

Isolement à Madagascar de virus associés à la dermatose nodulaire bovine

par J. RAMISSE, H. SERRES, E. RAKOTONDRAMARY

RÉSUMÉ

Nous avons isolé sur cellules rénales de veau en culture, des virus provenant de nodules cutanés prélevés chez des bovins locaux (zébus ou métis). Les caractères cytopathogènes (lyse cellulaire et inclusion) de ces virus ont été comparés à ceux des souches Sud-Africaines associées à la dermatose nodulaire. L'analogie de comportement entre les souches locales et NEETHLING, ainsi que les résultats similaires de la séro neutralisation nous font penser que ces souches sont très proches, sinon identiques.

La dermatose nodulaire bovine a été particulièrement étudiée en Afrique du Sud.

Les premiers essais d'isolement de l'agent causal sur embryons de poulet furent tentés par VAN DEN ENDE et Coll. (1948) qui mirent en évidence un virus « orphelin », et par HAIG (1949) qui put reproduire la maladie avec le 4^e passage. En 1956, ALEXANDER et HAIG isolèrent sur cellules rénales de veau en culture un virus qui demeurait pathogène après un certain nombre de passages et qui exerçait un effet cytopathogène sur les cellules. ALEXANDER, PLOWRIGHT et HAIG classèrent en 1957 un certain nombre de souches extraites de nodules ou de ganglion, en fonction de leur effet cytopathogène sur cellules rénales de veau et de leur pouvoir pathogène pour les bovins et les ovins. Ils constituèrent 3 groupes : le groupe I, dont le prototype était la souche BZD qui ne comprenait que des virus « orphelins », le groupe II, dont le prototype était la souche ALLERTON, rassemblait des virus qui provoquaient une maladie assez proche de la véritable dermatose nodulaire, mais qui exerçaient un effet cytopathogène rapide de type syncytial ; le groupe III, dont le prototype était la souche NEETHLING, correspondait à la dermatose décrite initialement par THOMAS et MARE

(1945), et était très pathogène pour les bovins. M. de LANGE (1959) étudia en détail l'effet cytopathogène des souches appartenant aux 3 groupes. PRYDIE et COACKLEY (1959) isolèrent des souches locales au Kenya, et étudièrent le comportement des souches Sud-Africaines. Selon CAPSTICK (1959), les souches du groupe II, inoculées expérimentalement aux bovins, paraissaient aussi pathogènes que les souches du groupe III. WEISS et GEYER (1959) montrèrent que l'hydrolysât de lactalbumine à la concentration de 2 p. 100 dans le milieu de culture cellulaire améliore la multiplication du virus.

A Madagascar, la dermatose nodulaire fit son apparition fin 1954. BUCK, QUESNEL et SERRES (1956) en décrivent l'épidémiologie, l'évolution clinique, et les aspects histopathologiques. Ils distinguèrent trois formes cliniques : cutanée, cutanée avec complications oculonasales, cutanée avec complications oculonasales et lymphatiques. L'examen microscopique des lésions montrait une infiltration inflammatoire avec œdème et pycnose des noyaux au niveau de l'épiderme. La maladie fut très meurtrière dans la région de Tuléar et Morondava, très contagieuse mais moins meurtrière dans la province de Tananarive. LALANNE (1956) en

mentionna les conséquences pour l'industrie du cuir.

Depuis cette première épizootie, d'autres foyers de moindre importance sont apparus en différents endroits en 1960, 1965 et début 1969.

Il semble, maintenant, que l'extériorisation clinique de cette maladie suive une certaine périodicité. Sans doute, entre-temps, la dermatose demeure-t-elle sous une forme plus ou moins latente.

On peut remarquer sur certains animaux (zébus ou métis) des nodules dont la localisation et l'aspect rappellent les descriptions classiques. Les animaux porteurs de ces nodules ne présentent pas d'éruption généralisée, leur état général ne paraît pas affecté. On remarque ces nodules à l'occasion de rassemblement d'animaux, par exemple, au moment du passage au bain détiqueur. Cliniquement, on ne pourrait rattacher, avec certitude, ces formations cutanées à la dermatose nodulaire. Cependant, à plusieurs reprises, nous avons isolé, à partir de ces nodules, des souches de virus dont les caractères cytopathogènes sont identiques à ceux du virus NEETHLING. C'est pourquoi nous pensons qu'il s'agit là d'une forme particulièrement bénigne de dermatose nodulaire.

Nous décrivons succinctement la technique d'isolement et les résultats obtenus.

MÉTHODE D'ISOLEMENT DES SOUCHES

1^o Origine des souches.

Dans les effectifs zébus et métis de la Ferme de Kianjasoa nous avons prélevé, en plusieurs fois et sur divers animaux, une trentaine de lésions cutanées. Ces lésions siégeaient à l'encolure, sur le thorax, le flanc, les membres, et se présentaient sous forme de nodules saillants de 1 à 2 cm de diamètre. Ces nodules correspondaient à un épaississement de la peau, accompagné parfois d'une réaction ganglionnaire sous-jacente. Après ablation, les nodules ont été conservés sous glace, et en chambre froide avant l'utilisation.

2^o Systèmes cellulaires et milieux de culture.

Nous avons fait l'isolement direct sur lignée de cellules rénales de veau fournie par

l'EMVT (1). Nous ne pouvons, en effet, disposer de cellules rénales primaires de veau ou de fœtus bovin car, à Madagascar pour l'instant, on n'abat pas de vaches gestantes ni de jeunes veaux de lait. Les cellules étaient cultivées en boîtes de JOUAN, en tubes de 16 × 160 mm, ou en tubes à lamelles. Pour la multiplication des cellules, nous utilisons le milieu de EAGLE (Basal Eagle Medium) additionné de 10 p. 100 de sérum de veau local. Ce sérum de veau provenait de veaux de 6 mois ou plus, étant donné que l'on n'abat pas de veaux de lait. Mais il convenait bien pour la multiplication des cellules. Pour l'entretien des cellules inoculées nous avons préféré compléter le milieu de base (BEM) par du sérum de veau d'importation, car nous pensions que le sérum local pouvait contenir des anticorps inhibiteurs des virus à isoler. Dans le milieu d'entretien le pourcentage de sérum était de 5 p. 100 et le pH ajusté à 7,5-7,6. Les cellules étaient repiquées une fois par semaine, en les traitant au versène (sans trypsine), et la couche était complète au bout de 4 ou 5 jours.

3^o Mise en culture et passages des souches virales.

Après dissection des nodules, les fragments ont été lavés dans une solution d'antibiotiques et de mycostatine (Pénicilline : 2.000 UI, Streptomycine : 1 mg, Mycostatine : 200 UI par ml de solution de HANKS). Nous avons broyé ces fragments au mortier en présence de sable stérile et de solution de HANKS. La suspension au 1/10^e a été centrifugée, et le surnageant inoculé aux tubes de cellules rénales de veau, à raison de 0,5 ml par tube. Après une adsorption de deux heures à la température du Laboratoire, nous avons rejeté l'inoculum, lavé les cellules avec de la solution de HANKS, et rajouté le milieu d'entretien. Les tubes ont été incubés à 37^o pendant une dizaine de jours. Durant l'incubation nous avons renouvelé le milieu 3 fois. Nous avons examiné quotidiennement les tubes et noté l'aspect de la couche cellulaire. A moins qu'un effet cytopathogène ne se soit manifesté avant, nous avons passé le contenu des

(1) Nous remercions nos confrères PERREAU et BA-VY de nous avoir procuré cette lignée.

tubes inoculés au 10^e jour après l'inoculation. Pour cela, nous avons gratté le tapis cellulaire inoculé, et introduit dans de nouveaux tubes de cellules la suspension ainsi recueillie (0,5 à 1ml par tube).

Parallèlement, nous avons mis en culture sur le même système cellulaire, des souches virales provenant d'Afrique du Sud (2) : NEETHLING, ALLERTON et BZD, souches déjà adaptées aux cultures cellulaires et reçues sous forme lyophilisée.

Nous avons comparé l'effet cytopathogène des souches locales et des souches Sud-Africaines, en considérant la lyse cellulaire et la formation d'inclusions. Pour la mise en évidence des inclusions, nous avons coloré les cellules infectées à l'hématéine-éosine après fixation dans le mélange de BOUIN.

4^o Séro-neutralisation.

Avec le sérum d'un veau convalescent de dermatose nous avons essayé de neutraliser les souches locales, ainsi que la souche Sud-Africaine NEETHLING. Le sérum a été dilué avec du HANKS au 1/10^e, 1/20^e, 1/40^e et 1/80^e. Aux dilutions de sérum nous avons ajouté un égal volume de suspension virale pure contenant environ 1.000 doses minima infectantes. Nous avons inclus, dans l'expérience un témoin virus et un témoin sérum normal dilué au 1/10^e, mélangé à 1.000 DMI de virus. Après un séjour de 1 h à 37°, les différentes suspensions ont été inoculées aux cellules. L'observation a duré jusqu'au 7^e jour après l'inoculation. L'absence d'effet cytopathogène devait indiquer la neutralisation du virus.

RÉSULTATS

Les souches locales, de même que les souches Sud-Africaines ont bien cultivé sur notre lignée de cellules rénales de veau.

1^o Effet cytopathogène induit par les souches Sud-africaines.

Le virus ALLERTON provoquait une lyse rapide (12 à 18 h) des cellules. Il se formait de

(2) Nous remercions le Docteur WEISS, d'ONDERSTEEPOORT d'avoir bien voulu nous envoyer ces souches.

gros syncytiums multinucléés au sein de la nappe qui, autour, se rétractait. Ces syncytiums avaient un aspect ovalaire, ou en poire. Des ponts cytoplasmiques filamenteux reliaient les syncytiums et la nappe. En 24-48 h, la presque totalité de la nappe cellulaire était lysée, les cellules flottant dans le milieu. L'aspect de syncytiums paraissait caractéristique. La coloration à l'hématéine-éosine montrait la pycnose des noyaux, la margination de la chromatine et la présence d'inclusions nucléaires acidophiles.

Le virus BZD n'a manifesté son effet cytopathogène qu'au 2^e passage à partir du 4^e jour suivant l'inoculation : amas de cellules arrondies ou en fuseau, trous dans la nappe, lyse progressive avec destruction complète des cellules, formation d'inclusions éosinophiles dans les noyaux, granulation du cytoplasme.

Le virus NEETHLING ne s'est montré cytopathogène qu'au 4^e passage. La progression de cet effet était très lente. Il s'est d'abord formé en bordure de la nappe des amas cellulaires denses et peu réfringents. Autour de ces amas la nappe s'est rétractée. Les cellules lysées ne se sont pas détachées immédiatement du verre, mais elles formaient après 5 ou 6 jours d'incubation des îlots compacts, grisâtres, condensés, présentant des noyaux pycnotiques. Les cytoplasmes étaient très granuleux. Après coloration à l'hématéine-éosine, on distinguait au sein de certaines cellules des inclusions cytoplasmiques entourées d'un halo chromophile clair. On ne remarquait pas de formations multinucléées.

2^o Effet cytopathogène provoqué par les souches locales.

Nous avons inoculé aux tubes de cultures cellulaires plusieurs séries de broyats nodulaires. Seuls quatre ont donné des résultats positifs. L'effet cytopathogène est apparu après un temps variable : pour la souche 507, au 2^e passage et au 8^e jour après l'inoculation des cellules ; pour la souche 537, au 3^e passage et au 8^e jour après l'inoculation ; pour la souche 542, au 3^e passage et au 7^e jour après l'inoculation ; pour la souche 732, au 4^e passage seulement, et au 5^e jour après l'inoculation.

Les lésions cellulaires produites par ces souches étaient tout à fait identiques à celles dues au

virus NEETHLING : formation d'amas de cellules arrondies, condensées, à noyaux pycnotiques en bordure de la nappe ; élargissement de ces amas qui devenaient grisâtres et très opaques ; rétraction de la nappe ; accroissement de la destruction cellulaire au fur et à mesure des passages ; progression assez lente de l'effet cytopathogène qui n'était jamais tout à fait complet, même avec une incubation prolongée pendant 15 jours ; absence de formation syncytiale. Pour obtenir une bonne infection des cellules, nous avons remarqué qu'il

était nécessaire d'inoculer non seulement le milieu de culture du passage précédent, mais aussi les cellules, lysées ou non, obtenues par grattage des tubes. Ceci confirme la constatation de PRYDIE et Coll. (1959) pour qui les passages réalisés avec le milieu de culture centrifugé ne donnaient pas de bons résultats. De plus, pour avoir des passages positifs nous avons inoculé, tout au moins au début, la suspension des cellules grattées sans la diluer. WEISS (1959) indiquait qu'avec un inoculum dilué l'effet cytopathogène était très retardé et

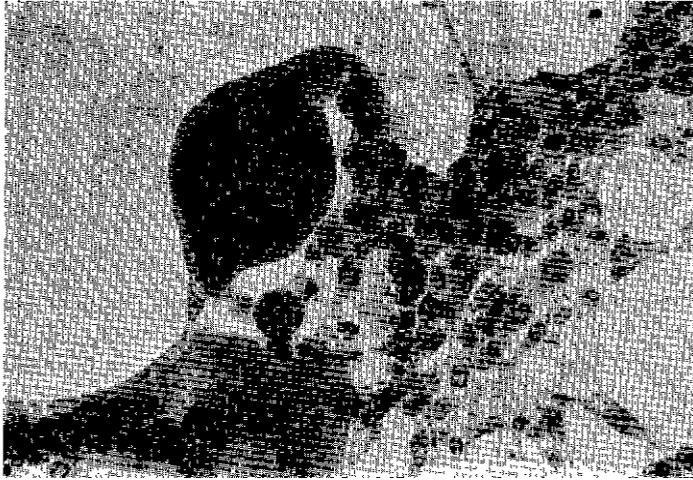


Photo 1. — Effet cytopathogène du virus ALLERTON sur cellules rénales de veau.



Photo 2. — Effet cytopathogène du virus NEETHLING sur cellules rénales de veau.
Inclusions cytoplasmiques.



Photo 3. — Effet cytopathogène de la souche virale 507 sur cellules rénales de veau.
Inclusions cytoplasmiques.

incomplet. D'ailleurs le titre obtenu sur cellules rénales de veau avec nos souches était assez faible (de l'ordre de 10^3 DMI/ml) et ne nous aurait pas permis de diluer beaucoup le virus. L'examen microscopique des préparations colorées à l'hématéine-éosine nous a montré la présence d'inclusions cytoplasmiques acidophiles analogues à celles induites par le virus NEETHLING. Ces inclusions étaient arrondies, nettement roses, entourées d'une auréole claire. Les noyaux étaient pycnotiques, fortement condensés et hyper chromatiques, ou présentaient une margination de la chromatine. Le cytoplasme des cellules lysées apparaissait granuleux et très acidophile. On notait la présence de fines languettes cytoplasmiques reliant des amas cellulaires.

3° Séro-neutralisation comparative.

Les résultats de la séro-neutralisation corroborent l'analogie des effets cytopathogènes des souches locales et NEETHLING. Ces virus sont

également neutralisés par le sérum de veau convalescent : neutralisation complète avec le sérum au $1/10^e$, partielle avec le sérum au $1/20^e$ et au $1/40^e$, nulle avec le sérum au $1/80^e$. Le sérum normal au $1/10^e$ n'inhibe pas le virus.

CONCLUSION

Comme les virus que nous avons isolés proviennent de nodules cutanés de bovins, comme ils produisent le même effet cytopathogène sur les cellules de rein de veau que le virus NEETHLING, comme de surcroît ils sont neutralisés au même titre que ce dernier virus par le sérum de convalescents de dermatose nodulaire, nous concluons qu'ils sont à rattacher au type NEETHLING.

*Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays tropicaux,
Laboratoire Central de l'Elevage,
Tananarive.*

SUMMARY

Isolation of viruses associated with the bovine lumpy skin disease in Madagascar

Viruses from cutaneous nodules taken in local cattle (zebus or half-breed) were isolated in calf renal cells cultures. The cytopathogenic characteristics (cellular lysis and inclusions) of these viruses were compared with those of South African strains associated with the lumpy skin disease. According to the

analogy of behaviour between the local and NEETHLING strains, as the similar results of sero-neutralization, the authors believe these strains are very near, if not identical.

RESUMEN

Aislamiento en Madagascar de virus asociados con la dermatosis nodular de los bovinos

Se aislaron, en cultivos de células renales de ternero, virus proviniendo de nódulos cutáneos recogidos en bovinos del país (cebras o mestizos). Se compararon los caracteres citopatogénicos (lisis celular e inclusión) de dichos virus con los de las cepas sur-africanas asociadas con la dermatosis nodular. Según la analogía de comportamiento entre las cepas locales y NEETHLING, así como los resultados similares de la sero-neutralización, los autores piensan que estas cepas son muy vecinas si no idénticas.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER (R. A.) et HAIG (D. A.). — Travail non publié, 1956.
2. ALEXANDER (R. A.), PLOWRIGHT (W.) et HAIG (D. A.). — **Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle.** *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1967, **5** (4), 489-492.
3. BUCK (G.), QUESNEL (J. J.) et SERRES (H.). — **Une maladie nouvellement identifiée à Madagascar « La Lumpy skin disease ».** *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1956, **9** (3), 229-235.
4. CAPSTICK (P. B.). — **Lumpy skin disease. Experimental infections.** *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1959, **7** (1), 51-62.
5. HAIG (D. A.). — **Lumpy skin disease.** *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1957, **5** (4), 421-430.
6. LALANNE (A.). — **La maladie nodulaire de la peau des bovins à Madagascar, ses conséquences pour l'industrie des cuirs.** *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1956, **46**, 596, 611.
7. LANGE (M. de). — **The histology of the cytopathogenic changes produced in monolayers epithelial cultures by viruses associated with lumpy skin disease.** *Onderstepoort. J. Vet. Res.*, 1959, **28** (2), 245-255.
8. PRYDIE (J.) et COACKLEY (W.). — **Lumpy skin disease — Tissue cultures studies.** *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1959, **7** (1), 37-50.
9. THOMAS (A. D.) et MARE (C. V. E.). — **Knopvelsiekte** *J SAVMA*, 1945, **16**, 36-43.
10. VAN DEN ENDE (M.), ALEXANDER (R. A.), DON (P.) et KIPPS (A.). — **Isolation in chick-embryos of a filterable agent possibly related etiologically to Lumpy skin disease of cattle.** *Nature*, 1948, **161**, 4092, 526.
11. WEISS (K. E.) et GEYER (S. M.). — **The effect of lactalbumin hydrolysate on the cytopathogenesis of Lumpy skin disease virus in tissue culture.** *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1959, **7** (3), 243-254.
12. WEISS (K. E.). — **La dermatose nodulaire in : Maladies nouvelles des animaux.** Rome FAO Etude agricole n° 61, pp. 189-216, 1964.