

ZVAN 1143

INSTITUT D'ÉLEVAGE ET DE MÉDECINE
VÉTÉRINAIRE DES PAYS TROPICAUX

REVUE D'ÉLEVAGE
ET DE
MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
DES PAYS TROPICAUX

**Adaptation du virus de la peste
des petits ruminants aux cultures cellulaires**

Note préliminaire

par Y. GILBERT et J. MONNIER

Tome XV (nouvelle série)

N° 4 — 1962

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS
23, rue de l'École-de-Médecine, PARIS-VI

Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires

Note préliminaire

par Y. GILBERT et J. MONNIER

INTRODUCTION

L'affection dénommée « Peste des petits ruminants » (PPR) est due à un ultra-virus étroitement apparenté à celui de la peste bovine, avec lequel il possède une communauté antigénique étroite : les épreuves de séro-neutralisation croisées *in vivo* (1) et *in vitro*, et la précipitation en milieu gélatiné, ne permettent pas de les distinguer : seul, leur pouvoir pathogène montre une différence marquée.

En effet, si le virus PPR provoque chez les caprins et les ovins l'évolution d'une affection dans laquelle les symptômes observés sont très semblables à ceux que présentent les bovins infectés par le virus de la peste bovine classique (hyperthermie, état typhique, ulcération de la muqueuse buccale, diarrhée profuse et mort) ce même virus injecté à des bovins des races les plus sensibles à la peste bovine ne provoque qu'une légère hyperthermie suivie de l'apparition de la résistance au virus PB.

La PPR a été signalée d'abord au Dahomey, en Côte d'Ivoire et, plus récemment, au Sénégal où elle entraîne des pertes sensibles dans les effectifs de petits ruminants.

Aucun vaccin n'est jusqu'ici disponible, sauf le vaccin bovipestique lapinisé qui aurait donné de bons résultats en Côte d'Ivoire mais ses difficultés de production et son prix de revient élevé en interdisent un emploi extensif.

C'est pourquoi il a semblé intéressant de tenter l'adaptation de ce virus aux cultures cellulaires, dans l'espoir que des passages en série en atténueraient le pouvoir pathogène et permettraient la production d'un vaccin efficace.

Le présent article rapporte les premiers résultats obtenus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation des suspensions cellulaires.

Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de cellules épithéliales de reins d'embryons ovins en provenance de l'abattoir de Dakar.

L'âge des embryons n'a pas été pris en considération.

Les reins sont décapsulés, la zone corticale prélevée en petits fragments à l'aide d'un bistouri ; ces fragments sont hachés, lavés 3 fois au PBS*, soumis à l'action d'une solution de trypsine Difco (1:250) à 3 p. 1.000 pendant 20 minutes à la température du laboratoire, sur agitateur magnétique. La trypsine est éliminée par décantation et remplacée par une solution fraîche de trypsine. La trypsination est poursuivie pendant 5 à 6 heures au réfrigérateur. Au bout de ce temps, la suspension cellulaire est filtrée sur gaze (4 épaisseurs), centrifugée à 900 tours/minute, pendant 4 à 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire lavé avec de la solution saline de Hanks additionnée de 10 p. 100 de sérum bovin. Après centrifugation, le culot cellulaire est mis en suspension à raison de 1 volume pour 300 de milieu nutritif composé de solution de Hanks additionnée de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, et 0,1 p. 100 d'extrait de levure, auquel on ajoute 10 p. 100 de sérum de veau (importé de France) ainsi que des antibiotiques : Pénicilline, 100 UI/ml et Streptomycine, 0,1 mg par ml.

Les renouvellements ultérieurs de milieu sont

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. 1962, 15, n° 4.

Reçu pour publication : août 1962.

* P B S : Phosphate buffer solution (Solution Dulbecco).

effectués tous les 2 ou 3 jours à l'aide du même milieu, mais la proportion de sérum est ramenée à 5 p. 100 de sérum de bovin (importé de France); au 1^{er} changement, et à 2 p. 100 pour les changements ultérieurs, qui s'effectuent lorsque le virage de l'indicateur coloré indique un pH nettement acide.

Réceptacles pour culture.

La suspension cellulaire est répartie soit en tubes de verre neutre ou de Pyrex de 18 x 180 à la dose de 2 ml, soit en tubes de Leighton à la même dose, soit en flacons plats pharmacie de 150 ml, à la dose de 15 ml, soit en flacons de 250 ml en verre neutre à la dose de 22,5 ml.

Pour la production de grandes quantités de virus, on utilise des boîtes de Roux de 1 l recevant 75 ml de suspension cellulaire.

Incubation.

Les flacons et tubes sont placés, après répartition de la suspension, en position stationnaire pendant 2 à 3 jours.

Le milieu est alors renouvelé.

Les flacons demeurent immobiles, alors que les tubes sont placés sur un tambour tournant (système *roller-tubes*).

La température d'incubation est, selon les cas, de 37° ou 40° C.

Souches de virus.

Des virus de différentes provenances ont été utilisés pour tenter d'infecter des cultures cellulaires. Seule a été couronnée de succès l'infection de couches monocellulaires par le sang provenant d'un mouton de race maure, spontanément infecté de PPR.

Ce mouton, amené malade au laboratoire, présentait une température de 41° 4 et des ulcérations de la muqueuse buccale et pharyngée.

Un prélèvement de sang fut pratiqué par ponction veineuse immédiatement avant l'abattage, puis, après celui-ci, la rate et des ganglions furent prélevés. Le sang obtenu fut aussitôt débriné par agitation dans un ballon contenant des billes de verre.

Passage du virus.

a) Premier passage.

Rate et ganglions sont broyés séparément au mortier en présence de poudre de verre, puis des suspensions à 10 p. 100 de ces tissus sont préparées dans de la solution de Hanks, et centrifugées à 2.000 t/minute pendant 10 minutes.

Dans des tubes contenant des cellules de rein d'embryon de mouton mises en culture quatre jours auparavant, on introduit 2 ml de suspension de rate ou de ganglion, ou de sang débriné.

Après 24 heures d'incubation à 37° C, le liquide infectant est remplacé par du milieu nutritif de Hanks, après rinçage des cellules au 'BS.

b) Passages ultérieurs.

Ils sont effectués en ajoutant du milieu du passage précédent à une suspension cellulaire fraîchement préparée, ou au milieu de renouvellement de couches cellulaires déjà constituées.

Titrage du virus.

En vue des titrages, le virus est dilué en série décimale dans du liquide de Hanks (dilutions 0⁻¹ à 10⁻⁶).

On porte alors 1 ml de chacune des dilutions dans un tube contenant 10 ml de suspension cellulaire. Après le mélange, le contenu de chaque tube de suspension infectée est réparti à la dose de 2 ml dans 5 tubes en verre neutre ou Pyrex de 18 x 180.

Chaque tube reçoit donc 0,2 ml de la dilution considérée.

Pour les titrages plus précis, on recourt à 10 tubes par dilution.

Identification du virus par séroneutralisation.

Le virus à identifier est dilué en une série de dilutions décimales 10⁻¹ à 10⁻⁶.

Deux séries de 6 tubes sont préparées.

Chaque série reçoit 1 ml des différentes dilutions de virus.

A chacun des tubes d'une série on ajoute 1 ml de sérum antibovipestique préparé soit sur lapin, soit sur bœuf.

Les tubes de l'autre série reçoivent 1 ml de sérum de bovin réceptif.

Après agitation, les tubes sont mis en incubation '1 h au bain-marie.

Les différents mélanges sont repartis à la dose de 0,2 ml par tube contenant 2 ml de suspension cellulaire.

On utilise 2 à 5 tubes par mélange.

Le virus est considéré comme neutralisé s'il existe une différence d'au moins 2 log à base 10 entre les titres des virus respectivement en présence de sérum normal et de sérum antivépistique.

Préparations colorées.

Elles sont réalisées à l'aide de tubes de Leighton recevant 2 ml de suspension cellulaire, infectée ou non.

Pour la coloration, les tubes sont vidés, lavés 3 fois au PBS, la couche cellulaire est fixée 3 à 5 minutes au Bouin alcoolique, puis colorée par l'hémalum de Mayer et l'éosine. Montage au baume du Canada.

Inoculation aux animaux.

Bovins. -Sont utilisés des bovins sans bosse de race N'Dama, provenant de la région de Kédougou, très sensibles à la peste bovine. Avant toute inoculation un prélèvement de sang est effectué, et le sérum soumis à une épreuve de séroneutralisation, en culture cellulaire à la dilution 1 : 2. Seuls, sont retenus pour les expériences, les bovins dont le sérum apparaît complètement dépourvu d'anticorps neutralisant le virus bovipéistique en culture cellulaire (présence d'effet cytopathogène dans les quatre tubes inoculés avec le mélange sérum-virus de culture).

Caprins. — Sont utilisés des caprins âgés de 6 à 12 mois provenant de la région de Fatik (Sénégal) de Thiès, ou de Kédougou. Le sérum de ces caprins est examiné avant toute inoculation pour détection des anticorps neutralisant le virus bovipéistique de culture.

Quinze jours après inoculation de virus PPR et avant toute épreuve, les animaux survivants (bovins ou caprins) subissent un second prélèvement de sang en vue d'obtenir du sérum (sérum B).

RÉSULTATS

Premier passage du virus sur cultures cellulaires.

Suspension ganglionnaire.

Après 24 heures à l'étuve à 37° C, les cellules sont complètement détruites (effet toxique de l'inoculum) et les tubes sont éliminés.

Suspension de rate.

Après 24 heures à l'étuve à 37° C, un effet toxique limité est observé sur la couche cellulaire ; cependant la majorité des cellules demeure intacte.

Aucun effet cytopathogène n'apparaît en 11 jours et, le tapis cellulaire étant décollé, les tubes sont éliminés.

Un deuxième passage est effectué, puis un troisième, mais aucun effet cytopathogène ne se manifeste pendant la période d'observation. Les passages sont abandonnés à l'issue du quatrième.

Sang.

Après 24 heures à l'étuve à 37° C, les cellules, après lavage au PBS, apparaissent intactes. Le milieu est régulièrement renouvelé.

Dix jours après l'infection, de larges plaques ressemblant à des cellules géantes se forment au sein de la couche cellulaire. Ces plaques augmentent en taille et en nombre, et se creusent d'énormes vacuoles.

Ces lésions persistent pendant plus de 21 jours, délai au bout duquel les tubes sont éliminés.

Dès le 2^e passage, un test d'identification par séro-neutralisation indique que l'effet cytopathogène est totalement inhibé par le sérum d'un bouc guéri de PPR et par le sérum antivépistique.

A partir du virus obtenu par premier isolement en culture, récolté à plusieurs reprises entre le 11^e et le 21^e jour après l'infection, deux séries de passages ont été commencées, l'une à la température de 37°, l'autre à 40° C.

Passages à 40° C.

Le milieu nutritif baignant les cellules infectées du 1^{er} isolement du virus est mélangé à une suspension cellulaire de rein d'embryon de mouton lors de la mise en culture. Un effet cytopathogène est observé 9 jours plus tard ; il se traduit par l'apparition au sein du tapis cellulaire, de

arges plaques constituées par d'énormes cellules géantes.

Au cours des passages suivants l'effet cytopathogène peut être décelé par observation à l'état frais dès le 5^e jour ; il se traduit toujours par l'apparition de syncytiums. Il n'existe pas de cellules rondes réfringentes isolées ou groupées en chaînes, comme on en observe dans les cultures infectées par le virus bovipestique.

Dans une deuxième série de six passages effectuée dans les mêmes conditions, à partir du virus de 1^{er} isolement, par passages successifs en suspension cellulaire fraîche, l'effet cytopathogène se manifeste régulièrement après 7 jours d'incubation.

Après apparition des premiers syncytiums, ceux-ci s'accroissent en taille et en nombre, et bientôt la culture est constituée par des cellules géantes, séparées par des cordons de cellules de type fibroblastique. Cet aspect persiste très longtemps, et une couche cellulaire presque continue est visible à l'oeil nu sur des flaconsensemencés 36 jours plus tôt.

Passages à 37° C.

Une série de 12 passages en série a été réalisée.

Le milieu du précédent passage est incorporé à la suspension cellulaire lors de sa mise en culture, sauf au 2^e passage effectué par infection 2 jours après leur mise en culture de cellules de rein d'embryon de mouton à l'aide du milieu nutritif de tubes du 1^{er} passage, et au 5^e passage effectué sur des cellules de 5 jours. L'effet cytopathogène apparaît en 6 à 7 jours, se manifestant par des zones d'apparence unie, renfermant de nombreux points réfringents qui sont les nucléoles des noyaux des syncytiums. Comme les cellules de rein d'embryon de mouton donnent des cultures extrêmement denses et qu'il n'est pas rare d'observer des zones où les cellules forment plusieurs couches, les lésions dues à l'infection sont parfois difficiles à identifier. En 12 à 14 jours, toute la surface du verre semble couverte de syncytiums sans tendance marquée à la vacuolisation. Ces cellules géantes subsistent pendant un temps très long (plus de 3 jours), elles présentent une partie centrale réfringente, opaque et jaunâtre, bordée par les noyaux disposés en une couronne entourée d'une zone périphérique plus claire.

Caractéristiques microscopiques des lésions déterminées par le virus sur les cellules cultivées in vitro.

1^o Dans des couches cellulaires obtenues par infection de suspensions lors de la mise en culture des cellules, incubées à 37° C.

En raison de la rapidité de croissance des cellules de mouton et de la lenteur d'apparition de l'E. C. P. (effet cytopathogène) celui-ci ne commence en général à se manifester qu'au sein d'une couche cellulaire entièrement constituée.

Au 5^e jour, les premiers effets cytopathogènes se traduisent par l'apparition d'amas de 2 à 6 noyaux, constituant l'amorce de cellules géantes, au milieu d'une zone de cytoplasme clair. Souvent, ces noyaux contiennent des inclusions sous forme d'une à 4 taches circulaires incolores, centrées par un point fortement éosinophile. Le nucléole est toujours intact. Par ailleurs, des inclusions de ce type se rencontrent dans les noyaux de cellules encore individualisées. Ces cellules sont en général groupées par zones bien déterminées.

Au 7^e jour, on observe des groupes de plusieurs petites cellules multinucléées, dont les noyaux renferment de 1 à 6 inclusions rose vif entourées d'un halo clair. De même, nombreuses sont les cellules isolées possédant de telles inclusions, dont la taille tend à augmenter. La tache éosinophile centrale est circulaire ou de forme allongée.

Au 8^e jour, les inclusions sont encore plus nombreuses, et occupent la plus grande part de la surface du noyau.

A partir du 9^e jour se constituent, par fusion d'éléments multinucléés voisins, de grands syncytiums, dont les noyaux se disposent en couronne, autour d'une zone centrale circulaire ou ovoïde fortement éosinophile. Les noyaux de ces cellules contiennent ou non des inclusions dont certaines occupent la quasi-totalité du noyau. En ce qui concerne le reste de la couche cellulaire, les limites des cellules deviennent difficiles à distinguer, d'autant plus que la culture est en général très dense. Le cytoplasme renferme des masses éosinophiles, et la plupart des noyaux, des inclusions.

Au 13^e jour, presque toutes les cellules sont infectées. Les cellules géantes ont atteint des proportions étendues. Les inclusions intranucléaires

occupent toute la surface du noyau, à l'exception d'un liseré périphérique. La tache rose centrale est plus ou moins étendue. Les plus petites sont intensément colorées alors que d'autres de plus grande dimension présentent une coloration plus pâle.

Au 17^e jour, l'image est à peu près la même, mais la culture devient moins dense par suite de la dégénérescence et du détachement de quelques cellules.

La durée maxima de survie des cultures infectées n'a pas encore été déterminée.

2^o Dans les couches cellulaires obtenues par infection de suspension cellulaire lors de la mise en culture, des cellules incubées à 40° C.

L'effet cytopathogène observé dans ces conditions est analogue à celui qui se manifeste à 37° C, mais l'évolution en est plus rapide.

Dès le 4^e jour, se constituent de petits amas de quelques noyaux. Les inclusions intracellulaires, petites, claires et centrées par un point rouge ne se voient qu'au 5^e jour.

Au 6^e jour, de nombreuses cellules géantes sont déjà constituées, dont les noyaux, disposés en couronne, renferment des inclusions rose vif entourées d'un halo. Ces inclusions ont une taille très sensiblement supérieure à celle des inclusions observées en même temps à 37° C.

Au 7^e jour, ces cellules multinucléées occupent une part appréciable de la surface de la culture : 1/4 à 1/5 environ. Les noyaux sont disposés en couronne autour d'un centre intensément coloré, la taille de ces cellules varie, elles peuvent contenir de quelques noyaux à plusieurs centaines. Pratiquement tous les noyaux, tant dans les syncytiums que dans les autres cellules, renferment des inclusions, à part quelques petites zones éparses qui renferment des cellules apparemment normales.

Après le 10^e jour, un certain nombre de cellules se détachent et la culture apparaît moins dense. Les inclusions nucléaires s'observent dans tous les noyaux. Certaines cellules géantes présentent des signes de dégénérescence : les noyaux semblent se rétracter, montrent des formes irrégulièrement polygonales, la bordure chromatique perd de sa netteté et le reste du noyau prend une coloration violacée.

Le cytoplasme devient vacuolaire, lâche et

âle à l'intérieur et à l'extérieur de la couronne et noyaux.

Dans les autres cellules, les inclusions nucléaires se présentent surtout sous la forme d'une tache rose vif bien délimitée, entourée d'un halo lair, lui-même bordé d'un liseré chromatique assez mince.

Dans d'autres, la tache rose s'étend et sa couleur perd de l'intensité et sa limite avec le halo devient indistincte. Enfin, d'autres noyaux montrent un centre rose pâle homogène, bordé d'un liseré chromatique.

Dans cet état, la culture persiste pendant plusieurs semaines. Un flacon coloré 36 jours après la mise en culture présentait une couche cellulaire encore visible à l'œil nu.

Après coloration on pouvait distinguer de nombreux syncytiums de grande taille, au cytoplasme vacuolé. L'examen au fort grossissement ne put être effectué en raison de l'épaisseur du verre.

Titre et croissance du virus.

Les titrages ont essentiellement été effectués avec la souche maintenue à 40° C dont il était intéressant de connaître le titre pour des raisons exposées plus loin.

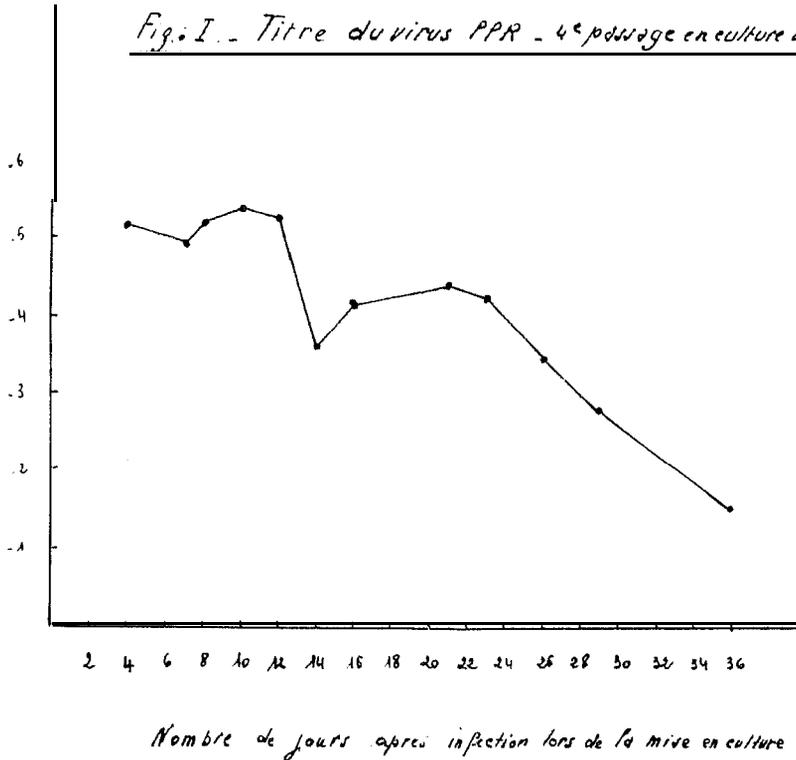
Le tableau suivant rassemble des chiffres enregistrés :

Série	N ^o du passage	Jour du prélèvement après mise en culture	titre par cm ³ (nombre de DI/CT)
1	4 ^e	8 ^e	10 ^{5,2}
1	6 ^e	5 ^e	10 ^{4,2}
1	6 ^e	12 ^e	10 ^{5,3}
1	6 ^e	14 ^e	10 ^{5,2}
2	3 ^e	11 ^e	10 ^{5,2}
3	3 ^e	13 ^e	10 ^{4,8}

Une courbe de croissance a été établie pour le virus du 4^e passage incubé à 40° C.

Au 1^{er} titrage, effectué 4 jours après infection lors de la mise en culture, le milieu nutritif con-

Fig. I. - Titre du virus PPR - 4^e passage en culture à 40°C



Nombre de jours après infection lors de la mise en culture

tient déjà $10^{5,1}$ doses infectantes pour culture cellulaire (DICT) par ml. Le maximum' est atteint au 10^e jour de culture, avec $10^{5,3}$ DICT par ml.

Le titre baisse vers le 14^e jour et se stabilise du 16^e au 25^e jour aux environs de 10^4 DICT par ml.

Le titre baisse alors sensiblement pour atteindre au 35^e jour après la mise en culture un titre de $10^{2,4}$ DICT par ml.

L'expérience a été interrompue alors que les flacons présentaient encore une couche cellulaire discernable formée de syncytiums et de traînées de cellules de type fibroblastique.

Un seul titrage de la souche entretenue à 37°C a été effectué au 12^e passage.

Le milieu prélevé au 10^e jour de culture contient $10^{5,1}$ DICT par ml.

Pouvoir pathogène des souches PPR de culture.

1^o Souche entretenue à 37°C.

Pouvoir pathogène pour les caprins.

Le virus de 1^{er} passage de culture cellulaire inoculé à deux caprins dont le sérum ne neutra-

lisait pas le virus bovipestique en culture cellulaire provoque, après une incubation de 3 et 5 jours respectivement, une élévation thermique de 2°C. Au 8^e jour, la face interne des lèvres et des joues sont couvertes d'un enduit nécrotique. La diarrhée apparaît le 8^e jour. La température descend brusquement et redevient normale le 10^e jour tandis que les lésions buccales disparaissent. Les deux boucs survivent.

Avec le virus du 6^e passage, l'un des deux boucs inoculés ne présente qu'une réaction thermique très faible (moins de 1°C) et survit jusqu'au 21^e jour après l'infection. A l'autopsie, seules sont relevées des lésions de pneumonie. Le sérum prélevé au 16^e jour après infection neutralise le virus bovipestique de culture à la dilution 1/100.

Le second bouc montre une réaction thermique intense du 5^e au 11^e jour après inoculation. Il meurt le 17^e jour mais ne présente aucun signe de PPR à l'autopsie.

Au 12^e passage, le virus inoculé à deux boucs réceptifs ne provoque qu'une réaction thermique fugace (2 jours au maximum) et n'excédant pas 1°C. Les deux animaux survivent.

2^o Souche entretenue à 40° C.

a) Pouvoir pathogène pour les caprins.

Au 3^e passage à 40° C, 4 jeunes boucs sont inoculés. La maladie évolue chez eux de façon similaire : après une incubation de 3 jours la température s'élève brusquement, atteint et dépasse même 41° C au matin du 5^e jour. Les lésions de la muqueuse buccale apparaissent du 6^e jour au 7^e jour suivant l'inoculation, et la mort survient du 6^e au 9^e jour.

A l'autopsie, les lésions caractéristiques sont observées : nécrose de la face interne des lèvres, de la face inférieure de la langue, de la muqueuse du pharynx, congestion de la valvule iléo-cæcale.

b) Titrage du virus sur caprins.

Le virus du 3^e passage est titré sur des lots de 4 jeunes boucs.

Les résultats observés sont groupés dans le tableau I.

Ainsi le virus PPR en culture infecte les caprins à la dose de 1 ml de la dilution 10⁻⁵. Ce titre est analogue à celui calculé sur cultures cellulaires (10^{5,2} DICT par ml).

Pouvoir pathogène et immunogène pour les bovins.

Seule a été inoculée aux bovins la souche entretenue par passage à 40° C.

TABLEAU 1

Titrage du virus PPR sur caprins (3^e passage à 40° C)

Dilution du virus	N° des boucs	Réaction thermique	Lésions buccales	Mort-M ou Survie=S	Anticorps neutralisants dans le sérum		Lésions à l'autopsie	
					Avant inoculation	15 j. après inoculation		
10 ⁻²	43	0	0	S	+	+		
	49	+	0	S	0	+		
10 ⁻³	45	+	+	M 9 ^e j.	0		+	
	50	+	+	M 7 ^e j.	0		+	
	51	+	+	M 7 ^e j.	0		+	
10 ⁻⁴	23	0	0	M 5 ^e j.	0		0	mort de pneumonie.
	46	+	+	M 10 ^e j.	0		+	
	48	+	0	S	0	+		
	35	+	0	M 6 ^e j.	0		0	congestion pulmonaire
10 ⁻⁵	20	+	+	M 11 ^e j.	0		+	
	39	+	+	M 10 ^e j.	0		+	
	44	+	0	M 10 ^e j.	0		+	
10 ⁻⁶	53	+	+	M 7 ^e j.	0		+	
	38	+	+	S	0	+		
	22	0	0	M	0		0	mort de pneumonie.
	40	0	0	S	+	+	-	

+ = présence d'anticorps ou de lésions - 0 = Absence - = examen non effectué.

Au 3^e passage, un veau reçoit 2 ml de milieu, soit environ 300.000 DICT par voie sous-cutanée. Il ne présente dans les jours suivants qu'une élévation thermique de 1° C environ les 5^e et 6^e jours sans aucun signe clinique. Son sérum, dépourvu avant inoculation d'anticorps neutralisant le virus PB, le neutralise 14 jours plus tard à la dilution 1/25. Cet animal demeure indifférent à l'inoculation de 100.000 DL., de virus bovine pestique caprinisé pratiquée 35 jours après inoculation de virus PPR.

Deux boucs placés au contact de cet animal durant toute la durée de l'expérience ne montrent aucun trouble et succombent à l'inoculation de virus PPR pratiquée le même jour que l'épreuve par virus caprinisé chez les bovins.

Le virus PPR ne semble donc pas se propager du bovin infecté au bouc sensible par cohabitation.

L'épreuve d'innocuité étant concluante, du virus du 3^e passage a été titré comparativement sur boucs, cellules et veaux.

Le virus, ainsi qu'il a été signalé plus haut, renfermait 10^{5,2} DICT par ml et infectait 4 boucs sur 4 à la dose de 1 ml d'une dilution 10⁻⁵.

Des 5 bovins de race N'dama recevant chacun 1 ml d'une dilution 10⁻⁴ de virus, deux meurent avant l'épreuve d'affections intercurrentes (parasitisme et misère physiologique) et le troisième possède dans son sérum prélevé avant inoculation de virus PPR, des anticorps neutralisant le virus PB. Seuls, les deux autres veaux doivent donc être pris en considération.

Titration du virus PPR de culture 5 ^e passage à 40° C sur bovins							
Dil.	N° Veau	Réaction thermique	Sérum A	Sérum B		Epreuve par virus caprinisé	Observations
				1:2	1:10		
-3	2111	0	N	P	P	Absence de réaction	Survit
	2120	0	II	P	P	Absence de réaction	Survit
-4	2088	+ 12-13 ^e j. 19	3	P	P	Absence de réaction	Survit
	2089	MORT	-	-	-		Misère physiologique.
	2104	8 ^e - 12 ^e j.	N	II	N	Réaction modérée	Survit
	2118	6 ^e - 10 ^e j.	N	P	P	Absence de réaction	Survit
	2122	MORT	-	-	-		Misère physiologique.
-5	2095	+ 7 ^e - 12 ^e j.	N	P	N	Absence de réaction	Survit
	2092	Température irrégulière	N	N	N	Absence de réaction	Survit
	2101	5 ^e - 6 ^e j.	P	P	N	Absence de réaction	Survit
	2109	11 ^e - 14 ^e j.	N	N	N	Absence de réaction	Survit
	2121	6 ^e j.	II	II	N	Réaction forte	Survit
-6	2083	4 ^e - 9 ^e j.	N	II	N	Réaction forte	Survit
	2100	5 ^e - 11 ^e j.++	N	N	N	Réaction Forte	survit
	2119	+ 11 ^e - 1 ^e j.	II	N	N	Réaction forte	Survit

L'un deux possède dans son sérum prélevé 15 jours après inoculation du virus PPR, des anticorps neutralisant le virus PB et ne réagit pas à l'épreuve par virus bovipestique caprinisé.

Le second, dont le sérum se révèle dépourvu d'anticorps neutralisant le virus PB 15 jours après l'inoculation du virus PPR, réagit faiblement à l'inoculation d'épreuve de virus bovipestique caprinisé.

Des 5 veaux recevant le virus PPR à la dilution 10^{-5} , quatre possèdent avant l'expérience un sérum dépourvu d'anticorps neutralisant le virus PB. De ceux-ci, un seul renferme dans son sérum, quinze jours après inoculation du virus PPR, des anticorps neutralisant le virus PB à un taux faible (1/2) et ne réagit pas à l'épreuve. Des trois animaux au sérum dépourvu d'anticorps neutralisants, deux ne présentent aucune réaction thermique à l'inoculation d'épreuve, alors que le troisième réagit fortement.

Une nette réaction thermique est enregistrée après épreuve par virus bovipestique caprinisé chez les trois bovins inoculés avec 1 ml de la dilution 10^{-6} de virus PPR.

DISCUSSION

Plusieurs tentatives d'adaptation du virus PPR sur cultures cellulaires avaient abouti à des échecs ; l'infection des cultures de cellules épithéliales de rein de mouton, était tentée à l'aide de suspensions de rate ou de ganglions. Le procédé ne semble pas convenable, puisqu'il a échoué avec les suspensions d'organes de l'animal dont le sang au contraire a permis l'adaptation du virus aux cultures.

Il est inhabituel de constater la PPR chez les petits ruminants des zones sahéliennes, et encore plus chez les ovins de ces régions.

L'origine de la contamination du mouton-souche n'a pu être élucidée. Il s'agit là d'un heureux hasard, et les circonstances ont permis de l'exploiter.

Deux séries de passages, à différentes températures, ont été effectuées.

De la série à 37° C, est attendue l'atténuation de la souche pour les petits ruminants, dans l'espoir d'obtenir un vaccin efficace. Les seules expériences effectuées consistent en l'inoculation de boucs pour recherche du pouvoir pathogène et de son atténuation éventuelle. Malheu-

reusement, des incidents, et, en particulier, des contaminations microbiennes, ont obligé à des retours en arrière si bien que la souche n'a jusqu'ici atteint que le 12^e passage.

Par incubation à 40° C est envisagé le maintien du pouvoir pathogène pour les petits ruminants, et du pouvoir immunogène pour le bœuf, afin de disposer éventuellement d'une souche vaccinale contre la peste bovine.

Il n'était donc pas souhaitable de multiplier les passages en culture à 40° C, le virus PPR étant de lui-même suffisamment atténué pour les bovins au point d'être toléré par les races les plus sensibles. C'est pourquoi la majorité des expériences ont été consacrées à la souche maintenue à 40° C (titrages en culture, sur caprins et bovins).

A partir de l'isolement du virus en culture, les deux séries de passages ont été poursuivies sans difficulté. L'effet cytopathogène est nettement discernable à l'état frais à partir du 6^e ou 7^e jour, et son délai d'apparition ne se raccourcit pas malgré la répétition des passages.

Cette durée de latence des lésions cellulaires est nettement supérieure à celle observée dans la peste bovine, et, à l'état frais, l'aspect des lésions est sensiblement différent. On ne note pas ces cellules arrondies, réfringentes, filamenteuses par lesquels débutent les foyers d'infection des cultures infectées par le virus bovipestique, mais seulement des zones arrondies ou ovalaires, constituées de grandes cellules multinucléées, au sein du tapis qui a eu le temps de se constituer complètement, compte tenu de la rapidité plus grande de « couverture » du verre par les cellules de mouton, et du retard d'apparition des lésions.

Si la concentration cellulaire est assez forte au départ, il est difficile de distinguer à l'état frais les lésions cytopathogènes en raison de l'enchevêtrement des cellules. L'aspect le plus frappant de l'effet cytopathogène réside dans les inclusions nucléaires, qui s'observent dans la quasi-totalité des cellules, qu'elles soient mono ou polynucléées. Il est difficile de rapprocher cet effet cytopathogène de tout autre produit par un virus différent.

Il semble que le maintien à 40° des cultures conserve au virus sa faculté de produire des inclusions, alors qu'à 37° on assiste à la diminution de leur fréquence et de leur taille.

La teneur en unités infectantes du milieu de culture est inférieure d'un log. à base 10 environ à celle enregistrée avec le virus PB. Cependant, si le maximum est moins élevé et atteint plus tardivement, le titre du virus se maintient pendant plus longtemps à une valeur relativement forte.

On peut rapprocher ceci de ce que l'effet cytopathogène du virus PPR est plus ménagé que celui du virus PB, et de ce qu'il n'y a pas destruction totale des cellules atteintes par le virus. Au contraire, l'observation de flacons de culture conservés 35 jours montre que, si les cellules infectées occupent du 10^e au 20^e jour après la mise en culture la quasi-totalité de la surface, il se produit ensuite une sorte de « cicatrisation » par prolifération de cellules de type fibroblastiques restées saines, qui réoccupent une part importante de la paroi de verre.

Cependant, on peut conclure à une diminution de la faculté des cellules géantes à produire du virus puisqu'au 35^e jour après la mise en culture, le titre en virus est de 10^{1,4} seulement, bien que le tapis cellulaire soit encore constitué pour une bonne part de cellules infectées.

Le maintien à 40° C des cultures de virus PPR semble avoir exalté le pouvoir pathogène du virus, puisque si les 2 boucs inoculés avec le milieu de l'isolement du virus à 37° C ont survécu, après, il est vrai, une très forte réaction, ceux inoculés avec le virus du 4^e passage à 40° C succombent régulièrement.

Il est vraisemblable que la température de culture élevée sélectionne les mutants virulents, comme cela a été observé pour d'autres virus. La possibilité de multiplication à température élevée est d'ailleurs considérée comme caractéristique des souches virulentes (marqueur Thêta).

Malgré cela, le pouvoir pathogène du virus cultivé à 40° C reste faible pour le bœuf, et les bovins N'Dama n'ont montré qu'une faible réaction thermique après inoculation.

Ils ont parfaitement résisté à l'épreuve, et leur sérum 14 jours après inoculation renfermait des anticorps neutralisant le virus bovine pestique à une dilution appréciable. Cependant la présence d'anticorps neutralisants n'est pas indispensable à l'état d'immunité puisque les bovins ayant reçu de faibles doses de virus se révèlent immunisés, bien que leurs sérums en soient dépourvus, Un

délai de 15 jours ne suffit peut-être pas à leur élaboration à un taux décelable.

Ainsi se trouve une fois de plus confirmée la parenté antigénique entre les deux virus. Toutes les recherches sérologiques ont été effectuées par neutralisations croisées, c'est-à-dire que le virus bovine pestique de culture a été utilisé pour la recherche des anticorps induits par le virus PPR dans les sérums des boucs et des veaux inoculés, et que le sérum antibovine pestique a été employé pour l'identification du virus PPR.

Il reste maintenant à comparer les titres des sérums vis-à-vis des virus homologues et hétérologues.

Le comportement particulier du virus PPR en cultures cellulaires apporte un élément nouveau permettant de considérer cette affection comme une entité nosologique distincte de la peste bovine, bien qu'étroitement apparentée.

Il est permis, à notre sens, de considérer le virus PPR comme un virus bovine pestique spontanément adapté aux petits ruminants et se perpétuant désormais chez ces espèces, indépendamment de l'espèce bovine. Il diffère donc des souches bovine pestiques pouvant accidentellement contaminer les ovins ou caprins telle celle étudiée par JOHNSON (4) qui, pathogène pour deux espèces, affectait à la fois bovins et ovins.

Le virus PPR ne peut non plus être confondu avec certains virus bovine pestiques adaptés en laboratoire à l'espèce caprine, et qui, par la suite se sont révélés spontanément transmissibles au sein de cette espèce. Ces faits ont d'ailleurs été rapportés en Asie, mais non en Afrique. D'autre part, le comportement chez les caprins des virus bovine pestiques artificiellement adaptés est tout à fait différent de celui du virus PPR. Seul ce dernier reproduit le tableau clinique de la peste bovine, alors que les virus vaccins bovine pestiques caprinisés ne provoquent aucune lésion visible chez les caprins infectés. L'existence de PPR a d'ailleurs été reconnue antérieurement à l'introduction en Afrique occidentale de virus vaccins caprinisés.

Enfin, il n'a pas été jusqu'ici possible de cultiver sur cellules le virus bovine pestique caprinisé (PLOWRIGHT et FERRIS, 5).

Des études entreprises, peut résulter l'obtention d'un vaccin efficace contre la peste des petits ruminants et la peste bovine. Des expé-

riences complémentaires seront cependant nécessaires pour confirmer l'impossibilité de contamination des ovins et caprins par les bovins inoculés de PPR.

CONCLUSIONS

1^o Une souche de virus PPR a été adaptée à la multiplication en cultures de cellules de rein d'embryon de mouton.

2^o Le virus provoque la formation au sein des cultures infectées de cellules multinucléées de grande taille. Dans la quasi-totalité des noyaux

des cellules, apparaissent des inclusions éosinophiles de grande taille.

3^o Le virus maintenu en cultures à 40^o C immunise les bovins contre la peste bovine et conserve son pouvoir pathogène pour les caprins.

4^o Le virus maintenu en cultures à 37^o perd rapidement, son pouvoir pathogène pour les caprins et les immunise contre le virus PPR virulent.

*Laboratoire national de recherches vétérinaires de Dakar-Hann (République du Sénégal).
Service de Virologie*

SUMMARY

Adaptation of the virus of « rinderpest of small ruminants » to tissue culture

1. — A strain of the virus of PPR (peste des petits ruminants) has been adapted to culture on embryo ovine kidney cells on which it multiplies.
2. — The virus induces the formation in the infected tissue cultures of multinuclear cells of large size. In a fair proportion of the nuclei of the cells, there appear eosinophile inclusions of large size.
3. — This tissue culture virus maintained at 40^o C immunizes cattle against rinderpest and retains its pathogenicity for goats.
4. — Tissue culture virus maintained at 37^o C rapidly loses its pathogenicity for goats and immunizes this species against virulent « PPR » virus.

RESUMEN

Adaptación del virus de la peste de los rumiantes menores al cultivo celular

1. — Una estirpe de virus PPR ha sido adaptada a la multiplicación en cultivo de células de riñón de embrión de cordero.
2. — El virus provoca la formación en el seno de los cultivos infectados células multiinucleadas de gran tamaño. En la mayor parte de los nucleos de las células aparecen inclusiones eosinófilas de gran tamaño.
3. — El virus mantenido en cultivos a 40^o C inmuniza a los bovinos contra la peste bovina y conserva su poder patógeno por lo que respecta a los caprinos.
4. — El virus mantenido en cultivos a 37^o C pierde rápidamente su poder patógeno por lo que respecta a los caprinos y les inmuniza contra el virus PPR virulento.

BIBLIOGRAPHIE

1. MORNET (P.), ORUE (J.), GILBERT (Y.), THIERY (G.) et SOW MAMADOU. — La peste des petits ruminants en Afrique Occidentale Française. Ses rapports avec la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1956, 9 : 313 (Avec rappel de la bibliographie antérieure).

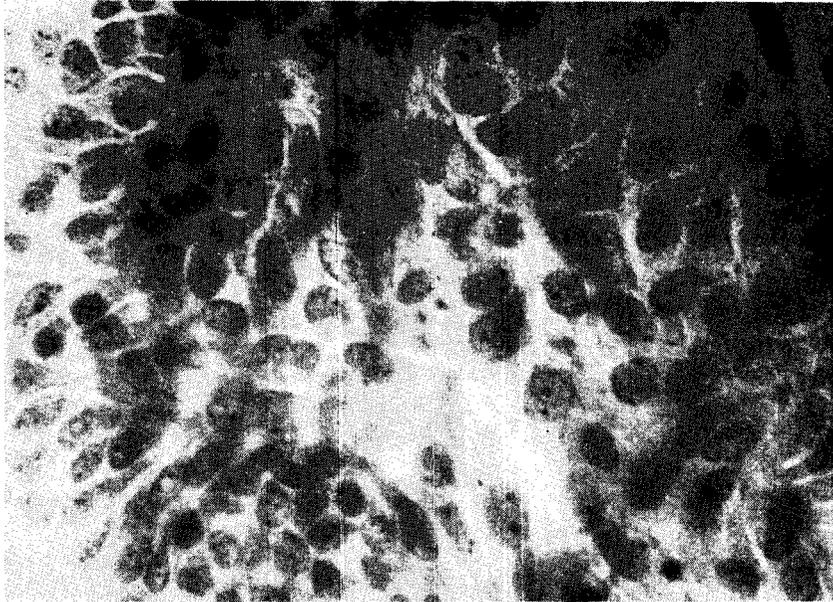


Photo n° 1. — Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon de mouton
— 8^e jour — X 750.

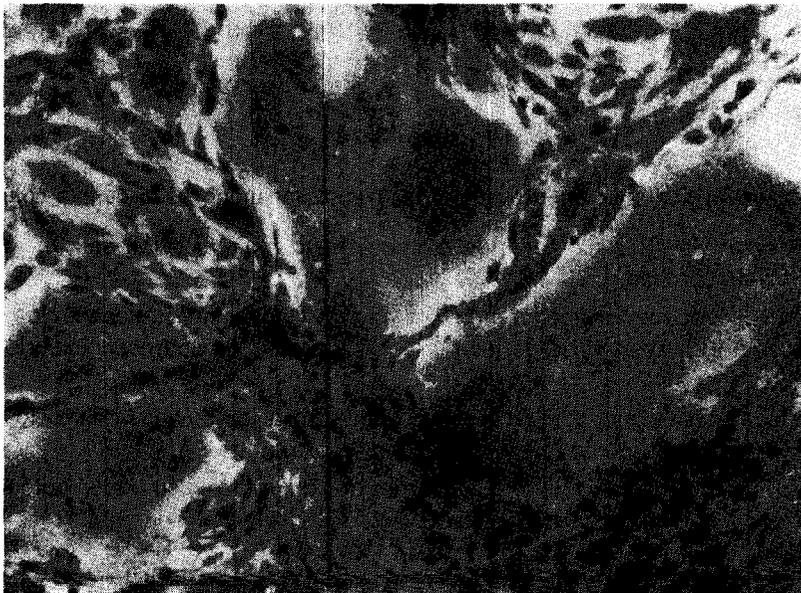


Photo n° 2. Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon de mouton
infectées par le virus P. P. R. — 4^e passage, incubation à 40° C,
8^e jour, X 125 — Cellules géantes, inclusions intranucléaires.

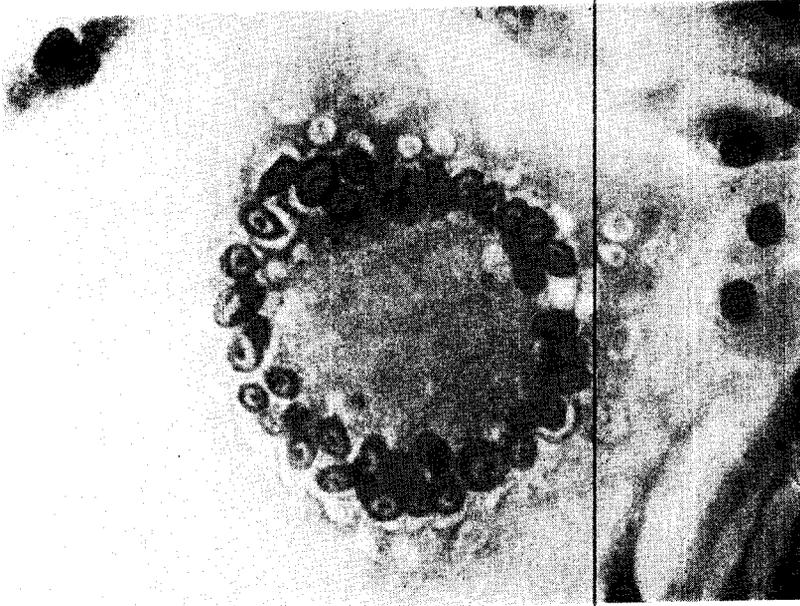


Photo n° 3. — Même culture que celle représentée sur la photo n° 2 \times 560.
 Détail d'un syncytium, inclusions intranucléaires.

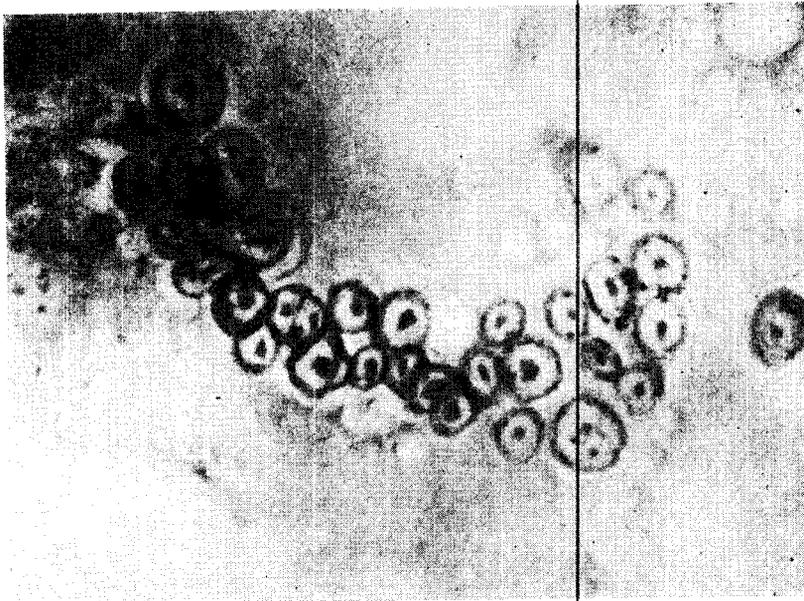


Photo n° 4. — Même culture que celle représentée sur les photos n° 2 et 3 \times 750.
 Cellule multinucléée, inclusions intranucléaires.

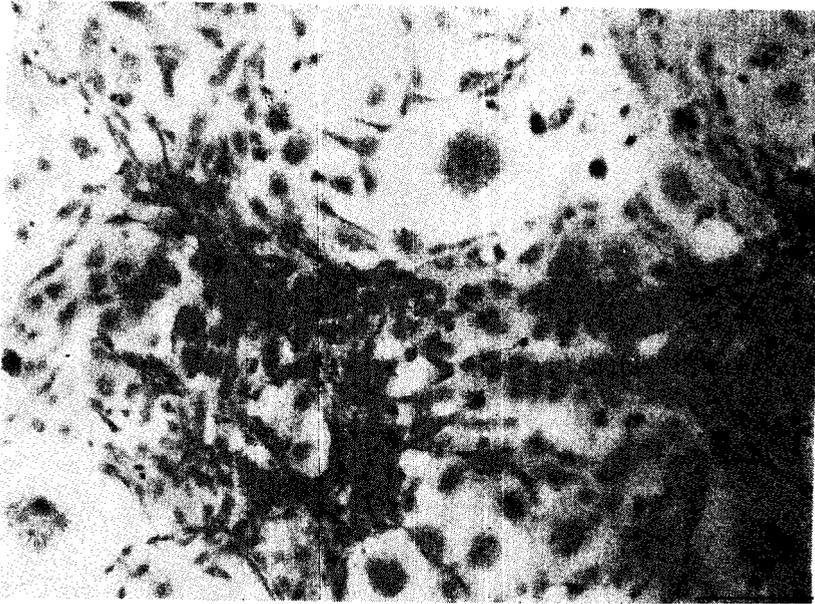


Photo n° 5. — Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon de mouton infectées par le virus P. P. R.—Ile passage, incubation 37° C, 9^e jour, \times 125
Aspect de la culture, cellules multinucléées.

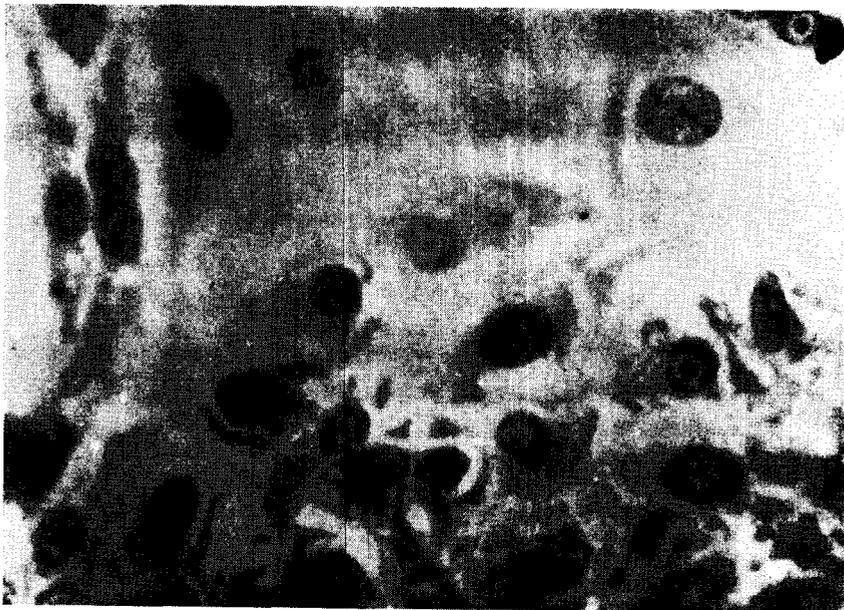


Photo n° 6. — Même culture que celle représentée sur la photo n° 5, \times 750.
Inclusions intranucléaires dans des cellules non groupées en syncytiums.

2. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — Studies with rinderpest virus in tissue culture. I. growth and cytopathogenicity. *J. comp. Path.* 1959, 69 : 152.
3. GILBERT (Y.) et MONNIER (J.). — Adaptation d'une souche de virus bovipestique à la culture cellulaire. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 1962, 15 : 4.
4. JOHNSON (R. H.). — An outbreak of rinder pest involving cattle and sheep. *Vét. Rec.* 1958, 70 : 457.
5. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — Studies with rinderpest virus in tissue culture. A technique for the detection and titration of virulent virus in cattle tissues. *Rés. Vét. Sci.* 1962, 3 : 94.