

A. Diallo¹
 W. P. Taylor²
 P. C. Lefèvre¹
 A. Provost¹

Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue vivant

DIALLO (A.), TAYLOR (W. P.), LEFÈVRE (P. C.), PROVOST (A.). Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue vivant. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, 42 (3) : 311-319.

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie très contagieuse, fréquemment associée à une forte mortalité. Dans les pays où elle sévit, la PPR représente un frein important à l'amélioration de la productivité des moutons et des chèvres. Jusqu'à présent, le seul moyen de lutte contre ce fléau a été l'utilisation du vaccin hétérologue anti peste bovine, toutes les tentatives pour développer un vaccin homologue ayant échoué. Cet article décrit l'atténuation de la souche nigériane du virus PPRV Nig. 75/1 par passages en série sur cellules Vero. Le virus avirulent obtenu a les mêmes caractéristiques que le vaccin bovine de Plowright et Ferris. Il constitue donc un vaccin homologue potentiel contre la PPR. *Mots clés* : Peste des petits ruminants - Virus - Vaccin.

INTRODUCTION

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale affectant les chèvres et les moutons, mais aussi certains ruminants sauvages (12). Décrite pour la première fois en Côte-d'Ivoire en 1942 par GARGA-DENNEC et LALANNE (13), cette maladie a été longtemps considérée comme localisée à l'Afrique de l'Ouest. Les données épidémiologiques dont on dispose aujourd'hui révèlent une aire d'endémie beaucoup plus importante (6, 26). Elle comprend la plupart des pays d'Afrique situés entre le tropique du Cancer et l'équateur, plus ceux de la péninsule Arabique. Récemment, elle a été décrite en Inde (26). Dans toutes ces régions, elle constitue un frein important au développement de la production de petits ruminants. Cliniquement, elle est caractérisée principalement par un état typhique, une stomatite nécrosante, un catarrhe oculo-nasal, une diarrhée profuse et très souvent une bronchopneumonie à la phase terminale suite à des complications bactériennes. A part ce dernier symptôme, la PPR ressemble énormément à la

peste bovine. Les deux virus en cause sont aussi très apparentés et appartiennent au genre *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae*, au même titre que ceux de la rougeole et de la maladie de Carré (14). Ce sont des virus épithéliotropes et très lymphotropes. L'étroite relation antigénique existant entre PPRV (virus de la PPR) et RPV (virus de la peste bovine) avait fait suggérer par MORNET et collab. (17) que le premier serait un virus bovine mieux adapté aux moutons et aux chèvres. Cependant, l'analyse des protéines ou de leurs gènes montre qu'il s'agit de deux virus bien distincts l'un de l'autre (1, 6, 8). Déjà, en 1979, TAYLOR (27) avait montré que le test de séroneutralisation pouvait permettre de distinguer nettement les deux virus. Une autre différence importante entre PPRV et RPV a été apportée par ROSSITER et WARDLEY (24) qui ont montré que le premier, *in vitro*, se multipliait plutôt mieux sur les lymphocytes de caprins ou d'ovins que ceux de bovins, et vice-versa pour le second. Enfin, les données épidémiologiques que l'on a des deux maladies aujourd'hui, révèlent que les agents en cause évoluent, dans la nature, indépendamment l'un de l'autre. Cependant, jusqu'à présent, la prophylaxie médicale de la PPR est basée sur l'utilisation du vaccin contre la peste bovine (3, 4, 28). L'emploi de ce dernier a fait suite aux différents échecs successifs enregistrés dans le passé pour la mise au point d'un vaccin homologue (2, 12, 15). Dans le présent article, sont présentés des résultats relatifs à l'obtention d'une souche de virus PPR atténuée par passages successifs sur des cellules Vero en culture *in vitro*. Ce virus est un candidat potentiel pour un vaccin homologue anti-PPR.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cellules

Les cellules Vero, cellules de rein de singe en lignée continue, sont utilisées pour la multiplication du virus dans des boîtes Falcon à usage unique. Le milieu de culture est constitué par du MEM (Flow, France) additionné de 5 p.100 de sérum de veau foetal, 100 U/ml de pénicilline et de 10 µg/ml de streptomycine. Le taux de sérum est réduit à 1 p. 100 une fois que le tapis cellulaire est complet.

1. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays tropicaux, Service de Pathologie Infectieuse, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort cédex, France.

2. AFRC, Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU 24 ONF, United Kingdom.

Adresse actuelle : Organisation of African Unity, Pan African Rinderpest Campaign, P.O. Box 30876, Nairobi, Kenya.

Reçu le 07.09.89, accepté le 04.07.89.

A. Diallo, W.P. Taylor, P.C. Lefèvre, A. Provost

Le virus

Le virus utilisé est la souche PPR Nig 75/1. Il a été isolé sur cellules de rein de mouton par TAYLOR et ABEGUNDE en 1975 au Nigeria (28) à partir d'une chèvre morte de PPR.

Titration du virus

Il est effectué dans des plaques Nunc à 96 trous suivant la technique décrite par ROSSITER et JESSETT en 1982 (23). La lecture est faite à J+5, J+7 et J+12 après l'infection. Le titre de la suspension virale est calculé selon la formule de KÄRBER.

Séroneutralisation

Les sérums sont décomplémentés par incubation à 56 °C pendant 30 mn. Ils sont ensuite titrés par séroneutralisation dans des plaques Nunc à 96 trous (23). Les dilutions sont faites directement dans les plaques. On ajoute ensuite dans chaque cupule 100 $DICT_{50}$ de virus. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant une heure. Après cette incubation, 20 000 cellules Vero sont déposées dans chaque trou. Le tout est mis dans l'étuve à CO_2 à 37 °C. La lecture est réalisée à J+5, J+7 et J+12.

Atténuation du virus

Après 6 passages sur les cellules de mouton, le virus a été atténué par des multiplications successives sur les cellules Vero de la façon suivante : 10 ml de cellules trypsinées et 1 ml de suspension virale non diluée sont mis dans une boîte Falcon de 25 cm². L'incubation est faite à 37 °C. Tous les deux jours, le milieu de culture ou d'entretien est renouvelé. La récolte de virus s'effectue en deux ou trois fois à partir du moment où l'effet cytopathogène atteint 30 p. 100 du tapis cellulaire et jusqu'à 80 p. 100 ou plus. Les milieux recueillis ainsi que le reste des cellules de la boîte sont soumis à deux cycles de congélation et décongélation. Les surnageants sont clarifiés par centrifugation, répartis en quantités égales et conservés dans le congélateur à -70 °C. Le passage suivant sera réalisé avec 1 ml de cette suspension virale. Parfois, l'infection des cellules a été réalisée sur un tapis cellulaire déjà formé, mais incomplet. Dans ce cas, l'absorption virale a lieu à 37 °C pendant une heure.

Clonage du virus

A certains stades des passages en série du virus sur les cellules, il a subi des clonages par dilution limite.

Cette technique consiste à titrer le virus, et à considérer les suspensions des dernières dilutions positives comme des clones.

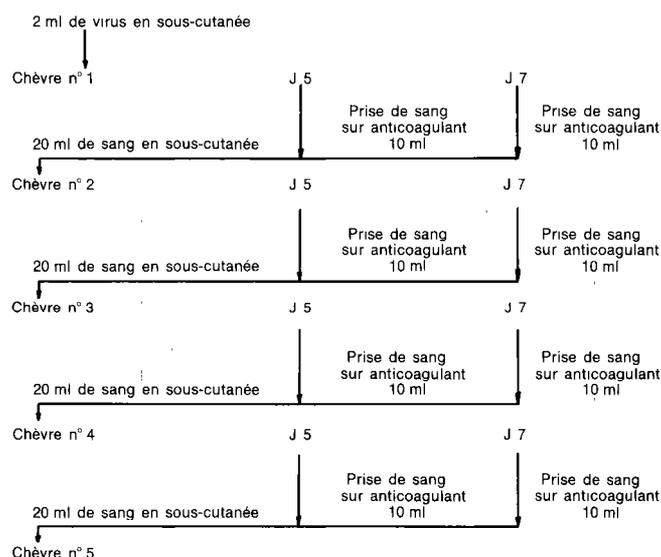


Schéma 1 : Clonage du virus par dilution limite. Le virus PPR 75/1 est titré dans une plaque à 96 trous. La suspension virale de chacun des derniers puits positifs a été prélevée, amplifiée 2 fois puis testée sur 3 animaux pour un pouvoir pathogène éventuel.

Les animaux

Les expériences sur animaux ont été menées dans un laboratoire de haute sécurité en Angleterre (Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, UK). Des chèvres, de tous âges et des deux sexes, ont été achetées sur place et sont donc toutes réceptives à la PPR et à la peste bovine. Elles ont servi pour le test du pouvoir pathogène du virus à différents passages sur cellules :

LK6 Vero 20

LK6 Vero 55

LK6 Vero 58

LK6 Vero 61

Pour chaque expérience, 4 animaux sont inoculés en sous-cutanée avec 2 ml de suspension virale à $10^{4.5}$ - $10^{5.2}$ $DICT_{50}$ /ml. Ils sont gardés dans le même local qu'un témoin de contact. Trois semaines plus tard, deux autres chèvres, dites témoins d'épreuve, sont mises avec les autres et tous les animaux reçoivent alors, en sous-cutanée, 2 ml de virus virulent ($10^{2.6}$ $DICT_{50}$ /ml, virus PPR Meiliq BK2, Vero 2, isolé au Soudan) (9). Ils sont soumis à une surveillance clinique quotidienne et à des prises de sang, en vue de l'obtention de sérums ou de leucocytes pour le contrôle de la virémie.

Il a été testé, sur 5 chèvres, la possibilité éventuelle du virus atténué à retrouver sa virulence après des passages successifs sur animaux. Pour cela, le premier animal est inoculé avec 2 ml de virus atténué ($10^{4.8}$ DICT₅₀/ml). Son sang, prélevé 5 à 7 jours plus tard, est injecté, en sous-cutanée, à un second animal et ainsi de suite. Vingt-un jours après l'inoculation de la cinquième chèvre, tous les animaux sont soumis, en même temps qu'un témoin, à une épreuve virulente.

RÉSULTATS

Multiplication du virus PPR Nig 75/1

Sur les cellules Vero, l'effet cytopathogène (ECP) de ce virus commence par l'arrondissement de quelques cellules qui deviennent alors très réfringentes. Leur nombre croît et elles finissent par envahir tout le tapis. Peu à peu, elles meurent et se détachent du fond de la boîte de culture. Parfois, on observe de petits syncytiums. Cependant, sur un tapis de cellules infectées et colorées à l'hémalum-éosine, il y a toujours de petits polycaryons avec un faible nombre de noyaux (4 à 6).

La rapidité d'apparition et de progression de l'ECP est certes fonction de la concentration virale de l'inoculum mais elle est aussi influencée par deux facteurs :

— Le degré d'adaptation du virus à se multiplier dans les cellules *in vitro*. En effet, jusqu'au passage 10 sur Vero, aucun effet viral n'est perceptible avant 4-7 jours après l'infection (p.i.) et la récolte définitive a lieu entre le 8ème et le 13ème jour. En revanche, aux environs du 50ème passage et plus, on commence à percevoir quelques cellules réfringentes dès le 2ème jour, et au 4ème-6ème jour p.i., tout le tapis cellulaire est entamé ;

— La fréquence de renouvellement du milieu de culture une fois que l'ECP a débuté : le nombre de cellules réfringentes augmente très rapidement le lendemain de chaque changement de milieu.

La figure 1 représente la courbe de production virale dans trois expériences différentes. Elle montre que le pic se situe entre 3 et 6 jours p.i., précisément au moment où l'on a le plus de cellules arrondies. La chute du titre viral correspond à la période de leur décollement du tapis et à la libération de grandes quantités d'enzymes protéolytiques dans le milieu cellulaire. Ces dernières vont inactiver le virus en digérant les protéines de surface qui lui sont nécessaires dans la première phase de son cycle de multiplication.

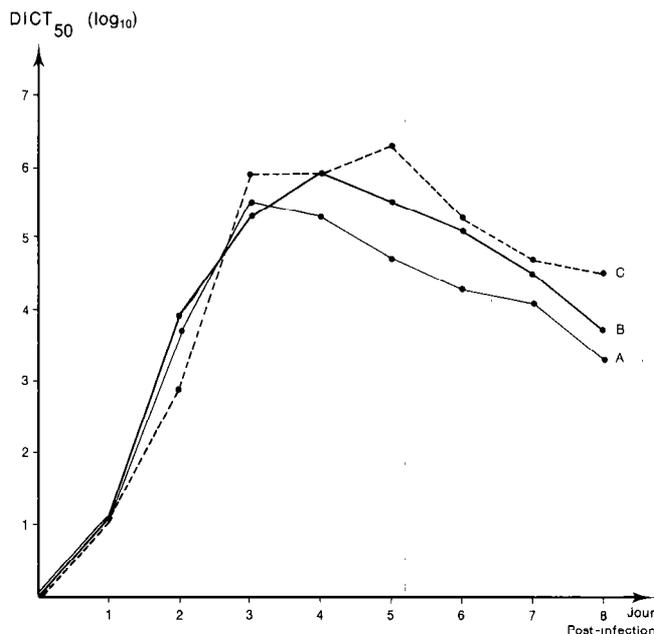


Fig. 1 : Courbe de production du virus PPR 75/1 LK5 Véro 63. Dans des petites boîtes de pétri (Nunc) des cellules fraîchement trypsinées sont infectées avec du virus PPR 75/1 LK5 Véro 63 à un taux d'infection de 0,1 DICT₅₀/cellule. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du neuf après que le tapis cellulaire a été lavé 2 fois. Ensuite, les boîtes sont mises dans une étuve à CO₂ à 37°C. Chaque jour, on en congèle une à -70°C. Les surnageants sont tirés suivant la technique décrite dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Chacune des courbes A, B et C représente le résultat d'expériences différentes.

Évaluation du pouvoir pathogène du virus au 20ème passage sur cellules Vero

La figure 2 montre les courbes de température des chèvres ayant reçu en sous-cutanée 2 ml de virus au 20ème passage sur cellules Vero. Après une période d'incubation de 5-6 jours, on enregistre une légère hyperthermie, dont la durée ne dépasse guère 48 heures. Les animaux ne présentent aucun autre symptôme morbide susceptible d'être lié au virus inoculé. Il apparaît donc que la souche de PPRV utilisée perd assez rapidement sa propriété de production de lésions des muqueuses.

Test d'innocuité du virus au 55ème passage sur cellules Vero

Les multiplications successives du virus sur cellules Vero ont été poursuivies jusqu'au 55ème passage, toujours à partir d'inoculum non dilués. La suspension obtenue a été testée sur des chèvres qui en ont reçu 2 ml en sous-cutanée. Elles n'ont présenté aucun

A. Diallo, W.P. Taylor, P.C. Lefèvre, A. Provost

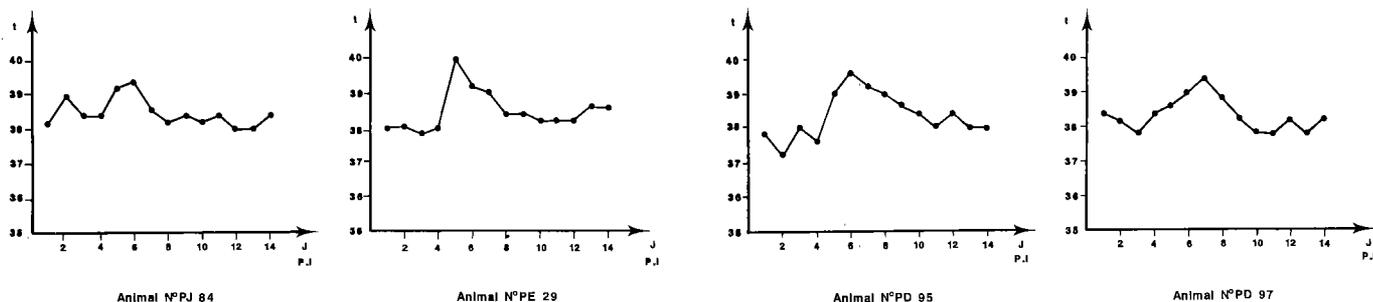
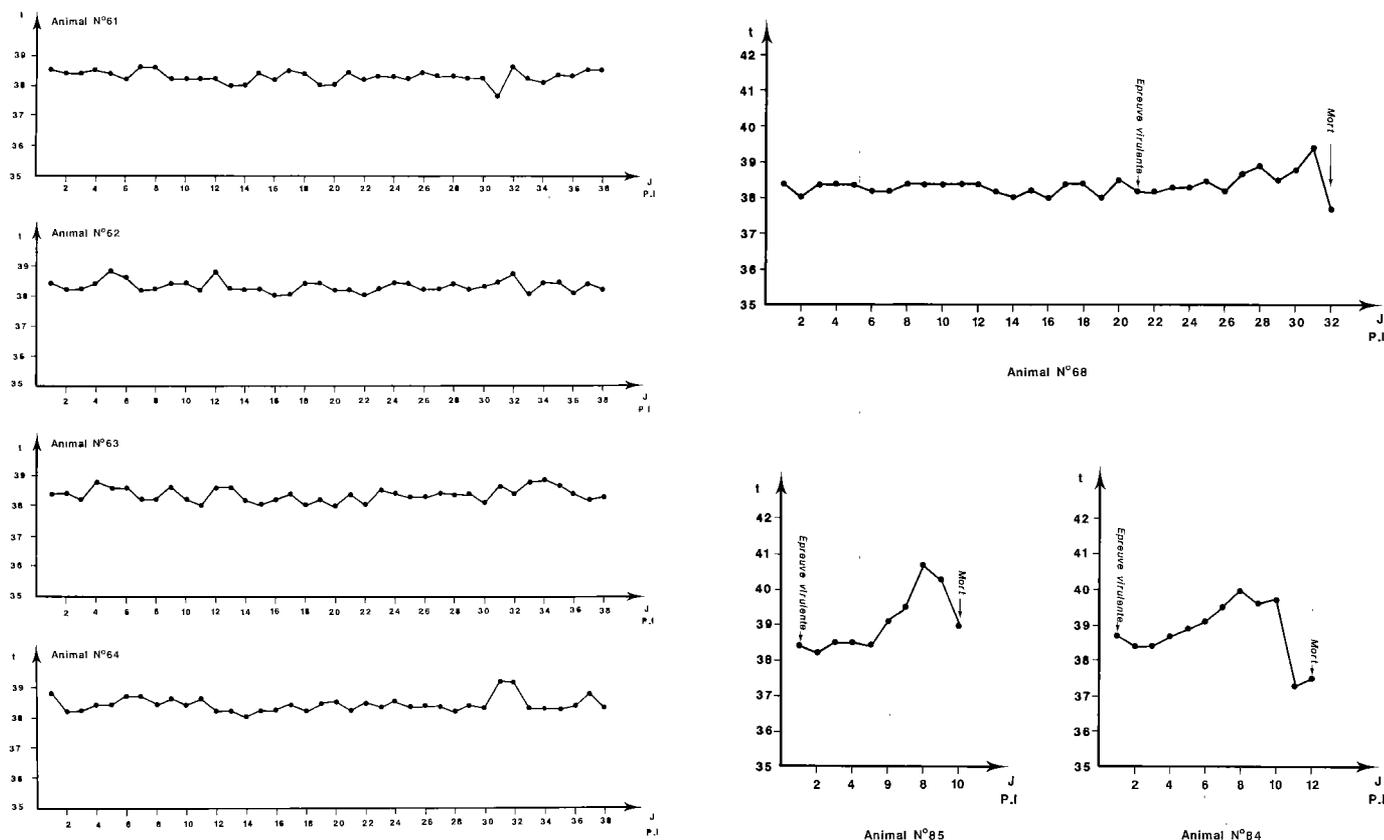


Fig. 2 : Courbe thermique de 4 chèvres inoculées avec le virus PPR au 20ème passage sur cellules Véro. Évaluation du pouvoir pathogène du virus PPR 75/1 LK5 Véro 20.

signe particulier d'infection (Fig. 3a). Trois semaines plus tard, elles ont été soumises à une épreuve virulente, de même qu'un animal témoin en contact et deux autres nouvellement introduits dans le même local. Seuls ces trois derniers, après une période d'incubation de 6 jours, ont présenté des symptômes

typiques de PPR aiguë : hyperthermie avec état typhique (Fig. 3b), larmolement, jetage, lésions érosives de la muqueuse buccale, diarrhée profuse et mort après 1 à 6 jours d'évolution de la maladie. Ainsi, le virus obtenu après 55 passages sur cellules Vero a perdu tout pouvoir pathogène et est à même de protéger les

Fig. 3 : Test d'innocuité du virus PPR 75/1 LK5 Véro 55.



a) Chaque graphique représente la courbe thermique de chacune des chèvres ayant reçu en sous-cutanée 2 ml du PPR 75/1 LK5 Véro 55 ($10^{3.8}$ $DICT_{50}/ml$). La flèche indique le jour de l'épreuve virulente avec PPR Meiliq ($10^{2.6}$ $DICT_{50}/ml$).

b) Courbes thermiques des chèvres témoins : n° 68 témoin de contact, n° 84 et n° 85 témoins d'épreuve.

animaux contre une infection virulente. La chèvre employée comme témoin-contact est restée totalement sensible à la PPR, ce qui prouve que le virus atténué, contrairement à la souche parentale, n'est pas excrété par les animaux inoculés. En fait, ce caractère a été constaté dès le 20ème passage (résultats non indiqués).

Sélection de clone avirulent

Après l'isolement du virus PPR 75/1 et pour s'assurer qu'il n'est pas contaminé, il a été cloné par 3 fois successives sur cellules de mouton suivant le procédé de dilution limite. En l'absence de technique de titrage du virus PPR par plages, le même procédé a été adopté pour la sélection de clone avirulent. En effet, l'adaptation progressive du PPRV à se multiplier sur cellules Vero, avec la perte du pouvoir pathogène, est le résultat d'accumulation de mutations dans le génome viral. Étant donné que les multiplications ont été réalisées à partir d'inoculum non dilués, il est très probable que la suspension au 55ème passage soit un mélange de plusieurs mutants. Il était donc nécessaire de sélectionner un mutant susceptible d'être utilisé comme vaccin. Ceci a été réalisé suivant le schéma 1. Dans un premier temps, 4 suspensions virales ont été sélectionnées et, après un test de pouvoir pathogène sur animaux, seule C₄ s'est révélée pleinement avirulente. Elle a subi un 2ème clonage et C₄ 7 E₄ a été retenu comme virus avirulent.

Passage en retour sur animaux du virus atténué cloné

Le clone C₄ 7 E₄ (au 61ème passage sur Vero) a été testé pour sa capacité éventuelle à retrouver un pouvoir pathogène par multiplication sur l'hôte naturel. Avant cela, une étude préliminaire a été menée pour déterminer la période de virémie chez les chèvres auxquelles a été injecté le virus PPR atténué. Chez certains animaux, il a été impossible de réisoler le virus inoculé. Chez les autres, la virémie, très faible et fugace (1 à 2 jours), se situait entre le 5ème et le 7ème jour après l'inoculation. A partir de ces résultats, les expériences de passage en retour ont été réalisées suivant le schéma 2. De cette manière, seuls deux passages successifs du virus par inoculation de sang hépariné ont pu être effectués. En effet, la chèvre 4, après une épreuve virulente, a fait une authentique PPR, de même que le témoin, contrairement aux trois premiers animaux qui sont restés immuns. Ces résultats nécessitent 2 commentaires :

- 2 passages successifs de PPR 75/1 C₄ 7 E₄ n'ont pas entraîné un retour à la virulence ;
- la chèvre 3 n'a pas fait de virémie, sinon de très courte durée et en dehors des jours de prises de sang.

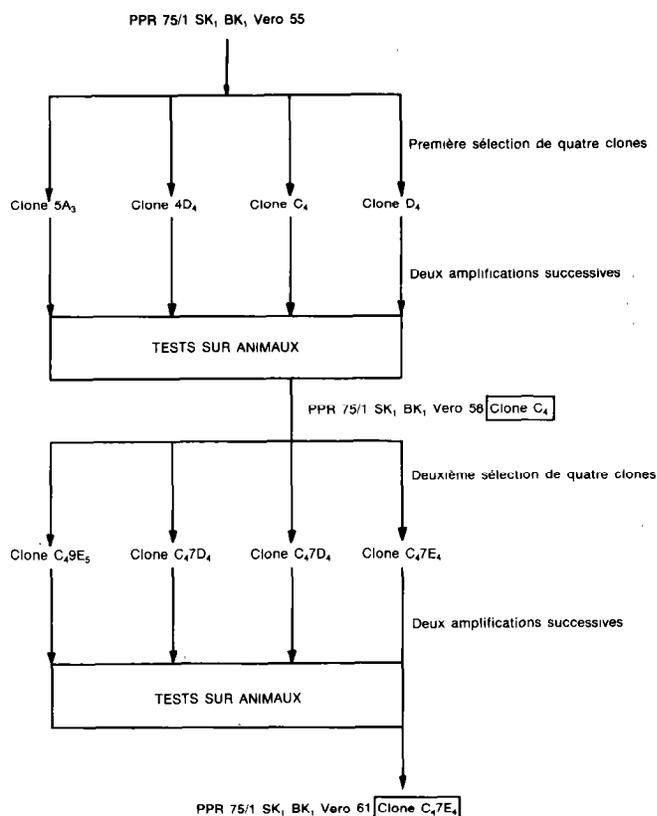


Schéma 2 : Passage en retour du virus sur des animaux. Une première chèvre a été inoculée en sous-cutanée avec 2 ml de PPR 75/1 C₄ 7 E₄ 10^{4.5} DICT₅₀/ml. Le passage en série a été mené comme indiqué dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Tous les animaux sont soumis à une épreuve virulente 3 semaines après que la 5ème chèvre a reçu du sang de la précédente.

Sérologie

Le tableau I résume le taux d'anticorps neutralisants trouvés dans le sérum de certains animaux vaccinés avec le virus à différents niveaux de passage sur cellules Vero. On constate, en dehors d'un cas, la présence d'anticorps neutralisants dès le 7ème jour après la vaccination. Leurs taux sont très importants 3 semaines après l'inoculation et n'augmentent pas après l'épreuve virulente.

Étant donné que les virus de la peste des petits ruminants et de la peste bovine sont antigéniquement très proches, les sérums d'animaux vaccinés avec le premier ont été testés contre les deux par séroneutralisation. Le tableau II résume les résultats et montre clairement que le titre d'anticorps neutralisants est plus élevé vis-à-vis du virus homologue (PPRV). Ceci confirme des résultats déjà publiés quant à la possibi-

lité de faire une distinction nette entre infection bovine pestique et PPR par la technique de séroneutralisation (19, 28).

TABLEAU I Titres des anticorps neutralisants dans le sérum des chèvres inoculées avec le virus avirulent PPR 75/1. Les sérums des différentes chèvres inoculées avec le virus PPR 75/1 à divers passages ont été titrés par neutralisation (voir Matériel et Méthodes). Les titres sont exprimés en log SN 50.

Nombre de passages du virus sur cellules Vero	Numéro de l'animal	Titre du sérum à :			
		0 j p.i.	7 j p.i.	21 j p.i.	7 j après l'épreuve virulente
p. 55	61	0	2,8	3,1	2,5
	62	0	0	3	2,7
	63	0	0,7	2,7	2,7
	64	0	0,7	2,5	2,5
	65	0	0,4	3,1	2,2
p. 58	20	0	1	2,1	1,8
	21	0	2,1	—	2,1
	22	0	1,5	—	2,4
	23	0	1,5	2,8	2,4
p. 61	88	0	—	2,2	—
	89	0	—	2,5	—
	90	0	—	2,8	—

TABLEAU II Comparaison du titre des anticorps neutralisants anti-PPRV et anti-RPV dans le sérum des chèvres vaccinées avec PPRV. Des sérums de chèvres récoltés à 7 jours (n° 20, 21, 22, 23) ou 27 jours après inoculation de PPRV 75/1 ont été titrés contre PPRV et RPV (voir Matériel et Méthodes). Les titres sont exprimés en log SN 50.

N° Échantillon	Nbre de j. après vaccinations avec PPRV	Titre anti-PPRV	Titre anti-RPV
20	7	1	0,3
21	7	2,1	0
22	7	1,5	0
23	7	1,5	0
88	21	2,2	0,9
89	21	2,5	1
90	21	2,8	1,2

DISCUSSION

GILBERT et MONNIER (15) ont été les premiers à adapter le virus PPR à la multiplication sur cellules *in vitro*. Sur les cellules de rein de mouton qu'ils ont utilisées, l'effet cytopathogène (ECP) du virus se manifestait par l'apparition de grands syncytiums. Plus tard, LAURENT (16) a étudié cet ECP sur différents systèmes cellulaires : avec le virus PPR employé, les résultats des premiers auteurs ont été retrouvés avec les cellules de rein de veau, de chèvre et de singe ; en revanche, sur les cellules d'amnios humain, les noyaux étaient très peu nombreux dans le polycaryon. Ce dernier résultat serait très proche de ce qui a été observé avec la souche PPR Nig 75/1 sur les cellules Vero. En effet, dans ce cas, les syncytiums ne sont pas toujours visibles à l'état frais. L'ECP se manifeste surtout par la formation de cellules arrondies, réfringentes et qui se détachent peu à peu. A la coloration à l'hémalun-éosine, on trouve des cellules avec quelques noyaux (4 à 6), c'est-à-dire des minisyncytiums. Ce type de polycaryons a été décrit par PLOWRIGHT et FERRIS (20) pour l'ECP du virus bovine pestique sur les cellules de rein de veau. Mais dans ce cas, on les trouve surtout dans les premiers stades de l'infection et, par la suite, les grands syncytiums prédominent. Le virus de la PPR, avec ceux de la peste bovine, de la rougeole et de la maladie de Carré, forment le genre des *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae* dont tous les membres ont la propriété d'entraîner la formation de syncytiums. Sur les cellules Vero, et contrairement à la souche PPR Nig 75/1, les trois autres virus du groupe provoquent l'apparition de grandes plaques cellulaires. Les *Morbillivirus* sont des virus comportant une membrane lipoprotéique hérissée de deux types de spicules : le premier est formé par une protéine dite H car possédant une propriété hémagglutinante chez le virus de la rougeole ; c'est lui qui sert à la fixation de la particule virale sur la cellule cible ; le second, dont la protéine constituante est dite F, porte la propriété fusionnante. Étant donné que dans un même système cellulaire, le PPRV Nig 75/1 se comporte d'une façon différente quant à l'ECP, il est possible que dans ce cas, sa protéine F soit, ou très peu exprimée, ou très peu active par rapport à celle des autres.

PLOWRIGHT et FERRIS (20, 21) ont montré que l'infection de cellules jeunes avec le virus bovine pestique aboutissait à l'apparition rapide de l'ECP, ainsi qu'à l'obtention de meilleures productions. Dans nos expériences d'adaptation du virus de la PPR aux cellules Vero, c'est la même stratégie qui a été adoptée. Au début des passages en série, l'ECP n'était pas visible avant 4 à 6 jours après l'infection. Par la suite, avec l'adaptation du virus à la cellule en culture *in vitro*, ce délai s'est réduit pratiquement à 2 jours. Chaque

multiplication a été réalisée à partir d'inoculum non dilués. En effet, SABIN et collab. (25) ont montré que les passages en série du poliovirus à très fortes doses conduisaient très rapidement à l'obtention de mutants. PLOWRIGHT et FERRIS (20, 21, 22) ont procédé de la même façon pour l'obtention du virus vaccinal anti-bovipestique largement utilisé aujourd'hui dans le monde. Ces derniers auteurs ont montré que le virus de la peste bovine subissait, au début des multiplications, une certaine exaltation de son pouvoir pathogène suivie d'une décroissance pour aboutir à une souche avirulente au 40ème passage. Le virus PPR 75/1 adapté à la culture sur cellules Vero, a lui aussi très rapidement perdu sa virulence : au 20ème passage, il n'entraîne qu'une légère hyperthermie chez les animaux ; au 55ème, il est totalement avirulent et entraîne une bonne immunité. Aucun essai clinique de ce virus n'a été fait avant le 20ème passage. En revanche, GILBERT et MONNIER (15) dans une tentative d'atténuation d'une souche de PPR, ont remarqué qu'elle était très pathogène au 6ème passage et qu'au 12ème, elle ne provoquait qu'une légère réaction thermique. Cependant, leurs travaux, poursuivis par BENAZET (2), n'ont pas abouti à l'obtention d'un virus totalement avirulent, malgré les 65 passages sur cellules de rein de mouton. Cet échec peut être dû :

- soit à une caractéristique particulière de la souche ;
- soit au système cellulaire utilisé (cellules rénales de mouton) ;
- soit à l'utilisation d'inoculats de concentrations probablement très faibles et ne permettant donc pas une meilleure chance d'obtention de mutants.

Le virus PPR avirulent obtenu n'est pas transmissible d'animal à animal par contact. En ce sens, il se comporte exactement comme le virus bovipestique atténué sur les cellules rénales bovines. Ce dernier est en fait essentiellement lymphotrope et a perdu sa capacité à se multiplier dans les muqueuses, d'où une excréation nulle (29). Il est fort possible que la souche PPR atténuée sur Vero ait subi la même modification de tropisme, et ce, dès le 20ème passage. Des modifications similaires pour des virus avirulents ont été rapportées dans la littérature. Elles font suite, dans la plupart des cas (virus rabique, réovirus, virus de la maladie de Newcastle, etc.), à une mutation dans le gène d'une ou des protéines de surface, protéines impliquées dans l'étape de fixation et de pénétration du virus dans la cellule (10, 11, 18).

Le virus de la PPR comporte deux protéines externes : l'une servant à sa fixation sur la cellule cible, l'autre à la fusion cellulaire. Il n'est pas impossible que la perte de son pouvoir pathogène, et vraisemblablement de son affinité pour les muqueuses, soit liée à des mutations sur les gènes de ces protéines. Les techniques de biologie moléculaire permettront de vérifier une telle hypothèse par comparaison des gènes des

protéines du virus atténué par rapport à ceux du sauvage.

Une autre caractéristique du PPRV avirulent est la très faible virémie qu'il engendre après son injection à un animal, virémie qui n'est décelable qu'au bout de 5 jours. Sa durée de deux jours est plus courte que celle, faible aussi, du virus bovipestique atténué (30). Probablement à cause de cette caractéristique, pas plus de deux passages en retour n'ont été réussis sur les chèvres. Néanmoins, ceci n'a été suivi d'aucune réversion du pouvoir pathogène du virus testé. La technique de sélection par dilution limite employée, déjà mise en oeuvre par DE BOER et BARBER (5) pour l'isolement d'un mutant du virus de la peste bovine, a certainement permis d'éliminer des mutants peu atténués et qui auraient pu prédominer à la faveur de trois multiplications successives sur animaux (2 passages en retour).

CONCLUSION

L'adaptation progressive de la souche du virus PPR Nig 75/1 à la multiplication sur cellules Vero en culture, s'est accompagnée d'une perte progressive de son pouvoir pathogène. Ce virus est actuellement au 63ème passage sur cellules Vero. Il entraîne une bonne immunité et provoque l'apparition d'anticorps neutralisants dès le 7ème jour p.i. Après une multiplication sur trois animaux successivement, il n'a montré aucun indice de réversion. Enfin, il est inoffensif. Inoculé à deux femelles gestantes, il n'a provoqué aucun avortement (résultats non indiqués). Toutes ces caractéristiques, similaires à celles retrouvées avec le virus atténué bovipestique, font du clone isolé un bon vaccin anti-PPR potentiel.

Les petits ruminants prennent de plus en plus d'importance dans l'économie des pays du tiers monde, notamment des régions sèches. Cependant, leur élevage, dans beaucoup de pays d'Afrique et du Moyen-Orient, est entravé par une maladie très contagieuse et mortelle : la peste des petits ruminants. Jusqu'à présent, pour lutter contre ce fléau, on utilise le vaccin hétérologue antibovipestique. Or, dans un certain nombre de régions, les deux maladies (peste bovine et PPR) coexistent. Les chèvres et les moutons sont sensibles aux deux agents en cause. A l'heure actuelle, le diagnostic différentiel mis en oeuvre est la séroneutralisation croisée : le titre de sérum est plus élevé avec le virus homologue. Si l'on vaccine les petits ruminants avec le vaccin hétérologue, ils fabriquent des anticorps antibovipestiques entravant ainsi toute enquête épidémiologique sérieuse sur le rôle éventuel des petits ruminants dans la circulation de virus

A. Diallo, W.P. Taylor, P.C. Lefèvre, A. Provost

bovine sauvages. En revanche, l'utilisation d'un vaccin homologue tel que PPR 75/1 pallierait cet inconvénient, si toutefois les animaux ainsi vaccinés ne multipliaient pas un virus peste bovine de surinfection. Pour répondre à une telle question, des expériences vont bientôt être menées dans ce sens, en même temps que la mise en place de vaccination à grande échelle dans deux pays africains.

DIALLO (A.), TAYLOR (W. P.), LEFÈVRE (P. C.), PROVOST (A.). Attenuation of a virulent PPR strain : potential homologous live vaccine. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 311-319.

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly contagious disease of small ruminants frequently associated with severe mortality in these hosts. In countries where it occurs, PPR represents an important constraint to the improved productivity of sheep and goats. Until now the only way to combat this plague has been the use of heterologous rinderpest vaccine ; all attempts to develop a homologous vaccine have ended in failure. The present communication describes the attenuation of the Nigerian strain PPRV Nig 75/1 by serial passage in Vero cells. The avirulent virus obtained has the same characteristics as Plowright and Ferris' rinderpest vaccine. The virus is advanced as a potential homologous vaccine against PPR. *Key words* : Peste des petits ruminants - Virus - Vaccine.

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur aide technique Mme S. GRAHAM, Mlles M. BARBRON, D. CALVEZ et Mr. COLIN TIMMS. Ce travail a été financé par la CEE sous le contrat TSD-A-091.

DIALLO (A.), TAYLOR (W. P.), LEFÈVRE (P. C.), PROVOST (A.). Atenuación de una cepa de virus de la peste de los pequeños rumiantes : candidato para una vacuna homóloga viva. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1989, **42** (3) : 311-319.

La peste de los pequeños rumiantes (PPR) es una enfermedad muy contagiosa, frecuentemente asociada con una mortalidad elevada. En los países donde ocurre, restringe mucho la mejoría de la productividad del ganado ovino y cabrio. Hasta ahora el solo medio de lucha contra esta plaga fué la utilización de una vacuna heteróloga anti peste bovina ; no tuvieron éxito los ensayos para desarrollar una vacuna homóloga. Este artículo describe la atenuación de la cepa nigeriana del virus PPRV Nig. 75/1 por pasajes en serie sobre células Vero. El virus avirulento obtenido tiene las mismas características que la vacuna bovine de Plowright y Ferris. Así constituye una vacuna homóloga potencial contra la PPR. *Palabras claves* : Peste de los pequeños rumiantes - Virus - Vacuna.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARRETT (T.), UNDERWOOD (B.). Comparison of messenger RNAs induced in cells infected with each member of the *Morbillivirus* group. *Virology*, 1985, **145** : 195-199.
2. BENAZET (B. G. H.). La peste des petits ruminants. Étude expérimentale de la vaccination. Th. Doct. vét., Toulouse, 1973. 100 p. (n° 91).
3. BONNIWELL (M. A.). The use of tissue culture Rinderpest vaccine (TCRV) to protect sheep and goats against « peste des petits ruminants » in the Ashanti Region of Ghana. *Bull. Off. int. Épizoot.*, 1980, **92** (11-12) : 1233-1238.
4. BOURDIN (P.), RIOCHE (M.), LAURENT (A.). Emploi d'un vaccin antivipestique produit sur cultures cellulaires dans la prophylaxie de la peste des petits ruminants au Dahomey. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1970, **23** (3) : 295-300.
5. DE BOER (C. J.), 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. DIALLO (A.). Peste bovine et peste des petits ruminants. Des menaces constantes contre l'élevage dans beaucoup de pays en développement. *Impact : Sci. Soc.*, 1988, **150** : 191-204.
7. DIALLO (A.), BARRETT (T.), BARBRON (M.), SUBBARAO (S. M.), TAYLOR (W. P.). Differentiation of Rinderpest and Peste des Petits Ruminants viruses using specific cDNA clone. *J. Virol. Meth.*, 1989, **23** : 127-136.
8. DIALLO (A.), BARRETT (T.), LEFÈVRE (P. C.), TAYLOR (W. P.). Comparison of proteins induced in cells infected with Rinderpest and Peste des Petits Ruminants viruses. *J. gen. Virol.*, 1987, **68** : 2033-2038.
9. EL HAG ALI (B.), TAYLOR (W. P.). Isolation of peste des petits ruminants virus from the Sudan. *Res. vet. Sci.*, 1984, **36** : 1-4.

10. FIELDS (B. N.), GREENE (M. I.). Genetic and molecular mechanism of viral pathogenesis : implications for prevention and treatment. *Nature*, 1982, **300** : 19-23.
11. FLAMAND (A.), COULON (P.), DIALLO (A.), LAFAY (F.), SEIF (I.). La rage : effet sur la virulence de mutations localisées dans le site III de la glycoprotéine. *Annls Inst. Pasteur, sér. E*, 1985, **136** : 363-372.
12. FURLEY (C. W.), TAYLOR (W. P.), OBI (T. U.). An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *Vet. Rec.*, 1987, **121** : 443-447.
13. GARGADENNEC (L.), LALANNE (A.). La peste des petits ruminants. *Bull. Servs. zootech. Épizoot. Afr. occid. fr.*, 1942, **5** : 16-21.
14. GIBBS (E. P.), TAYLOR (W. P.), LAWMAN (M. J. P.), BRYANT (J.). Classification of Peste des Petits Ruminants virus as the fourth member of the genus *Morbillivirus*. *Intervirology*, 1979, **11** : 268-274.
15. GILBERT (Y.), MONNIER (J.). Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1962, **15** (4) : 321-335.
16. LAURENT (A.). Aspects biologiques de la multiplication du virus de la peste des petits ruminants ou PPR sur les cultures cellulaires. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1968, **21** (3) : 297-308.
17. MORNET (P.), ORUE (J.), GILBERT (Y.), THIERY (G.), SOW (M.). La « Peste des Petits Ruminants » en Afrique occidentale française. Ses rapports avec la peste bovine. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1956, **9** : 313-342.
18. MILLAR (N. S.), CHAMBERS (P.), EMMERSON (P. T.). Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster : molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. gen. Virol.*, 1988, **69** : 613-620.
19. OBI (T. U.), ROWE (L. W.), TAYLOR (W. P.). Serological studies with peste des petits ruminants and rinderpest viruses in Nigeria. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1984, **16** : 115-118.
20. PLOWRIGHT (W.), FERRIS (R. D.). Studies with Rinderpest virus in tissue culture. *J. comp. Path.*, 1959, **69** : 152-171.
21. PLOWRIGHT (W.), FERRIS (R. D.). Studies with Rinderpest virus in tissue culture. II. Pathogenicity for cattle of culture-passaged virus. *J. comp. Path.*, 1959, **69** : 173-184.
22. PLOWRIGHT (W.), 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.
23. ROSSITER (P. B.), JESSETT (D. M.). Microtitre techniques for the assay of rinderpest virus and neutralising antibody. *Res. vet. Sci.*, 1982, **32** : 253-256.
24. ROSSITER (P. B.), WARDLEY (R. C.). The differential growth of virulent and avirulent strains of rinderpest virus in bovine lymphocytes and macrophages. *J. gen. Virol.*, 1985, **66** : 969-975.
25. SABIN (A. B.), WALTER (A.), HENNESSEN (A.), WINSSER (J.). Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types. *J. exp. Med.*, 1954, **99** : 551-576.
26. SHAILA (M. S.), PURUSHOTHAMAN (V.), DEEPA BHAVASAR, VENUGOPAL (K.), VENKATESAN (R. A.). Peste des petits ruminants infection of ovines in India. *Vet. Rec.*. (sous presse).
27. TAYLOR (W. P.). Serological studies with the virus of peste des petits ruminants in Nigeria. *Res. vet. Sci.*, 1979, **26** : 236-242.
28. TAYLOR (W. P.). Protection of goats against peste des petits ruminants with attenuated rinderpest virus. *Res. vet. Sci.*, 1979, **27** : 321-324.
29. TAYLOR (W. P.), ABEGUNDE (A.). The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Res. vet. Sci.*, 1979, **26** : 94-96.
30. TAYLOR (W. P.), PLOWRIGHT (W.). Studies of 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.