INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR-HANN

1279
ZVcc 1259

NOTE SUR LES CARACTERES CULTURAUX ET LA PATHOGENICITE
DE LA SOUCHE PPRV/75/2 DE PESTE DES PETITS RUMINANTS

Par Y. LEFORBAN, S. CISSOKHO, M. THIOUNE

REF, N° 77/VIRO.
JUILLET 1985.

INTRODUCTION

Le virus de la Peste des Petits ruminants est difficile à cultiver et les souches **conservées**, même sous forme **lyophilisée**, ont parfois du **mal** à redémarrer (**observations personnelles**).

De plus, nos tentatives d'isolement **à partir de** foyers en 1984 ont été infructueuses: bien que l'antigène précipitant soit **régulièrement** mis en évidence dans les organes (**ganglions**, **poumons**, raclages de muqueuse intestinale) de chèvres atteintes par la maladie naturelle ou expérimentale (**LEFORBAN et Coll., 1984**).

Il nous est donc **apparu intéressant** d'utiliser une souche exogène (**Nigérienne**) et d'étudier son comportement **cultural** et sa **pathogénicité** sur les chèvres **sénégalaises**.

I - METHODE ET PROTOCOLE

A. Origine de la souche

Il s'agit de la souche isolée à **VOM** au Nigeria en 1975 à partir de cellules épithéliales de gros **intestin d'une chèvre** atteinte de Peste des Petits Ruminants (**TAYLOR et Coll., 1979**). Elle a d'abord **été cultivée** par l'auteur sur cellules **rénales** primaires d'embryon de mouton en utilisant le milieu 199 additionné de 5 p.100 de **sérum** de veau nouveau-né, avant **d'être adaptée** aux cellules-**Véro** (cellule de lignée de rein de singe ; **Cercopithecus aethiops**).

Cette souche **nous a été confiée** le 16.10.1984 par le Dr **NGUYEN BA VY**, Virologiste à l'**IEVMT** (Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux), sous forme de deux ampoules lyophilisées correspondant au **8ème** passage sur cellule **Qéro** (lot du 2.03.1983).

B. Etude des caractères culturaux de la souche

Cette souche après reconstitution dans du milieu de culture a été passée sur tubes roulants de cellules Véro âgées de 2 à 4 jours : le milieu utilisé est le Hyla (milieu à 1^{er} hydrolysate de lactalbumine) additionné de sérum de veau à la concentration de 10 p.100 pour les cellules avant oriaculation et 2 à 3 p.100 après. Les tubes peuvent ainsi être gardé jusqu'à 20 jours après l'inoculation. L'inoculum viral d'origine est de 0,2 ml par tube.

Des essais de culture de la souche virale en cinétique ont également été effectués : les cellules sont mélangées au virus au moment de la trypsination, les tubes sont laissés stationnaires pendant 24 à 48 h puis mis en rotation ; la concentration de sérum dans ce cas est réduite à 7 p.100 et le milieu est changé après 2 jours et remplacé par du milieu à 2 ou 3 p.100 de sérum.

Des passages alternés sur cellules primaires d'embryon de rein de mouton ont aussi été faits,

Cette souche, après 12 passages sur cellule Véro, a été utilisée pour rechercher les anticorps anti virus PPR dans les sérums de 12 moutons de la zone de Ndiagne département de Louga avant et après vaccination avec le virus bovipestique de culture cellulaire (Tissupest). La séroneutralisation est faite en microplaque par la méthode cinétique, à virus fixe 100 DICP 50 (Dose infectieuse cytopathogène 50 p.100) et sérum variable en dilution arithmétique de raison 2,

La spécificité de la souche a également été contrôlée par séroneutralisation avec le sérum hyp-erimum anti peste bovine purifié de lapin préparé au Japon et fourni par la PAO,

C. Etude de la pathogénicité

Trois chèvres de race sahélienne ont été achetées dans les Niayes au Nord de Dakar, région où la peste des petits ruminants n'est pas signalée,

Ces chèvres sont gardées en observation pendant 12 jours au Laboratoire avant d'être inoculées, A leur arrivée, elles sont identifiées par une boucle auriculaire

et **déparasitées** avec le Fenbendazole (Panacur N.D.), elles sont aussi traitées contre la Coccidiose pendant 5 jours avec l'Amprolium (Amprol N.D.).

La **température** rectale des animaux est **relevée** tous les jours à partir de leur **arrivée** et les chèvres sont **gardées** en observation pendant un mois après leur inoculation. Celle-ci est faite par voie **sous-cutanée** au niveau de l'**encolure**, le **volume** de l'**inoculum** variant de 1 à 5 ml,

Un **prélèvement** de sérum est **effectué** le jour de l'inoculation et un mois après celle-ci,

Les anticorps sont titrés à la fois **sur** tubes et sur **microplaques** par 13 **méthode** en **cinétique** décrite plus haut,

Des **écouvillonnages** nasaux sont pratiqués au moment de la **montée thermique**. Les virus sont **recherchés** dans ces **écouvillons** par passage sur **cellules** rénales **d'embryon** de moutons ; 3 passages sur **cellule** sont **effectués** pour chaque **écouvillon**.

Les **animaux** font l'**objet** d'un examen **clinique** journalier et tous les **symptômes** sont rapportés,

RESULTATS

A. Caractères cultureux de La souche

Le premier passage à Dakar, sur tube de cellules Véro (9ème passage total), ne **révèle** aucun effet **cytopathogène (ECP)** après 13 jours. Les tubes sont congelés et **décongelés** et c'est au 2ème passage à Dakar (10ème passage Véro) qu'apparaissent certaines zones **réfringentes** sur le tapis à partir du 8ème jour, ceci aux plus faibles dilutions de virus (pur et 10¹ème).

Les essais de culture en cinétique ne donnent pas de meilleurs **résultats** que l'inoculation **différée** du virus, quant au développement l'ECP.

La souche au 10ème passage Véro, repassée 2 fois sur **cellules** de rein d'embryon de mouton n'a pas **montré** non plus d'ECP et en **conséquence**, nous n'avons pas poursuivi les passages sur ce substrat.

Au 11^{ème} passage Véro, l'ECP devient plus net, les plages réfringentes apparaissent entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour et des cellules arrondies se détachent du tapis. De plus, au 8^{ème} jour, l'ECP est aussi observé dans les tubes inoculés avec le virus dilué au $\frac{1}{100}$ et au $\frac{1}{1000}$ ème.

Au 12^{ème} passage (4^{ème} passage Dakar), l'ECP devient très net avec dz nombreuses cellules arrondies et très réfringentes. Au 8^{ème} jour, il touche 70 à 80 p.100 du tapis cellulaire, mais assez peu de cellules se détachent, celui-ci demeurant complet.

Le 6^{ème} passage est effectué sur boîte de Roux de manière à récolter une quantité de virus suffisante pour constituer une banque. Cette fois, la récolte est faite en 2 temps : première récolte au 4^{ème} jour en début d'apparition de l'ECP, le surnageant est recueilli et remplacé par du milieu neuf, La récolte finale est faite au 8^{ème} jour, lorsque 80 p.100 des cellules environ sont touchées. Les flacons sont gardés congelés à -30°C.

Le titrage de ces deux récoltes a été effectué sur deux lots différents du virus en utilisant la technique cinétique en microplaque. Les titres sont donnés au tableau 1, ils sont exprimés en DICP 50 par ml.

Tableau 1 : Titre du virus PPRV/75/2 au 12^{ème} passage sur cellules Véro

Lots	Récoltes	
	1 ^{ère} récolte 4 jours	2 ^{ème} récolte 8 jours
Lot 1	$10^{3,6}$	$10^{5,3}$
Lot 2	$10^{3,5}$	10^5

La deuxième récolte du lot 1 a été divisée en 2 parties, l'une a été répartie en aliquote et congelée à -30°C, l'autre a été lyophilisée en utilisant comme tampon le milieu de Victor à pH 7,3 (1 partie de virus, pour 2 parties de tampon).

.../...

C'est le virus congelé qui a été utilisé par la suite pour le test de séro-neutralisation sur microplaque en utilisant 100 DCP 50. La lecture du test est faite au 8ème jour,

B. Tests de séroneutralisation

La souche de virus est neutralisée par le sérum hyperimmune anti peste bovine à un titre supérieur au $\frac{1}{40}$ ème.

Les résultats des séroneutralisations des sérums de moutons sont donnés au tableau 2. Il apparaît, si l'on considère le seuil de positivité des sérums au $\frac{1}{10}$ ème, que 5 animaux sur 12 ont des anticorps anti PPRV avant vaccination dont l'un a un titre élevé ($\frac{1}{320}$).

Tous les animaux négatifs avant vaccination ont au plus 2 ans, mais un jeune ovin de 10 mois (n° 3097) a des anticorps avant vaccination (titre : $\frac{1}{40}$). Il ne semble donc pas qu'il y ait de relation stricte entre l'âge de l'animal et le titre d'anticorps anti PPRV bien que la présence d'anticorps soit plus fréquente chez les animaux âgés.

Chez 7 animaux sur 12, la vaccination avec le vaccin Peste bovine n'a pas entraîné de montée d'anticorps anti PPRV.

Chez les 5 autres, la montée d'anticorps est variable mais elle est particulièrement importante chez le 1253 où le titre est passé du $\frac{1}{10}$ ème au $\frac{1}{640}$ ème.

C. Pathogénicité

Concernant les expérimentations sur la chèvre, il faut tout d'abord souligner le problème de l'adaptation de cette espèce à la claustration et au nouveau régime alimentaire. Ses difficultés ont déjà été remarquées par de nombreux auteurs.

Cette adaptation entraîne une grande variation dans la température rectale des animaux. Ainsi, pendant la période de pré-inoculation, la température rectale des animaux a varié entre 38°2 et 40° pour la chèvre n°73, 37°8 et 40° pour la chèvre n°74, 37°6 et 39°6 pour la chèvre n°75.

Tableau 2 : Résultat du titrage d'anticorps chez 12 ovins de race Peulh-Peulh avec la souche PPRV/75/2.

Numéro auriculaire	Age de l'animal	Titre avant vaccination	Titre un mois après vaccination*
3099	3 ans	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
3003	2 ans	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$
1253	1 an	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{640}$
3097	10 mois	$\frac{1}{TF}$	$\frac{1}{150}$
1269	1 an	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$
3104	5 ans	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{160}$
1264	2 ans	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$
1252	4 ans	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{320}$
1251	4 ans	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$
3098	2 ans	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$
1263	2 ans	$\frac{1}{-Y-}$	$\frac{1}{5}$
1265	1 an	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{20}$

* Les animaux ont été vaccinés avec le Tissupest (virus bovipestique de cultures cellulaires) en utilisant la dose recommandée par les bovins ($\geq 10^{2,5}$ DICE 50).

Tableau 3 : Résultat de l'inoculation du virus PPRV75/2 à trois chèvres

Numéro auriculaire	Nature de l'inoculum	Titre d'anti-corps avant inoculation	Titre d'anti-corps 1 mois après l'inoculation	Réaction thermique	Symptômes observés
73	PPRV/75/2 12ème passage Véro (5 ml)	$< \frac{1}{5}$	$> \frac{1}{40}$	2ème jour après l'inoculation : 40°6 puis chute progressive	Toux fugace à J3 Léger jetage entre J10 et J12 Diarrhée entre J15 et J19
74	PPRV/75/2 12 passages Véro + 2 Passages sur rein de mouton (5 ml)	$< \frac{1}{5}$	$> \frac{1}{40}$	4ème jour après l'inoculation 40°4 puis chute progressive	Diarrhée entre J12 et J15 Anorexie entre J15 et J17
75	PPRV/75/2 8 passages sur Véro (souche d'origine IEMVT) (1 ml)	$< \frac{1}{5}$	$> \frac{1}{40}$	Pas e réaction thermique	Aucun symptôme observé

En **conséquence**, les animaux ne sont **considérés** en **hyperthermie** que lorsque la température rectale dépasse **40°C**.

Le **résultat** des inoculations est **schématisé sur** le tableau 3.

Aucun des animaux n'avaient d'anticorps avant l'**inoculation** **titre** $< \frac{1}{5}$ ils ont tous trois **développé** des anticorps contre la **souche** inoculée (**titre** $> \frac{1}{40}$ ème).

Les réactions à l'inoculation ont été **modérées** : la **montée thermique** n'a été observée que sur les chèvres 73 et 74 l'**une** au 2ème jour, l'autre au 4ème jour. Les symptômes sont **demeurés** frustrés (toux fugace? **légère** diarrhée, anorexie). L'animal n°75 n'a **développé** aucune **réaction** thermique, ni aucun **symptôme** associé bien qu'une montée des **anticorps** ait été notée.

DISCUSSION

Concernant les caractères cultureux, il est apparu que cette souche est difficile à **redémarrer** après **lyophilisation** mais qu'après 4 **passages** sur cellule Véro, l'**ECP** est devenu plus net et particulièrement **évident** à partir du 6ème passage à Dakar, ceci tant sur tube que sur **boîte** de Roux et sur **microplaque**.

Les 2 passages **effectués** sur **cellule** de rein de mouton n'ont pas permis le développement d'**une** meilleur ECP,

Le **titre** le plus **élevé** est obtenu quand 70 à 80 p.100 des cellules présentent des lésions : celui-ci **est obtenu** entre le 6ème et le 8ème jour.

La technique de **séronéutralisation** en **microméthode** mise au point donne des **résultats** très fiables : les **mêmes sérums** de moutons **titrés** à deux reprises avaient dans les deux cas des **titres** identiques,

Cette technique **utilisée** avec le **sérum** hyperimmun de lapin antipeste bovine a permis d'identifier la souche PPRV/75/2 comme proche **antigéniquement** du virus peste bovine puisque **neutralisé** à un titre **supérieur** à 1/40ème.

Les résultats de séroneutralisation des sérums de mouton présentés au tableau 2 posent le problème de la circulation du virus PPR dans les troupeaux sans symptôme clinique, S'agissant d'ovin, ceci semble être la règle, car nous n'avons jamais observé de réels foyers de peste des petits ruminants au Sénégal dans cette espèce. Dans la zone où les sérums ont été prélevé (Ndiagne), aucun foyer de PPR n'a, non plus, été observé dans l'espèce caprine et pourtant le virus semble, présent puisque l'un des sérums ovin a un titre supérieur au $\frac{1}{320}$ ème avant vaccination.

La montée d'anticorps anti PPR, après vaccination avec le vaccin bovipestique, est inconstante : elle n'est observée que chez 4 animaux sur 12 : l'on est en droit de se demander si la séroneutralisation avec le virus PPR détecte les anticorps anti PPR, anti peste bovine ou les deux à la fois, La réponse à cette question pourra être apportée en éprouvant les mêmes sérums vis-à-vis du virus peste bovine comme cela a été fait au Nigéria (TAYLOR, 1979).

La pathogénicité chez les trois chèvres de la souche inoculée à différents passages sur Véro paraît extrêmement faible. Comme nous l'avons déjà souligné, les montées thermiques post-inoculation sont difficiles à interpréter compte tenu de la grande variabilité de la température rectale des chèvres maintenues en clausuration. On peut cependant considérer que 40°3 et 40°6 correspondent à la réaction post-inoculation, Quant aux symptômes observés, ils sont à la fois tardifs par rapport à la réaction thermique, et discrets.

Des études de pathogénicité ont déjà été effectuées avec les souches dakaroises passées sur rein d'embryon de mouton à des températures différentes 37 et 40° (GILBERT et Coll., 1962). Mais les essais de vaccination avec cette souche à différents niveaux de passages ont été décevants, celle-ci gardant un pouvoir pathogène résiduel important même après 65 passages (BENAZET, 1973).

Nos résultats avec la souche nigérienne adaptée aux Véro, concernant seulement trois chèvres et il faut se garder de tirer des conclusions hâtives concernant sa faible pathogénicité. Des études complémentaires devront être faites sur un plus grand nombre d'animaux pour juger de celle-ci. Le facteur racial peut également intervenir (chèvres guinéennes plus sensibles que chèvres sahéliennes ?).

Le virus obtenu après plusieurs passages sur Véro, ayant un titre relativement élevé $10^{5,2}$ DICP 50, les inoculations pourront être faites avec des quantités de virus bien déterminées et l'effet de la dose pourra ainsi être mesuré.

CONCLUSION

La souche PPRV/75/2, objet du présent travail, paraît extrêmement intéressante pour les futures recherches sur la peste des petits ruminants au Sénégal. Les axes de recherches pourraient être les suivants :

- comparaison entre les titres d'anticorps anti peste bovine et anti peste des petits ruminants dans les mêmes sérums
- poursuite de l'étude de la pathogénicité de la souche à différents niveaux de passage sur Véro et à différentes doses (mise au point d'un vaccin homologue)
- comparaison de la souche nigérienne et des souches sénégalaises.

RESUME

Les caractères cultureux et la pathogénicité de la souche PPRV/75/2 du Nigéria au 5ème passage sur cellule Véro ont été étudiés.

Après 5 passages supplémentaires, elle produit un effet cytopathogène net. Cette souche a été utilisée pour la recherche d'anticorps neutralisants anti PPR dans les sérums de petits ruminants en micro-méthode.

Son inoculation à trois chèvres dépourvues d'anticorps sériques n'a provoqué qu'un léger pic thermique chez deux d'entre elles suivi d'une symptomatologie très frustrée,

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BENAÏZET (B.) - La peste des petits ruminants : étude expérimentale de la vaccination. Thèse Doct. vét. Toulouse, 1973.
- 2 - GILBERT (Y.), MONNIER (J.) - Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1962, 4 (15) : 321-335.
- 3 - LEFEVRE (P.C.) - Peste des petits ruminants et infection bovine pestigène les ovins et caprins. Maisons-Alfort, IEMVT, 1982.
- 4 - LEFORBAN (Y.), CISSOKHO (S.), THIOUNE (M.), BUREAU (F.) - La syndrome "peste des petits ruminants" chez la chèvre : observations de foyers et étude expérimentale. LNEAV Dakar. Réf. n°070/VIRO, juillet 1984.
- 5 - TAYLOR (W.P.) - Serological studies with the virus of PPR in Nigeria. Res. Vet. Sci., 1979, 26 : 236-242.
- 6 - TAYLOR (W.P.), ABEGUNDE (A.) - Isolation of peste des petits ruminants virus from Nigeria sheep and goats : 1979, 26 : 94-96.