

## ARTICLES ORIGINAUX

# Précipitation en milieu gélifié du virus rabique par le sérum rabique hyperimmun

par J. M. VILLEMOT et A. PROVOST

### INTRODUCTION

Lorsque nous nous sommes penchés sur les problèmes que pose la rage en Afrique-Equatoriale Française, nos recherches se sont orientées vers la mise au point d'une méthode de diagnostic qui, indépendamment des examens histopathologiques, devait permettre d'obtenir des résultats rapides, sûrs et fidèles. En effet, les corps de Négri peuvent être absents à l'examen histologique des cerveaux d'animaux enrégés abattus dès les premiers signes de suspicion, comme l'ont montré H. Ueki et coll. (1). Après inoculation de virus rabique par voie intra-cérébrale à la souris, ces chercheurs ont noté que l'infection virale se traduisait par l'apparition successive à un ou deux jours d'intervalle du virus infectant, de l'antigène soluble et enfin des corps de Négri. Les trois méthodes de diagnostic valables, qui découlent des observations précédentes, sont respectivement basées sur l'isolement du virus par inoculation, la fixation du complément et les examens histopathologiques. Si les corps de Négri sont apparents dans 98 p. 100 des cas d'animaux ayant succombé à l'infection rabique, ce pourcentage diminue beaucoup chez les animaux abattus lors des premiers signes de suspicion de la maladie. Or, en Afrique-Equatoriale Française, du fait de la vie errante des chiens de brousse qui appartiennent plus à une communauté qu'à des individus et ne portent aucun collier d'identité, du fait également des conditions d'éloignement, l'abattage des animaux suspects est la règle, en particulier en Oubangui-Chari et au Tchad. Lorsque les agents du Service vétérinaire sont alertés, il ne leur reste plus qu'à effectuer des prélèvements à partir des cadavres et à les adresser au laboratoire, un hémisphère cérébral étant expédié en solution de formol à 10 p. 100 et l'autre en glycérine.

Seule, une méthode sérologique pouvait résoudre le problème du diagnostic qui nous

préoccupait, sous réserve qu'elle pût être appliquée à des cerveaux conservés en solution formolée ou même putréfiés. Nous avons donc cherché à utiliser une technique plus simple et plus rapide que celle applicable à la réaction de fixation du complément, qui utilise un antigène extrait par la méthode de Casals (2) à l'acétone-éther; d'autre part, la déviation du complément nécessite la préparation d'un antigène selon la technique d'Ando (3 et 4) impliquant une centrifugation à 16.000 tours/minute que nous ne pouvions réaliser. La valeur de la fixation du complément dans le diagnostic de la rage est d'ailleurs actuellement très discutée. C'est pourquoi nous avons pensé adapter au virus rabique la réaction de précipitation spécifique en milieu gélifié suivant la technique d'Oudin reprise par Ouchterlony et modifiée par Mansi (5). Nos premiers résultats portant sur 12 cerveaux de chiens infectés par le virus des rues et de lapins infectés par le virus fixe ont fait l'objet d'un compte rendu à l'Académie des Sciences (6).

### LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION

Les méthodes sérologiques sont basées sur la combinaison spécifique entre un antigène et son anticorps correspondant quand ils sont mis en contact. Lorsqu'un antigène est soluble et qu'il est mis en présence d'un immun-sérum précipitant, un complexe antigène-anticorps se forme et précipite : c'est la réaction de précipitation.

Celle-ci ne se produit que lorsque les deux réactifs en présence se trouvent en proportion convenable ; un excès d'antigène ou d'anticorps inhibe la réaction ; si l'on fait diffuser l'antigène dans le sérum ou l'anticorps dans la solution antigénique, le précipité se forme dans la zone où les deux réactifs se trouvent en proportion équivalente. Parfois, cette réaction est dénommée " réaction de floculation initiale " et Ramon

l'appliqua le premier au titrage des sérums anti-diphthériques préparés sur chevaux.

Malheureusement, lorsque ces méthodes immuno-chimiques de précipitation en tube — où antigène et anticorps sont directement en contact — utilisent des mélanges d'antigènes, elles s'avèrent trop aléatoires. Oudin (7 et 8), recherchant une méthode d'analyse des mélanges antigéniques, propose dans ce but la réaction de précipitation en milieu gélifié. La technique consiste à superposer le liquide antigénique à l'immunsérum inclus dans la gélose coulée en tube. D'autres auteurs par la suite ont contribué à améliorer les techniques utilisées. Ouchterlony (9) étudie les systèmes antigéniques de la toxine diphthérique en aménageant des cupules dans le milieu gélifié. Jensen et Francis (10) en 1953 étendent aux virus la méthode de précipitation. En médecine vétérinaire, la réaction de précipitation en milieu gélifié a permis d'élargir le champ des investigations; Bodon (11) l'applique le premier à l'étude du virus aphteux. Mansi (5) étudie les antigènes solubles mis en évidence dans certaines maladies à virus : maladie de Carré et hépatite à virus du chien, myxomatose et fibrome du lapin, peste porcine, chorio-méningite lymphocytaire. Verge et coll. (12), Mackowiak et coll. (13), Brown et Crick (14) appliquent la réaction de précipitation au complexe précipitant du virus aphteux, et Brown et Crick à celui du virus de la stomatite vésiculeuse (15). Mansi (16) adapte la méthode aux recherches sur les antigènes solubles des *Brucella* et d'*Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Les résultats intéressants obtenus par ces différents auteurs nous ont conduits à l'étude de la précipitation spécifique appliquée au virus rabique. Cette étude offrait a priori la possibilité d'un diagnostic rapide et de recherches sur la nature antigénique du virus.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons repris et adapté au virus rabique la technique d'Oudin, reprise par Ouchterlony et modifiée par Mansi (5) pour l'étude des virus des maladies animales. Elle consiste, après avoir découpé de petits réservoirs dans la gélose coulée dans une boîte de Pétri, à remplir les petites cuves ainsi obtenues de matériel cérébral rabique d'une part et d'immunsérum d'autre part.

Antigène soluble et anticorps précipitant diffusent l'un vers l'autre à travers le milieu gélifié et donnent un complexe qui précipite

en formant des lignes nettement visibles à l'œil nu.

### 1° Milieu

Il est constitué de :

Bacto Agar .....	15 g
Chlorure de sodium.....	16 g
Méthyl-orange .....	0,03 g
Merthiolate .....	0,2 g
Eau .....	1.000 ml

Le méthyl-orange facilite la lecture des résultats, et le merthiolate inhibe la croissance bactérienne. Par la suite, nous avons supprimé le chlorure de sodium du milieu, ce qui diminue la zone d'hémolyse autour des réservoirs.

Le milieu est réparti à raison de 30 ml par tube de 22mm et conservé à 4° C. Au fur et à mesure des besoins, les tubes sont mis au bain-marie et le milieu fondu est coulé dans des boîtes de Pétri rigoureusement propres. Le milieu refroidi doit être parfaitement homogène, clair et ne renfermer aucun débris de coton. Nous avons essayé plusieurs milieux différents mais aucun ne s'est montré supérieur à l'autre. Parmi les colorants incorporés qui ont été essayés, le méthyl-orange semble avoir donné les meilleurs résultats; le rouge Congo à 0,012 p. 100 donne également de bonnes lectures. Selon Lazear et coll. (17) le bleu de méthylène à 0,03 p. 100 est préférable lorsqu'on désire exécuter des photographies en noir et blanc.

### 2° Réservoirs

A l'aide d'une canne de verre de 7 mm de diamètre intérieur et de 8 mm de diamètre extérieur, on découpe à l'emporte-pièce six petits cylindres verticaux de milieu gélifié, laissant ainsi six réservoirs disposés sur la circonférence d'un cercle hypothétique de 14 mm de rayon, à 5 mm de distance les uns des autres. Ces normes ont été fixées après avoir déterminé la distance à adopter entre la source d'anticorps et la source d'antigène pour obtenir la meilleure différenciation des lignes de précipitation. Une goutte de milieu fondu est ensuite coulée à l'aide d'une pipette dans chaque réservoir afin d'assurer l'étanchéité. Il faut souligner ici la nécessité d'une étanchéité parfaite afin d'éviter toute fuite de sérum qui se mêlerait à l'antigène, empêchant ainsi la formation des lignes de précipitation.

### 3° Antigènes

Nous avons utilisé comme matériel d'étude des

cerveaux de chiens infectés de rage des rues dans les conditions naturelles, où la présence de virus rabique avait été confirmée, et des cerveaux de lapins inoculés par voie intracérébrale avec du virus fixe (souche L. Pasteur au 1.955<sup>e</sup> passage). Il est important de déposer dans les réservoirs destinés à l'antigène de petits morceaux de tissu cérébral prélevés en plusieurs endroits, et non une suspension.

#### 4<sup>o</sup> Anticorps

L'un des facteurs primordiaux de la réaction de précipitation est la richesse en anticorps précipitants de l'immunsérum utilisé. Aussi avons-nous utilisé quatre sérums, préparés selon trois processus d'immunisation différents :

a) *Sérum antirabique brut de cheval hyperimmunisé* selon la méthode de l'Institut Pasteur de Garches (18).

Rappelons que le processus d'immunisation comprend schématiquement deux séries d'inoculations, suivies d'injections d'entretien :

première série : virus fixe phéniqué  
 première injection .. 40 ml } Suspension phé-  
 8 jours après ..... 80 ml } niquée de cerveau  
 8 jours après ..... 120 ml } de lapin à 5 p. 100.  
 deuxième série : virus fixe frais  
 première injection... Un demi cerveau de lapin en  
 suspension dans 50 ml d'eau  
 distillée.  
 8 jours après ..... Un cerveau de lapin dans  
 100 ml d'eau distillée.  
 8 jours après ..... Deux cerveaux de lapins  
 dans 150 ml d'eau distillée.

Pour l'entretien de leur immunité, les chevaux sont réinoculés tous les mois avec deux cerveaux de lapins en suspension dans 150 ml d'eau distillée (virus rabique fixe frais).

b) *Sérum antirabique purifié de cheval.*

Nous avons utilisé le sérum antirabique destiné à l'usage thérapeutique, livré dans le commerce.

c) *Sérum antirabique d'âne immunisé avec du virus rabique fixe formolé et du virus fixe frais (âne n<sup>o</sup> 1).*

Nous avons cherché à obtenir une source d'anticorps plus économique en utilisant l'âne comme animal producteur. Fermi (19), immunisant des ânes contre le virus rabique, avait mis en évidence des anticorps neutralisants d'un titre au moins égal à celui de l'immunsérum de cheval. Nous pouvions donc espérer qu'il en serait de même des anticorps précipitants. Il

est intéressant de faire remarquer ici que Jezierski (20), immunisant un âne avec le virus de la poliomyélite, cultivé *in vitro* sur tissus de singe, obtint une formation d'anticorps spécifiques d'un titre très élevé. Les résultats que nous avons obtenus avec le sérum préparé sur âne furent excellents quant à la présence d'anticorps précipitants. Nous avons choisi pour cela deux processus différents d'immunisation. La première méthode que nous avons utilisée est semblable à celle de l'Institut Pasteur de Garches pour l'immunisation des chevaux, avec cette différence toutefois qu'elle substitue au virus rabique fixe phéniqué le virus fixe formolé selon la technique de Plantureux.

d) *La seconde méthode utilise du sérum antirabique d'âne immunisé avec une souche avianisée (âne n<sup>o</sup> 2).*

Il nous a paru intéressant de produire un immunsérum dépourvu de tout anticorps anti-cerveau en vue d'éviter, au cours de la réaction de précipitation en milieu gélifié, l'apparition éventuelle de complexes insolubles précipitants cerveau-anticorps anticerveau. Le processus d'immunisation choisi fut le suivant :

première série = virus rabique avianisé souche Flury HEP (high egg passage) par voie intramusculaire.  
 première injection . 6 ml } suspension de ma-  
 8 jours après ..... 12 ml } tériel embryonnaire  
 8 jours après ..... 12 ml } à 33 p. 100.  
 8 jours de repos.  
 deuxième série = virus rabique avianisé souche Flury LEP (low egg passage) par voie intramusculaire.  
 première injection 12 ml } suspension de ma-  
 8 jours après ..... 12 ml } tériel embryonnaire  
 8 jours après ..... 24 ml } à 33 p. 100.

Pour l'entretien de l'immunité, on pratiquait une injection de rappel tous les mois avec 24 ml d'une suspension à 33 p. 100 d'embryon infecté avec la souche Flury LEP.

La première récolte de sang avait lieu 15 jours après la troisième injection de la deuxième série.

#### 5<sup>o</sup> Techniques

Deux techniques sont utilisables : la première consiste à disposer alternativement dans les réservoirs périphériques du tissu cérébral rabique et du tissu cérébral normal servant de témoin et à couler du sérum antirabique dans le réservoir central ; la seconde consiste à adopter la disposition inverse en remplissant alternativement les

réservoirs périphériques d'immunsérum et de sérum normal et en versant dans le réservoir central du tissu cérébral rabique.

## 6° Lecture des résultats

Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 37° C, et les réservoirs de sérum sont rechargés avant qu'ils ne soient vides, toutes les 12 heures environ. Les lectures se font après 24, 48 et 72 heures selon le moment d'apparition des lignes de précipitation, en utilisant comme système optique un éclairage sur fond noir. Nous avons adopté pour cela le dispositif de Lazear et coll. (17) en le simplifiant. Une boîte en contreplaqué avec un couvercle amovible est tapissée intérieurement de papier argenté, et deux miroirs plans sont inclinés de manière à réfléchir les rayons lumineux issus d'une lampe de 100 watts en les faisant converger sur un orifice circulaire de 8 cm de diamètre percé dans le couvercle. Un écran tapissé de papier noir est disposé de façon à arrêter les rayons directs, permettant ainsi une lecture sur fond noir.

## RÉSULTATS

### 1° Distance et dimension optima des réservoirs d'antigène et d'anticorps

Il faut accorder une grande importance tant à la distance des réservoirs qu'à leur dimension. Lorsqu'un antigène soluble et son anticorps correspondant diffusent l'un vers l'autre dans un gel, la ligne de précipitation se forme dans la région où ils sont en proportion d'équivalence. Si les concentrations initiales d'antigène et d'anticorps sont équivalentes, le précipité reste stationnaire.

Si la concentration de l'antigène est initialement trop élevée par rapport à celle de l'anticorps pour permettre l'obtention d'une ligne de précipitation située à mi-distance entre les réservoirs d'antigène et d'immunsérum, la position de cette ligne de précipitation sera plus rapprochée du réservoir d'antigène que du réservoir d'anticorps. D'autre part, un excès d'antigène aboutit à la solubilisation de l'immun-précipité formé.

Si cet excès d'antigène est très grand, l'immun-précipité sera solubilisé au fur et à mesure de sa formation et la réaction pourra passer inaperçue. Dans ces conditions, la quantité d'antigène introduite dans la cuve et, par voie de conséquence, la dimension de cette dernière ont une grande importance. D'autre part, le maximum de densité du précipité est étroitement lié, comme l'a montré Oudin (21) à la concentration en anticorps.

C'est pourquoi, afin de déterminer la distance entre les cuves et leur dimension optima, nous avons repris la disposition adoptée par Mansi (5).

Dans une boîte de Pétri dans laquelle le milieu gélifié a été coulé, des réservoirs de 7 mm sont découpés de manière à former trois rangées verticales. La rangée centrale comprend six réservoirs que l'on remplit d'immun-sérum ; d'autre part, les rangées latérales sont disposées de telle sorte que les distances entre les réservoirs latéraux et le réservoir central soient respectivement de la première à la sixième rangée horizontale de 3, 5, 7, 9, 11 et 18 mm. La source d'antigène est déposée dans les réservoirs des deux rangées latérales (voir fig. 1).

Dans une deuxième boîte de Pétri, la même disposition est adoptée en découpant des réservoirs de 10 mm de diamètre.

Les résultats les plus rapides et les plus satisfaisants concernant la mise en évidence des lignes de précipitation ont été obtenus avec des réservoirs de 7 mm de diamètre, distants les uns des autres de 7 mm.

### 2° Étude des lignes de précipitation spécifiques du virus rabique

Nous exposerons ici les résultats que nous avons obtenus en utilisant comme source d'anticorps le sérum brut de cheval hyperimmunisé selon la méthode de l'Institut Pasteur de Garches.

#### a) Cerveau de chien normal.

Aucune ligne de précipitation n'apparaît entre les cupules contenant l'antigène et l'anticorps, quelle que soit la durée d'incubation. Notre expérimentation portant sur 44 cerveaux de chiens (dont 24 étaient enrages) n'a jamais mis en évidence d'immun-précipité lorsqu'il s'agissait de chiens indemnes de rage.

#### b) Cerveau de lapin normal.

Après 48 heures, on voit une ligne de précipitation très nette apparaître au voisinage du réservoir d'anticorps, dessinant un arc de cercle à concavité dirigée vers celui-ci. Les travaux de Korngold et Van Leeuwen (22), qui établissent une relation entre le poids moléculaire de l'antigène et l'incurvation de la ligne de précipitation, permettent de penser que l'antigène responsable de cet immun-précipité serait d'un poids moléculaire élevé. Une deuxième ligne commence à se dessiner près du réservoir d'antigène ; celle-ci est bien visible après 72 heures et présente une concavité moins marquée que la première, ce qui traduit une fraction antigénique d'un poids moléculaire inférieur. Il s'agit bien d'un immun-

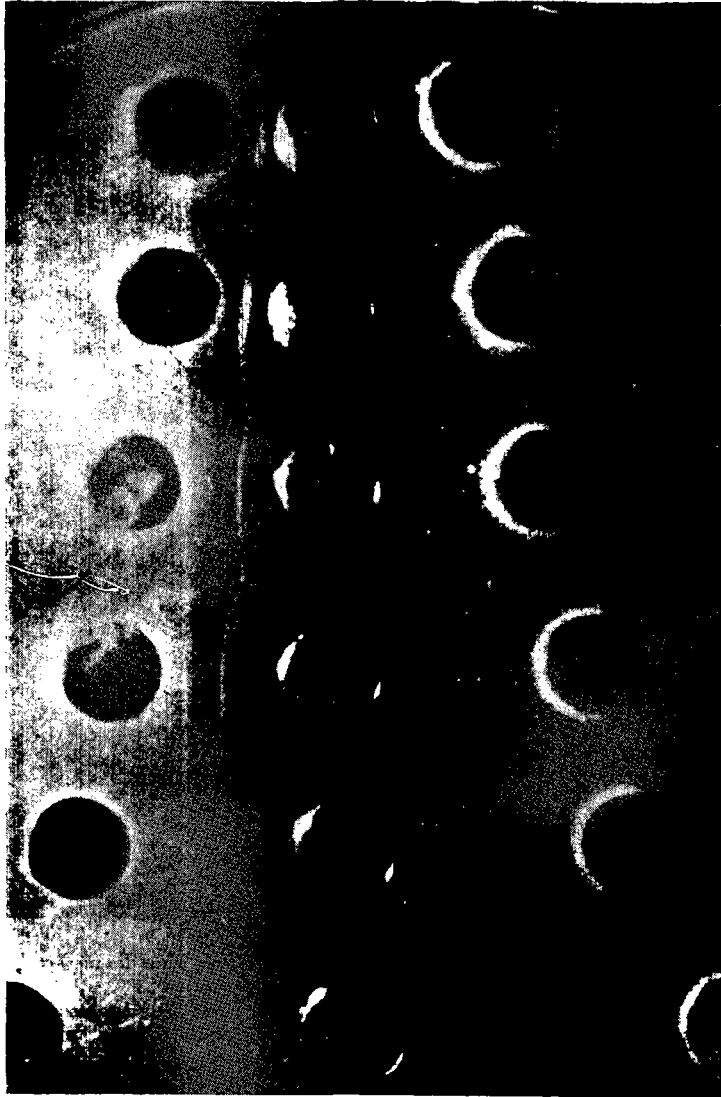


Fig. 1. — Recherche de la distance optima à adopter pour des réservoirs de 7 mm de diamètre (les écarts entre les réservoirs d'une même rangée sont respectivement de 3, 5, 7, 9, 11 et 18 mm).

Du tissu cérébral de chien infecté par le virus de la rage des rues est placé dans les rangées de droite et de gauche. Les réservoirs de la rangée centrale sont remplis de sérum hyperimmun de cheval. Lecture après 48 heures.

précipité et non d'un phénomène de Liesegang car si nous reprenons la technique choisie pour étudier la distance et la dimension optima des réservoirs, les deux lignes de précipitation se forment en face de chaque cupule d'antigène pour donner deux tracés ininterrompus.

Ces lignes de précipitation peuvent être attribuées au complexe immun-précipitant antigène cerveau normal de lapin et anticorps anticerveau de lapin. L'existence de tels anticorps provient de l'hyperimmunisation des chevaux avec des

injections de cerveaux de lapins infectés par le virus fixe. Lorsque ces sérums sont épuisés en les mélangeant sur agitateur Kline avec du cerveau de lapin normal broyé, le surnageant après centrifugation ne permet plus d'obtenir les lignes de précipitation, ce qui prouve que celles-ci sont bien dues à des anticorps anticerveau normal de lapin.

#### c) Cerveau de chien enragé

Après 48 heures apparaissent deux lignes de

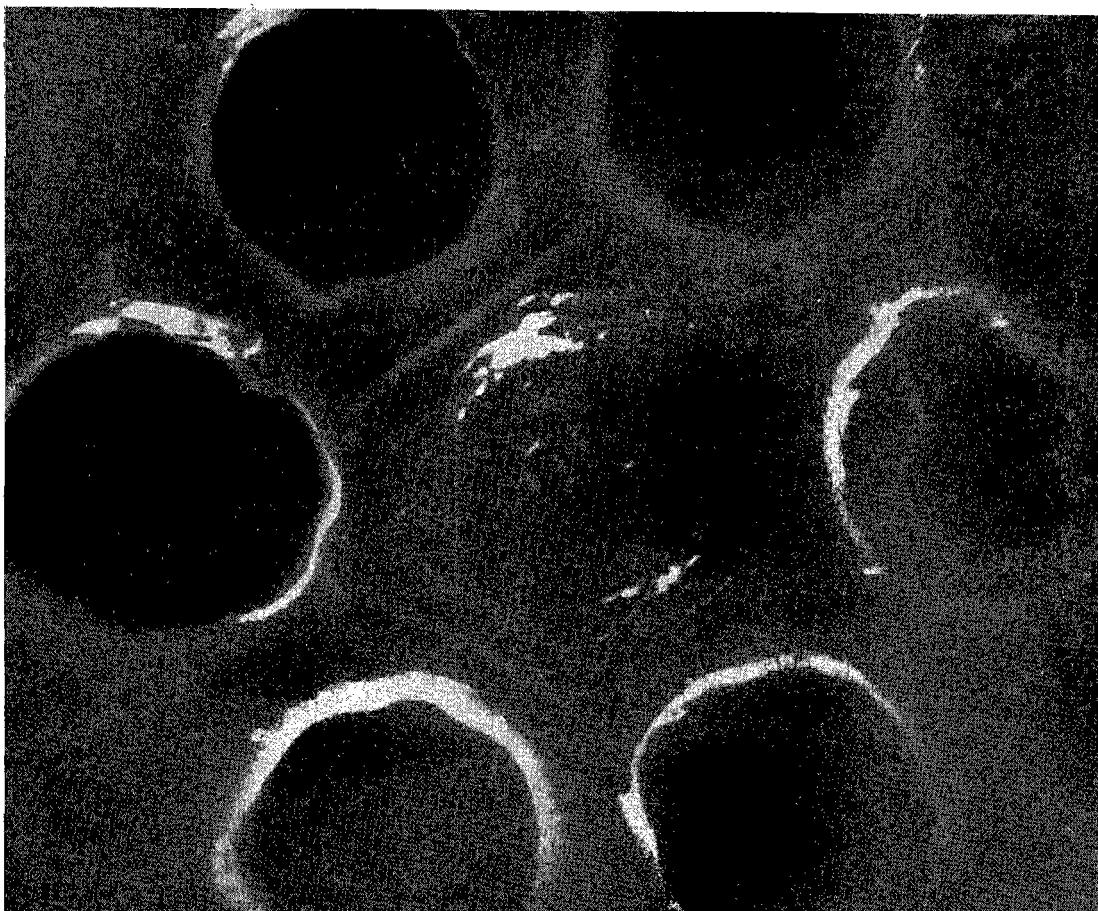


Fig. 2. — Lignes de précipitation obtenues avec du tissu cérébral de chien enragé (virus des rues) et du sérum rabique hyper-immun préparé sur cheval.

Lecture après 48 heures : Apparition de deux lignes de précipitation (dont l'une beaucoup moins dense) en face des réservoirs contenant du tissu cérébral rabique. Aucune précipitation en face des témoins (cerveau de chien normal).

précipitation presque rectilignes dont la concavité est dirigée vers les réservoirs d'anticorps. Ces deux lignes doivent être attribuées à deux fractions antigéniques, l'une ayant un poids moléculaire voisin de celui de l'anticorps et l'autre un poids moléculaire légèrement supérieur. L'expérimentation a porté sur 24 cerveaux de chiens reconnus infectés par le virus rabique. Les deux lignes de précipitation ont toujours été retrouvées, que ce soit sur des cerveaux frais, putréfiés, conservés en glycérine ou au congélateur pendant plus d'un an (voir fig. 2). Il ne s'agit pas non plus ici de phénomènes de Liesegang, cette possibilité étant éliminée par la technique déjà décrite.

d) *Cerveau de lapin inoculé avec du virus rabique fixe.*

Après 48 heures, trois lignes de précipitation apparaissent, celle qui est la plus proche du réservoir d'anticorps allant se confondre avec celle apparaissant devant les réservoirs témoins contenant du tissu cérébral normal de lapin. Après 72 heures, une quatrième ligne est visible et rejoint la deuxième ligne de précipitation apparaissant devant les témoins. Les deux lignes de précipitation dues au virus rabique se trouvent comprises entre les deux lignes de précipitation dues à l'antigène cerveau de lapin normal (voir fig. 3).

En utilisant un sérum épuisé ainsi qu'il a été déjà indiqué, seules, les deux lignes de précipitation spécifiques au virus rabique apparaissent.

e) *Suspension d'embryons de poulet infectés par la souche de virus avianisé Flury.*



Fig. 3. — Lignes de précipitation obtenues avec du tissu cérébral de lapin normal, du tissu cérébral de lapin infecté par du virus rabique fixe et du sérum rabique hyperimmun préparé sur cheval.

Lecture après 48 heures : Une ligne de précipitation commune à tous les cerveaux de lapin et deux lignes de précipitation devant les réservoirs d'antigène rabique.

Une deuxième ligne de précipitation anticerveau normal de lapin commence à se voir.

Après plusieurs essais infructueux, nous avons obtenu une précipitation en remplissant chaque cupule destinée à l'antigène avec du matériel lyophilisé non réhydraté représentant 3 ml de la suspension embryonnaire fraîche à 33 p. 100. Dans ces conditions, en 48 heures, apparaissent les deux lignes de précipitation spécifiques au virus rabique.

### 3° Action des différents immunsérums

Nous avons vu que des concentrations convenables d'antigène soluble et d'anticorps précipitant étaient indispensables pour que la réaction de précipitation se produise. Du fait que la virulence du matériel cérébral suspect utilisé aux fins de diagnostic est inconnue, de même que la concentration en antigène soluble, il est néces-

saire de disposer dans les cupules qui lui sont destinées du tissu cérébral au lieu d'une simple suspension de ce tissu. Selon les travaux de Oudin (21), la concentration du sérum en anticorps précipitant conditionne la densité de l'immunoprécipité formé. C'est pourquoi nous nous sommes efforcés de produire un sérum le plus riche possible en anticorps précipitants. Dans ce but, nous avons comparé les réactions de précipitation respectivement obtenues avec trois sérums dont nous disposions et du sérum antirabique brut, préparé sur cheval, utilisé comme référence. Un de ces trois sérums, le sérum antirabique purifié, préparé sur cheval, a donné sensiblement les mêmes résultats que le sérum brut ; avec les deux autres, provenant des ânes n<sup>os</sup> 1 et 2, nous avons obtenu deux lignes très nettes de

précipitation spécifiques au virus rabique après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37° C. En outre, le sérum de l'âne n° 2 ne précipitait pas l'antigène cerveau normal de lapin. Nous disposons donc d'une méthode diagnostique de la rage en 24 heures et nous n'insisterons pas sur l'intérêt capital de cette réaction précoce.

#### 4° Application de la réaction de précipitation au diagnostic de la rage

La méthode de précipitation spécifique en milieu géliné a été systématiquement appliquée à tous les cerveaux suspects que nous avons reçus depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1958 jusqu'au 15 août 1958. L'expérimentation a porté sur 44 cerveaux de chiens, 16 de chats, 2 de singes et 2 cerveaux humains. La réaction de précipitation a fait apparaître deux lignes d'immun-précipité dans le cas de 24 cerveaux de chiens et un cerveau humain ; les examens classiques devaient par la suite confirmer le diagnostic de rage. Au cours de notre expérimentation, nous avons relevé quelques observations particulièrement intéressantes que nous relaterons ici, afin de souligner l'intérêt que prend dans certains cas délicats la réaction de précipitation.

Les cerveaux de deux singes morts subitement furent envoyés de l'Oubangui-Chari au laboratoire de Farcha à un mois d'intervalle environ. L'un d'eux présentait des inclusions oxyphiles homogènes dans le cytoplasme des cellules nerveuses de la corne d'Ammon. L'inoculation d'une émulsion cérébrale des deux prélèvements par voie intracérébrale à des rats tuait ceux-ci en 12 jours environ. Nous avons retrouvé, dans les cellules nerveuses de la couche moyenne de la corne d'Ammon de ces rats, des inclusions oxyphiles ; après trois passages sur rats, ces inclusions se montraient plus volumineuses, de nature hétérogène, et pouvaient être prises pour des corps de Négri. Nous avons alors pratiqué une séro-neutralisation qui nous a permis d'affirmer qu'il ne s'agissait pas d'un virus rabique. Le test de précipitation en milieu géliné fut particulièrement intéressant dans ces deux cas, puisqu'il permit en 48 heures d'étayer l'hypothèse d'une infection à virus neurotrophe différent du virus rabique, alors que l'examen histopathologique restait douteux.

Un cerveau de chien et un cerveau humain arrivés putréfiés manifestèrent deux lignes de précipitation très nettes lors du test de précipitation. La présence de corps de Négri et les inoculations par voie intramusculaire au cobaye

sous le couvert d'antibiotiques confirmèrent le diagnostic de rage.

Dans deux autres cas, nous n'avons reçu que du matériel cérébral formolé, et, dans ces deux cas, l'apparition de lignes de précipitation a permis un diagnostic de rage, confirmé par la présence de corps de Négri.

Dans deux cas d'abattage précoce de chiens suspects, nous n'avons pas relevé la présence de corps de Négri alors que le test de précipitation était positif. Les inoculations et la présence de corps de Négri chez les animaux inoculés sont venues étayer le diagnostic de rage.

#### 5° Spécificité de la réaction

Celle-ci n'a été que très incomplètement étudiée jusqu'ici. Néanmoins, aucune précipitation n'apparaît avec le virus de la maladie de Carré, utilisé comme antigène sous forme de rate virulente de furet, et mis en présence de sérum antirabique. Dans ce but, il est préférable d'utiliser un milieu sans chlorure de sodium.

En outre, la forme nerveuse de la maladie de Carré est la plus fréquente des infections neurotropes chez le chien. Nous pouvons donc légitimement penser que parmi les 44 cerveaux, examinés depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1958, provenant de chiens morts ou abattus avec une symptomatologie à prédominance nerveuse, plusieurs étaient infectés du virus de la maladie de Carré et ne pouvaient donc précipiter le sérum antirabique.

D'autre part, nous avons déjà vu que le sérum antirabique s'était révélé incapable de précipiter un virus neurotrophe isolé chez deux singes originaires d'Oubangui-Chari.

L'étude de la spécificité de la réaction immunologique de précipitation reste à effectuer notamment vis-à-vis de la maladie d'Aujeszky, de la chorioméningite lymphocytaire et des encéphalites africaines à virus.

### ÉTUDE ANTIGÉNIQUE DU VIRUS RABIQUE

La réaction immuno-chimique de précipitation en milieu géliné du virus rabique se traduit par deux lignes de précipitation qui apparaissent entre les réservoirs contenant respectivement l'immun-sérum et le tissu cérébral rabique. Chacune de ces lignes manifeste la présence d'un complexe précipitant antigène-anticorps, c'est-à-dire l'existence de deux fractions antigéniques solubles, dont l'une a un poids molé-



culaire voisin de son anticorps précipitant, tandis que l'autre possède un poids moléculaire supérieur à celui de l'anticorps correspondant. La réaction de diffusion en gel permet donc de reconsidérer la structure antigénique du virus rabique.

Schématiquement, une suspension de tissu cérébral rabique se dédouble, lorsqu'on la soumet à une centrifugation, en deux éléments : d'une part, un surnageant qui renferme « l'antigène soluble » fixant le complément au même taux que la suspension d'origine, mais dont le titre infectieux est très faible, d'autre part un sédiment contenant « l'antigène viral » dont le titre infectieux est supérieur à celui de la suspension d'origine, mais dont le pouvoir fixateur du complément a considérablement diminué. L'antigène soluble et l'antigène viral peuvent tous deux engendrer l'apparition en quantités égales d'anticorps neutralisants et fixateurs du complément. Cependant, ainsi que l'on montré Kipps et coll. (23), l'antigène soluble du virus rabique, traité par l'acide phénique à 0,5 p. 100 et incorporé à un adjuvant constitué de paraffine, lanoline et *Mycobacterium phlei*, engendre une formation d'anticorps neutralisants et fixateurs du complément en quantité égale à celle engendrée par l'antigène viral seul ou par un mélange à parties égales d'antigène soluble et d'antigène viral ; par contre, il est remarquable que le même antigène soluble, après chauffage à 56° C pendant 30 minutes, n'engendre pratiquement que des anticorps fixateurs du complément, le titre d'anticorps neutralisants ainsi obtenu étant très faible. Kipps et coll. (23) en concluent que la différence constatée entre les effets respectifs du phénol et de la chaleur décrits ci-dessus traduit l'existence de deux composants, ou de deux groupes fonctionnels distincts, de la substance antigénique ; cependant, ils n'ont pu déterminer avec précision les causes de cette différence.

La réaction de précipitation en milieu gélifié permet d'affirmer la présence de deux composants solubles de dimensions différentes. L'un de ces composants est thermostable et le deuxième thermolabile ; la diffusion en gélose effectuée avec du matériel rabique chauffé 30 minutes à 56° C ne donne qu'une seule ligne de précipitation. Nos résultats viennent donc confirmer ceux de Kipps et coll. et permettent d'attribuer deux dimensions particulières différentes aux fractions antigéniques solubles.

## DISCUSSION

L'apparition de deux lignes de précipitation

entre des cupules renfermant respectivement du tissu cérébral rabique et de l'immun-sérum permet une application pratique de la technique de diffusion en milieu gélifié, d'un intérêt considérable du point de vue diagnostique. Sur 64 cerveaux examinés depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1958 jusqu'au 15 août 1958, nous avons relevé 25 observations positives dont une concernant le cerveau d'un enfant de 13 ans mort de rage.

Nous n'avons jusqu'alors observé aucune réaction de précipitation avec du matériel suspect qui se révélait ultérieurement indemne de rage lorsque d'autres méthodes de diagnostic étaient utilisées ; de même, dans le cas contraire, chaque fois que nous avons pu isoler le virus rabique par les méthodes classiques de laboratoire, nous avons pu mettre en évidence les deux lignes de précipitation, malgré l'abatage souvent précoce des animaux suspects imposés par les conditions d'éloignement des postes vétérinaires et les mœurs errantes des chiens indigènes.

La réaction de diffusion en milieu gélifié est praticable avec du tissu cérébral frais, putréfié, glyciné ou formolé ; cette méthode appliquée à deux cerveaux de chiens enragés, conservés au congélateur à — 20° C pendant plus d'un an, a permis l'obtention de lignes de précipitation caractéristiques. Par ailleurs, dans le cas des deux cerveaux de singes morts d'infection neurotrophe à virus dont la nature n'a pu être déterminée, la réaction de précipitation nous a permis en 24 heures d'éliminer la suspicion de rage, alors que les résultats d'examen histopathologiques et des inoculations restaient douteux et que seule, la séro-neutralisation venait confirmer les résultats négatifs du test de précipitation.

L'utilisation de deux ânes hyperimmunisés, l'un selon la méthode de l'Institut Pasteur de Garches, en substituant du vaccin formolé au vaccin phéniqué constituant la première série d'inoculations, l'autre avec une souche avianisée de virus rabique, a permis la production d'un sérum très efficace pour l'obtention des lignes de précipitation. Nous disposons donc d'une source d'anticorps économique et très riche en anticorps précipitants.

Du point de vue dogmatique, l'étude du virus rabique par la réaction de précipitation en milieu gélifié permet de mettre en évidence deux constituants de l'antigène soluble. Quatre hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer la présence de particules de dimensions différentes. Les particules les plus volumineuses auraient un édifice moléculaire différent, ou représenteraient une agglomération d'unités plus petites, ou bien

encore, elles seraient constituées de l'union de certaines particules de petites dimensions par liaison mécanique avec des composés lipidiques du tissu cérébral. Il n'est pas impossible non plus que les différences dans les dimensions des composants de l'antigène soluble représentent des étapes de la synthèse intracellulaire du virus. Si nous replaçons cette étude dans le cadre des investigations portant sur les virus animaux, l'hypothèse de liaisons mécaniques de particules de l'antigène soluble avec des substances tissulaires de taille variée est soutenue par le fait que l'antigène soluble de la blue-tongue, extrait du cerveau de souris infecté par la méthode de Casals à l'acétone-éther est de dimension particulière uniforme de  $\pm 8 \text{ m}\mu$ , alors que l'extraction par l'eau physiologique met en évidence des particules fixant le complément et dont la taille est intermédiaire entre  $8 \text{ m}\mu$  et celle du virus infectieux (Fulton et Dumbell, 24). Dans certaines conditions telles que l'extraction par l'acétone-éther, il y aurait libération d'unités de base à partir de complexes particulières. Pour Kipps et ses collaborateurs (21) l'antigène soluble ne représente pas un constituant essentiel du virus ; la rupture du virus purifié de la rage ne libère pas d'antigène soluble. La « non spécificité » de l'antigène soluble, son apparition précoce et le fait que sa présence est une preuve spécifique de l'infection virale étayent l'hypothèse d'un produit caractéristique élaboré lors de la synthèse intracellulaire du virus.

Laboratoire de recherches vétérinaires  
de Farcha — Fort-Lamy — Tchad.

### BIBLIOGRAPHIE

1. UEKI (H.), KATO (T.), OISHI (J.), MURAKAMI (H.), SHIMADA (K.). — *Am. J. vet. Res.*, 1957, **18**, 216.
2. CASALS (J.). — *Proc. Soc. exp. Biol., N-Y*, 1949, **70**, 339.
3. ANDO (K.), ISHII (K.), OKA (Y.), IRISAWA (J.), SHIMADA (K.), KATO (T.). — *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 1953, **6**, 22.
4. ANDO (K.), ISHII (K.), OKA (Y.), IRISAWA (J.), SHIMADA (K.), KATO (T.), MURAKAMI (H.). — *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 1953, **6**, 659.
5. MANSI (W.). — *J. comp. Path.*, 1957, **67**, 297.
6. VILLEMOT (J.-M.), PROVOST (A.). — *C.R. Acad. Sci.*, 1958, **246** (18), 2694.
7. OUDIN (J.). — *Methods in Medical Research*. Year Book, Publishers, Chicago, 1952, **5**, 335.
8. OUDIN (J.). — *C.R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115.
9. OUCHTERLONY (O.). — *Ark. Kemi. Min. Geol.*, 1948, **26**, B. I.
10. JENSEN (K. E.), FRANCIS (T.). — *J. Immunol.*, 1953, **70**, 321.
11. BODON (L.), RICHTER (J.), SCENT-IVANTI. — *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1956, **6**, 211.
12. VERGE (J.), DHENNIN (L. et L.), FONTAINE (M.), LARENAUDIE (B.). — *Rev. Immunol Thérap. antimicrob.* 1957, **21**, 260.
13. MACKOWIAK (M.), FAYET (Th.), CAMAND (R.). — *Rev. Immunol. Thérap. antimicrob.* 1957, **21**, 271.
14. BROWN (F.), CRICK (J.). — *Virology*, 1958, **5**, 133.
15. BROWN (F.), CRICK (J.). — *Nature*, 1957, **179**, 319.
16. MANSI (W.). — *Nature*, 1958, **181**, 1289.
17. LAZEAR (E. J.), KILLINGER (A. H.), HAYS (M. B.), ENGELBRECHT (H.). — *Vet. Med.*, 1958, **53**, 229.
18. **La Rage, Techniques de Laboratoire**, Monographie de l'O.M.S., 1955.
19. FERMI (C.). — **La Rabbia**, Instituto Sieroterapia Vaccinogeno Toscano " Sclavo " Sienne. Vol. II, 972-974.
20. JEZERSKI (A.). — *Ann. Inst. Past.*, 1955, **89**, 206.
21. OUDIN (J.). — *Ann. Inst. Past.*, 1948, **75**, 30 et 109.
22. KORNGOLD (L.), VAN LEEUWEN (G.). — *J. Immunol.*, 1957, **78**, 172.
23. KIPPS (A.), DU T. NAUDE (W.), POLSON (A.), SELZER (G.), VAN DEN ENDE (M.). — The size distribution of specific antigens in virus infected tissues and their significance. Ciba Foundation symposium on the nature of viruses. Churchill J. A. Ltd., 104, Gloucester Place, London W. 1., 1957, 224-243.
24. FULTON (F.), DUMBELL (K. R.). — *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 97.

## SUMMARY

### **Agar precipitation test of rabies virus by hyperimmune rabies anti-serum**

A study of the virus of rabies by the specific agar precipitation test has revealed two lines of precipitation indicating two antigenic complexes of soluble precipitating antibodies. The precipitin test was applied to 64 brain specimens of which 25 were positive by the classical tests and there was no variation in results in any case between the diagnostic methods.

The two lines of precipitation appear to be specific for rabies virus and never appear when rabies anti-serum is added to the virus of dog distemper.

The choice of the donkey as serum-producer is justified by the abundance of precipitating antibodies in the hyperimmune anti-serum, as also by the low cost of the animal and its maintenance.

This evidence of two soluble antigenic components having different dimensions permits the drawing of interesting and dogmatic conclusions when this study is compared with the antigenic constitution of other virus infections of animals.

## RESUMEN

### **Precipitación en medio gelificado del virus rábico por el suero rábico hiperimmune**

El estudio del virus rábico por el método de la precipitación específica en medio gelificado pone en evidencia la formación de dos líneas de precipitación debidas a dos complejos antígeno soluble-anticuerpo precipitante.

El test de precipitación aplicado al diagnóstico nos ha permitido obtener 25 respuestas positivas comprobadas según los métodos clásicos sobre 64 cerebros recibidos. No hemos revelado hasta el presente ninguna discordancia entre los resultados de la difusión en gel y los de los métodos clásicos. Las dos líneas de precipitación parecen específicas del virus rábico, y en particular no aparecen nunca cuando suero hiperimmune antirrábico es puesto en presencia del virus de Carré.

La elección del asno como animal productor de suero está justificada por la riqueza en anticuerpos precipitantes del suero hiperimmune obtenido, así como por el precio de compra y mantenimiento económico de este animal.

La puesta en evidencia de dos componentes antigénicos solubles que tienen características diferentes permite conclusiones dogmáticas interesantes cuando se coloca este estudio en el cuadro de la investigación acerca de la naturaleza antigénica de los virus animales.