

ARTICLES ORIGINAUX

Recherches immunologiques sur la Péripleumonie

2^e partie : Relations sérologiques entre le virus vaccinal et *Mycoplasma mycoides*

par A. PROVOST

Dans un travail déjà ancien, Heslop (7) signale que le sérum des bovins qui ont été atteints de cow-pox est capable de dévier le complément avec un antigène péripleumonique alors que dans ce cas la séro-agglutination (en tube) conserve toute sa spécificité. Il apporte à l'appui de sa thèse le cas d'une vache indemne de péripleumonie et de 11 agneaux, tous inoculés de cow-pox, dont les sérums déviaient le complément avec son antigène péripleumonique à base d'extrait alcoolique du tissu réactionnel d'un phénomène de Willems.

Malgré l'importance qu'avait cette découverte il semble qu'elle soit passée inaperçue. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de reprendre ces données dans le cadre des recherches sur la péripleumonie entreprises dans ce laboratoire.

Les sérums de bovins atteints de cow-pox pourraient donner une réaction positive avec un antigène péripleumonique pour les raisons suivantes :

1. Communauté antigénique entre le virus du cow-pox et le microorganisme de la péripleumonie ;
2. Réaction biologique positive fautive, du type de celles qui existent dans la sérologie de la syphilis, spécialement lors de la vaccination antivariolique ;
3. Réaction non spécifique due à un antigène péripleumonique non purifié comme en employait Heslop ;
4. Pouvoir anti-complémentaire du sérum aux basses dilutions.

Cette dernière hypothèse est à rejeter, car la pratique courante de la déviation du complé-

ment impose l'emploi, spécialement pour les sérums de bovins qui sont souvent anti-complémentaires, de témoins-sérums, au moins pour les basses dilutions.

L'hypothèse 3 ne tient plus de nos jours, depuis que Campbell et Turner (1) ont introduit dans l'étude sérologique de la péripleumonie leur antigène de culture, dont vingt ans de pratique attestent la spécificité.

Restaient à vérifier les hypothèses 1 et 2 ; les résultats obtenus et les réflexions suggérées font l'objet de la présente note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'expérience consiste à inoculer la vaccine à des animaux et à étudier leur comportement sérologique vis-à-vis des antigènes vaccinal et péripleumonique.

Vice-versa, on éprouve des immunsérums de péripleumonie vis-à-vis de ces deux antigènes, pour apprécier une réaction croisée éventuelle.

Souche virulente. — Le virus vaccinal utilisé est le vaccin commercial de l'Institut de la Vaccine, 8, rue Ballu, Paris (9^e). Nous nous sommes servis d'un tube de vaccin lyophilisé du lot 1155, préparé en juin 1956 ; le produit lyophilisé est broyé dans un mortier et dilué dans 10 parties d'eau physiologique.

Animaux employés. — Deux jeunes zébus arabes de 8 mois environ (numrotés B 470 et B 471) furent rasés sur les deux côtés de la poitrine, scarifiés et les scarifications recouvertes

de l'émulsion vaccinale. Avant cette opération, on avait recueilli leur sérum pour vérifier qu'il ne contenait pas d'anticorps déviant le complément pour la vaccine ni la péripneumonie, ni d'anticorps agglutinant pour cette dernière. Ces sérums furent de nouveau prélevés 10, 20 et 30 jours plus tard et testés vis-à-vis des mêmes antigènes.

On sait depuis longtemps que le lapin est l'animal de choix dans l'expérimentation de la vaccine. Par ailleurs nous avons pu constater, ainsi que l'avait suggéré Gambles (4) que le lapin, bien que ne faisant jamais de maladie clinique, réagit toujours par une production d'anticorps à une sollicitation antigénique de produits péripneumoniques (« lymphé », suspensions de *M. mycoïdes*, filtrats de cultures). Pour cette raison, il nous a semblé intéressant d'apprécier la réaction sérologique de cet animal pour le virus vaccinal et, si celui-ci a effectivement des relations antigéniques avec *M. mycoïdes*, de rechercher la présence d'anticorps vis-à-vis des antigènes péripneumoniques dans les sérums de ces lapins inoculés de vaccine. Pour ce faire, après avoir prélevé leur sérum, deux lapins (L 42 et L 43) furent inoculés de vaccine :

L 43 par scarification sur le dos et les flancs,

L 42 par voie intradermique en 10 points différents sur le dos.

Leur sérum fut prélevé 10, 20 et 30 jours plus tard par ponction cardiaque.

Signalons que le rabbit-pox est inconnu dans l'élevage.

Sérums de contrôle. — Un sérum de zébu anti-péripneumonie et un sérum de lapin anti-*Mycoplasma* furent introduits dans les réactions pour servir de contrôle des antigènes péripneumoniques et vérifier la réaction croisée possible avec le virus vaccinal.

Le sérum de zébu provenait d'un animal faisant un phénomène de Willems après inoculation sous-cutanée de lymphé péripneumonique. Le sérum de lapin fut préparé en injectant 4 fois à 5 jours d'intervalle par voie intraveineuse 10 ml d'une suspension de *M. mycoïdes* en sérum physiologique de densité optique égale au tube n° 10 de Brown.

Antigène vaccinal. — Il fut préparé à partir d'une suspension à 20 p. 100 en eau physiologique de membranes chorio-allantoïdiennes d'embryons de poulet inoculées selon le procédé classique avec la suspension vaccinale.

Après 18 heures de macération à + 4° au cours desquelles on fit une opération de gel-dégel, la suspension fut centrifugée 30 minutes à 12.000 tours. Le surnageant constitue l'antigène.

Après titrage de son pouvoir anti-complémentaire, cet antigène fut titré vis-à-vis du sérum du lapin L 43 selon la technique de Kolmer. On s'est servi dans la suite des expériences de deux unités antigéniques. Un antigène « normal » de membranes chorio-allantoïdiennes semblablement traitées fut introduit en contrôle dans la réaction pour faire la part de la fixation non spécifique, si elle devait exister.

Antigènes péripneumoniques. — L'antigène déviant le complément a été préparé selon la technique standard de Campbell et Turner (1) avec notre souche B 13 de *M. mycoïdes*, isolée d'un cas mortel de péripneumonie. On a employé dans la suite du travail deux unités antigéniques. L'antigène agglutinant est l'antigène coloré pour réaction sur lame que nous produisons et dont la technique de préparation a été publiée par ailleurs (10).

Sérums à tester. — Les sérums de zébus ne furent pas inactivés par la chaleur comme à l'ordinaire, mais par dilution dans l'eau physiologique à 15 p. 1000, selon la technique de Serra et Guarini (11), car l'expérience montre que les sérums de zébus contenant des anticorps vis-à-vis à *M. mycoïdes* ont des titres plus élevés quand ils n'ont pas été chauffés.

Les sérums de lapins furent, quant à eux, inactivés par chauffage à 56° pendant 20 minutes.

Diluant. — On s'est servi au cours de ce travail du diluant de Kolmer (sérum physiologique à 0,85 p. 100, additionné de 1 ml par litre d'une solution à 10 p. 100 de SO₄Mg).

Complément. — Nous avons utilisé le complément lyophilisé de l'Institut Pasteur de Paris, qui a l'énorme avantage dans les pays tropicaux de conserver un titre inchangé pendant plusieurs mois.

Système hémolytique. — Pour obvier au fait que les sérums de bovins contiennent aux faibles dilutions des agglutinines anti-mouton nous avons porté notre choix sur les hématies de chèvre, espèce dont les globules ne sont pas agglutinés par les sérums de bovin. Nous avons préparé un sérum de lapin anti-chèvre, contenant deux unités hémolytiques à la dilution 1/750.

Techniques des réactions. — Nous avons

employé pour la déviation du complément la technique classique de Kolmer (8) avec fixation à 4° pendant 18 heures. Les résultats rapportés sont les dilutions extrêmes de sérum donnant une fixation du complément de 3 ou 4 +.

La technique de la réaction d'agglutination sur lame pour les sérums de péripneumonie a déjà été décrite (10). Les degrés d'agglutination sont notés de 1 + à 4 + selon la grosseur croissante des agglutinats.

RÉSULTATS

Observation clinique. — Du 3^e au 5^e jour après les inoculations, zébus et lapins présentèrent des papules qui se transformèrent en vésicules vite rupturées les jours suivants, puis se recouvrirent d'une croûte. Celle-ci tomba du 15^e au 20^e jour en laissant une cicatrice blanchâtre. L'état général des animaux ne fut altéré en aucune façon. Il est à signaler que le zébu B 471 mourut de heart-water avant la fin de l'expérience.

Résultats sérologiques. — Les tableaux I

et 2 résument les résultats obtenus. Deux remarques s'imposent pour les sérums de vaccine :

— **quant au titre des sérums.** Il ne faut pas s'étonner d'avoir des titres de l'ordre de 1/20 et de 1/8. Il se peut que lors de l'hyperimmunisation des lapins par le virus vaccinal on obtienne des titres avoisinant 1/40 (3), mais on ne doit pas oublier qu'ici on n'a fait que donner la vaccine aux animaux sans chercher leur hyperimmunisation. Ces résultats sont d'ailleurs semblables à ceux que l'on peut obtenir lors d'un séro-diagnostic de variole humaine (3). Les titres obtenus peuvent donc être considérés comme significatifs, d'autant plus que l'on assiste à une montée d'anticorps spécifiques après l'inoculation vaccinale.

— **quant à la durée des anticorps.** Gastinel (9) avait montré dès 1911 que : « la sensibilisatrice disparaît vers le 20^e jour, étant seulement contemporaine de la phase évolutive de l'infection vaccinale ». C'est ce que nous vérifions encore ici, où les titres déclinent du jour 20 au jour 30.

TABLEAU I - SERUMS DES ANIMAUX INOCULES DE VACCINE

Type de réaction	Antigène	Numéros des sérums	Sérums des jours			
			0	10	20	30
Déviation du complément	Antigène vaccinal	B 470	-	1/8	1/4	1/2
		B 471	-	1/8	1/2	† *
		Bovin normal	-	-	-	-
		L 42	-	1/8	1/8	1/4
		L 43	-	Trace	1/20	1/10
	Antigène normal M C A	B 470	-	-	-	-
		B 471	-	-	-	† *
		Bovin normal	-	-	-	-
		L 42	-	-	-	-
		L 43	-	-	-	-
	Antigène péripneumonique	B 470	-	1/16	1/8	1/4
		B 471	-	1/4	1/4	† *
Bovin normal		-	-	-	-	
L 42		-	1/8	1/8	1/8	
L 43		-	-	1/8	1/8	
Agglutination sur lame	Antigène péripneumonique coloré	B 470	-	-	-	-
		B 471	-	-	-	† *
		Bovin normal	-	-	-	-
		L 42	-	-	-	-
		L 43	-	-	-	-

*. B 471 mort de heart-water le 21^e jour.

L'examen du tableau I montre que les immun-sérums de vaccine dévient le complément à un titre sensiblement égal avec les deux antigènes : vaccinal et péri-pneumonique, et que le devenir de ces anticorps suit, en gros, un chemin parallèle.

La réaction d'agglutination sur lame a, par contre, toujours été négative.

TABLEAU II

SÉRUMS DE ZÉBU ET DE LAPIN ANTI-PÉRI-PNEUMONIE

Type de réaction	Antigène	Immunsérum	Titre
Déviation du complément	Antigène vaccinal	bovin	1/8
		lapin	1/16
	Antigène normal M C A	bovin	-
		lapin	-
	Antigène péri-pneumonique	bovin	1/640
		lapin	1/512
Agglutination sur lame	Antigène péri-pneumonique coloré	bovin	+++
		lapin	+++

Le tableau II indique que les sérums anti-péri-pneumoniques extériorisent un plus fort pouvoir déviant le complément pour l'antigène péri-pneumonique que pour l'antigène vaccinal.

La réaction est donc croisée : les sérums des animaux faisant la vaccine dévient le complément avec les deux antigènes, et, réciproquement, les immuns-sérums de péri-pneumonie dévient le complément avec ces deux mêmes antigènes.

DISCUSSION

Les vues de Heslop semblent confirmées. Voyons ce que deviennent les hypothèses que nous avons émises plus haut.

La quatrième hypothèse (pouvoir anticomplémentaire) a été rejetée d'emblée. La troisième (réaction non spécifique due à un antigène non purifié) doit subir le même sort, car avec des sérums de bovins métropolitains, à coup sûr exempts d'anticorps vis-à-vis de la péri-pneumonie, la réaction est toujours négative avec l'antigène du type Campbell et Turner que nous produisons (tableau I). Reste à faire la part

entre la première hypothèse (communauté antigénique) et la deuxième (réaction positive fausse).

Du fait que la réaction est croisée entre les deux sortes de sérums et les deux antigènes, on peut éliminer la réaction positive fausse, ainsi qu'une réaction anamnésique possible, induite pour les anticorps péri-pneumoniques par l'inoculation vaccinale.

De toute manière, l'apparition chez les lapins d'anticorps contre la péri-pneumonie, maladie inconnue à l'état naturel chez cet animal et à laquelle il est expérimentalement insensible, plaide en faveur d'autre chose que d'une réaction anamnésique et laisse soupçonner que cette montée d'anticorps est bien due à la vaccine. Comme les immunsérums de lapin anti-*Mycoplasma mycoïdes* dévient le complément avec les deux antigènes, il nous semble, en face de ces faits, qu'on puisse affirmer qu'il existe une relation sérologique entre le virus vaccinal et *Mycoplasma mycoïdes*.

On peut étendre, sans grand risque, ces conclusions expérimentales, tirées de cette étude sur le virus vaccinal, à celui du cow-pox, car ce dernier contient au moins tous les antigènes du virus vaccinal (12). Cette relation sérologique ne peut s'expliquer que par un antigène ou un motif antigénique commun entre ce virus et l'agent de la péri-pneumonie.

En nous plaçant sur le plan pratique, on peut se demander quelle peut être l'incidence de ces réactions croisées pour le diagnostic de la péri-pneumonie et le dépistage de la maladie ? Seule sera faussée la déviation du complément, car la réaction d'agglutination sur lame n'est pas touchée. Il est certain que l'on peut avoir là une cause d'erreur dans le dépistage des porteurs chroniques de *M. mycoïdes*, qui donnent des titres de fixation de l'ordre du 1/10-1/20, titres que l'on obtient justement dans l'infection vaccinale.

Pour ce qui est du Centre Africain Français (A.E.F. et Cameroun), le cow-pox y est pratiquement inconnu, et ne viendra donc pas interférer dans le diagnostic de la péri-pneumonie ni le dépistage des porteurs chroniques ; celui-ci se fait d'ailleurs par hémou- ou séro-agglutination rapide sur lame (10), réaction plus sensible que la déviation du complément. Tel n'est pas le cas de tous les pays ; l'Australie, par exemple, n'ignore pas le cow-pox (7) ni la

péripleurésie et la méthode officielle de dépistage des porteurs chroniques est la déviation du complément (5). Dans ces conditions, on peut penser que quelques diagnostics erronés pourraient se produire.

Tel pourrait être le cas également du Japon ou des Etats-Unis, pays indemnes de péripleurésie à l'heure actuelle, mais qui en redoutent l'introduction sur leur territoire et qui ont demandé à l'Australie (C.S.I.R.O.) de leur fournir l'antigène péripleurésique. L'interprétation mal conduite d'une déviation du complément positive pourrait avoir des conséquences désastreuses.

En présence d'un séro-diagnostic faiblement positif (1/10-1/20) avec cette technique, il sera donc conseillé de soumettre l'animal à un examen clinique minutieux pour déceler les éventuelles lésions cicatricielles de cow-pox ; celles-ci seront récentes, puisque nous avons vu que les « sensibilisatrices sont contemporaines de la phase évolutive de l'infection vaccinale ». En leur absence, l'animal sera retenu comme porteur chronique. La conclusion pratique, pour l'A.E.F. et le Cameroun, pays sans cow-pox, est rassurante.

La dissociation observée entre les résultats de la déviation du complément et de l'agglutination sur lame est des plus intéressantes sur le plan dogmatique. Elle met en évidence la dualité des anticorps responsables de ces deux réactions dans la péripleurésie, anticorps dont Dafaalla (2) vient de montrer qu'ils correspondent à deux antigènes différents. Nos constatations viennent recouper les siennes, puisqu'un seul anticorps pour la péripleurésie a été produit par les animaux inoculés de vaccine.

La comparaison directe des propriétés chimiques et immunologiques de l'antigène B de Dafaalla et de l'antigène protéique de surface LS du virus vaccinal, antigène responsable de l'apparition des anticorps fixant le complément, n'a pas été faite. Elle serait cependant d'un intérêt théorique considérable, car si l'identité ou la similitude de ces antigènes était prouvée, *M. mycoides*, chef de file du groupe des P.P.L.O., se rapprocherait très étroitement des plus gros parmi les virus ; ainsi se comblerait peu à peu le hiatus existant dans la philogénie de ces micro-organismes.

Section de virologie.
Laboratoire de Farcha
Fort-Lamy (Tchad).

BIBLIOGRAPHIE

1. CAMPBELL et TURNER. — **Studies on Contagious Pleuropneumonia of Cattle. IV. An Improved Complement Fixation Test.** *Aust. Vet. J.*, 1953, 29, 154.
2. DAFALLA. — **Etudes sur la structure antigénique de l'agent causal de la péripleurésie.** *Bull. Epiz. Afr.*, 1957, 5, 211.
3. **Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases.** 2^e éd. *Am. Pub. Health Assoc.*, New-York, 1956, pp. 351.
4. GAMBLES. — **Studies on C.B.P.P., with Special Reference to the Complement-Fixation Test.** *Brit. Vet. J.*, 1956, 112, 78.
5. GREGORY. — **Rapport sur les recherches effectuées en Australie sur la péripleurésie.** *Bull. Epiz. Afr.*, 1957, 5, 265.
6. HANNOUN. — **Les antigènes des virus.** *Biologie médicale*, 1956, 45, 203.
7. HESLOP. — **Further researches into C.B.P.P.** *J. Comp. Path.*, 1922, 35, 1.
8. LÉPINE et SOHIER. — **Techniques de laboratoire appliquées au diagnostic des maladies à virus.** Masson, Paris, 1954, pp. 69.
9. LEVADITI et LÉPINE. — **Les ultra-virus des maladies humaines.** Maloine, Paris, 1948, pp. 232.
10. PROVOST et QUEVAL. — **Recherches immunologiques sur la péripleurésie. I. La réaction d'agglutination.** *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 1957, 10, 357.
11. SERRA et GUARINI. — **Sulla possibilità di dimostrare la presenza di anticorpi devianti nel siero iperimmune antiptoso.** *La clinica veterinaria*, 1951, 74, 2321.
12. VAN ROOYEN et RHODES. — **Virus Diseases of Man.** Thomas Nelson and Sons, New York, 1948, pp. 282.

SUMMARY

Studies on Immunity in Contagious Bovine Pleuropneumonia.

II. Serological relationships between *Mycoplasma mycoides* and the virus of Vaccina of Cattle (Cow-Pox).

A study of the comparative results obtained by both sera of cattle vaccinated against cow-pox and cattle vaccinated against C.B.P.P. using the C.F. test and the rapid slide agglutination test.

The author confirms that there exists an antigenic relationship between the causal agents of these two diseases, which may falsify the C.F. test, but does not interfere with the specificity of the agglutination test.

One should not, therefore, ignore the probability that chronic P.P. carriers diagnosed by the C.F. test may include a not negligible proportion of reactors to cow-pox.

RESUMEN

Investigaciones inmunológicas sobre la perineumonía.

II. Relaciones serológicas entre el virus de la vacuna y el *Mycoplasma mycoides*.

El autor estudia el comportamiento de los sueros de los animales inmunizados contra la enfermedad pustulosa de la vaca y los de los inmunizados contra la perineumonía frente al antígeno de la enfermedad pustulosa de la vaca y los antígenos perineumónicos en la desviación del complemento y la agglutinación en lámina, confirmando la relación antigénica existente entre el virus de la enfermedad pustulosa de la vaca y el *Mycoplasma mycoides*, ésta relación antigénica falsea la reacción de desviación del complemento, pero deja intacta la especificidad de la reacción de agglutinación en lámina.

La incidencia de la enfermedad pustulosa de la vaca en el diagnóstico de los portadores crónicos de perineumonía efectuada a partir de la desviación del complemento no debe pues ser descuidada.