 3
STABILITÉ DU VIRUS GET VIS-A-VIS DE LA TRYPSINE⁽¹⁾

Souches de virus GET	Concentration en trypsine (µg/ml)				
	10	100	500	1 000	10 000
152.SG	0,3 ⁽²⁾ (0,1 - 0,4)	0,5 (0,4 - 0,6)	1,3 (1,1 - 1,5)	1,3	-
188.SG	0,1 (< 0,1 - 0,1)	0,1 (0,1 - 0,2)	0,8 (0,8 - 0,9)	1,1 (1,0 - 1,1)	≥ 2,3
D.52	0,2 (0,1 - 0,2)	1,7 (1,4 - 1,9)	2,7 (2,3 - 3,2)	3,3 (3,2 - 3,3)	-
Purdue. 115	< 0,1 (< 0,1 - < 0,1)	1,1 (1,1 - 1,1)	3,1 (3,0 - 3,1)	3,1	-

(1) : Trypsine cristallisée d'origine porcine (Sigma) avec une activité spécifique de 15 000 UI/mg

(2) : réduction du titre infectieux en log₁₀ après une incubation de 60 min à 37 °C

ALPHACHYMOTRYPSINE (tableau 4)

Même en tenant compte de sa faible activité spécifique, la chymotrypsine est moins active que la trypsine sur le pouvoir infectieux du virus GET. Considérant les résultats obtenus avec une concentration d'enzyme de 1mg/ml, on constate que la souche 152.SG et surtout la souche 188.SG sont à nouveau moins sensibles que la souche d'origine D.52. En revanche, la souche 152.SG présente une sensibilité très voisine de celle de la souche PURDUE. 115.

TABLEAU 4
STABILITÉ DU VIRUS GET VIS-A-VIS DE L'ALPHACHYMOTRYPSINE⁽¹⁾

Souches de virus GET	Concentration en enzyme (µg/ml)			
	1	10	100	1 000
188.SG	0,3	0,1	0,8 (1,0 - 0,7)	2,0 (2,8 - 1,2)
152.SG	-	0,1	0,7	1,9
D.52	-	0,2	0,1 (0,3 - 0,0)	2,5 (2,6 - 2,4)
Purdue.115	-	< 0,1	< 0,1	1,8

(1) : L'Alphachymotrypsine d'origine bovine (Worthington), présente une activité spécifique de 50 Unités/mg.

(2) : Réduction du titre infectieux en log₁₀ après une incubation de 60 min à 37 °C

PEPSINE (tableau 5)

Le virus de la GET est sensible à la pepsine et l'intensité de l'inactivation dépend de la concentration d'enzyme. Les résultats révèlent des différences entre souches. A nouveau, les souches 152.SG et 188.SG sont 10 fois moins sensibles que les souches D.52 et PURDUE. 115 si on considère l'influence de la concentration d'enzyme.

TABLEAU 5
STABILITÉ DU VIRUS GET VIS-A-VIS DE LA PEPSINE

Souches de virus GET	Concentration en pepsine ($\mu\text{g/ml}$) ⁽¹⁾			
	1	10	100	1 000
152.SG	0,8 (0,8 – 0,8) ⁽²⁾	1,1 (1,1 – 1,1)	3,0	$\geq 4,0$
188.SG	0,9 (0,9 – 0,9)	1,3 (1,1 – 1,6)	2,8 (2,7 – 3,0)	3,9 (3,2 – > 4,1)
D.52	2,5 (2,3 – 2,6)	3,1 (3,0 – 3,2)	3,2 (2,5 – 4,0)	3,3 (3,0 – 3,6)
Purdue 115	1,8 (1,7 – 1,9)	2,7 (2,6 – 2,7)	3,2 (2,9 – 3,5)	3,0 (2,9 – 3,0)

(1) : pepsine cristallisée d'origine porcine (Sigma) ayant une activité spécifique de 2 400 UI/mg
(2) : réduction de titre infectieux en \log_{10} après une incubation de 60 min à 37 °C

E – Pouvoir pathogène pour le porcelet nouveau-né

Deux portées de porcelets SPF à la mamelle ont été inoculés par voie orale à l'âge de 4 jours avec respectivement 4×10^6 et 4×10^7 P.F.U. de la souche 152.SG du virus de la GET. Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Quelle que soit la dose de l'inoculum, aucune mortalité n'est observée tout au long des 24 jours d'observation. Les porcelets inoculés avec 4×10^7 ont tous manifesté le 5^e et le 6^e jour une diarrhée bénigne qui n'a pas eu d'influence défavorable sur l'état général tout-à-fait satisfaisant. Les porcelets « contact » de cette portée ont présenté à leur tour un tableau clinique identique à partir du 6^e jour. A partir des échantillons de matières fécales, il n'a pas été possible de réisoler le virus en culture cellulaire. Ce dernier a diffusé néanmoins aux porcelets « contact » chez qui s'est développée une réponse immunitaire (anticorps neutralisants du sérum). La multiplication de la souche 152.SG chez les porcelets « contact » n'a pas induit un regain de virulence résiduelle à la faveur d'un second passage sur porcelet sensible.

TABLEAU 6
INNOCUITÉ DE LA SOUCHE 152.SG DU VIRUS GET POUR LE PORCELET S.P.F. A LA MAMELLE

	Dose de l'inoculum viral administré par voie orale à chaque porcelet			
	4×10^6 PFU		4×10^7 PFU	
	inoculés	« contact »	inoculés	« contact »
Mortalité (morts/total)	0/3	0/3	0/4	0/3
Diarrhée (malades/total)	0/3	0/3	4/4	3/3
Virus isolé dans les matières fécales (positifs/total)	0/3	0/3	0/4	0/3
Réponse immunitaire (positifs/total)	3/3	3/3	4/4	3/3
Titre moyen du sérum en anticorps neutralisants				
au 8 ^e jour	1/65	1/10	1/13	< 1/2
au 15 ^e jour	1/100	1/300	1/15	1/8
au 21 ^e jour	1/200	1/340	1/33	1/16

DISCUSSION

Après de nombreux passages en culture cellulaire alternés à chaque fois avec un séjour dans du contenu gastrique de porc adulte, nous avons sélectionné deux souches du virus GET dont les propriétés, par comparaison avec celles de la souche d'origine D.52 ou celles de la souche PURDUE. 115, sont présentées dans ce rapport.

Ces deux souches ont les propriétés suivantes :

- Meilleure stabilité dans les solutions acides (pH 2,0)
- Meilleure résistance vis-à-vis des enzymes gastriques (pepsine) et des enzymes pancréatiques (trypsine),
- Caractère « petite plage » qui se manifeste exclusivement sur les cellules testiculaires de la lignée « ST »,
- innocuité et pouvoir immunogène pour le porcelet SPF à la mamelle âgé de 4 jours.

La stabilité à l'acidité et aux enzymes digestives d'une part et le caractère « petite plage » d'autre part, ont été considérés successivement par FURUUCHI *et al.*, (1975) et par HESS *et al.*, (1977) comme des propriétés propres aux souches virulentes pour le porcelet. Confirmant nos travaux précédents (LAUDE *et al.*, (1981) ainsi que ceux de MOCSARI (1980), les résultats présents sont en contradiction avec ceux de nos collègues japonais et allemands. Il est vrai que nos conditions expérimentales sont différentes, car nous avons essayé de nous rapprocher le plus possible des conditions physiologiques du tractus digestif du porc adulte et ceci dans la perspective de l'amélioration des méthodes d'immunisation de la truie par voie orale contre la GET. C'est pour cette raison que nous avons choisi par exemple de travailler à pH 2 et non à pH 3 comme les autres auteurs, afin d'opérer dans des conditions sévères plus proches de celles du milieu stomacal du porc adulte. De même, pour étudier la stabilité du virus vis-à-vis des enzymes digestives, nous avons choisi de travailler avec des concentrations croissantes de différentes enzymes cristallisées d'activité spécifique connue, ce qui nous a permis de mettre en évidence de façon plus précise des différences entre les souches étudiées.

Nos résultats suggèrent que les souches 152.SG et 188. sont des propriétés structurales particulières. Ces dernières seraient peut-être susceptibles d'assurer aux particules virales infectieuses une meilleure stabilité au cours du transit entre la cavité buccale et l'épithélium de l'intestin grêle du porc adulte. Compte tenu de l'absence de virulence pour le porcelet nouveau-né, ces deux souches sont de bons candidats comme vaccin à virus vivant anti-GET par voie orale chez la truie gestante. Des expérimentations ultérieures nous permettront d'évaluer la capacité de ces souches à induire chez la truie, une immunité lactogène anti-GET protectrice pour le porcelet.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Serge BERNARD pour ses conseils et ses critiques ainsi que Isabelle LANTIER pour les titrages d'activité enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

- AYNAUD J.M., 1982. Journée Rech. Porcine en France. **14**, 397-404
- CORRING T., AUMAITRE A., 1972. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., **12**, 109-124.
- FURUUCHI S., SHIMIZU Y., KUMAGAI T., 1975. Natl. Inst. Anim. Health Q., **15**, 159-164 ;
- HESS R.G., BACHMANN P.A., 1977. Infect. Immun., **13**, 1624-1646.
- LAPLACE J.L., 1974. Ann. Zootech. **23**, 89-104.
- LAUDE H., GELFI J., AYNAUD J.M., 1981. Am. J. Vet. Res., **42**, 447-449.
- LOW A.G., 1982. Br. J. Nutr., **48**, 147-159.
- McCLURKIN A.W., NORMAN J.O., 1966. Can. J. Comp. Med., **30**, 190-198.
- MOCSARI E., 1980. Acta. Vet. Acad. Sci. Hung., **28**, 341-350.
- TOMA B., BENET J.J., 1976. Rec. Med. Vét., **152**, 565-568.