

## ARTICLES ORIGINAUX

# Nouvelles recherches sur le virus-vaccin bovine lapinisé

par P. MORNET, Y. GILBERT, J. ORUE et G. THIERY

(Avec la collaboration de R. MAHOU)

### I. — TITRAGE DU VIRUS

Les variations de la teneur en virus des organes du lapin aux différents stades de l'infection ont été recherchées en vue de déterminer le moment où elle est maxima, qui correspond théoriquement à celui où l'animal devrait être sacrifié pour obtenir le plus grand nombre de doses vaccinales/bœuf (D.V.B.).

Il eût été intéressant de répéter, sous une autre forme, les expériences de 1953 (Mornet et coll.) et d'opérer sur les différents fluides et organes viraux (sang, rate, ganglions, poumon, cerveau, appendice iléo-cæcal...); mais la consommation de lapins est si importante au cours de tels essais que nous nous sommes contentés de suivre les variations de la teneur en virus d'une suspension vaccinale standard : sang-rate-ganglions mésentériques.

#### Protocole.

Quatre lapins sont inoculés avec du virus de passage, selon la technique habituelle utilisée pour la préparation du vaccin.

Les sujets sont sacrifiés par saignée cardiaque, à intervalles d'environ 12 heures après l'inoculation : 24, 39, 48, 63, 72, 87 et 96 heures.

Le sang est recueilli dans un flacon muni de billes de verre et défibriné par agitation.

Les prélèvements suivants sont effectués d'autre part :

Rate .....	2,4 g
Ganglions .....	8 g

Ces organes sont introduits dans une éprouvette et l'on ajoute du sang jusqu'à obtention d'un volume total de 78 cm<sup>3</sup>.

On broie le tout dans un appareil réfrigéré, placé en chambre froide à + 4°. La durée du broyage est de 3 à 4 minutes.

La suspension est alors filtrée à travers une gaze stérile et le résidu exprimé à l'aide d'une pince stérile. Elle est ensuite répartie par 1 cm<sup>3</sup> dans des flacons type pénicilline soumis à la lyophilisation et

bouchés sous vide. On prélève également 1 cm<sup>3</sup> de suspension pour servir à la détermination de la dose minima infectante (D.M.I.L.) du produit frais.

Le titrage sera donc effectué parallèlement avec le produit frais et avec le produit lyophilisé.

Pour faciliter le calcul des pertes en D.M.I.L. consécutives à la lyophilisation, nous exprimerons ainsi nos résultats :

a) pour le produit frais : D.M.I.L. = poids minimum de suspension totale (sang + rate + ganglions) déterminant l'infection chez le lapin.

b) pour le produit lyophilisé : D.M.I.L. = poids minimum de suspension totale (sang + rate + ganglions) déterminant l'infection chez le lapin.

Nous convertirons ensuite nos résultats en tenant compte que du poids d'organes (rate et ganglions) présents dans la suspension, la virulence du sang étant considérée comme relativement faible par la plupart des auteurs, surtout en ce qui concerne le produit lyophilisé (Mornet et coll., 1953 — Scott, 1954).

#### 1° Titrage de la suspension fraîche.

La suspension est titrée dès la fin de la préparation. Des dilutions sont effectuées en eau physiologique à 8,5 ‰, réfrigérée. Les doses à inoculer sont toutes ramenées au volume de 1 cm<sup>3</sup>.

Chaque dose est inoculée à deux lapins par voie endoveineuse, à la veine marginale de l'oreille.

Les résultats ci-après ont été obtenus (Tableau I).

#### 2° Titrage de la suspension lyophilisée.

Après lyophilisation, les flacons contenant le vaccin sec sont bouchés sous vide et stockés à basse température (— 22°).

La teneur en virus est recherchée après une semaine de conservation environ. Un flacon, renfermant le produit sec provenant de la dessiccation sous vide et à basse température, est prélevé et son contenu sert à préparer des dilutions à différents titres.

Ainsi qu'il a été précisé plus haut, la D.M.I.L. est

rapportée au poids de suspension fraîche ou d'organes frais ayant servi à préparer le produit lyophilisé (1).

Le titrage est effectué selon la technique utilisée pour le produit frais.

Au cours des expériences de titration, il a été obtenu un certain nombre de résultats paradoxaux.

A partir d'une série de dilutions, si l'on commence les inoculations par les titres les plus élevés (ceux

contenant le minimum de suspension virulente), on observe des réactions chez les premiers sujets, alors que les derniers, ayant reçu des doses de virus plus fortes, ne réagissent pas.

Le contraire est également possible. Il ne s'agit évidemment pas là d'observations régulières mais de cas particuliers pour lesquels nous n'avons pas d'explications satisfaisantes. Faut-il voir dans ces phénomènes une variation dans l'éluion du virus ou

TABLEAU N° I. — Doses minima infectantes-Lapin (D.M.I.L.) en virus frais.

STADE DE L'INFECTION (heures)	NOMBRE D'ESSAIS	SUSPENSION TOTALE		ORGANES CONTENUS DANS LA SUSPENSION	
		D.M.I.L. en mg	Nombre de D.M.I.L. au g	D.M.I.L. en mg	Nombre de D.M.I.L. au g
24	1	?	moins de 40.000	?	?
39	3	0,0033	300.000	0,00044	2.250.000
		0,0025	400.000	0,00033	3.000.000
48	4	0,002	500.000	0,000266	3.750.000
		0,00166	600.000	0,00022	4.500.000
63	3	0,002	500.000	0,000266	3.750.000
		0,00166	600.000	0,00022	4.500.000
72	1	0,00143	700.000	0,00019	5.250.000
87	2	0,00166	600.000	0,00022	4.500.000
96	1	0,002	500.000	0,000266	3.750.000

plus simplement une répartition « physique » irrégulière, non homogène, ce que Brotherston (1951) constate au point critique des dilutions? (Tableau II).

## II. — TEMPS OPTIMUM D'OBTENTION DU VIRUS VACCINAL

Il est recherché en tenant compte du titre du virus et du poids des organes.

(1) Le poids correspondant d'organes secs peut facilement être calculé en divisant par 4 le poids indiqué pour les organes frais.

C'est ainsi que, suivant nos expériences, le taux maximum en virus des organes se situe vers la 72<sup>e</sup> heure après l'inoculation. Mais, à ce stade, le poids des organes servant à la préparation du vaccin est nettement moindre qu'à la 63<sup>e</sup> heure :

63<sup>e</sup> heure..... 3,5 g  
72<sup>e</sup> heure..... 2,55 g

D'où traduit en D.M.I.L.

63<sup>e</sup> heure..... 1 g organes = 600.000 D.M.I.L.  
3,5 g organes = 2.100.000 D.M.I.L.  
72<sup>e</sup> heure..... 1 g organes = 700.000 D.M.I.L.  
2,5 g organes = 1.750.000 D.M.I.L.

Il est donc plus intéressant d'effectuer les prélèvements à la 63<sup>e</sup> heure.

### III. — APPARITION ET PERSISTANCE DU VIRUS DANS LE SANG

#### Protocole.

Un lapin dénommé « donneur » est infecté au temps 0. A des intervalles de temps déterminés,

on effectue des prélèvements de sang par ponction cardiaque.

Ce sang est immédiatement injecté dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin dénommé « réactif ». Le déclenchement d'un cortège symptomatologique et nécropsique de peste signe la présence de virus chez le sujet « donneur ».

Les opérations effectuées sont résumées dans le tableau n° III.

TABLEAU N° II. — Doses minima infectantes-Lapin en produit sec

STADE DE L'INFECTION (heures)	NOMBRE D'ESSAIS	SUSPENSION TOTALE		ORGANES CONTENUS DANS LA SUSPENSION	
		D.M.I.L. en mg	Nombre de D.M.I.L. au g	D.M.I.L. en mg	Nombre de D.M.I.L. au g
24					
39	4	0,014 0,0085	70.000 120.000	0,00186 0,00113	525.000 900.000
48	4	0,004 0,0032	250.000 310.000	0,00053 0,00043	1.875.000 2.325.000
63	4	0,002	500.000	0,000266	3.750.000
72	1	0,0015	600.000	0,0002	4.500.000
87	2	0,0025 0,002	400.000 500.000	0,00033 0,000266	3.000.000 3.750.000
96	1	0,0033	300.000	0,00047	2.100.000

De la lecture de ce tableau, il ressort que le virus peut être mis en évidence à partir de la 10<sup>e</sup> heure jusqu'au 15<sup>e</sup> jour suivant l'infection.

### IV. — OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES SUIVANT LE STADE DE L'INFECTION

#### Avant-propos.

L'étude histologique des lésions que crée chez le lapin le virus bovipestique ne peut être utilement menée à bien qu'à la condition d'en suivre l'évolution au moins une fois par jour au début de la

maladie. En effet, toutes les descriptions relevées dans la littérature font état d'une dégénérescence des lymphocytes et d'une prolifération secondaire des cellules réticulohistiocytaires, mais il n'a été mentionné nulle part, à notre connaissance tout au moins, une infiltration par les polynucléaires et la nécrose secondaire de ces derniers (1).

Cette altération ne peut être saisie qu'à condition

(1) Fukusho et Nakamura, en 1940, signalent toutefois la présence de « polynucléaires éosinophiles » dans le thymus.

TABLEAU N° III. — Apparition et

LAPIN DONNEUR			LAPIN RÉACTIF					
Date d'inoculation	N°	Heure du prélèvement	N°	Date d'inoculation	T° au moment de l'inoculation	Incubation en heures	T° maxima	Heure maximum thermique
24-11-53	370	4	374	24-11-53	39°5	—	—	—
24-11-53	370	4	375	24-11-53	39°4	—	—	—
24-11-53	370	10	376	24-11-53	39°1	24	40°9	60
24-11-53	370	10	377	24-11-53	39°	24	41°2	60
24-11-53	371	15	379	25-11-53	39°1	30	41°	60
24-11-53	371	15	380	25-11-53	39°2	30	40°8	48
24-11-53	371	20	382	25-11-53	39°4	36	41°3	48
24-11-53	371	20	383	25-11-53	39°5	36	41°1	48
24-11-53	370	24	378	25-11-53	38°8	36	41°2	72
24-11-53	370	30	381	25-11-53	39°9	36	40°7	36
24-11-53	373	4 j.	384	28-11-53	39°1	24	41°	48
24-11-53	370	5 j.	385	29-11-53	38°9	24	41°1	60
24-11-53	370	6 j.	385 <i>b</i>	30-11-53	38°7	24	41°3	48
24-11-53	370	7 j.	385 <i>t</i>	1-12-53	39°1	24	41°5	60
24-11-53	370	8 j.	403	2-12-53	39°3	30	41°2	48
24-11-53	370	9 j.	404	3-12-53	39°5	48	41°2	48
24-11-53	370	10 j.	405	4-12-53	39°2	48	41°	48
24-11-53	370	13 j.	408	7-12-53	39°8	72	41°1	72
26- 1-54	431	13 j.	439	8- 2-54	39°2	60	40°7	60
26- 1-54	431	14 j.	440	9- 2-54	40°1	108	41°7	132
26- 1-54	431	15 j.	441	10- 2-54	39°7	60	40°6	60
15-a2-54	444	16 j.	482	3- 3-54	39°3	—	40°5	96
15- 2-54	444	17 j.	483	4- 3-54	39°5	—	40°5	24
15- 2-54	444	17 j.	484	5- 3-54	39°2	—	40°9	48

## persistance du virus dans le sang

LÉSIONS	RÉSULTAT	OBSERVATIONS
—	0	Pas de réaction thermique.
—	0	Pas de réaction thermique.
—	+	Sacrifié le 7 <sup>e</sup> jour. Lésions plaques de Peyer.
—	+	— d° —
Typiques	+	Sacrifié le 6 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 6 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 5 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 5 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 6 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Mort dans la nuit du 4 <sup>e</sup> au 5 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 5 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 4 <sup>e</sup> jour.
Typiques	+	Sacrifié le 3 <sup>e</sup> jour.
	+	Mort le 9-12-53. Lésions plaques de Peyer encore visibles.
Typiques	+	
Typiques	+	
Typiques	+	
?	+	
?	+	
Typiques	+	
Légères	+	
?		Non sacrifié. Réaction thermique faible.
?		Non sacrifié. — d° —
?		Non sacrifié. — d° —

de noter leur arrivée dans les organes. En effet, les polynucléaires du lapin sont pseudo-éosinophiles sur les frottis de sang et intensément acidophiles sur les coupes histologiques. L'étude des photomicrographies qui accompagnent de nombreuses publications montre que les images décrites sont identiques à celles que nous observons, mais le point que nous mentionnons précédemment paraît avoir échappé.

Il est donc indispensable, pour étudier les lésions de la peste bovine chez le lapin, plus encore que chez les autres animaux réceptifs, de colorer électivement les polynucléaires neutrophiles (1). Nous avons pour cela utilisé une particularité de ces cellules décelée antérieurement : c'est la présence dans le cytoplasme de granulations colorables par la méthode de Baker sur les coupes à congélation.

### Histopathologie.

Les lésions que nous avons pu déceler au microscope intéressent le sang et les organes hémolymphopoiétiques ou les formations lymphoïdes des autres tissus. C'est pourquoi, dans l'étude qui va suivre, nous envisagerons d'abord les types de lésions rencontrées et leur évolution, puis nous rapporterons ces lésions aux divers organes hémolymphopoiétiques par ordre chronologique; enfin nous mentionnerons les quelques particularités des autres tissus, toujours en fonction du temps.

#### 1<sup>o</sup> La lésion élémentaire lymphoïde.

La lésion élémentaire que l'on retrouve dans tous les organes hémolymphopoiétiques consiste en une atteinte particulière des follicules lymphoïdes. Nous allons envisager l'évolution de la lésion sans tenir compte de son siège en chiffrant les stades à la manière des cancérologues, mais ici le stade 0 correspondra à une image normale, les stades suivants traduiront par leur numéro le degré d'évolution, le terme ultime étant le stade 7.

Le stade 0 correspond au follicule normal, constitué par un stroma réticulaire à disposition générale

rayonnée enserrant dans ses mailles vers la périphérie des petits lymphocytes et vers l'intérieur des moyens et grands lymphocytes ainsi que quelques macrophages issus du stroma par libération. En général, il existe au centre de la formation une zone plus claire dite *centre germinatif* due à une densité moins grande de cellules à noyaux plus lâches. C'est en cette région que l'on observe le plus de figures de mitose et des débris nucléaires (corps tingibles) que phagocytent les macrophages.

Il convient de noter en outre, chez les lapins qui ont servi aux expériences, la présence d'un pigment protéique brun jaune clair associé à de l'hémosidérine et de phosphoaminolipides dans quelques cellules réticulaires.

Le follicule est entouré, selon les lieux, par un tissu réticulé histiocytaire vrai ou un tissu conjonctif, plus ou moins apparenté au système réticulohistocyttaire.

Le stade 1 présente les premières modifications dues à la présence du virus. Il s'agit d'une légère infiltration du tissu environnant par des polynucléaires neutrophiles tandis qu'il y a un ralentissement considérable dans la sortie des lymphocytes. Les cellules réticulaires semblent s'hypertrophier légèrement et le noyau montre par son nucléole une activité accrue.

Le stade 2 diffère du précédent par une infiltration péri-folliculaire de polynucléaires beaucoup plus accusée et par une phagocytose très marquée de cellules réticulaires, principalement dans la partie centrale claire du follicule. Les cellules phagocytées sont soit des lymphocytes à noyau nettement pycnotique soit des lymphocytes à noyau apparemment normal. Les cellules réticulaires se libèrent des voisines pour devenir macrophages, parfois sous forme de plasmodes à 3 ou 4 noyaux. Elles phagocytent de 4 à 8 ou 10 lymphocytes ce qui les rend énormes et bien visibles. Il résulte de cette phagocytose une légère raréfaction des lymphocytes petits et grands.

Le stade 3 est caractérisé par une dégénérescence de la plupart des lymphocytes et lymphoblastes dans tout le follicule. Les noyaux sont pycnotiques ou plus souvent en caryorrhexis. La caryolyse est moins fréquente. Les cellules réticulaires deviennent toutes des macrophages assurant le nettoyage du follicule mais incapables de tout englober malgré une augmentation marquée de leur taille. L'infiltration périphérique de polynucléaires est intense et quelques-uns ont pénétré dans le follicule où s'opère la destruction de la lignée lymphoïde.

Le stade 4 n'est qu'une complication du stade 3 : la zone centrale est envahie par un nombre considérable de polynucléaires pseudo-éosinophiles qui

(1) Les polynucléaires neutrophiles de toutes les espèces sur coupes tissulaires à congélation présentent un cytoplasme bourré de petites sphérules Baker-positives.

Chez le lapin, ce sont ces sphérules qui prennent le colorant acide sur les frottis en raison de leur nature lipoprotéique.

Chez les autres mammifères, ces sphérules ne sont pas colorées sur les frottis, les agents tinctoriaux se déposent dans les espaces situés entre eux et forment les granulations d'Ehrlich seules visibles (G. Thiery).

masquent presque totalement l'aspect du follicule et font penser à une nécrose prononcée de toute la partie infiltrée de polynucléaires.

**Le stade 5 :** les polynucléaires de la zone centrale dégèrent pour la plupart. Tous les lymphocytes sont en voie de dégénérescence (pycnose ou caryorhexis nucléaire). Une partie des macrophages de la zone centrale succombe apparemment par excès de phagocytose. Le follicule apparaît plus clair sur les coupes histologiques.

**Le stade 6** correspond à un nettoyage déjà poussé des éléments mortifiés. La zone périphérique, libre de débris cellulaires, est constituée de cellules réticulaires anastomosées, le centre renferme des débris cellulaires et de rares macrophages.

**Le stade 7 :** le follicule est complètement nettoyé ; il ne reste plus qu'un réseau de cellules anastomosées qui prennent peu à peu un aspect quiescent. Peu à peu, les cellules se tassent les unes contre les autres ; il ne reste du follicule que la trame cellulaire.

L'évolution qui vient d'être analysée ci-dessus correspond à la forme habituelle. Cependant, quelques très rares follicules ne sont pas touchés par le processus et restent intacts ; d'autres, également très peu nombreux, ne présentent qu'une nécrose centrale discrète et se régénèrent, atrophiés après atteinte virale. Nous n'avons jamais pu assister aux phénomènes de régénération signalés par les auteurs. Dès que le centre germinatif est dégénéré, le follicule ne peut plus se reconstituer même lorsqu'il existe encore des lymphoblastes à la périphérie. Ceux-ci peuvent tout au plus élaborer quelques lymphocytes dans le lieu où ils se trouvent.

## 2° Les lésions des organes hémolymphopoiétiques.

Les lésions ne sont appréciables qu'à partir de la 24<sup>e</sup> heure. Bien qu'il existe déjà à la 6<sup>e</sup> heure après l'inoculation intraveineuse une décharge de polynucléaires pseudo-éosinophiles dans la moelle osseuse, celle-ci ne se traduit, au niveau des organes hémolymphopoiétiques, que par l'apparition de ces polynucléaires vers la 24<sup>e</sup> heure dans les sinus des ganglions et de la rate. L'infiltration s'accroît ensuite et apparaît dans le chorion intestinal situé entre les formations lymphoïdes et la surface.

Les polynucléaires pénètrent dans les follicules lymphoïdes qui se présentent ainsi à la 40<sup>e</sup> heure au stade 1, 2, 3 et même 4 au niveau des ganglions mésentériques tandis que le stade 3 est plus souvent le seul atteint dans les autres ganglions. Dans tous les ganglions, l'infiltration par les polynucléaires est très intense autour des follicules et dans les sinus de la périphérie. De nombreux lymphocytes des sinus commencent à présenter des signes de dégénérescence nucléaire. Dans les formations lymphoïdes, la lésion folliculaire est plus marquée au

niveau du *sacculus*, de la *tonsilla* et de l'appendice où un certain nombre de follicules sont aux stades 1, 2 et même 3 ; dans les plaques de Peyer de l'intestin grêle, on ne note que les stades 1 et 2. L'infiltration par les polynucléaires est très intense dans tous les cas, au-dessus des formations lymphoïdes.

Les lésions s'accroissent progressivement au niveau des follicules lymphoïdes qui, à la 70<sup>e</sup> heure, atteignent tous au moins le stade 4 et beaucoup le stade 5 au niveau des ganglions ; on y décèle, en outre, la dégénérescence de tous les lymphocytes libres des sinus et de quelques polynucléaires, tandis qu'une hémorragie périphérique se produit fréquemment. Au niveau des organes lymphoïdes intestinaux, tous les follicules du *sacculus*, de la *tonsilla* et de l'appendice sont pratiquement aux stades 3 et 4, quelques-uns au stade 5. De très rares follicules de plus petite taille situés en profondeur semblent échapper au processus. Les plaques de Peyer de l'intestin grêle montrent encore des follicules depuis le stade 1 jusqu'au stade 4. La rate est congestionnée, les cordons de Billroth gorgés d'hématies sont le siège d'une légère déshabitation. Le thymus ne montre qu'une légère infiltration par des polynucléaires pseudo-éosinophiles et la phagocytose accrue de quelques thymocytes.

A partir de ce moment, les follicules lymphoïdes atteignent rapidement, sauf de très rares exceptions, au moins le stade 5 tandis que ceux qui étaient déjà à ce stade évoluent lentement vers le stade suivant. L'hémorragie des ganglions mésentériques, parfois minime, devient pratiquement la règle. Elle est fréquente au niveau des autres ganglions et formations lymphoïdes intestinales et, dans la rate toujours congestionnée, une réticulose s'installe.

Dans la masse osseuse les quelques éléments lymphoïdes ont disparu et se retrouvent sous forme de débris dans les cellules réticulaires mobilisées. La granulopoïèse est encore très active au détriment de l'érythro-poïèse. Tel est l'aspect des organes hémolymphopoiétiques du 4<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> jour.

Après le 6<sup>e</sup> jour, il ne persiste que de rares foyers de nécrose et tous les follicules lésés ont dépassé le stade 5. Le nettoyage s'opère à partir du centre des follicules. Les polynucléaires infiltrant les organes lymphoïdes (sinus ganglionnaires, voisinage des formations intestinales) sont en voie de dégénérescence et peu à peu phagocytés sur place. Il est curieux de noter l'intégrité des cordons médullaires des ganglions, des zones lymphoïdes surmontant les follicules intestinaux et paraissant avoir la même valeur, et des corpuscules de Malpighi de la rate.

Le 12<sup>e</sup> jour, le nettoyage est pratiquement complet, les follicules sont tous au stade 7. Il n'en persiste que quelques rares, en général incomplets,

TABLEAU N° 4. — Doses minima infectantes-Lapin (D.M.I.L.) suivant les auteurs avec le virus frais lyophilisé

MATÉRIEL	CHENG (1949)		BROTHERSTON (1951)		NAKAMURA (1953)		SCOTT (1954)	
	F	S	F	S	F	S	F	S
Suspension (sang-rate-ganglions).....		100.000	1 million	100.000				
Sang .....	10.000 (a)						100	100
Rate .....	100.000 (a)						1 million	1 million
Ganglions.....	1 million (a)				1 milliard (b)	100.000	1.1/2 mil.	1.1/2 mil.
MATÉRIEL	DAKAR (1953)				DAKAR (1954)			
	F		S		F		S	
Suspension (sang-rate-ganglions).....	100.000		320.000		600.000		2 millions (c)	
<p>(a) Chiffre maximum.</p> <p>(b) Chiffre cité par Stevenin.</p> <p>(c) Si les calculs sont effectués par les divers auteurs comme par nous-mêmes, pour obtenir 1 g de produit sec titrant 2.000.000 de D.M.I.L., il a fallu (exemple Dakar 1954) dessécher 4 g d'organes frais renfermant au départ <math>600.000 \times 4 = 2.400.000</math> D.M.I.L. La perte est donc de 400.000 D.M.I.L. pour 2.400.000 D.M.I.L. soit : <math>\frac{400.000}{2.400.000} = 17 \%</math>.</p>								

dans les diverses formations lymphoïdes de l'intestin et quelques-uns dans les ganglions lymphatiques.

Il s'agit ici évidemment d'une description synthétique de nombreuses observations et les images indiquées à chaque période ne sont que les plus couramment observées. De même, l'absence de régénération des follicules lymphoïdes est le phénomène le plus courant, mais certains sujets moins sensibles, lors d'infection peu sévère, n'ont qu'un nombre relativement réduit de follicules lymphoïdes lésés. Leur régénération est possible lorsque le centre germinatif n'est pas totalement détruit.

### 3° Lésions des autres organes.

Elles consistent en l'atteinte de quelques points lymphoïdes pulmonaires dans un nombre réduit de cas, en une légère réticulose transitoire du SRH, en des signes d'hyperactivité de la corticosurrénale au début de l'affection, accompagnée des modifications organiques classiques qui en dépendent.

### CONCLUSION

La maladie du lapin causée par le virus bovine lapinisé se traduit par une atteinte élective du tissu lymphoïde avec destruction subtotale de la lignée lymphoïde.

Le rôle des polynucléaires ne paraît pas négligeable au début de la formation des lésions, ce qui peut laisser supposer leur intervention dans le métabolisme du virus.

Lorsque l'animal survit, bien que privé de lym-

phocytes, il ne résiste pas aux affections intercurrentes, bénignes en d'autres circonstances.

### V. — LYOPHILISATION TITRE COMPARÉ DU VIRUS DANS LES ORGANES AVANT ET APRÈS LYOPHILISATION

Ainsi que nous l'avons indiqué, dans les conditions habituelles de travail sous les tropiques, une des opérations délicates de la préparation du virus lapinisé est la dessiccation sous vide et à basse température.

Quelles que soient les précautions (1) que nous prenions aux divers stades de la préparation, les pertes par lyophilisation ne sont guère inférieures à 20 %.

Si l'on se reporte en effet aux tableaux 1 et 2 on constate en comparant la valeur des D.M.I.L. en frais et en lyophilisé que :

- à la 48<sup>e</sup> heure, les pertes sont d'environ 50 %.
- à la 63<sup>e</sup> heure, les pertes sont d'environ 17 %.
- à la 72<sup>e</sup> heure, les pertes sont d'environ 15 %.

Nous répétons que la 63<sup>e</sup> heure constitue le temps optimum du prélèvement (cf. chapitre II). Ces résultats sont d'ailleurs bien supérieurs à ceux obtenus par les différents auteurs (voir tableaux 4 et 5).

(1) Nous travaillons pendant les temps délicats à — 5°C.

TABLEAU N° 5. — Pourcentage des pertes par lyophilisation suivant les auteurs (1)

AUTEURS	VIRUS FRAIS	VIRUS SEC	PERTES %
NAKAMURA .....	1 milliard	100.000	99,99
BROTHERSTON.....	1 million	100.000	97,5
DAKAR (1953) .....	100.000	320.000	20
CHENG.....	100.000	100.000	75
SCOTT :			
ganglions .....	1 1/2 million	1 1/2 million	75
rate.....	1 1/2 million	1 million	75
sang .....	100	100	75
DAKAR (1954) .....	600.000	500.000	17

(1) 4 g matériel frais = 1 g matériel lyophilisé.

## VI. — OBSERVATIONS SUR LA VACCINATION DES BOVINS

### 1° Dose minima vaccinale (D.M.V.). Tableau n° 6.

Diverses expériences ont été conduites en plusieurs régions d'A.O.F. sur des bœufs sans bosse, animaux les plus sensibles à la peste bovine et qu'il n'a pas été possible jusqu'à présent d'immuniser avec le virus bovipestique caprinisé, parce qu'il est trop virulent pour ces animaux (1).

L'expérience la mieux conduite et la plus démonstrative fut celle pratiquée à Ziguinchor (Sénégal) par l'un d'entre nous avec la collaboration de notre

(1) Il donne, par contre, de bons résultats chez les zébus.

confrère Martignolles qui a la charge du secteur de Casamance.

### Matériel vaccinal :

Vaccin lyophilisé obtenu de lapins sacrifiés à la 63<sup>e</sup> heure de l'infection. Préparé le 20 mai 1954. Conservé au congélateur à — 30°C pendant 50 jours. Reconstitution du vaccin en eau physiologique refroidie. Doses injectées sous le volume de 1 cm<sup>3</sup> par voie sous-cutanée.

### Virus d'épreuve :

5 cm<sup>3</sup> de virus de passage par voie sous-cutanée douze jours après l'injection de vaccin.

On peut donc théoriquement vacciner un bovin avec 1/100 mg.

TABLEAU N° 6

DOSE EN g (a)	NOMBRE DE VEAUX	RÉACTION VACCINALE	RÉACTION AU CONTRÔLE	RÉSULTATS
0,001	2	+	0	Immunité
0,0008	2	+	0	Immunité
0,0006	4	2 + 2 0	0	Immunité
0,0005	4	3 + 1 ±	0	Immunité
0,0004	3	2 + 1 ±	0	Immunité
0,0002	3	1 + 2 0	0	Immunité
0,0001	3	1 ± 2 0	0	Immunité
0,00005	3	2 0 1 ±	0	Immunité
0,00001	3	0	2 = 0 1 = signes de peste mais guérit.	Immunité
Témoins	4		Peste typique.	

(a) Les doses sont rapportées au poids d'organes entrant dans la composition de la suspension (soit un quart du poids d'organes frais) :

D.M.V. = 0,01 mg d'organes secs provenant de 0,04 mg d'organes frais (après lyophilisation).

## 2° Rapport D.M.I.-Lapin — D.M.V.-Bœuf.

La D.M.I. lapin (lyophilisé) à la 63<sup>e</sup> heure est de 0,000066 mg d'organes secs.

La D.M.V. bœuf (lyophilisé) est de 0,01 mg.

$$\text{Le rapport} = \frac{0,000066}{0,01} = \frac{1}{150}$$

Théoriquement, il faut donc 150 D.M.I./Lapin pour vacciner un bœuf.

## 3° Nombre de doses vaccinales par lapin.

Un lapin donne en moyenne 3,5 g correspondant à 0,875 d'organes secs. La D.M.V. étant 0,01 mg sec, un lapin pourrait fournir théoriquement 87.500 D.M.V.

Nous avons vu que, dans la pratique, pour avoir une marge de sécurité très grande (1), la D.M.V. est fixée à 1,25 mg sec, soit 125 fois la dose théorique. Sur cette base, un lapin fournit 760 doses vaccinales en sec.

## 4° Réaction thermique.

On a discuté, et on discute encore longuement, sur la constance et la nécessité de la réaction thermique post-vaccinale chez le bœuf pour l'obtention de l'immunité.

L'analyse des travaux des différents auteurs permet de noter :

### Brotherston (1951).

TABEAU	NOMBRE bovins	DOSE en g	RÉACTION thermique	JOUR réaction
IX	2	0,001	0	
	1	0,01	+	
	1	0,1	+	
XI	11	0,004	6 = 0	1 au 5 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> .
			5 = +	1 au 6 <sup>e</sup> .
				3 au 6 <sup>e</sup> — 7 <sup>e</sup> .
XII	2	0,0001	0	
	2	0,00025	1 = 0	7 <sup>e</sup> — 9 <sup>e</sup> .
			1 = +	
	2	0,0005	1 = 0	?
			1 = +	
	2	0,005	0	
	2	0,001	0	
	3	0,1	0	
3	0,1	1 = 0	1 au 5 <sup>e</sup> et 9 <sup>e</sup> .	
		2 = +	1 au 6 <sup>e</sup> et 9 <sup>e</sup> .	

(1) à cause de la fragilité du virus bovipestique lapinisé.

Ces résultats ne nous paraissent pas avoir tous la même valeur, la réceptivité de certains animaux à la peste bovine n'étant pas complètement démontrée. Plusieurs témoins ont, en effet, guéri après l'infection expérimentale de contrôle.

Le même Brotherston, dans la deuxième partie de sa note, à l'occasion de la vaccination d'un troupeau de 700 animaux, dont certains de race européenne, remarque que le virus-vaccin lapinisé immunise les bovins sans avoir provoqué de réaction fébrile. Mais il est probable que, sur un effectif aussi important, les températures n'ont pas été prises avec un aussi grand soin que sur les sujets des tableaux IX, XI, XII.

### Illartein et Guerret (1954).

Relatant une expérience portant sur 9 taurillons, ils indiquent que la réaction thermique vaccinale est très nette et constante. Elle s'est traduite par une poussée fébrile débutant le 3<sup>e</sup> ou le 4<sup>e</sup> jour après la vaccination, augmentant jusqu'au 7<sup>e</sup> jour environ, pour décroître ensuite et disparaître les 11<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> jours.

### Scott (1954).

Analysant 5.925 courbes thermiques matinales de 311 bovins ayant reçu du virus bovipestique lapinisé et de 113 témoins non vaccinés, il constate les 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours après inoculation une élévation significative de température chez les premiers.

### Mornet et coll. (1954).

#### EXPÉRIENCE ZIGUINCHOR

NOMBRE bovins	DOSE en g	RÉACTION thermique	JOUR réaction
2	0,001	+	6 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> .
2	0,0008	+	5 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> .
4	0,0006	2 +	6 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> .
		2 0	
4	0,0005	3 +	5 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> — 6 <sup>e</sup> .
		1 ±	6 <sup>e</sup> ?
3	0,0004	2 +	6 <sup>e</sup> — 7 <sup>e</sup> .
		1 ±	8 <sup>e</sup> .
3	0,0002	1 +	5 <sup>e</sup> .
		2 0	
3	0,0001	1 ±	6 <sup>e</sup> .
		2 0	
3	0,00005	1 ±	6 <sup>e</sup> .
		2 0	
3	0,00001	0	

Le tableau ci-dessus montre que la réaction thermique n'est pas constante (sur 27 sujets vaccinés : 12 résultats +, 4 ±, 11 négatifs) et que près de 50 % des bovins réceptifs ne font pas de réaction thermique tout en étant solidement immunisés.

Il faut d'ailleurs toujours avoir à l'esprit qu'en région tropicale, les hématozoaires de « sortie » jettent souvent la perturbation dans la courbe thermique. Un mouvement fébrile insignifiant peut être prolongé et augmenté par la présence de piroplasmes ou de trypanosomes dans le sang périphérique.

La vulgarisation du procédé (Soudan en particulier) confirme que les hématozoaires et les coccidies intestinales sont responsables des incidents enregistrés.

Et puisque la réaction thermique n'est pas obligatoire pour l'obtention de l'immunité, nous donnons notre préférence aux virus vaccinaux qui s'installent à bas bruit.

### 5° Signes cliniques.

Les signes cliniques sont très irrégulièrement observés. Il est signalé parfois un léger larmolement, un peu de diarrhée. La symptomatologie devient plus alarmante dans le cas de complications par piroplasmes, trypanosomes et surtout coccidies (entérite hémorragique).

Il est d'ailleurs indéniable que seuls les tests sérologiques (titrage des anticorps) peuvent permettre de donner une réponse satisfaisante aux problèmes d'immunologie qui nous préoccupent, l'interprétation de la courbe thermique ou des signes cliniques étant sujets à caution.

## VII. — PRODUCTION DU VIRUS-VACCIN LAPINISÉ ANTIPESTIQUE

### Préparation :

Des lapins pesant 1,500 à 2 kg, âgés de 2 à 3 mois environ, sont inoculés dans la veine marginale de l'oreille avec une suspension sang-rate-ganglions provenant du passage précédent (1).

Les animaux font une réaction thermique atteignant son acmé de la 40<sup>e</sup> à la 60<sup>e</sup> heure. La température maxima varie de 40°5 à 41°5; elle est le plus souvent de 41°.

Les lapins sont sacrifiés à la 63<sup>e</sup> heure après ino-

(1) La souche Nakamura III, qui avait lors de sa réception subi 800 (?) passages (1954), était, à Dakar, le 31 décembre 1954, à son 170<sup>e</sup> passage. Le passage en série sera d'ailleurs de moins en moins utilisé.

culation, par ponction cardiaque. Le sang prélevé est défibriné par agitation dans un flacon contenant des billes de verre.

On prélève ensuite les ganglions mésentériques et la rate. Le poids moyen des organes prélevés est de 3,5 g par lapin. Ils sont additionnés de 9 fois environ leur poids de sang de telle sorte que 1 cm<sup>3</sup> de suspension contienne 10 cg d'organes frais qui donnent 25 mg desséchés, correspondant à 20 doses de 1,25 mg. Le tout est broyé pendant 3 à 4 minutes dans le bol réfrigéré d'un *mixer*. La suspension est alors filtrée sur gaze, exprimée et répartie à raison de 1 cm<sup>3</sup> par flacon type pénicilline de 20 cm<sup>3</sup>.

Les flacons sont placés dans l'appareil à lyophiliser, congelés par *self freezing* et soumis à une dessiccation de 20 heures environ.

L'humidité résiduelle du virus sec varie de 1 à 2 %.

Les flacons sont bouchés sous vide avec un bouchon caoutchouc à collerette. Les expéditions s'effectuent par avion dans des *containers* isothermes (en ébonite multicellulaire) pouvant recevoir 75 à 80 flacons, soit 1.500 à 1.600 doses.

Sont résumées ci-dessous les opérations effectuées au cours de l'année 1954.

Nombre de lapins inoculés.....	943
Nombre de lapins sacrifiés.....	878
Poids des organes prélevés (en gramme).....	3.083
Volume de sang ajouté (en cm <sup>3</sup> ).....	18.600
Volume total de suspension (en cm <sup>3</sup> ).....	21.372
Nombre de flacons préparés.....	14.263
Nombre de flacons utilisables (après contrôle).....	13.546
Nombre de doses de vaccin (1 dose = 1,25 mg).....	270.920

### Commentaire sur la production.

#### 1° Utilisation des lapins inoculés.

65 lapins n'ont pu être utilisés pour la production de vaccin pour les raisons suivantes.

— Lapins ne présentant pas de lésions nettes à l'autopsie.....	7
— Lapins dont les organes n'ont pu être utilisés (par suite de panne de l'appareil à lyophiliser).....	30
— Lapins morts accidentellement.....	28
Total.....	65

#### 2° Poids des organes prélevés.

Les 878 lapins sacrifiés ont fourni 3.083,01 g d'organes, soit une moyenne par lapin de 3,51 g.

Le poids d'organes varie considérablement : si l'on fait la moyenne des poids prélevés par lot

(chaque lot correspond à une préparation de vaccin et compte de 4 à 14 lapins), on enregistre des variations de 2 à 5,75 g.

Elles paraissent d'ailleurs en rapport avec :

- a) l'état d'entretien des animaux;
- b) le stade d'évolution de la maladie lors du prélèvement. En sacrifiant les lapins soixante-douze heures après l'inoculation, on enregistre des poids beaucoup plus faibles, 2,5 g en moyenne.

### 3° Lyophilisation.

Il n'est pas utilisé de virus-vaccin frais par suite :

- a) de la faible durée de la conservation;
- b) des difficultés de transport à longue distance.

D'autre part, les lots lyophilisés peuvent être testés à volonté, et avant chaque envoi, ce qui donne une sécurité très grande aux vaccinateurs.

En ce qui concerne la lyophilisation proprement dite, nous avons exposé (1953) les inconvénients de l'appareil que nous possédons. Un appareil de fabrication française présentant de nombreux avantages va nous être livré incessamment.

Nous avons également souligné que la suspension devait être faite en se servant exclusivement du sang comme diluant. En effet, les pertes par lyophilisation en utilisant l'eau physiologique sont beaucoup plus élevées. Le sang intervient à la fois comme élément « liant » et protecteur sans augmenter de façon appréciable le taux d'unités virulentes.

### 4° Conditionnement du vaccin.

Il est actuellement effectué en flacons type pénicilline de 20 cm<sup>3</sup> renfermant 20 doses vaccinales maintenues sous vide (1).

Cette présentation offre l'avantage de permettre au vaccinateur de réaliser la dilution du virus lyophilisé directement par introduction de 20 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique à travers le bouchon. Et d'autre part de l'obliger à ne préparer la suspension que pour un petit nombre d'animaux pouvant être aisément vaccinés en un laps de temps n'excédant pas trente minutes (durée maxima théorique de conservation du virus remis en suspension).

Par contre, elle a l'inconvénient d'offrir sous un poids et un volume importants un nombre restreint de doses vaccinales, surtout si l'on tient compte de l'encombrement de la glace nécessaire à la conservation à basse température.

### 5° Nombre de doses vaccinales obtenues par lapin.

En moyenne un lapin fournissant 3,5 g d'organes

frais, correspond à 0,875 g d'organes secs, et permet d'obtenir 700 doses vaccinales lyophilisées de 1,25 mg.

### 6° Dose vaccinale-bœuf (D.V.B.).

La D.V.B. admise par nous dans la pratique est de 1,25 mg d'organes secs.

## CONCLUSIONS

1. Le titrage du virus bovine pestique lapinisé fait ressortir le nombre considérable de doses minimales infectantes pour le lapin :  $\pm 5$  millions au gramme d'organes frais.

La richesse en D.M.I.L. varie suivant le stade de l'infection. La 76<sup>e</sup> heure après l'infection constitue le temps optimum, mais la quantité de virus obtenue est plus élevée si le sujet est sacrifié à la 63<sup>e</sup> heure.

Le virus est décelé chez le lapin expérimentalement infecté dès la 10<sup>e</sup> heure après l'inoculation et jusqu'au 15<sup>e</sup> jour.

2. L'histopathologie permet de suivre l'évolution de la maladie expérimentale du lapin, qui se traduit par une atteinte élective du tissu lymphoïde avec destruction subtotale de la lignée lymphoïde. Le rôle des polynucléaires ne semble pas négligeable au début de la formation des lésions.

3. Les pertes en virus à la suite de la lyophilisation paraissent inévitables mais peuvent être réduites à moins de 20 %.

4. La dose minima vaccinale bœuf est de 0,01 mg d'organes secs, soit 150 fois plus élevée, théoriquement, que la dose minima infectante lapin. Un lapin fournit en moyenne 700 doses vaccinales/bœuf (lyophilisées).

La réaction thermique post-vaccinale est irrégulière et n'apparaît pas indispensable pour l'obtention de l'immunité.

5. La production du virus-vaccin antipestique lapinisé obéit à des règles précises dont on ne saurait sous-estimer l'importance, compte tenu de la fragilité du virus.

Si ce vaccin constitue un progrès indéniable sur les autres méthodes prophylactiques, sa préparation reste conditionnée par la production « en masse » de lapins, un appareillage pour la dessiccation à basse température très adapté aux conditions de travail en régions tropicales et à la labilité du virus.

## BIBLIOGRAPHIE

BROTHERSTON (J.-G.). — **Le virus lapinisé de la peste bovine et le virus-vaccin. Quelques observations en Afrique Orientale** 1)

(1) Pour les manipulations, il serait plus simple de remplacer le vide par un gaz inerte, l'azote. Malheureusement le gaz fabriqué à Dakar par les Sociétés industrielles est insuffisamment purifié.

- Expériences de laboratoire; 2) Expériences pratiques.** *Journ. Comp. Path. Thérap.* 1951, **61**, 263 et 285.
- MORNET (P.), ORUE (J.), LABOUCHE (C.) et MAIN-GUY (P.). — **Les virus-vaccins contre la peste bovine : le virus bovipestique lapinisé. I) Revue des travaux. II) Recherches effectuées au Laboratoire de Dakar.** *Rev. Elev. et Méd. Vét. Pays Tropicaux* 1953, **6**, 125-166.
- STEVENIN (G.). — **Mission au Japon — Étude de la vaccination contre la peste bovine par le virus lapinisé**, 1953.
- ILLARTEIN (P.-R.) et GUERRET (M.). — **Contribution à l'étude de la prophylaxie de la peste bovine en Guinée française — A.O.F. — Note sur des essais de vaccinations de taurins N'Dama au moyen de la souche de virus pestique lapinisé Nakamura III.** *Bull. Soc. Path. Exo.* 1954, **47**, 402.
- SCOTT (G.-R.). — **La teneur en virus des tissus de lapins infectés avec la peste bovine.** *Brit. Vet. J.* 1954, **110**, 152.
- SCOTT (G.-R.). — **Réactions thermiques du bétail du Kenya, vacciné avec le virus bovipestique lapinisé.** *Nature*, 1954, **174**, 44.