ETUDE COMPAREE AU MOYEN DES PROPRIETES IN VITRO, DU VIRUS SAUVAGE ET DE VIRUS ATTENUÉS DE LA PESTE PORCINE CLASSIQUE

J.-M. AYNAUD

Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie

THIVERVAL - GRIGNON

INTRODUCTION

Si la température de développement *in vitro* d'un virus est modifiée, on sélectionne au cours des passages les mutants les mieux adaptés à se multiplier à cette nouvelle température. PRUNET puis ASSO ont montré que l'adaptation du virus de la fièvre aphteuse à se développer aux basses températures (25° - 29°) permet d'obtenir rapidement la disparition du pouvoir pathogène original. Les virus mutants ainsi préparés se distinguent de la souche sauvage originale par un certain nombre de propriétés, appelés facteurs d'identification dont l'intérêt est capital dans la préparation des vaccins vivants. Les facteurs d'identification permettent de repérer les clones les plus atténués, de s'assurer de l'homogénéité des populations de virus qui composent les vaccins et surtout de contrôler la stabilité du caractère avirulent des souches après inoculation et multiplication chez l'animal vacciné (ASSO).

Pour notre part, nous cherchons à établir les facteurs d'identification du virus de la peste porcine classique, c'est-à-dire les propriétés *in vitro* différenciant les virus pathogènes des virus atténués. Nous présentons dans ce rapport des résultats expérimentaux relatifs d'une part aux caractéristiques de la multiplication *in vitro* du virus et d'autre part à la résistance du virus à la chaleur.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé la lignée établie de cellules de rein de porc "PK 15" qui est très sensible à la multiplication du virus de la peste porcine.

Les virus étudiés étaient les suivants :

a) - Souche sauvage "ALFORT" (Dr LARENAUDIE).

Ce virus est très pathogène pour le porc puisqu'il est capable de provoquer la mort de l'animal en 8 à 10 jours après l'inoculation.

b) - Les souches de virus atténués

Ces virus ont perdu leur pouvoir pathogène tout en conservant le pouvoir de multiplication et le pouvoir immunigène.

- la souche lapinisée "SUVAC" (Institut Phylaxia de BUDAPEST)
- mutants froids obtenus au laboratoire de GRIGNON au moyen de sélection à 29° en culture cellulaire.

L'identification, le titrage et le clonage sont réalisés au moyen des techniques d'immuno-fluorescence.

RESULTATS

1 - ETUDE COMPAREE DE LA MULTIPLICATION *IN VITRO* DANS LES CELLULES PK 15 DE VIRUS PATHOGENES ET DE VIRUS ATTENUESa) - la taille des plages de cellules fluorescentes 24 h après l'infection

24 heures après l'infection à 37° avec les clones 29 ou avec la souche sauvage ALFORT on observe des plages de cellules fluorescentes constituées de 15 à 30 cellules en moyenne. Dans les mêmes conditions les plages fluorescentes obtenues avec la souche lapinisée "SUVAC" sont composées de 1 à 2 cellules. La souche lapinisée "SUVAC" se comporterait donc comme un mutant "petite plage", ce qui suggère une vitesse de multiplication beaucoup plus lente que celle observée avec la souche sauvage "ALFORT" ou avec les clones 29 dans les mêmes conditions.

b) - apparition de la fluorescence spécifique en fonction de la température dans les cellules infectées

Des tubes de leighton renfermant des couches monocellulaires infectées par les diverses souches de virus, sont plongés dans des bains-marie à différentes températures. 24 heures plus tard, les cellules sont colorées par les anticorps fluorescents. Les cellules infectées par la souche sauvage "ALFORT" présentent une fluorescence spécifique entre 36° et 43° avec un maximum observé vers 39° - 40°. Dans les mêmes conditions, les cellules infectées par la souche lapinisée "SUVAC" ou par les clones 29 présentent une fluorescence dans des gammes respectivement de 32° à 41° et de 29° à 42° avec des maximums observés à 39° et 38°c.

Il semble donc que l'antigène viral produit lors de l'infection par la souche sauvage "ALFORT" apparaît dans les cellules que si les températures d'incubation sont relativement élevées.

c) - le développement en cycle unique et le rendement thermique

Le cycle unique est théoriquement la multiplication d'une particule infectieuse dans une cellule. Ce système est pratiquement impossible à réaliser. Aussi, on a recours à une population de cellules que l'on infecte dans un temps très bref avec une grande quantité de virus de telle façon que toutes les cellules soient infectées en même temps. Dans ces conditions, la multiplication virale est synchrone et on peut globalement assimiler un tel système à la multiplication d'une particule infectieuse dans une seule cellule. Le cycle unique présente un grand intérêt, car en faisant varier tel ou facteur du milieu on peut obtenir des renseignements sur les caractéristiques du développement *in vitro* du virus. Dans notre cas nous avons surtout étudié la cinétique d'apparition des particules infectieuses en fonction de la température.

Le développement en cycle unique a été étudié pour l'instant seulement pour la souche sauvage "ALFORT" et pour quelques clones 29°.

Ces deux types de virus ont une multiplication rapide. Leur cycle est terminé à la 15ème heure. L'étude du développement en cycle unique en fonction de la température révèle de grandes différences entre les deux types de virus. La souche sauvage "ALFORT" a un rendement élevé en particules infectieuses entre 37° et 41,5° avec un optimum à 39,5°. Par contre le clone 29 étudié se développe bien qu'entre 37° et 38,5°. La multiplication de ce clone n'est donc possible que dans une gamme étroite de température. De plus, des différences se rencontrent dans la détermination du RT qui est la température supraoptimale à laquelle on observe une diminution de 90 % dans la production en particules infectieuses.

La souche sauvage "ALFORT" a un RT de 42,5 alors que le clone 29° c a un RT de 40°.

42,5° est sans doute qu'un RT apparent car il est vraisemblable que le métabolisme cellulaire est fortement affecté par la température de 42° - 43° c.

La souche sauvage "ALFORT" est donc particulièrement bien adaptée à se développer aux températures élevées voisines de la température moyenne du porc, et même la température de 41,5° ne gênera pas beaucoup la multiplication du virus sauvage. Par contre le développement *in vivo* des clones 29 sera inhibé, non seulement par la température interne moyenne du porc, mais encore à plus forte raison par les températures élevées de l'animal en état d'hyperthermie.

2 - RESISTANCE DU POUVOIR INFECTIEUX A LA CHALEUR

Les virus pathogènes résistent à la température de 50° pendant 15 minutes et ne sont que partiellement inactivés à 56° pendant le même temps. Le traitement à 56° c provoque une diminution de 90 % du pouvoir infectieux. Dans les mêmes conditions les "clones 29° c" sont partiellement inactivés à 50°, et inactivés à 56°, température à laquelle on observe une diminution de 99 % du pouvoir infectieux.

Les virus atténués des "clones 29°" sont donc beaucoup plus fragiles que les virus pathogènes.

CONCLUSION

Certaines propriétés *in vitro* relatives à la multiplication virale et à la thermostabilité du virus semblent donc être associées avec le pouvoir pathogène du virus de la peste porcine. Nous avons montré qu'une souche de virus capable de provoquer la mort du porc en 8 à 10 jours, possédait les propriétés *in vitro* suivantes :

- capacité de multiplication *in vitro* dans une gamme étalée de températures élevées.
- thermostabilité du pouvoir infectieux, vraisemblablement en rapport avec la structure de la particule virale.

Par contre, des souches de virus ayant perdu leur pouvoir pathogène tout en conservant le pouvoir immunigène, possèdent les propriétés suivantes :

- capacité de multiplication *in vitro* dans une gamme étroite de températures inférieures à 39° c.
- instabilité du pouvoir infectieux à la chaleur.

Les propriétés *in vitro* que nous avons étudiées sont appelées facteurs d'identification. Ils permettent de distinguer les virus pathogènes des virus atténués sans recourir à l'inoculation du porc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ASSO J., Etude de quelques mutants du virus de la fièvre aphteuse - Thèse de Doctorat es-Sciences Naturelles PARIS 1967

AYNAUD J.-M., Etude de multiplication *in vitro* d'un clone du virus de la peste porcine - Recherches Vétérinaires 1968. I, P. 25-36.

RELATION ENTRE LES PROPRIETES IN VITRO DU VIRUS DE LA PESTE PORCINE ET LE POUVOIR PATHOGENE POUR LE PORC

		VIRUS PATHOGENES	VIRUS ATTENUES	
		souche "Alfort"	"Clones 29°"	Souche lapinisée "Suvac"
<u>Multiplication</u> <u>du</u> <u>virus</u> <u>in vitro</u>	gamme des températures correspondant à la fluorescence spécifique	36° C - 43° C optimum à 39 - 40	29° C - 42° C optimum à 38	32° C - 41° C optimum à 39°
	taille des plages	grandes plages	grandes plages	petites plages
	durée du cycle viral	15 h	15 h	
	gamme des températures correspondant à un rendement élevé en virus	37° C - 41°,5	37° C - 38°,5	
	température optimale de développement	39°,5	38°	
	RT	42°,5	40°	
<u>Résistance du</u> <u>pouvoir infectieux</u> <u>à la chaleur</u>	50° C pendant 15'	stable	partiellement inactivé	
	56° C pendant 15'	partiellement inactivé	inactivé	