

Un vaccin mixte antibovipestique-antipéripleu- monique lyophilisé utilisable, sur le terrain, sans réfrigération

I. Sélection de virions bovipestiques à inactivation thermique retardée

par A. PROVOST (*) et C. BORREDON (*)

(avec la collaboration technique de Mme G. DUFAU et M. N'GALDAM)

RESUME

Ayant remarqué que l'inactivation thermique à 45° C du vaccin antibovipestique de cultures cellulaires lyophilisé se produisait selon un processus diphasique, les auteurs ont sélectionné un virus variant qui, après clonage, possède une demi-vie de quatre jours alors que celle de son parent n'est que de 1,8 jour à cette température.

Ce clone viral, dénommé 16 b-1009, a été caractérisé quant à son innocuité, son pouvoir immunigène et sa thermostabilité; il permet la confection d'un vaccin lyophilisé qui conserve sa pleine activité après 15 jours à 45° C, au titre universellement admis de $10^{9,5}$ DCP₅₀ par dose vaccinale, qualité qui permet son utilisation sans glace sur le terrain.

Il n'est pas osé de prétendre que l'introduction de la technique de lyophilisation a été un tournant décisif dans l'histoire de la lutte contre la peste bovine. Appliquée successivement aux virus-vaccins caprinisés, lapinisés, avianisés et lapinisés-avianisés, c'est avec le vaccin de cultures cellulaires que les raffinements de technique ont pu intervenir, permettant la délivrance par les laboratoires d'un produit préparé selon un protocole standardisé, parfaitement titré quant à son pouvoir immunigène. Les normes de production et de contrôle qui ont été récemment édictées par l'O.M.S. (15) représentent le couronnement de cette évolution. C'est grâce au vaccin lyophilisé de cultures cellulaires qu'a pu être menée à

bien la campagne interafricaine contre la peste bovine en Afrique Centrale et Occidentale (P.C. 15), au cours de laquelle 60 millions de doses de ce vaccin ont été utilisées (11) avec le succès le plus complet.

Pourtant, les vaccins lyophilisés, quels qu'ils soient, restent tributaires d'une sujétion en région tropicale, qui est celle de la « chaîne du froid », depuis le moment de leur sortie du lyophilisateur jusqu'à celui de leur inoculation à l'animal : stockage à — 25° C voire — 78° C au laboratoire en attendant les résultats des contrôles de production d'un lot et son expédition aux utilisateurs, expédition en récipients isothermes sous glace hydrique ou carbonique, stockage en congélateurs dans les centres de vaccination, transport en flacons thermos ou récipients isothermes sous glace hydrique jusqu'au lieu d'utilisation par les équipes vac-

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Farcha, B.P. 433, Fort-Lamy, Tchad.

cinales, la glace étant alors nécessaire tant à la conservation du vaccin qu'à sa réhydratation dans un liquide réfrigéré. Dans les meilleures conditions, qui furent celles du P.C. 15, une machine à glace ravitaille une dizaine d'équipes de vaccination dans un rayon de 60 à 100 km, selon la nature du terrain; chaque équipe dispose aussi d'une autonomie de glace de 5 à 6 jours, des rotations de véhicules devant être prévues pour les séjours de plus longue durée.

En la comptabilisant, on découvre que le coût de cette chaîne de froid est important, *atteignant le tiers du prix de revient de la vaccination tous postes budgétaires compris* (12). Outre ce boulet financier, il est évident que toute panne des machines à glace dans les centres secondaires de stockage et de distribution du vaccin immobilisera les équipes d'intervention par manque de moyens de conservation sous froid; nombreux ont été les exemples de ces circonstances malheureuses au cours du P.C. 15 (11). Point n'est besoin d'épiloguer plus avant pour conclure que la nécessité de l'utilisation de la glace sur le terrain est une entrave à l'efficacité des équipes de vaccination en même temps qu'elle grève lourdement les budgets des services de l'élevage. Il s'agit pourtant là d'une obligation. En effet, lorsque l'on étudie la stabilité thermique des vaccins antipestiques de cultures cellulaires (figure 1), on arrive à plusieurs conclusions importantes sur les plans théoriques et pratiques.

Le titre minimal requis par un vaccin au moment où il va être injecté à l'animal est de $10^{2,5}$ DCP₅₀ (dose cytopathogène 50 p. 100) par dose vaccinale. Ce titre, imposé maintenant par les normes internationales (15), a été ainsi déterminé à la suite des travaux de PLOW-RIGHT et FERRIS (20), confirmés par ceux de SINGH et collab. (27), montrant qu'une seule DCP₅₀ était capable d'immuniser un bœuf réceptif. La norme de $10^{2,5}$ DCP₅₀ a néanmoins été adoptée de façon à créer une marge de sécurité suffisante permettant de compenser la destruction du virus occasionnée par la manipulation finale du vaccin réhydraté, les bovins vaccinés recevant toujours de ce fait la quantité minimale de virus nécessaire à leur immunisation. L'un des facteurs intervenant sur ce titre minimal est le titre qu'aura le vaccin à la sortie du laboratoire producteur; il appartient à ce

dernier de délivrer un produit du plus haut titre possible, et non de se contenter du minimum autorisé, afin de pallier les pertes, contrôlables ou non, que subira le vaccin durant son stockage, son transport et son utilisation. Les autres facteurs agissant dans la résistance du vaccin lyophilisé à l'inactivation thermique sont: la température, le temps d'exposition aux températures inaliéables, la qualité de l'excipient de lyophilisation. La figure 1, colligée des résultats de plusieurs auteurs, rend compte de cette inactivation et explique la nécessité du stockage à basse température et du transport sous froid.

Les essais d'amélioration de la conservation des vaccins lyophilisés ont jusqu'alors porté sur l'excipient de lyophilisation. D'une manière générale, les producteurs utilisent des diluants contenant des peptones (hydrolysate de caséine ou de lactalbumine, peptones enzymatiques). D'après les résultats publiés, la meilleure formule de diluant paraît être le mélange saccharose-hydrolysate de lactalbumine (22). Des recherches ont été réalisées à Dakar et à Farcha (2, 23) avec adjonction de sulfate de sodium ou de magnésium, sans qu'elles débouchent sur un résultat pratique.

Il est dès lors patent que d'énormes progrès restent à accomplir dont le but final est d'améliorer la stabilité thermique, donc la conservation du vaccin, avec en filigrane la suppression du transport sous glace sur le lieu de vaccination.

Il est en effet apparu en 1965, à la fin de la phase I du P.C. 15, que la réduction des moyens d'action des Services Vétérinaires ne leur permettrait pas de renouveler, voire même d'entretenir, le matériel frigorifique producteur de glace. Aussi, en dehors de toute éthique scientifique, l'amélioration des propriétés de conservation du vaccin devenait-elle une impérieuse nécessité si l'on voulait poursuivre l'effort de lutte contre la peste bovine et appliquer ces mesures conservatoires. Ce sont ces dernières considérations qui ont déterminé les recherches ci-après exposées.

CONSIDERATIONS THEORIQUES SUR L'INACTIVATION THERMIQUE DES VIRUS

L'inactivation thermique d'un virus est le

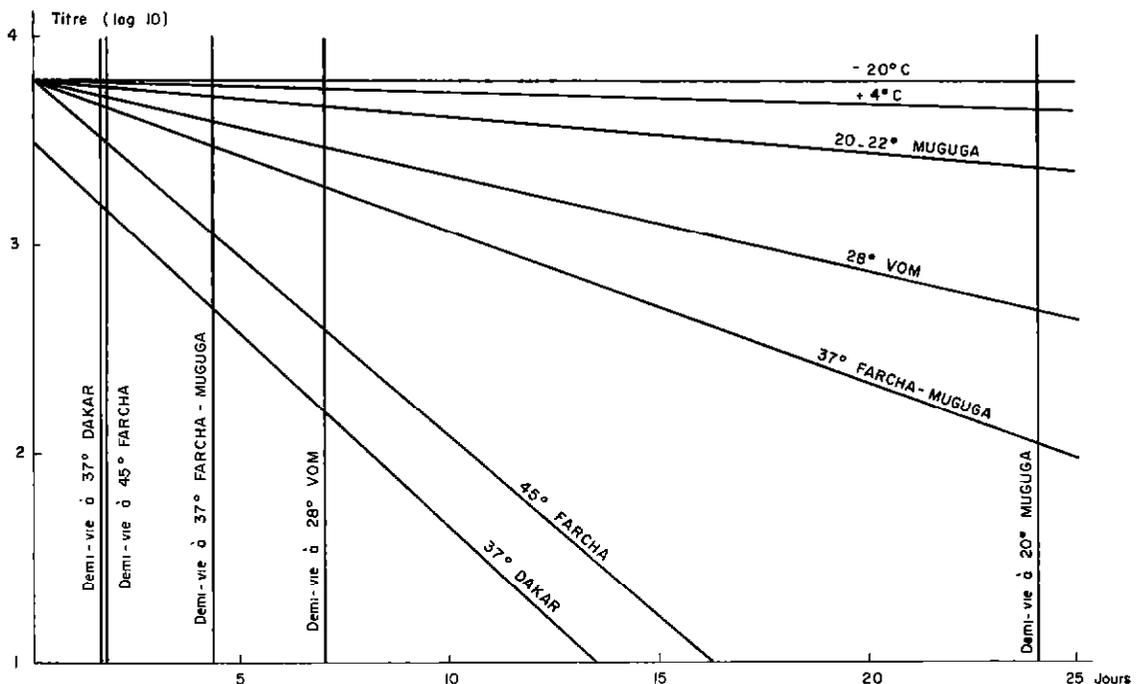


Fig. 1. — Inactivation du virus-vaccin bovine pestique lyophilisé (cultures cellulaires) à différentes températures.

Cette figure composite, dont les éléments sont tirés des résultats publiés par différents laboratoires (2, 16), reflète le comportement disparate du produit selon les températures et les diluants de lyophilisation. Pour la commodité de la lecture, on a donné aux droites la même origine sauf pour le vaccin de Dakar, ce qui n'influe pas sur la pente des droites ni sur la demi-vie.

phénomène physio-chimique qui se produit lorsqu'un « stress » thermique défini est appliqué à une population virale définie contenue dans un milieu physique défini; pratiquement, elle se mesure en comparant le titre N de l'une des activités biologiques de la population virale soumise au stress thermique (infectiosité, pouvoir hémagglutinant ...) à celui N_0 d'une même population virale non soumise à ce stress. Elle est soumise à la relation générale :

$$(1) \quad \frac{N}{N_0} = e^{-kt} \text{ ou } \log N = \log N_0 - \frac{kt}{2,303}$$

où t est le temps d'exposition à une température donnée et k une constante appelée « constante de vélocité » pour cette température. La classique équation d'ARRHENIUS lui assigne la valeur :

$$(2) \quad \log k = - \frac{E}{2,303 RT} + C$$

où E est l'énergie d'activation et R la constante des gaz parfaits (1,987 cal. par degré et par

mole) et T la température absolue (8). Dans les limites des températures vitales (0 à 45° C), l'inactivation thermique d'un virus est une réaction du premier ordre et sa représentation graphique en coordonnées semi-logarithmiques est une droite à pente négative; la figure 1 en donne un exemple. Il est alors commode de définir, comme pour les corps radioactifs, une période dite demi-vie, temps au bout duquel la moitié des virions est inactivée (ou, à l'inverse, la moitié est toujours active). Cette propriété est vraie, que les virus soient en phase liquide ou lyophilisés; dans ce dernier cas, la demi-vie est notablement augmentée.

Toutefois, pour beaucoup de virus, lorsque l'on atteint des températures relativement dysgénésiques (45 à 60° C), on s'aperçoit que la droite d'inactivation s'infléchit comme s'il existait à ces températures une population virale plus résistante que la population d'origine; on appelle parfois ce phénomène « effet de queue » (tailing effect). Le cas existe, que le virus soit en phase liquide (11) ou lyophilisé (9);

on l'observe avec le virus bovipestique (4, 22) sans que cette observation ait donné lieu à commentaires.

L'interprétation de cet infléchissement des droites d'inactivation a reçu diverses interprétations : les uns admettent une hétérogénéité phénotypique de la population virale vis-à-vis du stress thermique, d'autres le rapportent à des facteurs expérimentaux (aggrégation de virions, adsorption aux parois, voire aérosol viral à l'interface liquide-air) (3, 8); WOESE (29), enfin, suppose que l'acide nucléique existerait sous deux formes qui ne se dénaturent pas de la même façon. C'est sur ces bases que le raisonnement suivant a été tenu : si le vaccin bovipestique lyophilisé soumis à un stress thermique important présente un effet de queue, il suffirait d'isoler les virions qui se montrent particulièrement thermorésistants et d'étudier la population virale qui en découle lors de leur réplication, pour éventuellement obtenir une souche de virus plus thermorésistante à l'inactivation thermique que la souche d'origine, à condition que la thermorésistance phénotypique soit conditionnée par le génome viral.

L'exposé qui va suivre est le compte rendu de l'isolement d'une telle population virale à partir du vaccin bovipestique de cultures cellulaires. On verra que l'hypothèse faite au départ a été vérifiée, ce qui ne va pas sans remettre en cause certaines données de virologie fondamentale (6, 8).

Pour le sujet qui nous occupe, certains points méritent d'être précisés en exergue :

- Le virus est le virus bovipestique adapté aux cultures de néphrocytes bovins par PLOWRIGHT et FERRIS.

- Ce virus est le virus-vaccin bovipestique utilisé pour les campagnes de vaccination; il est produit selon des normes déjà décrites (25).

- Il ne sera fait mention que du produit à l'état lyophilisé; en conséquence, lorsque l'on parlera plus loin d'inactivation thermique, de thermodégradation et de thermorésistance, *tous ces termes se référeront au produit lyophilisé* et non au virus en phase liquide. La thermorésistance dont il sera fait mention est celle des virions bovipestiques en phase solide lyophilisée; elle n'a rien à voir, on le verra, avec leur thermorésistance en phase liquide.

Elle est également parfaitement différente du facteur « rt » (résistance à la température) (14) qui définit les conditions thermiques de réplication cellulaire de certains virus, *in vitro* comme *in vivo*, et qui est généralement associé au facteur virulence (13).

MATERIEL ET METHODES

1. Virus

Ainsi qu'il a déjà été dit, le virus de départ est le virus-vaccin bovipestique adapté aux cultures cellulaires par PLOWRIGHT et FERRIS (18). On a utilisé le lot n° 27 du vaccin Pestosec du Laboratoire de Farcha, produit dans les conditions déjà décrites; il correspond au 38^e passage de la souche RPOK-BK.

Le titrage primitif, de nombreuses fois répété par la suite, lui assigne une richesse de $10^{3,8}$ DCP₅₀ par 0,2 ml de vaccin reconstitué à son volume initial d'avant la lyophilisation. Ce titre ne correspond pas exactement aux normes internationales qui sont définies par rapport à la dose vaccinale, mais on a préféré le rapporter au volume de 0,2 ml, car c'est celui qui est utilisé pour infecter les tubes de cultures, et aussi pour ne pas trop augmenter la taille des graphiques. Dans la suite de l'exposé, c'est à ce volume que l'on se référera. De plus, lorsqu'il sera fait mention des vaccins expérimentaux, il sera sous-entendu qu'ils ont été produits selon le même protocole que le vaccin original Pestosec.

2. Traitement thermique

Après avoir constaté la réalité du vide dans les flacons de vaccin lyophilisé avec un éclateur à haute fréquence, on les place dans une étuve réglée à $45^{\circ} \text{C} \pm 0,5$. Ils y séjournent jusqu'à ce qu'ils soient retirés pour le titrage. La température de 45°C a été pragmatiquement choisie comme étant la température moyenne des heures chaudes de la saison sèche au Tchad.

3. Techniques virologiques

a) Titrage

A la sortie de l'étuve, les flacons soumis au chauffage à 45°C sont réfrigérés pendant quelques minutes dans un bain d'eau glacée de façon à ce que, lors de la réhydratation, le

virus ne subisse pas de choc thermique en phase liquide; la réhydratation se fait avec de l'eau distillée à 4° C au volume initial du vaccin avant lyophilisation (5 ml).

Les dilutions pour titrage sont effectuées en tampon phosphaté à pH 7,2 en suivant une progression géométrique de 10 en 10 ou de 2 en 2, selon le titre moyen attendu. On utilise 10 tubes de cultures cellulaires par dilution, chaque tube recevant 0,2 ml de suspension virale mélangée aux cellules en suspension; on porte sur rouleur pendant 24 heures en position stationnaire puis on met à tourner. Le calcul de la DCP₅₀ est fait selon la méthode de REED et MUENCH après 10-12 jours de culture.

b) Clonage

Après plusieurs efforts infructueux pour obtenir des plages sur tapis cellulaire infecté par des dilutions de virus bovine pestique et recouvert de milieux nutritifs solidifiés soit par gélose Noble, l'agarose, la méthyl-cellulose ou la gomme adragante, on s'est rabattu sur la technique des dilutions terminales de BURNET en milieu liquide déjà utilisé par De BOER et BARBER (5). L'interprétation sera donnée au chapitre des résultats.

c) Identification du virus

On la réalise par séro-neutralisation sur les virus réisolés en cultures cellulaires en utilisant un sérum antivirale pestique préparé sur lapin. En quelques occasions, on a appliqué la méthode d'immunofluorescence à deux souches mettant en œuvre un sérum de lapin antivirale pestique et des globulines fluorescentes anti-lapin (24).

d) Techniques sérologiques

La recherche des anticorps antivirale pestiques neutralisants s'effectue classiquement selon la technique de PLOWRIGHT et FERRIS (19) et celle des anticorps hétérologues inhibant l'hémagglutination morbilleuse selon celle de BÖGEL et collab. (1).

4. Animaux d'expérience

Les pouvoirs pathogènes et immunigènes des virus clonés puis identifiés en cultures cellulaires ont été testés sur bouvillons de race Zébu Bororo sans anticorps antivirale pestiques, importés de la République Centrafricaine et maintenus en étables d'isolement.

RESULTATS

1. Isolement de variants à inactivation thermique retardée

L'isolement de clones de virus bovine pestiques vaccinal à thermo-inactivation retardée a été réalisé en 4 phases successives; les 3 premières seront décrites dans ce chapitre.

Phase 1

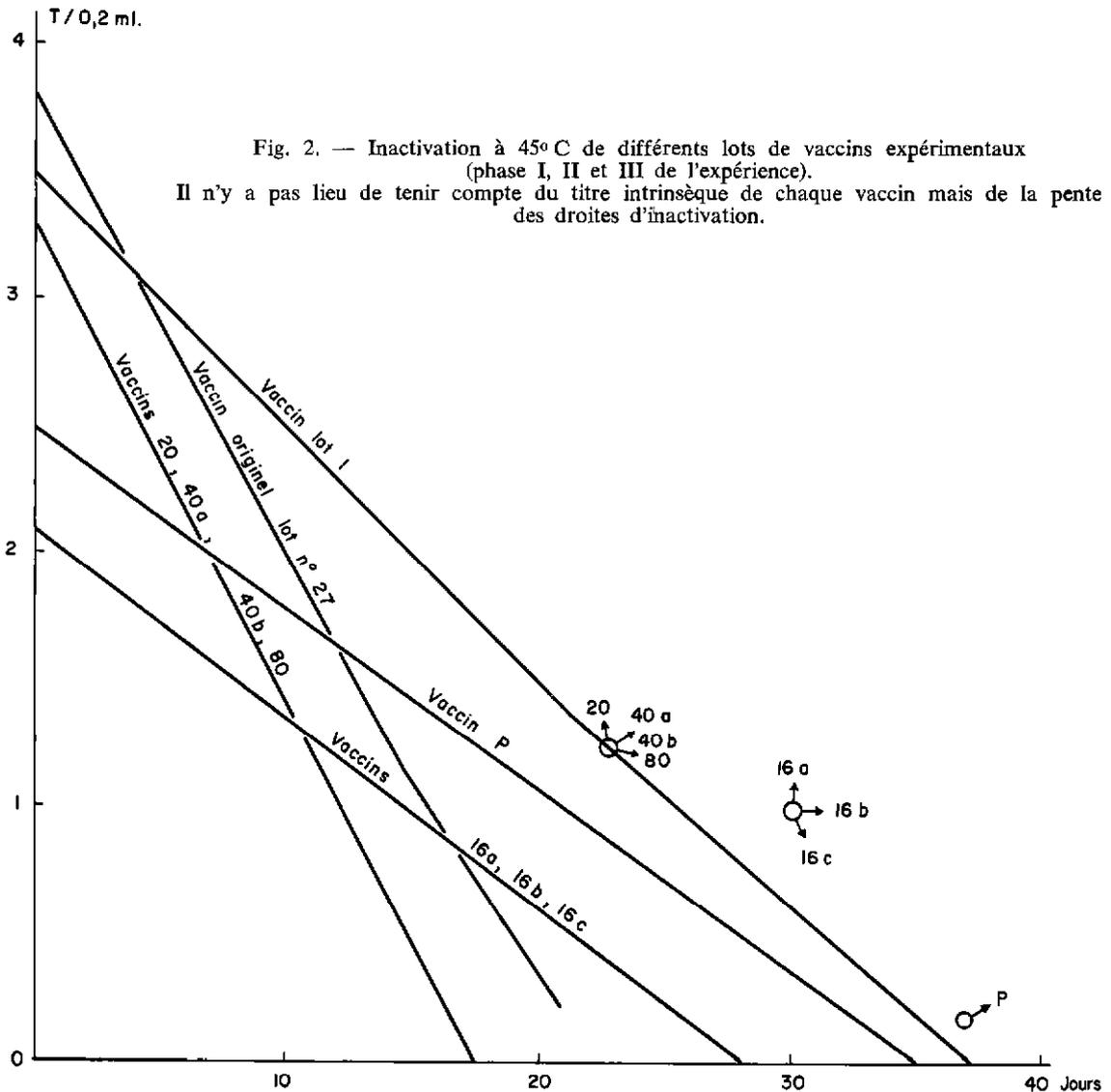
Les titrages du lot n° 27 de vaccin Pestosec maintenu pendant 21 jours à 45° C ont permis l'établissement de la courbe d'inactivation tracée sur la figure 2. On remarque que la droite s'infléchit à partir du jour 15 du titrage; ce fait étant dû à ce que le titrage du 21^e jour est encore positif par suite de l'existence d'un tube à la dilution 10⁻¹ dans lequel existe un effet cytopathique.

Mettant en application le raisonnement exposé plus haut, on récolte le liquide de culture de ce tube avec lequel on infecte, sans effectuer de dilution, une culture de cellules de rein d'embryon de veau. Cette culture récoltée lorsque l'effet cytopathique atteint environ 70 p. 100 du tapis cellulaire, sert à préparer un lot expérimental n° I. Après lyophilisation, le titre du produit est de 10^{8,5}/0,2 ml. Des flacons sont placés à l'étuve à 45° C.

Phase 2

Les titrages des 15 premiers jours du chauffage à 45° C laissent présager que ce lot expérimental est déjà considérablement plus résistant à l'inactivation thermique que le vaccin d'origine; calculée dans cette limite de temps, la demi-vie passe de 1,8 à 3,2 jours.

A partir du 21^e jour du titrage, la droite d'inactivation s'infléchit par suite du résultat des titrages des jours 21, 23 et 30. On récolte les tubes des dilutions au 1/20, 1/40 et 1/80 du jour 23 et 3 tubes de la dilution au 1/16 du jour 30 (numérotés respectivement 16a, 16b et 16c). Le titrage du 37^e jour fournit encore un tube (vaccin non dilué) dans lequel existe un effet cytopathique; il est récolté et numéroté P. Avec les récoltes des jours 23, 30 et 37, on réalise des lots expérimentaux de vaccin qui sont identifiés par les sigles 20, 40a, 40b, 80, 16a, 16b, 16c, P, rappelant la dilution du titrage d'où ils sont issus. Ces lots expérimentaux sont placés à l'étuve à 45° C.



Phase 3

Les droites d'inactivation des 8 lots expérimentaux fournissent une famille très hétérogène : les vaccins 20, 40a, 40b et 80 s'inactivent comme le vaccin d'origine; les vaccins 16a, 16b et 16c ont entre eux le même comportement tandis que le vaccin P se montre le plus thermorésistant avec une demi-vie de 4 jours à 45° C.

Ce résultat reflète l'hétérogénéité phénotypique au regard de l'inactivation thermique des

virions présents dans les titrages ayant servi à préparer les lots expérimentaux. Il apporte aussi une confirmation de l'hypothèse que cette variante phénotypique est génétiquement déterminée puisque, lorsque les isoléments de particules virales thermorésistantes sont poussés (cas des vaccins 16a, 16b, 16c et P), la résistance thermique constatée est de beaucoup supérieure à celle des vaccins réalisés avec des populations virales non sélectionnées.

La phase IV de la sélection sera exposée plus loin.

2. Caractéristiques des variants (*) thermorésistants

a) Nature bovipestique

Il convient de se demander si les virus que l'on manipulait étaient bien du virus bovipestique et non un virus cytopathogène issu des cultures cellulaires. A cet effet, on réalise une séro-neutralisation avec le sérum de lapin antibovipestique sur chacun des variants de la phase 3; tous sont neutralisés, attestant ainsi que l'on travaille bien avec le virus de la peste bovine.

b) Effet cytopathique

Alors que le vaccin originel fournit en cultures cellulaires de grands plasmodés multinucléés, les variants de la phase 3 déterminent la formation de petits polycaryocytes et de nombreuses cellules étoilées. La lyse du tapis cellulaire est rapide, pratiquement totale 4 jours après l'infection.

c) Thermorésistance en phase liquide

On pouvait se demander si la thermorésistance plus marquée des variants 16a, 16b, 16c et P à l'état lyophile par rapport à celui du vaccin originel était liée à la thermorésistance en phase liquide. A cet effet, on étudie les inactivations thermiques au bain-marie à 45° C du lot de vaccins Pestosec n° 27 et des 4 variants, après reconstitution de la pastille lyophilisée dans 100 ml d'eau distillée. Elles se révèlent être identiques, avec une demi-vie de 12 minutes.

Il en découle 2 conclusions : l'une dogmatique qui est l'indépendance des deux caractères phénotypiques d'inactivation thermique à l'état liquide et à l'état lyophile; l'autre pratique, conditionnant en fait toute l'utilité de cette recherche : le but final étant de se passer de l'utilisation de la glace sur le terrain, il conviendra de trouver un diluant qui soit thermoprotecteur du vaccin à température ambiante pour que les opérations vaccinales puissent s'effectuer dans des conditions satisfaisantes.

3. Innocuité et pouvoir immunigène des variants

Bien qu'il n'y ait *a priori* aucun lien entre la thermorésistance à l'état lyophile et les facteurs associés « rt-virulence » (14), on devait se demander si les mutants phénotypiques possédaient toujours les mêmes qualités d'innocuité que le vaccin originel.

Des bouillons sensibles reçoivent une dose vaccinale de chacun des lots expérimentaux de vaccin et sont logés en étable d'expérience, selon le schéma indiqué dans le tableau I, avec des bouillons sensibles non vaccinés qui seront les témoins d'une éventuelle excrétion et de la diffusion des vaccins expérimentaux. La cinétique de la sérologie est suivie pendant 47 jours, temps au bout duquel tous les bovins reçoivent un aérosol de virus bovipestique virulent appliqué dans des conditions expérimentales déjà décrites (26).

Le pouvoir pathogène des vaccins expérimentaux n'est apparemment pas supérieur à celui du 38^e passage en cultures cellulaires qui, chez quelques veaux, produit une légère montée thermique de peu d'ampleur. Par contre, il est plus surprenant de constater que l'un des bovins en contact du box I (n° 3912) a présenté un peu de fièvre 12 jours après la vaccination, soit une semaine après le n° 3906 vacciné avec le vaccin 20. Rien de spécial n'est à remarquer pour l'animal en contact du box 2.

La montée d'anticorps neutralisants est normale pour les animaux vaccinés; il y a également séro-conversion antimorbilleuse sauf pour les n°s 3901 et 3906. On constate par ailleurs au 21^e jour de l'expérience, soit 9 jours après la phase hyperthermique du bovin contact n° 3912 du box I, que les deux témoins hébergent des anticorps neutralisants qu'ils ne possédaient pas avant l'expérience.

Lors de l'épreuve d'immunité, seul l'animal du box 2 contracte la peste.

Il est dès lors patent que l'un des virus-vaccins expérimentaux injectés aux bovins du box I a été excrété et s'est montré contagieux.

Pour cette raison et aussi parce que leur thermorésistance à l'état lyophile n'est pas spécialement remarquable, ils ont été exclus dans la suite de la recherche.

(*) Le terme de variant est pris dans l'acceptation en génétique virale que lui donne FENNER (6).

TABLEAU N° I

Essai d'innocuité et de pouvoir immunigène de vaccins expérimentaux produits avec les variants à thermo-dégradation retardée.

Logement	N°	Vaccin	Titre (\log_{10}) par dose	Hyperthermie	Ac IHM	Ac SN	Immunité
Box I	3 909	N° I	3,9	-	4	2,5	+
	3 906	20	2,5	+	0	1,9	+
	3 907	40a	2,9	-	8	2,2	+
	3 910	40b	3,7	-	16	2,2	+
	3 911	contact	-	-	2	0,7	+
	3 912	contact	-	+	4	0,7	+
Box II	3 902	16a	2,9	+	4	2,2	+
	3 904	16b	2,9	-	16	2,5	+
	3 901	16c	2,5	-	2	2,2	+
	3 903	P	2,9	+	16	2,2	+
	3 905	contact	-	-	0	0	-

Ac SN : anticorps sériques neutralisants, exprimés par l'exposant du TN_{50} (19).

Ac IHM : anticorps sériques inhibant l'hémagglutination morbilleuse, exprimés par l'inverse de la dilution de sérum inhibant totalement l'hémagglutination.

Les chiffres des anticorps SN et IHM sont ceux du 21e jour de l'expérience.

Dans un autre essai, le pouvoir immunigène de 3 vaccins expérimentaux conservés pendant un certain temps à 45° C a été recherché concurremment à l'expérience précédente. Un certain nombre de flacons des vaccins 40b, 16b et P sont soumis pendant 26 jours au chauffage à 45° C.

Deux bovins par vaccin reçoivent une dose vaccinale (reconstitution en eau distillée réfrigérée à 4° C), les jours 15, 23 et 26, soit au total 18 bovins divisés en 3 lots correspondant aux 3 jours; un témoin non vacciné est inclus dans chacun des 3 lots.

Lors de l'épreuve virulente faite un mois après la vaccination, les bovins vaccinés avec les vaccins 16b et P chauffés pendant 15 jours résistent, tandis que ceux ayant reçu le vaccin 40b et le témoin contractent la peste. Tous les animaux ayant reçu les vaccins chauffés pendant 23 et 26 jours contractent eux aussi la peste lors de l'épreuve (tableau 2).

On conclut aisément que les variants 16b et P permettent de faire les vaccins pouvant supporter pendant au moins 15 jours, mais pas 23, un séjour à 45° C et à l'obscurité. C'est évidemment un net progrès par rapport au vaccin ordinaire, mais les titrages réalisés au

15^e jour du chauffage à 45° C n'indiquent qu'une richesse de $10^{1,6}$ et $10^{2,5}DCP_{50}$ par dose vaccinale, respectivement, inférieure au minimum internationalement admis. La technologie de production des vaccins expérimentaux n'avait pas été spécialement poussée, d'où leur titre modeste au départ qui conditionne en partie celui que l'on retrouve 15 jours plus tard.

Il en résulte que c'est à partir du titre minimal de $10^{2,5}DCP_{50}$, après 15 jours de chauffage à 45° C, que devra être calculée la norme minimale de production à la sortie du lyophilisateur; on l'obtient par extrapolation des droites d'inactivation, soit $10^{3,8}DCP_{50}$ /dose vaccinale pour 16b et P.

TABLEAU N° II

Vaccin	Temps de chauffage à 45° C		
	15 j	23 j	26 j
16b	+	-	-
P	+	-	-
40b	-	-	-

+ indique que les bovins vaccinés ont résisté à l'épreuve virulente.

4. Clonage du vaccin à thermo-dégradation retardée (phase 4)

La dernière expérience laisse un sentiment d'insatisfaction car, au vu des droites d'inactivation thermique de la figure 2, on s'attendait à ce que les variants 16b et P soient toujours immunigènes après chauffage pendant 23 jours à 45° C, ce qui n'a pas été. On s'est demandé si ce fait ne provenait pas d'une hétérogénéité phénotypique des virions composant la population virale des vaccins expérimentaux, aussi décida-t-on d'effectuer un clonage de cette population et d'étudier la thermorésistance des clones isolés.

La technique du clonage est celle des « dilutions limites » dont le principe est de récolter les liquides des tubes d'un titrage dont les dilutions les plus poussées donnent encore un effet biologique (hémadsorption, effet cytopathique ...); pour le virus bovine pestique, c'est l'effet cytopathique qui est le révélateur de la présence de virions dans la dilution limite.

On confectionne un lot expérimental de vaccin avec le variant 16b; un titrage préliminaire lui assigne une richesse de $10^{3,4}$ DCP₅₀/ml après 15 jours de séjour à 45° C. Un flacon est alors soumis à cette température pendant la même période de temps, au bout de laquelle on réalise des dilutions précises de la dilution terminale pour laquelle on escompte avoir un effet cytopathique par 0,2 ml. Des tubes de cultures cellulaires sont ainsi infectés pour chacune des dilutions 1/700, 1/800 ... 1/1.300, à raison de 10 tubes de cellules rénales d'embryon de veau de 2^e explantation par dilution, puis portés sur rouleur.

Le milieu est changé dès qu'il a tendance à virer vers l'acidité. La lecture intervient les 8, 9 et 10^e jours après l'infection.

L'effet cytopathique est net (destruction de la nappe cellulaire) pour tous les tubes jusqu'à dilution 1/900 comprise. Dans la dilution 1/1.000, il n'y a qu'un tube qui présente un effet cytopathique certain; quatre montrent des couches cellulaires un peu sales, les autres sont normaux. Le tube n° 2 présentant des lésions non équivoques est baptisé 1002; ceux pour lesquels on a des doutes sont respectivement numérotés 1003, 1004, 1008 et 1009 dans l'ordre où ils se présentent sur la roue du rouleur.

Il n'a pas été possible de réisoler le virus du tube 1002, fait *a priori* surprenant mais qui s'est éclairé par la suite.

Les couches cellulaires subsistant dans les tubes 1003, 1004, 1008 et 1009 sont décollées avec une spatule caoutchoutée et les agrégats cellulaires réensemencés avec une suspension cellulaire de néphrocytes de fœtus bovin. Neuf jours plus tard, un effet cytopathique (plasmodes et cellules étoilées) se manifeste dans les cultures infectées à partir des tubes 1003 et 1009; les deux autres ne montrent aucune modification jusqu'au 15^e jour et sont éliminés.

Partant de ces cultures, on réalise deux banques de virus appelés clones 1003 et 1009; elles sont lyophilisées et conservées à — 20° C.

Ces clones représentent le 43^e passage en cultures cellulaires de la souche originelle RPOK-BK de PLOWRIGHT et FERRIS.

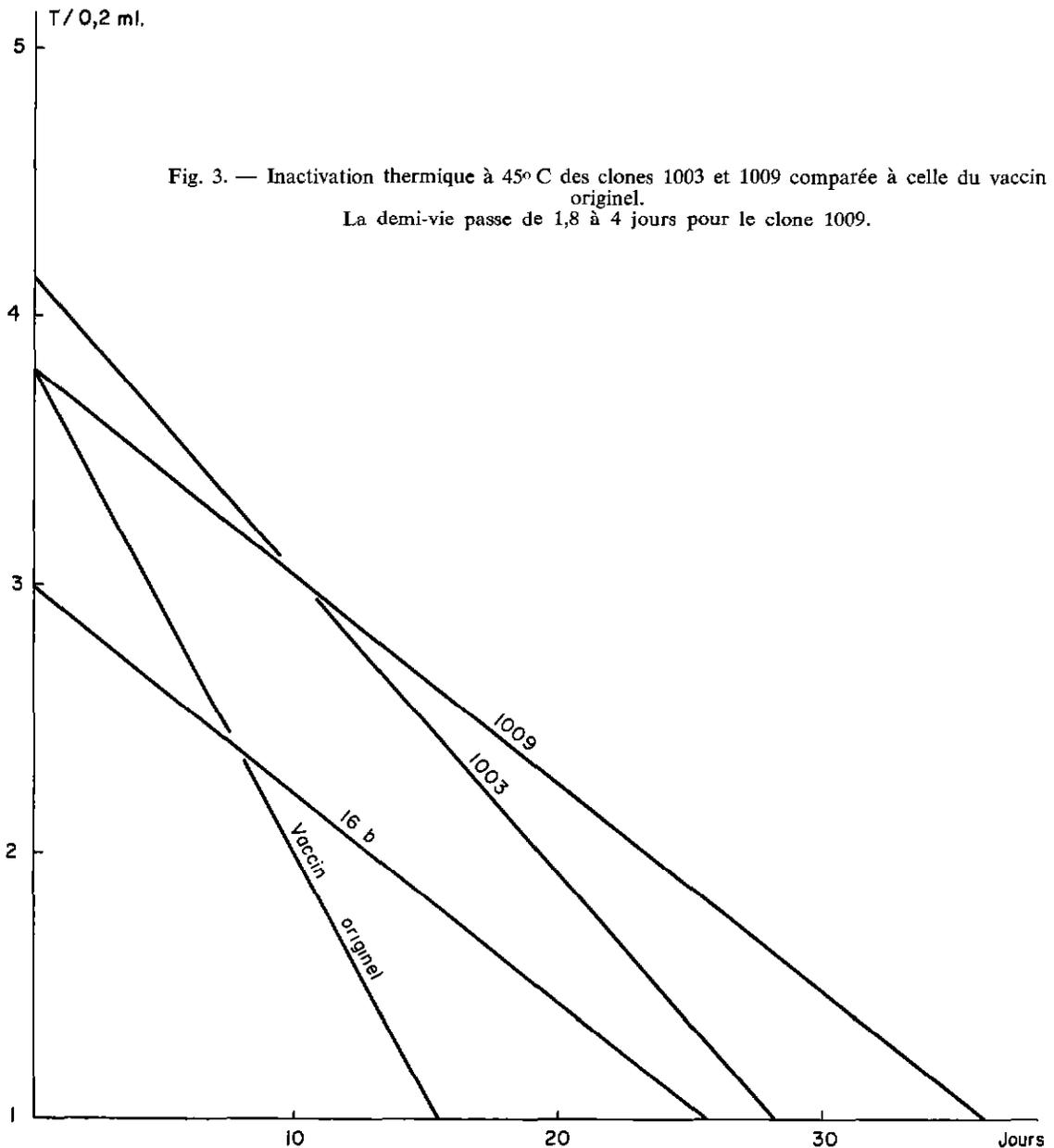
5. Caractérisation du clone 16 b-1009

a) Thermorésistance

Des échantillons de chacune des deux banques lyophilisées sont soumis au chauffage à 45° C et titrés tous les 5 jours par dilution de base log₂. On construit ainsi des courbes d'inactivation thermique (figure 3). Le clone 1009 se révèle légèrement plus thermorésistant. C'est lui qui sera utilisé par la suite.

On remarquera que pour les deux clones, les points des titrages sont sur une ligne droite, ce qui pourrait justifier le travail de sélection entrepris et l'obtention d'un clone viral à comportement phénotypique homogène quant à son inactivation thermique.

Par ailleurs, l'isolement de 2 clones à comportement thermique légèrement différent à partir du variant 16b laisse à penser que ce dernier était encore phénotypiquement hétérogène, fait qui n'a pu être apprécié vraisemblablement par suite de l'imprécision relative des titrages utilisant des lots de cellules différents (21).



b) Nature bovipestique

Elle est confirmée par une épreuve de séro-neutralisation. De plus, dans le mélange neutralisé, on recherche la possibilité d'existence d'une souche non cytopathogène du virus de la maladie des muqueuses par interférence virale avec une souche cytopathogène (MD-MI) et par immunofluorescence. Les deux tests sont négatifs.

c) Effet cytopathique

Il est identique à celui du variant 16b :

débutant le 3^e jour après l'infection (rapport d'infection de 0,01 environ), il est total le 4^e. On observe alors, dans les restes du tapis cellulaire des cellules étoilées et quelques rares petits polycaryocytes. Par contre, dans les tubes d'un titrage, on note la présence, aux hautes dilutions, des plasmodes classiques.

d) Innocuité

Tenant compte des remarques de PLOW-RIGHT et FERRIS (20) quant à la possibilité qu'a le virus bovipestique après un nombre

relativement bas de passage en cultures cellulaires de donner des réactions thermiques, voire une peste bénigne par passages successifs *in vivo* sur bovin, on a voulu explorer cette éventualité pour le clone 16b-1009 parce qu'elle conditionne son utilisation en temps que souche vaccinale éventuelle.

On inocule par voie sous-cutanée à un bouvillon sensible 100 doses vaccinales ($10^{5.8}$ DCP₅₀); un bouvillon témoin est laissé à son contact. Le 5^e jour après la vaccination, 20 ml de sang sont prélevés sur héparine et immédiatement inoculés à un autre bouvillon sensible, lui aussi logé avec un animal témoin. Cinq passages de retour sont ainsi réalisés. A chaque passage, on pratique un réisolement du virus en cultures cellulaires à partir de la fraction leucocytaire sanguine. A la fin de l'expérience, animaux inoculés et témoins sont éprouvés par un aérosol d'une souche bovipestique pathogène.

Aucun des cinq bovins ayant reçu soit le vaccin (1^{er} passage), soit le sang du passage précédent n'a présenté de fièvre ni de symptômes pouvant évoquer une peste atypique; il en a été de même des témoins lors de l'épreuve virulente, ceux-ci contractent la peste alors que les autres résistent. Le virus n'a pas été réisolé en cultures cellulaires à partir des leucocytes, fait classique avec le virus-vaccin et qui constitue précisément un marqueur par rapport aux souches virulentes (28).

Il paraît donc que l'on peut être assuré de l'innocuité du clone 16b-1009, qui se montre fixé dans son atténuation et dépourvu de contagiosité.

Depuis 1968, ce clone sert à préparer le vaccin antipestique au Laboratoire de Farcha. Plus de 8 millions de doses ont été produites et utilisées au Tchad, au Cameroun et en République Centrafricaine sans qu'elles donnent lieu à des remarques de la part des utilisateurs.

DISCUSSION

Les résultats qui viennent d'être exposés fournissent matière à réflexion sur les plans théoriques et pratiques.

L'inactivation thermique du virus bovipestique lyophilisé ne se départ pas d'un phénomène

qui paraît bien être général en virologie : c'est l'existence dans une population virale donnée de virions qui présentent une plus grande résistance à la dégradation thermique.

Indépendamment de nous, le fait a été confirmé par PLOWRIGHT et collab. (22). En d'autres termes, cela signifie que l'inactivation thermique d'un virus ne suit pas strictement une loi exponentielle et que l'assimilation à la dégradation naturelle des corps radioactifs ne saurait être faite, sans que pourtant cela remette en cause la définition de la demi-vie.

On a dit que l'existence de ces virions variants phénotypiquement avait donné naissance à diverses hypothèses rapportées plus haut.

D'une manière générale, les virologistes n'ont pas admis que cette résistance phénotypique puisse être génétiquement déterminée (8).

L'isolement des virions à inactivation thermique retardée (dénomination qui paraît être préférable à celle de thermostable) a pourtant été accomplie par YOUNGER (30) qui a montré qu'il s'agissait là d'un caractère génétiquement stable (31). Il paraît en être de même dans nos mains avec le virus bovipestique et il semble raisonnable de pouvoir affirmer que des virions ayant les propriétés du clone 16b-1009 existaient dans la population de départ, au milieu d'autres à propriétés différentes au regard de la stabilité thermique. La courbe d'inactivation ne fait que refléter l'inactivation thermique d'une population dans son ensemble.

On a vu dans l'observation rapportée plus haut que ce caractère génétique de thermodégradation retardée à l'état lyophile est indépendant de la thermodégradation en phase liquide. Il est possible que le processus d'inactivation ne soit pas le même sur les plans moléculaires et architecturaux des virions bovipestiques, sans qu'aucune précision puisse être donnée plus avant.

Il est possible par contre qu'il y ait un caractère qui soit lié dans certains cas au caractère thermodégradation retardée : c'est celui de la sensibilité au Ph acide. Il n'en n'a pas été fait mention dans le texte relatif au clonage du variant 16b-1009 mais cette opération a dû être répétée de nombreuses fois car le virus que l'on isolait se montrait très labile

aux pH inférieurs à 6,8. Le clone 1009 ne possède pas ce caractère.

Sur le plan pratique, il est évident que le clone 1009 est plus thermorésistant que le vaccin originel, avec une demi-vie à 45° C de quatre jours comparée à celle de 1,8 jour. Toutefois, dans une récente publication (17), PLOWRIGHT fait état d'une thermostabilité assez étonnante du vaccin lyophilisé de l'EAVRO, avec une demi-vie de 14 semaines à 20° C, et de 3 semaines à 37° C, ce qui diffère considérablement de la demi-vie de 4,3 jours, reportée dans la figure 1 d'après les chiffres qu'il a publiés en 1963 (16).

Comme les résultats de PLOWRIGHT ne sont pas comparables aux nôtres, étant donné la dissemblance des températures d'inactivation, on a calculé, selon la méthode de GREIFF et RIGHTSEL (7), la droite de régression de la constante de vélocité k (*) du vaccin de l'EAVRO en fonction du temps requis pour qu'il perde 1 log de son titre, en utilisant pour ce faire les données expérimentales de PLOWRIGHT et collab. (22). On obtient ainsi la droite de la figure 4. En reportant sur ce graphique le point correspondant au clone 1009 calculé à partir des données de la figure 3, on

(*) La constante de vélocité se calcule aisément à l'aide de la formule (1) citée plus haut.

constate qu'il reflète une thermorésistance à peine plus grande ($k = 0,077$ pour le clone 1009 et $k = 0,085$ pour le vaccin de l'EAVRO); en d'autres termes, cela signifie que le vaccin de l'EAVRO et celui produit avec le clone 1009 ont pratiquement la même résistance à l'inactivation thermique. C'est une conclusion surprenante si l'on se rappelle que les chiffres avancés par PLOWRIGHT étaient au départ identiques aux nôtres avec la souche RPOK-BK originelle non clonée. Doit-on penser que c'est la modification du diluant de lyophilisation, (incorporation de saccharose à la peptone), qui est à l'origine d'une telle amélioration des résultats actuels ?

Quoi qu'il en soit, l'introduction du clone 1009 à thermo-inactivation retardée a totalement changé la stratégie des opérations de vaccination au Tchad où elles s'effectuent maintenant sans glace. Le vaccin actuellement délivré est donné comme pouvant être conservé pendant 15 jours à la température ambiante, même à la température extrême de la saison chaude (45° C), pour autant qu'il soit maintenu à l'obscurité et qu'on ne l'expose pas à l'insolation directe.

Pour en arriver là, il a néanmoins fallu résoudre des problèmes de technologie qui seront exposés dans la seconde partie de cet article.

SUMMARY

A combined lyophilised rinderpest-CBPP vaccine to be used in the field without refrigeration.

I. Selection of rinderpest virions with delayed thermal inactivation properties

The thermal inactivation at 45° C of the lyophilised rinderpest cell culture vaccine follows a diphasic process, of which it has been taken profit to select a viral variant; after cloning, the half life of the clone at 45° C is 4 days instead of 1,8 days for its parent virus.

This clone, named 16 b-1009, has been characterized for its safety, potency and thermal stability; it is used for the manufacturing of a freeze-dried vaccine which, after exposure at 45° C for 15 days, keeps its potency at the internationally recommended titer of $10^{5.6}$ TCD₅₀; this quality allows its use without refrigeration in the field.

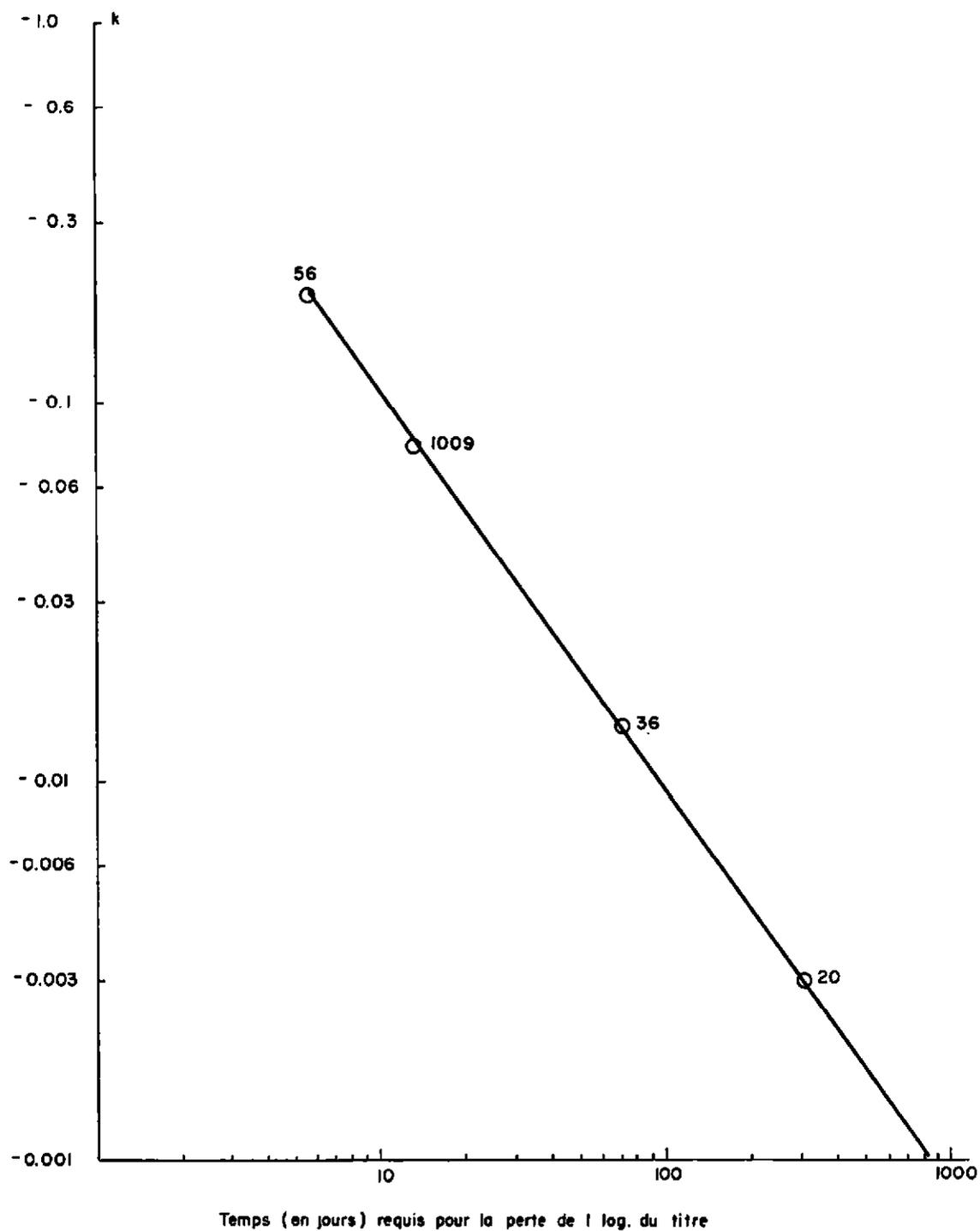
RESUMEN

Una vacuna mixta liofilizada contra la peste bovina y la perineumonía utilizable sobre terreno sin refrigeración.

I. Selección de viriones bovipéuticos teniendo una inactivación térmica retrasada

Los autores habían notado que la inactivación térmica a 45° C de la vacuna antibovipestica de cultivos celulares liofilizada ocurría según

Fig. 4. — Droite de régression de l'indice de vélocité en fonction du temps requis pour la perte d'un log du titre.
Cette droite a été calculée à partir des données expérimentales de la référence 22.



un proceso difásico. Seleccionaron un virus variable que, después de clonaje posee una media vida de cuatro días mientras que la de su pariente no es más que de 1,8 días a dicha temperatura.

Se caracterizó este clone viral, denominado 16 b-1009, desde el punto de vista de su inocuidad, su poder inmunogeno y su termoestabilidad.

Permite la fabricación de una vacuna liofilizada que conserva su actividad completa después de 15 días a 45° C, al título universalmente admitido de $10^{2.3}$ DCP₅₀ por dosis vaccinal, cualidad que permite su utilización sin helado sobre terreno.

BIBLIOGRAPHIE

1. BÖGEL (K.), ENDERS-RUCKLE (G.) et PROVOST (A.). Une réaction sérologique rapide de mesure des anticorps antibovipestiques. *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **259** : 482-484.
2. BOURDIN (P.). In: Rapport annuel du Laboratoire de Dakar pour 1966, pp. 56-59.
3. CLARK (R. M.). A mathematical model of the kinetics of viral devitalisation. *Mathematical Bioscience*, 1968, **2** : 413-423.
4. De BOER (C. J.) et BARBER (T. L.). pH and thermal stability of rinderpest virus. *Arch. ges. Virusf.*, 1964, **15** : 98-108.
5. De BOER (C. J.) et BARBER (T. L.). Segregation of an avirulent variant of rinderpest virus by the terminal dilution technique in tissue culture. *J. Immun.*, 1964, **92** : 902-907.
6. FENNER (F.). The Biology of animal viruses. I. Molecular and cellular biology. New York, Academic Press, 1968.
7. GREIFF (D.) et RIGHTSSEL (W. A.). An accelerated storage test for predicting the stability of suspensions of measles virus dried by sublimation in vacuo. *J. Immun.*, 1965, **94** : 395-400.
8. HIATT (C. W.). Kinetics of the inactivation of viruses. *Bact. Rev.*, 1964, **28** : 150-163.
9. HOFSTAD (M. S.) et YODER (H. W.). Inactivation rates of some lyophilised poultry viruses at 37 and 3 °C. *Avian Dis.*, 1963, **7** : 170-177.
10. KAPLAN (C.). Heat inactivation of vaccinia virus. *J. Gen. Microb.*, 1958, **18** : 58-63.
11. LEPISSIER (H. E.). Campagne conjointe O.U.A./C.T.S.R. contre la peste bovine en Afrique centrale et occidentale. Lagos, O.U.A./S.T.R.C., 1971. (Publ. n° 103).
12. LEPISSIER (H. E.). Communication personnelle.
13. LWOFF (A.). Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism. *Bact. Rev.*, 1959, **23** : 109-124.
14. LWOFF (A.) et LWOFF (M.). Remarques méthodologiques à propos de la thermostabilité du développement viral. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101** : 313-317.
15. Normes relatives au vaccin anti-peste bovine (vivant) préparé en cultures cellulaires et au vaccin anti-peste bovine (vivant) préparé sur l'animal. Genève, O.M.S., 1970. (Rapport technique O.M.S. n° 444.)
16. PLOWRIGHT (W.). The production and use of culture-attenuated rinderpest vaccine. Rapport 17^e Congrès Mondial Vétérinaire, (Hanovre), 1963, **1** : 679-682.
17. PLOWRIGHT (W.). The production and use of rinderpest cell culture vaccine in developing countries. *Wild Anim. Rev.*, 1972 (1) : 14-18.
18. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). Studies with rinderpest in tissue culture. I. Growth and cytopathogenicity. *J. comp. Path.*, 1959, **69** : 152-172.
19. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. The stability of cultured virus and its use in virus neutralisation tests. *Arch. ges. Virusf.*, 1961, **11** : 516-533.
20. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. *Res. vet. Sci.*, 1962, **3** : 172-182.
21. PLOWRIGHT (W.), HERNIMAN (K. A. J.) et RAMPTON (C. S.). Studies on rinderpest vaccine. II. Factors influencing the accuracy of vaccine potency tests. *Res. vet. Sci.*, 1969, **10** : 502-508.
22. PLOWRIGHT (W.), RAMPTON (C. S.), TAYLOR (W. P.) et HERNIMAN (K. A. J.). Studies with rinderpest culture vaccine. III. Stability of the lyophilised product. *Res. vet. Sci.*, 1970, **11** : 71-81.
23. PROVOST (A.). In: Rapport annuel du Laboratoire de Farcha pour 1968, pp. 101-102.
24. PROVOST (A.). Peste bovine et immunofluorescence. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1970, **73** : 915-922.
25. PROVOST (A.), BORREDON (C.) et QUEVAL (R.). Recherches immunologiques sur la péripneumonie. XI. Un vaccin mixte vivant antibovipestique-antipéripneumonique inoculé en un seul temps. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1970, **23** : 143-162.
26. PROVOST (A.), MAURICE (Y.) et BORREDON (C.). Note sur la peste bovine expérimentale du dromadaire. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21** : 293-296.
27. SINGH (K. V.), OSMAN (O. A.), BAZ (T. I.) et ELCICY (I. F.). The use of tissue culture rinderpest vaccine for egyptian cattle and water buffaloes. *Cornell Vet.*, 1967, **57** : 465-479.
28. TAYLOR (W. P.) et PLOWRIGHT (W.). Studies on the pathogenesis of rinderpest in experimental cattle. III. Proliferation of an attenuated strain in various tissues following subcutaneous inoculation. *J. Hyg. (Camb.)*, 1965, **63** : 263-275.
29. WOESE (C.). Thermal inactivation of animal viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960, **83**, art. 4 : 741-751.
30. YOUNGER (J. S.). Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. *J. Immun.*, 1957, **78** : 282-290.
31. YOUNGER (J. S.) et HALLUM (J. V.). Cystine-independent thermoresistant mutants of poliovirus. *J. Bact.*, 1964, **88** : 265-266.