



**HAL**  
open science

# PESTE PORCINE CLASSIQUE: LES FACTEURS D'IDENTIFICATION IN VITRO (MARQUEURS GÉNÉTIQUES) DU VIRUS EN RELATION AVEC LE POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE PORC (1)

J.-M. Aynaud, A. C. Galicher, J. Lombard, C. Bibard, M. Mierzejewska

► **To cite this version:**

J.-M. Aynaud, A. C. Galicher, J. Lombard, C. Bibard, M. Mierzejewska. PESTE PORCINE CLASSIQUE: LES FACTEURS D'IDENTIFICATION IN VITRO (MARQUEURS GÉNÉTIQUES) DU VIRUS EN RELATION AVEC LE POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE PORC (1). *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1972, 3 (2), pp.209-235. hal-00900705

**HAL Id: hal-00900705**

**<https://hal.science/hal-00900705>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**PESTE PORCINE CLASSIQUE :**  
**LES FACTEURS D'IDENTIFICATION *IN VITRO***  
**(MARQUEURS GÉNÉTIQUES)**  
**DU VIRUS EN RELATION**  
**AVEC LE POUVOIR PATHOGÈNE POUR LE PORC (1)**

J.-M. AYNAUD, A. C. GALICHER, J. LOMBARD, C. BIBARD et M. MIERZEJEWSKA (2)

*Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, I. N. R. A.,  
78 - Thiverval-Grignon*

---

**RÉSUMÉ**

Grâce aux techniques de titrage du virus en culture cellulaire à l'aide de l'immunofluorescence, l'étude comparée des propriétés *in vitro* de virus sauvages pleinement virulents, de virus faiblement virulents, de mutants froids atténués et de quelques souches de vaccins vivants, a permis de mettre en évidence des facteurs d'identification (marqueurs génétiques) *in vitro* du virus de la peste porcine classique. La température optimale de développement, la vitesse de multiplication dans les cellules « PK 15 » et la résistance du pouvoir infectieux à 56°C, sont les trois caractères à l'aide desquels on peut différencier les souches sans recourir à l'inoculation au porc.

La multiplication rapide liée à une intense production de particules infectieuses et à la formation de grandes plages de cellules fluorescentes vers 39°-40°C ainsi que la résistance du pouvoir infectieux à 56°C caractérisent les virus pleinement pathogènes.

Inversement, le développement optimal vers 33°-34°, la multiplication lente du virus liée à une faible production de particules infectieuses et à la formation de petites plages ainsi que la fragilité du pouvoir infectieux à 56° sont des caractères *in vitro* propres aux virus dépourvus de pouvoir pathogène pour le porc.

---

**INTRODUCTION**

Les facteurs d'identification *in vitro* (ou marqueurs génétiques) constituent des caractères qui permettent d'identifier aisément une souche de virus sans recourir à l'inoculation de l'animal naturellement sensible. Leur connaissance facilite les études

(1) Travail réalisé en partie grâce à un contrat Communauté économique européenne — I.N.R.A.

(2) Adresse actuelle : Instytut Weterynarii al Partyzantow 53 - Pulawy (Pologne).

génétiques et la mise au point et le contrôle des vaccins vivants. Concernant la peste porcine classique, maladie dont la prophylaxie médicale est exclusivement basée sur l'emploi des vaccins vivants, on ne connaissait pas encore les facteurs d'identification du virus.

Il est relativement aisé d'obtenir des souches ayant perdu leur pouvoir pathogène et de les utiliser comme vaccins « vivants ». Elles sont obtenues, soit à la suite de très nombreux passages *in vivo* (lapin), soit *in vitro* au moyen de passages en série dans divers systèmes cellulaires (rein de porc, rein de mouton, rein de cobaye, etc.).

L'immunofluorescence dans ses caractères qualitatifs ne permet pas de distinguer les souches de virus de la peste porcine (AIKEN, 1967 ; TEEBKEN, 1967). A part l'inhibition du phénomène END pour certains mutants (SASAHARA, 1966 ; IZAWA, 1971) il n'existait jusqu'à présent aucun facteur d'identification *in vitro* permettant, sans recourir à l'inoculation au porc, de différencier les virus pathogènes des virus atténués.

L'importance économique de cette maladie nous a incités à rechercher les facteurs d'identification *in vitro* du virus liés au pouvoir pathogène pour le porc.

Nous avons étudié des marqueurs se rapportant, d'une part aux conditions de la cinétique du développement viral en culture cellulaire (température optimale de développement, « *rt* », vitesse de multiplication, taille des plages, etc.) et, d'autre part à la structure de la particule virale (résistance du pouvoir infectieux à 56°C ou à différents pH). La possibilité de distinguer facilement au laboratoire les souches atténuées des souches pathogènes à l'aide de quelques facteurs d'identification présente un intérêt dans l'étude des souches isolées sur le terrain et dans la recherche d'une meilleure homogénéité génétique dans les populations virales constituant les vaccins vivants.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

### 1. — Les techniques d'immunofluorescence

A partir du sérum hyperimmun antipeste porcine du commerce, les immunoglobulines antipeste porcine sont extraites au moyen de trois précipitations successives par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Après deux jours de dialyse à + 4°C contre un tampon phosphate (0,01 M, pH 7,6), les immunoglobulines sont purifiées à l'aide d'une chromatographie sur DEAE-cellulose équilibrée dans le même tampon. Les protéines obtenues sont ensuite dialysées contre de l'eau distillée à + 4°C pendant deux jours et enfin lyophilisées et stockées à - 20°C.

Le marquage avec l'isothiocyanate de fluoresceïne se fait dans les conditions suivantes : la protéine et l'isothiocyanate de fluoresceïne sont mis en présence à + 4°C sous un rapport  $\frac{\text{fluoresceïne}}{\text{protéine}} = \frac{1}{200}$  dans un tampon carbonate-bicarbonate (0,5 M, pH 9,5) pendant une nuit sous agitation à la chambre froide. Après filtration sur une colonne de G 25, équilibrée à pH 7,6 dans un tampon phosphate 0,01 M, les immunoglobulines marquées avec la fluoresceïne sont soumises à une chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans le tampon phosphate (0,05 M, pH 7,6).

L'éluion pratiquée avec un tampon phosphate (0,05 M, pH 7,6) permet de recueillir une population d'anticorps fluorescents hautement spécifiques. Après dialyse contre de l'eau distillée à + 4°C pendant deux jours, les anticorps fluorescents sont lyophilisés et stockés à - 20°C. Les recherches réalisées sur les conditions de concentrations à respecter lors de l'utilisation de ces anticorps ont établi qu'une concentration de 2 à 5 mg d'anticorps fluorescents par ml de tampon (0,01 M, PO<sub>4</sub>, 0,15 M NaCl, pH 7,6) permettait d'obtenir une fluorescence spécifique optimum avec un contraste satisfaisant.

2. — *Les cellules*

La lignée cellulaire de rein de porc « PK 15 » (1) est utilisée pour la production et le titrage des divers virus étudiés. Les cellules sont cultivées en milieu de Earle additionné d'hydrolysate de lactalbumine (0,5 p. 100), des vitamines du milieu de Lépine et de sérum de veau embryonnaire 5 p. 100 dépourvu d'inhibiteur ou d'anticorps antiviral de la maladie des muqueuses.

3. — *Les souches du virus de la peste porcine*a) *Virus sauvages pleinement pathogènes pour le porc.*

## 1° La souche « Alfort ».

Par une technique décrite antérieurement (AYNAUD, 1968) nous avons isolé au 19<sup>e</sup> passage à 37°C dans les cellules PK 15, un clone à partir de la souche « Alfort » (2).

2° La souche « ALD » (3) est multipliée et titrée à 37°C dans les cellules « PK 15 » dans les mêmes conditions que pour la souche « Alfort ».

Pour ces deux souches virulentes, les stocks respectifs possèdent des titres infectieux de l'ordre de 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> UFP/ml.

b) *Virus ayant perdu en partie ou en totalité le pouvoir pathogène pour le porc.*1° *Les clones « 29 ».*

Les clones « 29 » sont des mutants froids qui ont été tous obtenus au laboratoire à partir de la souche « Alfort » par sélection et clonage à 29°C dans les cellules « PK 15 » après un nombre de passage aux dilutions limites plus ou moins important selon chaque clone. Le tableau 1 explique l'origine des divers clones isolés au laboratoire.

La souche H 41 est pathogène.

Les clones H 798, H 908 et H 104 possèdent encore un pouvoir pathogène résiduel plus ou moins intense, tandis que les clones H 128.8, U 14, U 19 et U 610 ont perdu le pouvoir pathogène pour les porcelets de 20 à 25 kg dans les conditions expérimentales.

2° *Les souches « O » (4), « D » (4), « S », GPE- (5) et « Suvac » (6)* sont des virus atténués actuellement utilisés comme vaccin vivant.

La souche « O » a été obtenue par passages sur lapin suivis de passages à 37° sur culture de cellules de rein de lapin, puis sur culture de cellules de rein de mouton.

La souche « D » a été obtenue par passages en série à 37° sur culture de cellules de testicules de porc.

La souche GPE-, a été obtenue par SASAHARA (1965), à partir de la souche virulente «ALD», au moyen de 142 passages en série à 37° dans des cultures de cellules de testicules de porc suivis de 36 passages à 37° dans des cultures de testicules de bovin suivis enfin de 36 passages à 30° accompagnés de clonages dans des cultures de cellules de rein de cobaye.

La souche « S » et la souche « Suvac » sont des souches « lapinisées ».

La souche « Suvac » (6) est une souche chinoise ayant subi de très nombreux passages sur lapin que nous avons adaptée aux cultures de cellules PK 15. Le stock utilisé dans cette étude était constitué par le 40<sup>e</sup> passage à 37°.

3° *La souche 331 (7).*

Isolée aux États-Unis sur le terrain dans un foyer de peste porcine subaiguë, cette souche

(1) Obtenue grâce au Laboratoire national des Maladies animales, Ames (Iowa), U. S. A.

(2) Utilisée comme souche d'épreuve par le Laboratoire central de Contrôle et de Recherches des services vétérinaires, 94 - Maison-Alfort.

(3) La souche « Ald », utilisée comme souche d'épreuve à l'Institut national de la Santé animale à Kodaira. Tokio (Japon), nous a été fournie par le Dr KORN, de l'Institut Fédéral de Recherches sur les Maladies à virus des animaux. Tübingen (République fédérale allemande.)

(4) Les souches O et D constituent des vaccins vivants commercialisés.

(5) La souche GPE- : nous a été fournie par le docteur Kenzo NOBUTO de l'Institut national de la Santé animale de Kodaira, Tokio.

(6) La souche « Suvac » nous a été fournie par le docteur BOOL. Centraal Diergeneeskundig Institut, Amsterdam (Hollande).

(7) La souche 331 nous a été fournie par le docteur MENGELING du Laboratoire national des Maladies animales, Ames (Iowa), U. S. A.

a fait l'objet de travaux importants de la part de MENGELING (1968-1970) et CHEVILLE (1969-1970) concernant la pathogénie des formes chroniques de la maladie.

4° *Le virus P 18 a* été isolé à 37°C à partir d'une lignée de cellules de rein de porc infectées de façon permanente.

De façon générale, pour l'étude de chacun de ces virus, nous avons constitué un stock à l'aide des cellules PK'15.

#### 4. — *Le titrage du virus*

Le titrage du pouvoir infectieux est réalisé dans des tubes de Leighton renfermant à l'état confluent une couche monocellulaire de cellules PK 15.

Chaque lamelle est infectée avec 0,2 ml de chaque dilution de virus. L'adsorption du virus se réalise à la température ambiante pendant une heure.

Après avoir rajouté un ml de milieu de maintien (contenant 2 p. 100 de sérum de porc normal ou de sérum de veau embryonnaire dépourvu d'inhibiteurs), les tubes de Leighton sont mis à l'étuve.

Après 24 heures d'incubation à 37°C pour les souches sauvages et la souche « D »,  
30 heures à 37°C pour la souche 331,  
48 heures à 37°C pour les souches « O » ou Suvac, et la souche « S »,  
48 heures à 31°C pour les clones 29°C et la souche « GPE- »,

Le surnageant est éliminé et les cellules sont fixées dans l'acétone froid pendant quinze minutes. Après séchage, les lamelles sont recouvertes avec les anticorps fluorescents et incubées à 37°C pendant soixante minutes. Après un lavage de 30 à 45 minutes dans un bain agité par un barreau magnétique, les lamelles sont séchées et montées dans la glycérine tamponnée. Il est alors facile de compter sous le microscope à ultraviolets les plages colorées par les anticorps fluorescents qui sont constituées de 10 à 20 cellules infectées dont seul le cytoplasme présente la fluorescence verte spécifique. Un réticule placé dans l'oculaire permet de compter plus facilement les plages sur toute l'étendue de la lamelle. Dans ces conditions, le titre infectieux du virus est exprimé par le nombre d'unités formant des plages de cellules fluorescentes.

#### 5. — *Les techniques de cycle unique*

Les cellules PK 15 sont infectées en suspension avec du virus à raison de 5 à 10 UFP par cellule.

L'adsorption est réalisée à 37°C pendant trente minutes sous agitation. Les cellules sont ensuite lavées trois fois et remises en suspension dans du milieu de maintien à raison de 500 000 cellules par ml. L'incubation des cellules en suspension est réalisée dans des flacons siliconés, placés dans des bains-marie agités. Des prélèvements de 0,2 ml effectués à différents temps du cycle sont titrés après avoir été congelés à 70°C et décongelés deux fois.

Pour étudier l'influence de la température sur le rendement en particules infectieuses, avec chacun des virus, nous avons infecté en cycle unique une population de cellules « PK 15 », que nous avons divisée ensuite en 8 lots placés dans des bains-marie agités, réglés chacun à une température différente de 30°C à 42,5°C.

Dans ces conditions nous avons défini comme température optimale la température d'incubation permettant d'obtenir en fin de cycle le titre infectieux maximum.

A partir de cette valeur représentant un rendement de 100 p. 100, il est alors facile de déterminer le *rt* qui, selon LWOFF, est la température supraoptimale à laquelle est observée une baisse de 90 p. 100 dans le rendement en virus.

#### 6. — *Cinétique d'inactivation à la chaleur*

Chacune des suspensions virales est diluée au 1/10 dans de l'eau distillée.

Elles sont alors portées pendant quinze et trente minutes à 56°C dans des bains-marie agités. Dès que l'épreuve est terminée, les suspensions de virus sont placées immédiatement dans la glace fondante.

Les titres infectieux des suspensions virales chauffées sont comparés avec ceux des suspensions de virus maintenues dans la glace fondante.

Pour étudier l'influence des sels sur la cinétique d'inactivation par la chaleur, les virus sont dilués au 1/10 dans du tampon *Tris-HCl* (0,16 M, pH 7,6) additionné de chlorure de magnésium (1 M) ou de sulfate de magnésium (1 M) ou dans du tampon phosphate (0,5 M pH 7,6), et chauffés également à 56°C pendant quinze et trente minutes.

7. — *Influence du pH sur le pouvoir infectieux du virus*a) *Cinétique d'inactivation du pouvoir infectieux du virus à pH acide (2,6).*

Les suspensions virales sont diluées au 1/10 dans du tampon McIlvaine 0,1 M (acide citrique-phosphate disodique) à pH 2,6 placé à la température de la glace fondante.

Des prélèvements sont effectués en fonction du temps et titrés.

b) *Stabilité du pouvoir infectieux du virus en fonction du pH.*

Nous avons utilisé le tampon de Britton et Welford (*J. Chem. Soc.*, 1937, p. 1848).

Ce tampon qui est constitué par du véronal, de l'acide citrique, du phosphate monopotassique, de l'acide borique et de la soude, possède une large zone tampon s'étendant de pH 2,4 pour une molarité de 0,0285 M, jusqu'au pH 11,8 pour une molarité de 0,1142 M.

On dilue les suspensions virales au 1/10 dans dix solutions de ce tampon réglées chacune à un pH différent échelonné de pH 2,5 à pH 11,8.

Après quarante minutes de contact à ces différents pH à la température de la glace fondante, l'activité infectieuse résiduelle est titrée.

Nous avons vérifié que l'addition du virus ne modifie pas le pH de chaque solution tampon.

8. — *Pouvoir pathogène pour le porc des virus étudiés*

10<sup>6</sup> UFP de chacun des virus sont inoculés par voie intramusculaire à des lots de porcs de 20 à 25 kg.

Au cours d'une période d'observation de quinze à vingt jours, on recherche les signes cliniques et nécropsiques habituels de la peste porcine. La température interne est relevée quotidiennement et des prises de sang sont effectuées vers le 7<sup>e</sup> jour en vue de rechercher l'intensité de la virémie.

Enfin, vers le vingtième jour, le pouvoir immunogène est contrôlé au moyen d'une épreuve pratiquée avec le virus sauvage pleinement virulent (10<sup>6</sup> doses infectieuses), ou à l'aide de la recherche de l'activité neutralisante des sérums des animaux inoculés, à l'égard de 100 ou 200 unités formant des plaques fluorescentes en culture cellulaire.

## RÉSULTATS

A partir des résultats obtenus par ASSO (1966) avec le virus de la fièvre aphteuse, en vue de déterminer les facteurs d'identification du virus de la peste porcine, nous avons étudié les propriétés *in vitro* relatives d'une part, aux conditions de la cinétique de développement du virus dans les conditions de cycle unique (température optimale de développement, *rt*, vitesse de multiplication), et d'autre part, à la résistance du pouvoir infectieux du virus à la chaleur 56°C et en fonction du pH.

1. — *Cinétique de développement en culture cellulaire*a) *Le développement du virus en cycle unique (fig. 1 à 5).*

La multiplication du virus de la peste porcine dans les conditions de cycle unique qui est maintenant bien connue (AYNAUD, 1968) présente les caractéristiques suivantes :

- La phase de latence a une durée de 3 à 7 heures selon les souches ;
- La phase de croissance exponentielle se termine entre la dixième et la vingt-cinquième heure également selon les souches ;
- à la suite du changement dans la pente de la courbe à la fin de la phase de

croissance exponentielle, on observe une augmentation progressive du titre infectieux indiquant une production continue de virus par les cellules infectées.

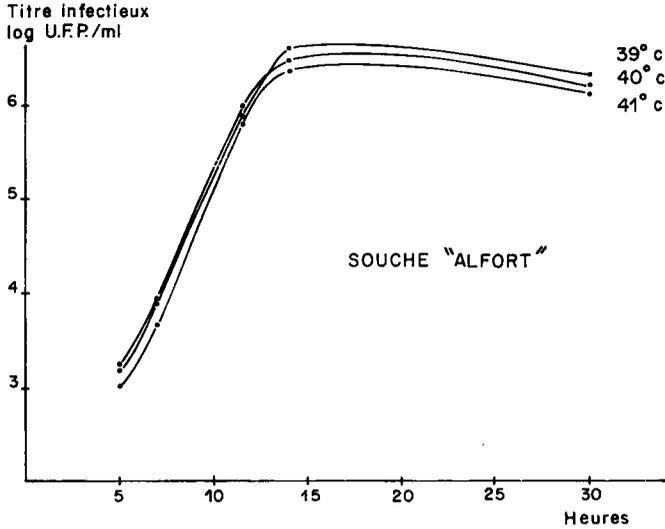


FIG. 1. — Souche « Alfort ». Multiplication en cycle unique (multiplicité d'infection de 10 UFP/cellule)

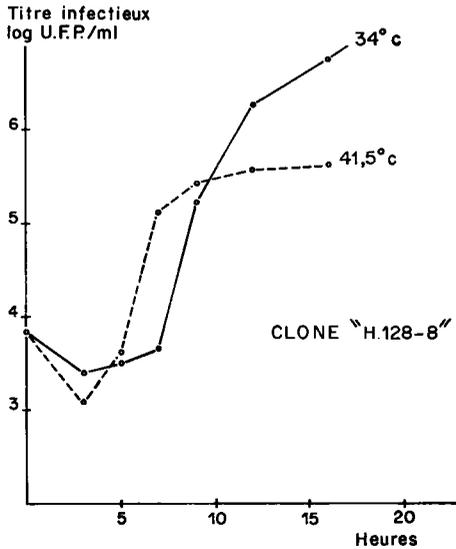


FIG. 2. — Clone « H.128.8 » Multiplication en cycle unique (multiplicité d'infection de 10 UFP/cellules)

Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par MENGELING (1969) et par DANNER (1970).

La production de virus se prolonge ainsi pendant plusieurs jours après l'infection

des cellules. Le virus se multiplie dans les cellules hôtes sans causer de dommages apparents susceptibles de provoquer un effet cytopathogène ou même d'arrêter la multiplication cellulaire ; ce qui pourrait expliquer pourquoi, au cours du cycle unique

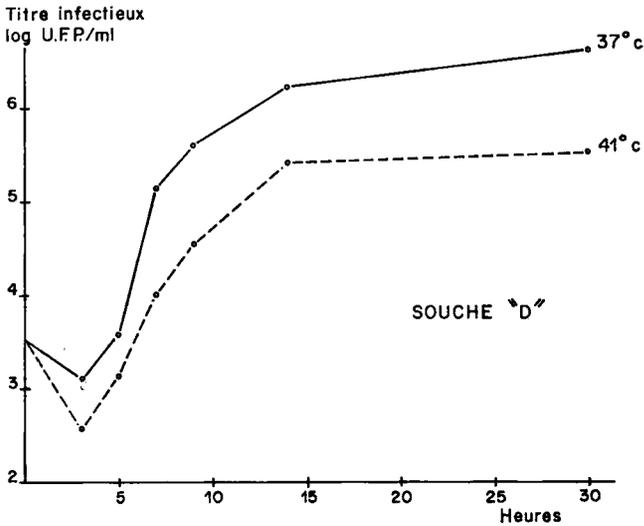


FIG. 3. — Souche « D ». Multiplication en cycle unique (multiplicité d'infection de UFP/cellule)

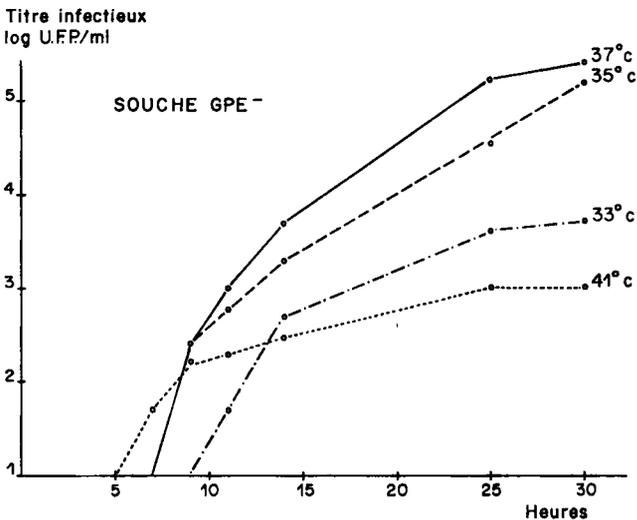


FIG. 4. — Souche « GPE<sup>-</sup> ». Multiplication en cycle unique (multiplicité d'infection de 5 UFP cellule)

on n'observe aucune différence dans la cinétique d'incorporation d'uridine-<sup>14</sup>C entre des cellules « PK 15 » infectées en suspension et des cellules témoins placées dans les mêmes conditions (LEJOLLY, 1971).

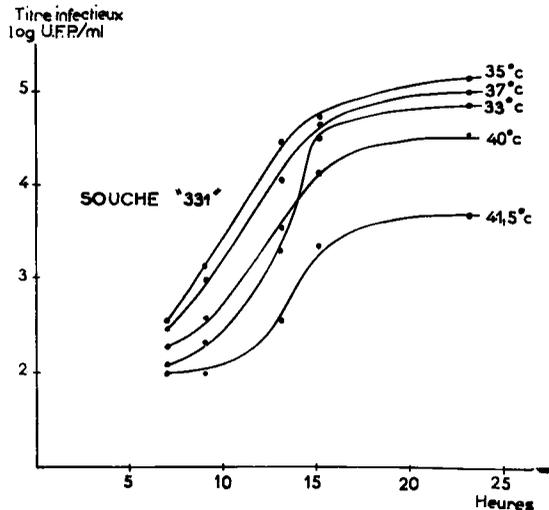


FIG. 5. — Souche « 331 ». Multiplication en cycle unique (multiplicité de 10 UFP/cellule)

Par ailleurs, des observations au microscope électronique réalisées à partir de coupes ultrafines de cellules « PK 15 », infectées en cycle unique, révèlent une faible production de particules virales au niveau de chaque cellule (SCHERRER, 1970).

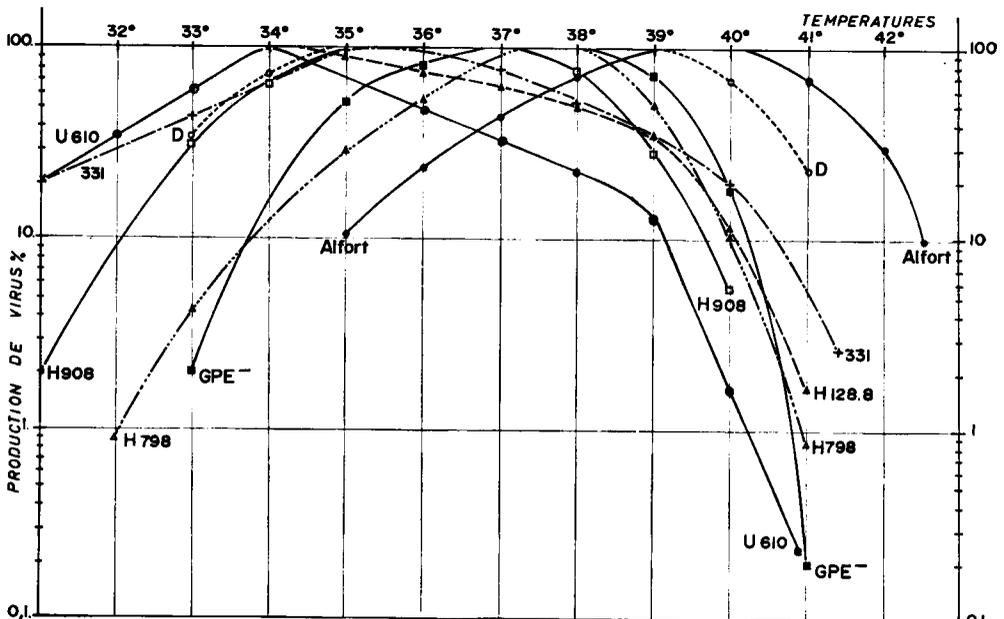


FIG. 6. — Influence de la température d'incubation sur le rendement de la production de particules infectieuses de diverses souches et clones du virus de la peste porcine. Détermination de la température optimale et du «  $r_t$  ».

b) *Le rendement thermique* (fig. 6).

Nous avons comparé divers mutants quant aux modalités de leur développement en fonction de la température, en nous intéressant à l'étude de la température optimale de développement et au *rt* défini selon LWOFF.

1. *La température optimale de développement.*

Les virus sauvages pleinement virulents pour le porc (souche Alfort) présentent une température optimale de développement de 39°-40°C.

La plupart des autres virus étudiés possèdent une température optimale inférieure à 39°C, excepté la souche « D ».

Les clones « H 128 8 », « U 610 » et la souche « GPE<sup>-</sup> », qui sont complètement atténués pour le porc, ont respectivement des températures optimales de 33°, 34° et 37°-38°C.

Les clones « H 798 », « H 908 » et la souche « 331 », qui sont encore un peu virulents pour le porc, ont respectivement des températures optimales de 37°-38°C, 35°-38°C et 35°C.

La souche « D », qui est un vaccin du commerce, possède une température optimale située dans une zone large de température (35°-39°C).

La température optimale de développement est un caractère en relation avec le pouvoir pathogène car les souches les plus chaudes sont les plus virulentes et inversement, les plus froides sont celles qui ont perdu tout pouvoir pathogène pour le porc. Cependant, entre ces deux extrêmes la situation semble plus complexe.

Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs d'identification *in vitro* interviennent dans la détermination du pouvoir pathogène.

2. *Le « rt ».*

Le virus sauvage (souche « Alfort ») possède un *rt* (température supra-optimale correspondant à une diminution de 90 p. 100 dans la production de virus) de 42,5°C, tandis que la majorité des virus ayant plus ou moins perdu le pouvoir pathogène pour le porc ont des *rt* situés entre 39,5° et 40,5°C.

Tous les *rt* étudiés jusqu'à présent sont donc localisés dans une étroite zone de température et nous n'avons jamais encore isolé de clone dont le *rt* soit inférieur à 39°C.

Pour la souche « D », nos résultats indiquent que son *rt* serait supérieur à 41°C, ce qui la rapprocherait de la souche « Alfort ».

3. *La vitesse de multiplication.*

Nous avons observé que pour certaines souches formant de grandes plages fortement fluorescentes, les titres infectieux au cours des passages en séries en culture cellulaire se maintenaient régulièrement autour de 10<sup>7</sup> UFP (souche Alfort), alors que pour d'autres formant des petits foyers de cellules faiblement fluorescentes, les titres infectieux ne dépassent jamais 10<sup>5</sup> UFP (souche chinoise « Suvac »). KORN avait déjà montré en 1967 qu'il était délicat de mettre en évidence en culture cellulaire des souches faiblement virulentes dont le développement est lent *in vitro*.

Ces observations suggèrent l'existence de relations entre la taille des plages,

l'intensité de la fluorescence, les titres infectieux maximum obtenus dans les conditions optimales et la durée du cycle.

Nous avons donc rassemblé arbitrairement tous ces caractères sous le terme de vitesse de multiplication.

En effet, bien que le terme de vitesse de multiplication soit impropre dans le contexte présent par rapport à sa définition précise, à défaut d'un autre nous avons pourtant choisi ce terme qui reflétait mieux l'ensemble de nos observations.

En raison de la très faible production de virus observée au cours des passages en culture cellulaire dans le cas de la souche « Suvac » (les titres infectieux sont toujours inférieurs ou égaux à  $10^5$  UFP/ml), il ne nous a pas été possible d'aborder l'étude du développement de ce virus en cycle unique.

En revanche, dans le cas de la souche « GPE<sup>-</sup> » et de la souche « 331 », les titres infectieux maximum atteignent  $10^6$  UFP/ml sans toutefois les dépasser ; après concentration par le polyéthylène glycol (Carbovax 6000) à 10 p. 100 il nous a été possible d'entreprendre l'étude du cycle de ces deux souches de virus. Il faut rappeler que l'on obtient facilement  $10^7$  et même plus avec la souche « Alfort ».

A la différence de tous les autres virus dont la multiplication est aussi rapide que celle du virus sauvage « Alfort », la souche GPE<sup>-</sup>, la souche « O », la souche « 331 » et la souche « Suvac » se multiplient lentement en culture cellulaire (fig. 4 et 5).

La souche GPE<sup>-</sup> présente un cycle de développement plus long que tous les autres virus étudiés dans les mêmes conditions (fig. 4).

De même, la souche « 331 » a une phase de latence de 6 heures environ et les titres infectieux maximums obtenus en cycle unique à la température optimale ne dépassent pas  $10^5$  UFP (fig. 5).

De plus les plages observées avec ces deux souches sont de taille réduite et la fluorescence est faible.

Dans le cas de la souche « Suvac » (Fig. 7) on observe également de minuscules plages constituées de 1 à 2 cellules faiblement fluorescentes, alors que dans les mêmes condi-

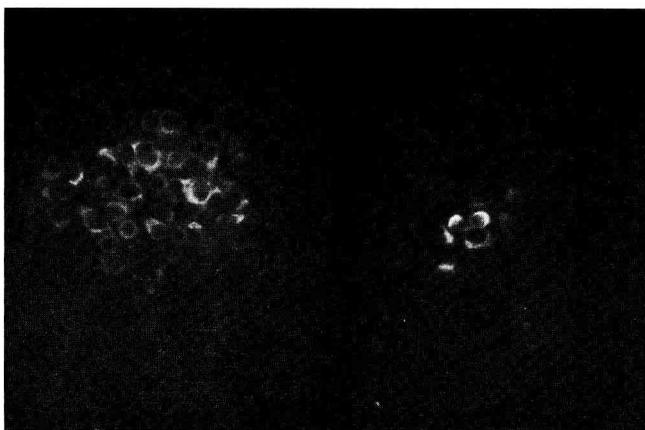


FIG. 7. — Taille des plages de cellules fluorescentes obtenues dans les cellules PK15, après vingt-quatre heures d'incubation à 37°.

à gauche : grande plage obtenue avec la souche sauvage « Alfort »

à droite : petite plage obtenue dans les mêmes conditions avec la souche lapinisée dite « chinoise » (Suvac).

tions de temps et de température les virus dont le cycle est court provoquent la formation de grandes plages constituées de 30 à 50 cellules fortement fluorescentes.

La vitesse de multiplication constitue donc un marqueur facile à étudier par la recherche de la taille des plages ou du niveau maximum de la production de particules infectieuses dans les cellules « PK 15 ».

Toutefois, parmi les virus caractérisés par une multiplication lente en culture cellulaire, on rencontre non seulement des virus complètement atténués comme la souche « Suvac », la souche « GPE<sup>-</sup> » et la souche « O », mais aussi des virus encore faiblement pathogènes comme la souche « 331 ».

Ces faits suggèrent que la vitesse de multiplication n'est pas le seul facteur d'identification *in vitro* intervenant dans l'expression du pouvoir pathogène du virus pour le porc.

## 2. — La résistance du pouvoir infectieux du virus à la chaleur (56°C)

### a) Influence de différents sels sur la cinétique d'inactivation à 56°C du virus de la peste porcine (fig 8).

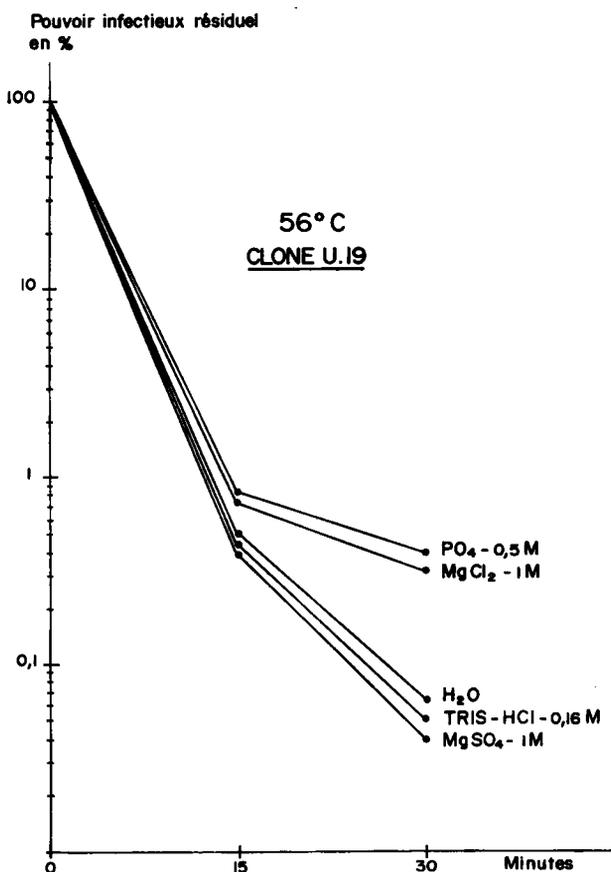


FIG. 8. — Influence des sels sur la cinétique d'inactivation à 56°C du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine

Avant de rechercher les relations entre la stabilité du virus à 56°C et le pouvoir pathogène pour le porc, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux conditions de l'inactivation du virus en fonction de la composition en sels du milieu.

On sait en effet que des concentrations élevées (WALLIS, 1962), de l'ordre de la molarité, en cations  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  et  $Na^+$  exercent une intense influence stabilisatrice lors du traitement des entérovirus à 50°C pendant une heure ; par contre, les mêmes cations augmentent l'inactivation des virus enveloppés, comme les myxovirus, les arbovirus et les herpesvirus (WALLIS, 1965).

On sait également que le sulfate de magnésium et l'ion phosphate stabilisent respectivement les myxovirus et les arbovirus (MAYER, 1966).

Nous avons donc voulu rechercher l'influence de ces divers sels sur la thermostabilité à 56°C du virus de la peste porcine qui est maintenant rattaché aux togavirus (HORZINEK, 1969). Dans ce but nous avons étudié la cinétique d'inactivation à 56°C du pouvoir infectieux du clone U 19 du virus de la peste porcine en fonction de la présence des sels.

Nous avons choisi le tampon phosphate (0,5 M, pH 7,6), le chlorure de magnésium (1 M) et le sulfate de magnésium (1 M) dans du tampon *Tris*-HCl (0,16 M).

Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives dans la cinétique d'inactivation réalisée à partir du virus dilué au 1/10 dans l'eau distillée ou dans le tampon *Tris*-HCl (0,16 M) additionné de sulfate de magnésium (1 M).

Seul le tampon phosphate (0,5 M, pH 7,6) et le chlorure de magnésium exerceraient une légère influence stabilisatrice à 56°C en trente minutes sur le virus.

Toutefois la différence observée (1. log) par rapport au témoin en eau distillée est négligeable par rapport à celle (4. log) observée par MELNICK (1962) avec les entérovirus.

De ces résultats il ressort donc que les sels étudiés ont peu ou pas d'influence sur la thermostabilité à 56°C du virus de la peste porcine.

#### b) *Relations entre la résistance du virus à 56°C et son pouvoir pathogène pour le porc* (fig. 9).

Au moyen de la cinétique d'inactivation du pouvoir infectieux à 56°C nous avons pu comparer quinze virus entre eux.

Parmi ceux-ci certains sont pleinement pathogènes pour le porc (souche « Alfort », souche « ALD »), d'autres possèdent un pouvoir pathogène résiduel (P 18, H 41, H 104, H 908, 331, D) et d'autres enfin sont complètement atténués (souche chinoise « Suvac », « O », U 14, U 19, GPE<sup>-</sup>, U 610 et U 128.8).

Les épreuves de résistance à la chaleur permettent de classer les virus étudiés en trois groupes :

##### *Groupe I.*

Ce groupe comprend des virus qui subissent une baisse de titre infectieux de 1,6 log environ après 30 minutes d'inactivation à 56°C. C'est le cas des deux souches sauvages virulents Alfort et ALD.

##### *Groupe II.*

Les virus de ce groupe subissent une perte de titre infectieux de 2 à 2,7 log environ. C'est le cas des clones isolés à 29°C (H 41, H 104, H 798), du virus P 18 isolé à

37°C en culture cellulaire, des souches de vaccin « D », « S », « O », de la souche chinoise « Suvac » et de la souche « 331 ».

Ce groupe est hétérogène à l'égard du pouvoir pathogène pour le porc, car il est constitué aussi bien de virus encore pathogènes comme le virus H 41 et 331 que de virus complètement atténués comme la souche chinoise.

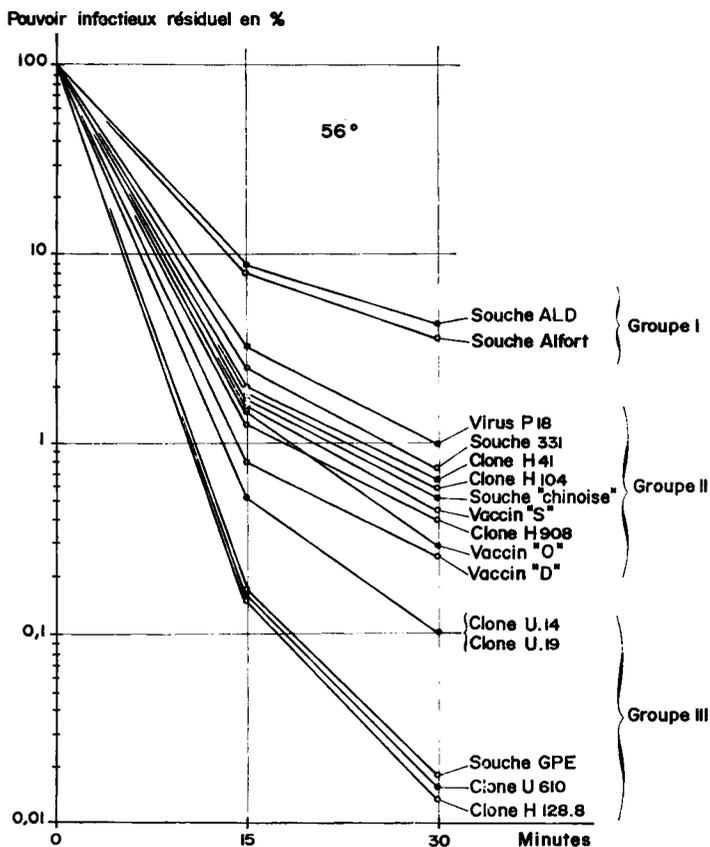


FIG. 9. — Cinétique d'inactivation à 56°C du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine  
Étude comparée de divers virus

### Groupe III.

Les virus de ce groupe sont rapidement inactivés à 56°C puisqu'ils subissent une perte de titres infectieux de 3 à 4. log après trente minutes. C'est le cas des clones (U 14, U 19, H 128.8 et U 610) isolés au laboratoire et de la souche GPE<sup>-</sup>.

Les virus de ce groupe III ont tous été obtenus par sélection et clonage à 29°C. Ce sont des mutants froids complètement atténués pour le porc et qui sont caractérisés par une grande fragilité du pouvoir infectieux vis-à-vis de la chaleur (56°C).

### 3. — La résistance du pouvoir infectieux du virus en fonction du pH

#### a) Cinétique d'inactivation du pouvoir infectieux du virus à pH acide (fig. 10).

Nous avons étudié la cinétique d'inactivation des souches ALD et Alfort ainsi que du clone U 610, à pH 1,6 dans le tampon Mac Ilvaine.

Pendant les cinq premières minutes du séjour dans le tampon acide on assiste à une brutale diminution du pouvoir infectieux correspondant à une perte de 2 log. environ qui est suivie d'un plateau indiquant la survie dans la population virale d'une fraction résistante.

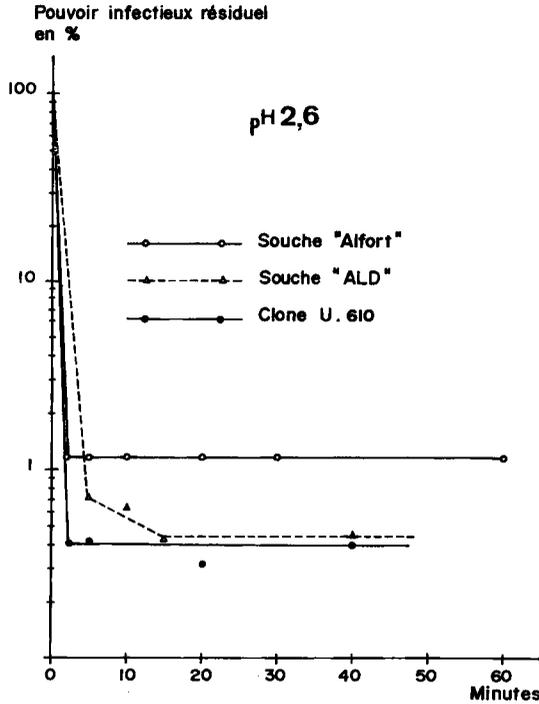


FIG. 10. — Cinétique d'inactivation à pH 2,6 (tampon Mac Ilvaine) du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine. Étude comparée de trois virus

Ce phénomène assez général qui est observé pour d'autres virus comme celui de la fièvre aphteuse à pH 6 (BACHRACH, 1957) serait plus lié à une hétérogénéité phénotypique que génétique.

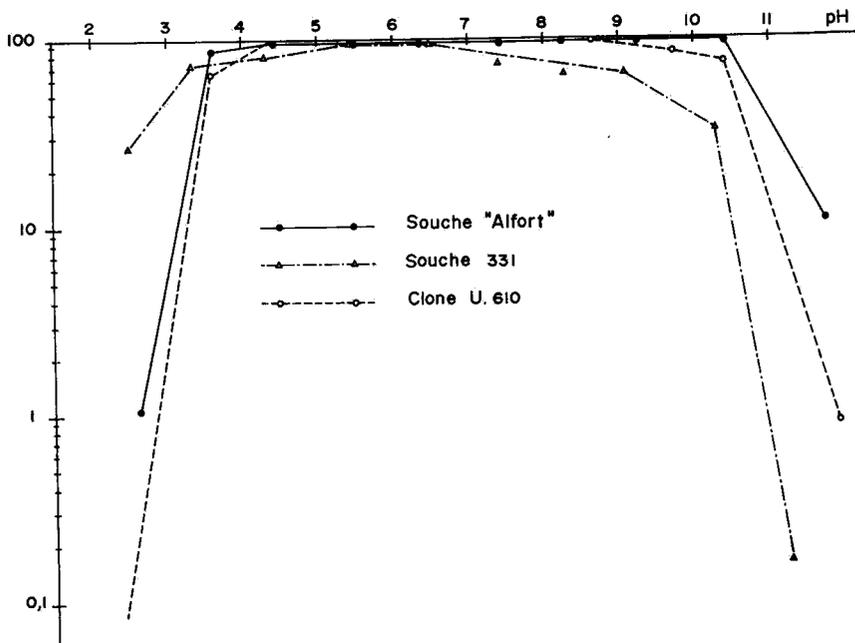
Nos résultats indiquent que les 3 virus étudiés s'inactivent à pH 2,2 apparemment de la même manière.

b) *Relations entre la stabilité du virus en fonction du pH et de son pouvoir pathogène pour le porc (fig. 11 et 12).*

Dans le cas du virus de la fièvre aphteuse, ASSO (1966) a montré que des mutants fragiles à 56°C étaient également rapidement inactivés à pH 6,4 alors que dans les mêmes conditions le virus sauvage pathogène s'avère résistant à 56°C et à pH 6,4.

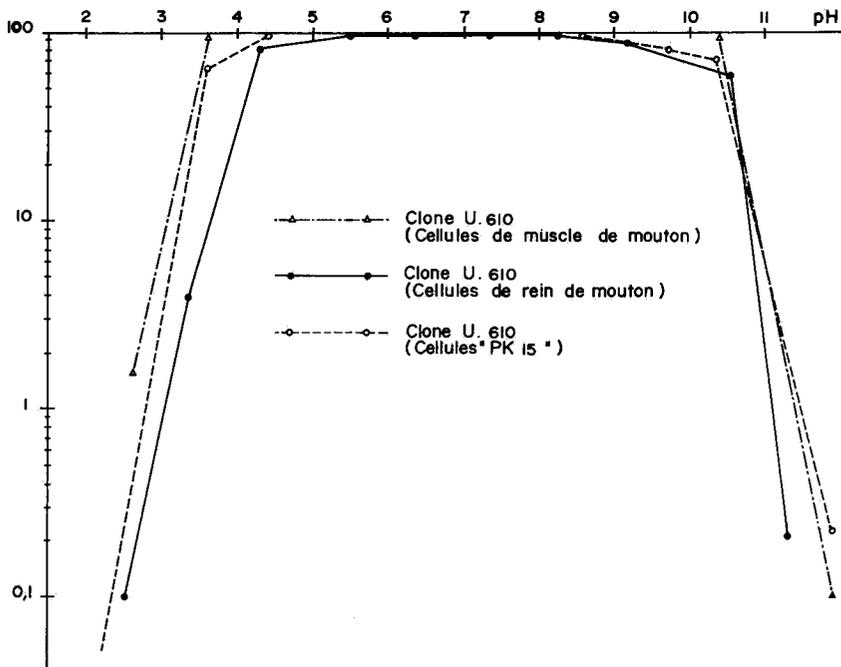
Dans cette optique, nous avons voulu étudier la stabilité du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine en fonction du pH, de manière à vérifier si, dans certaines zones de pH, il était possible de différencier facilement à l'aide de l'inactivation les virus pathogènes des virus atténués.

Pour chaque clone, nous avons choisi d'incuber pendant quarante minutes à la



Pouvoir infectieux résiduel  
après 40 minutes

FIG. 11. — Stabilité du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine en fonction du pH  
Étude comparée de trois virus



Pouvoir infectieux résiduel  
après 40 minutes

FIG. 12. — Stabilité du pouvoir infectieux du virus de la peste porcine (clone U 610)  
en fonction du pH. Influence de la cellule hôte

température de la glace fondante des aliquotes de virus dans dix solutions du même tampon, mais à des pH différents s'échelonnant de pH 2,4 à pH 11,8. En d'autres termes, nous avons recherché après inactivation, le titre infectieux résiduel de la fraction résistante dans la zone du plateau mise en évidence au cours de l'étude de la cinétique.

Les résultats obtenus ont été les suivants :

La souche sauvage virulente « Alfort », la souche « 331 » et le clone U 610 se révèlent remarquablement stables de pH 3,5 à pH 10,5 dans nos conditions de travail (fig. 11).

Dans le cas de la souche « 331 » la stabilité optimum observée entre pH 5 et pH 6 doit vraisemblablement correspondre à la stimulation du pouvoir infectieux du virus à pH 5, phénomène que COLLINS (1960) avait déjà remarqué avec des souches virulentes.

Ces résultats indiquent que, de façon générale, le virus de la peste porcine s'avère stable dans une large zone de pH et qu'il semble illusoire d'espérer différencier les souches virulentes des souches atténuées à l'aide de la stabilité de leur pouvoir infectieux entre ces deux pH.

Toutefois, à pH 2,6 et à pH 11,8, nous avons observé des différences, d'une part entre souches virulentes et souches atténuées dont la production virale est réalisée sur cellules PK 15 et, d'autre part entre trois suspensions virales du clone U 610 produites respectivement sur cellules PK 15, sur cellules de rein de fœtus de mouton et sur cellules de muscle de fœtus de mouton (fig. 12).

Mais il convient d'ajouter qu'il n'est pas possible d'apprécier la valeur significative de ces différences obtenues à des pH aussi extrêmes où des variations importantes peuvent aisément survenir. La stabilité du pouvoir infectieux du virus en fonction du pH ne peut donc pas être retenue comme facteur d'identification.

#### 4. — *Pouvoir pathogène pour le porc des différents virus étudiés* (tabl. 1 et 2)

Les virus du groupe I, virus « chauds » et résistants, se révèlent hautement pathogènes puisqu'ils provoquent en huit à quinze jours la mortalité des porcs accompagnée de tout le cortège des signes cliniques habituels.

Le groupe II est hétérogène vis-à-vis du pouvoir pathogène pour le porc puisqu'il comprend des virus causant de la mortalité (H 41), des virus doués de virulence résiduelle plus ou moins intense <sup>(1)</sup> (P 18, H 104, H 908) et des virus complètement atténués (souche chinoise « Suvac »). Ce groupe comprend par ailleurs les souches de vaccin vivant « D » et « O » ainsi que la souche « 331 » isolée par MENGELING, responsable de l'évolution des formes chroniques de la maladie chez les jeunes porcelets.

Inoculés aux porcs, les clones H 104 et H 908 provoquent une hyperthermie assez élevée (41°-41,5°C) accompagnée ou non d'anorexie, mais aucune mortalité n'est observée dans ce cas.

La souche lapinisée chinoise « Suvac », complètement atténuée pour le porc, est connue pour ses propriétés *in vivo* (AYNAUD, 1970).

<sup>(1)</sup> Se traduisant chez l'animal par de l'anorexie et de l'hyperthermie.

TABLEAU I

Origine des clones « 29 » isolés au laboratoire à partir de la souche sauvage virulente « Alfort » au moyen de passages en série en dilution limite à 29°C dans les cellules « PK 15 »

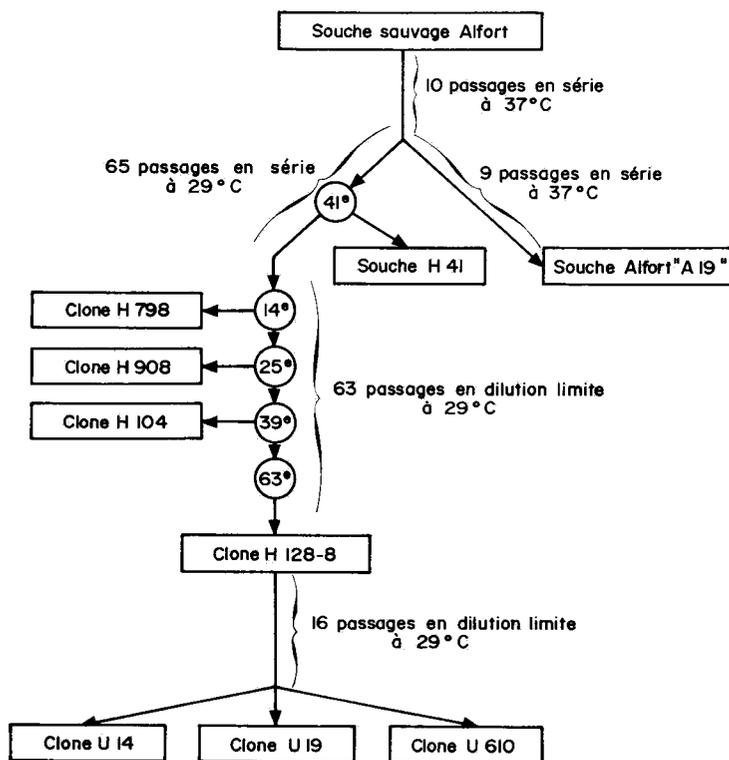


TABLEAU 2

Pouvoir pathogène et immunogène des divers virus étudiés

Virus	Nombre de porcelets inoculés	Pouvoir pathogène				Pouvoir Immunigène
		Hyperthermie	Signes cliniques	Mortalité	Virémie	
Alfort.....	10	10/10	+++	10/10	+	
ALD.....	10	10/10	+++	10/10	+	
H 41.....	10	10/10	++	6/10	ND	+
H 798.....	10	10/10	++	1/10	ND	+
H 908.....	20	20/20	+	5/20	ND	+
H 104.....	30	25/30	±	0/30	+	+
H 128-8.....	10	2/10	—	0/10	—	+
U 19.....	14	2/14	—	0/14	±	+
Suvac 16.....	9	0/9	—	0/9	ND	+
Suvac 25.....	9	0/9	—	0/9	ND	+
U 610.....	170	0/170	—	0/170	—	+

Le groupe III, constitué exclusivement par des virus « froids » rapidement inactifs à 56°C (clones U 14, U 19, U 610, U 128.8 et souche GPE-), est bien homogène puisque tous les virus étudiés appartenant à ce groupe ont perdu le pouvoir pathogène pour le porc en conservant le pouvoir immunigène.

Inoculés au porc même à des doses de 10<sup>8</sup> UFP, ces virus ne provoquent même plus d'hyperthermie et la virémie est peu ou pas décelable.

## DISCUSSION

Notre discussion portera, d'une part sur la valeur des différents marqueurs étudiés et, d'autre part sur leur signification.

### I. — Valeur des marqueurs étudiés comme facteur d'identification

#### a) Le « *rt* ».

Le virus sauvage « Alfort » possède un *rt* élevé (42,5°C). Le *rt* mesuré dans ce système *in vitro* ne serait peut-être qu'un *rt* apparent inférieur au *rt* réel, d'autant plus que nous sommes en présence d'un virus dont le cycle est long (15 heures) par rapport à celui de la fièvre aphteuse (4 heures), par exemple, et l'on peut se demander si un tel rendement mesuré en fin de cycle (vers la quinzième heure) est inférieur à une valeur supposée réelle en raison des conditions thermiques du milieu qui sont défavorables à la cellule hôte. Tous les virus étudiés dans ce travail possèdent un *rt* supérieur à 39,5°C. Il est par conséquent difficile de baser un facteur d'identification sur le *rt* dont la valeur subit peu de variations en fonction des souches. Car des mutants complètement atténués (U 128.8 et GPE-) et certains encore pathogènes (H 798, H 104) ont des *rt* de valeur semblable.

De même, dans le cas des mutants froids comme le clone H 128.8 et le clone U 610 isolés au laboratoire, le *rt* observé n'est peut-être qu'un *rt* apparent supérieur au *rt* réel en raison de l'absence d'inhibition des synthèses cellulaires à la suite de l'infection virale. L'intense métabolisme des cellules PK 15 vers 37°-38°C pourrait entraîner avec lui la production de virus qui lui est étroitement liée. Pour vérifier cette hypothèse, il nous faudrait étudier la température optimale de culture des cellules PK 15 et rechercher le *rt* de chacun des virus en présence d'un inhibiteur des synthèses cellulaires.

#### b) La température optimale de développement.

La température optimale de développement constitue un marqueur qui est bien lié au pouvoir pathogène car les souches les plus froides sont aussi celles qui sont dépourvues de virulence pour le porc. C'est le cas pour le virus de la poliomyélite (DUBES, 1956 ; LWOFF, 1960), le virus de la fièvre aphteuse (ASSO, 1967), le virus de la peste équine (MIRCHAMSY, 1967), le virus de la rougeole (HOZINSKY, 1966), le virus de l'influenza (MACKENZIE, 1969) et le virus de la vaccine (KIRN, 1964).

Le virus sauvage « Alfort » possède une température optimale de développement élevée qui correspond à la température interne du porc (39,5°C). On connaît ainsi

d'autres exemples de virus dont la température optimale est élevée tel que celui de la peste aviaire (39°C) ou mieux celui de la maladie de Newcastle (42°C) qui correspond bien à la température interne des volailles (41°-42°C) (RUIZ-GOMEZ, 1963).

S'il y a peu de différences entre les souches au niveau du *rt* (excepté pour les souches pleinement virulentes), la détermination des températures optimales permet par contre d'observer des différences assez prononcées entre les souches.

Le virus sauvage virulent dont le *rt* est de 42,5°C a une température optimale de 39°-40°C. La souche « D », obtenue sans aucun clonage par passage en série à 37°C en culture cellulaire, a un *rt* de 41,5°C et une température optimale étalée de 35° à 39°C ce qui suggère une hétérogénéité génétique dans la population de virus. Tous les autres mutants dont le *rt* est situé entre 39,5°C et 40,5°C présentent des températures optimales de développement qui s'échelonnent de 33°-34°C pour les clones U 128.8 et U 610, 35°-36°C pour la souche « 331 », jusqu'à 37°-38°C pour le clone H 798 et la souche GPE<sup>-</sup>.

On peut ainsi distinguer les souches chaudes douées d'un intense pouvoir pathogène pour le porc et des souches froides ayant perdu en partie ou en totalité leur pouvoir pathogène. La température optimale de développement semble donc un bon marqueur permettant de caractériser une souche. Mais nous avons vu qu'il n'est pas le seul à intervenir dans l'expression de la virulence.

#### c) *La vitesse de multiplication.*

La température optimale n'est pas le seul marqueur à intervenir car le clone H 798 et la souche GPE<sup>-</sup>, qui possèdent le même *rt* et la même température optimale, diffèrent profondément par leurs propriétés à l'égard du porc. L'un provoque encore de la mortalité (H 798) tandis que l'autre (GPE<sup>-</sup>) est inoffensif. De plus, si l'on considère la vitesse de multiplication, le clone H 798 se multiplie rapidement et intensément (cycle court) en formant de grandes plages en culture cellulaire, tandis que la souche GPE<sup>-</sup> se multiplie lentement (cycle long) avec des titres infectieux peu élevés en formant des plages de taille réduite. Vis-à-vis de la résistance à 56°C, le clone H 798 appartient au groupe II, tandis que la souche GPE<sup>-</sup> appartient au groupe III.

Inversement, bien que se multipliant lentement en culture cellulaire la souche 331 qui appartient au groupe II se révèle encore pathogène pour le porc.

Par ailleurs, la souche chinoise « Suvac » et la souche « O », qui se multiplient lentement en culture cellulaire, sont des virus totalement dépourvus de pouvoir pathogène pour le porc.

La vitesse de multiplication *in vitro* est certainement en rapport avec le pouvoir pathogène pour l'animal sensible. C'est cependant un marqueur complexe puisque le rendement en virus dans les conditions optimales, la durée du cycle et la taille des plages obtenues interviennent dans son expression. De plus, il semble bien qu'il ne soit pas non plus le seul à intervenir.

#### d) *La résistance du pouvoir infectieux à 56°C.*

La résistance à la chaleur constitue un marqueur qui est bien en relation avec le pouvoir pathogène puisque les souches les plus fragiles sont aussi celles qui sont dépourvues de virulence pour le porc. C'est le cas du virus de la poliomyélite (PAPAEVANGELOU, 1961; YOUNGER, 1957), du virus de l'encéphalite de l'Europe centrale (MAYER, 1965) et du virus de la fièvre aphteuse (ASSO, 1966).

Du fait de leur grande fragilité, les virus du groupe III sont instables dans le milieu extérieur où ils sont rapidement inactivés. Leur diffusion dans l'organisme en est donc limitée. La stabilité du virus à la chaleur est un nouveau marqueur intervenant dans le pouvoir pathogène. La mise en œuvre aisée de ce test au moyen d'un chauffage pendant trente minutes à 56°C constitue un facteur d'identification facile à rechercher. Il faut remarquer que l'acquisition de la fragilité du pouvoir infectieux à 56°C s'accompagne pour les souches se multipliant rapidement d'un abaissement notable de la température optimale de développement.

Au cours des passages à 29°C, nous avons sélectionné des virus qui sont à la fois froids et fragiles. Toutefois, le petit nombre de virus étudiés jusqu'à présent nous empêche d'étayer plus solidement cette observation.

e) *La stabilité du pouvoir infectieux en fonction du pH.*

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives concernant la stabilité en fonction du pH entre les diverses souches de virus qui se comportent apparemment toutes de la même façon entre pH 3,5 et pH 10,5 ; ce qui indique que le pouvoir infectieux du virus est remarquablement stable. On savait déjà que le pouvoir infectieux du virus est non seulement stable (KUBIN, 1967), mais est stimulé dans certaines conditions à pH 5 (COLLINS, 1960).

## 2. — Signification des marqueurs étudiés

a) *Le rendement thermique et la température optimale de multiplication.*

Ces marqueurs sont directement liés aux conditions de la synthèse du virion comme l'ont montré les travaux réalisés avec le virus de la poliomyélite (LWOFF, 1960) et avec le virus de la fièvre aphteuse (ASSO, 1967). L'élaboration d'une particule infectieuse met en jeu, d'une part la synthèse et l'activité de l'ARN-polymérase propre à l'acide nucléique viral et, d'autre part la synthèse des protéines de structure et leur assemblage selon une morphologie précise (DELAGNEAU, 1970 ; SCHERRER, 1971).

b) *La vitesse de multiplication.*

Ce marqueur est matérialisé *in vitro* surtout par la taille des plages observées vingt-quatre heures après l'infection. La relation entre la taille des plages et la virulence est connue pour d'autres virus. Ainsi pour certains myxovirus parainfluenza comme le virus de Newcastle (SCHLOER, 1968) ou celui de la rougeole (RAPP, 1964), le caractère « petite plage » semble lié à la perte de la virulence. Dans le cas du virus de la rougeole, la taille des plages, employée dans certaines conditions pour différencier *in vitro* les virus pathogènes des virus atténués, serait liée à la sensibilité particulière de ces mutants à l'interféron (MYRCHAMSY, 1969).

Concernant la peste porcine, tous les virus se multipliant rapidement *in vitro* ont été adaptés, sélectionnés et clonés uniquement sur des cellules d'origine porcine, tandis que les virus caractérisés par une multiplication lente ont été sélectionnés sur des systèmes hétérologues par rapport au porc : la souche « Suvac » a subi de très nombreux passages sur lapin (500 à 600), la souche « O » a été obtenue par passages sur lapin, suivis de passages sur cellules rénales de lapin, puis sur cellules rénales de

mouton ; enfin la souche GPE<sup>-</sup> a subi des passages nombreux sur cellules de testicules de bovins, suivis par des passages à 30°C sur cellules rénales de cobaye.

Dans ce dernier cas, il faut remarquer que la souche GPE<sup>-</sup> qui se multiplie lentement en culture cellulaire présente en même temps une très grande fragilité à 56°C, du même ordre que celle observée avec les clones U 610 et H 128.8 qui eux, par contre, se multiplient rapidement *in vitro*. On sait qu'il existe des variations dans le développement d'un même virus, d'un système cellulaire à l'autre. Les cultures de cellules de moustiques permettent au virus Sindbis de se multiplier à 28°C avec un rendement identique à celui obtenu dans des cellules de vertébrés incubées à 37°C (STEVENS, 1970). LABB (1969) a également montré que la sensibilité du développement viral à la température est fonction, d'une part de la thermosensibilité propre de chaque souche de virus et, d'autre part du système cellulaire utilisé. On pourrait donc supposer qu'au cours des très nombreux passages sur des systèmes cellulaires hétérologues, on sélectionne des mutants bien différents de ceux que l'on obtiendrait dans un système homologue. Dans cette optique, un virus lapinisé pourrait être à l'origine de la souche 331 isolée dans un foyer de peste porcine subaiguë aux U. S. A.

c) *La stabilité du pouvoir infectieux à 56°C et en fonction du pH.*

A la lumière des résultats obtenus avec le virus de la fièvre aphteuse (ASSO, 1967), avec le virus Sindbis (SIMPSON, 1969 ; BURGE, 1966), ou avec le virus de l'encéphalite de l'Europe centrale (MAYER, 1965), les différences de thermostabilité du pouvoir infectieux observé à 56°C entre les diverses souches du virus de la peste porcine sont vraisemblablement en rapport avec des modifications de structure au niveau des protéines du virion. L'inactivation à 56°C atteint essentiellement les protéines du virion (DIMMOCK, 1967), mais il n'est pas possible encore de savoir si, dans notre cas, c'est la protéine du core ou celle de l'enveloppe qui sont touchées par l'action de la chaleur.

L'effet inactivant du pH s'exerçant du niveau des surfaces externes du virus surtout quand il est enveloppé, nous avons tenté de rechercher si l'inactivation par les solutions acides ou basiques permettrait de révéler des différences entre virus résistants et virus fragiles à 56°C, ce qui conduirait à conclure à la présence de structures différentes au niveau des protéines de l'enveloppe.

Malheureusement, toutes les souches étudiées se révèlent stables entre pH 3,5 et pH 10,5. Les différences observées, au-delà de ces deux limites, n'ont pas une grande valeur significative en raison des valeurs extrêmes des pH (2,6 et 11,8). Toutefois, si des différences pouvaient être mises en évidence pour un même clone produit sur des systèmes cellulaires différents (rein de porc, rein et muscle de mouton, muscle de veau), on pourrait supposer l'existence de variations de structure (lipides) au niveau de l'enveloppe vraisemblablement d'origine phénotypique comme cela a déjà été observé dans le cas du virus de l'influenza (HASPEL, 1971) ou du virus de Newcastle (DRAKE, 1962).

Dans le cas du virus de l'encéphalite de l'Europe centrale (MAYER, 1965) ou du virus Sindbis (BOSE, 1970), une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions a permis de mettre en évidence des différences dans la charge électrique globale au niveau des surfaces externes des virus appartenant aux différents groupes de mutants.

Dans ces deux cas, on a pu montrer que des virus pathogènes et résistants à la

chaleur s'élevaient de la colonne avec des molarités différentes de celles des virus atténués et fragiles. De tels résultats indiquent que la structure de l'enveloppe virale serait modifiée. Mais ceci reste à vérifier à l'aide de cette technique dans notre système.

## CONCLUSION

Nous avons montré qu'il est possible de différencier aisément au laboratoire, sans recourir à l'inoculation au porc, les souches virulentes des souches atténuées du virus de la peste porcine par l'étude de la température optimale de développement, de la vitesse de multiplication dans les cellules PK 15 et de la stabilité du pouvoir infectieux à 56°C (tabl. 3).

Ces trois caractères constituent des facteurs d'identification *in vitro* intervenant dans l'expression du pouvoir pathogène pour le porc. Les résultats obtenus nous permettent de prévoir qu'un virus pleinement virulent pour le porc possédera les propriétés *in vitro* suivantes :

- a) développement optimal dans des conditions de température élevée (39°-40°C) ;
- b) multiplication rapide liée à une production intense de particules infectieuses et à la formation de grandes plages de cellules fluorescentes ;
- c) résistance du pouvoir infectieux à la chaleur (56°C). C'est le cas des souches « ALFORT » et « ALD ».

Par leurs propriétés *in vitro* les virus dépourvus de tout pouvoir pathogène seront classés en deux types :

### *Le premier type.*

- a) développement optimal dans des conditions de température basse (33°-34°C) ;
- b) multiplication rapide liée à une production élevée de particules infectieuses et formation de grandes plages dans les conditions optimales ;
- c) grande fragilité du pouvoir infectieux à 56°C.  
C'est le cas des clones H 128.8 et U 610.

### *Le deuxième type.*

- a) multiplication lente liée à une faible production de particules infectieuses et formation de petites plages ;
- b) fragilité du pouvoir infectieux à 56°C ;
- c) température optimale de développement délicate à déterminer en raison de la faible production de virus.

C'est le cas des souches « O », « Suvac », GPE-.

Par ailleurs, il existe bien une corrélation entre ces caractères *in vitro* et le pouvoir pathogène pour le porc, car des souches (souche « 331 ») situées par leurs propriétés *in vivo* entre les souches virulentes et les souches atténuées occupent également une position identique de par leurs propriétés *in vitro*.

TABLEAU 3  
*Facteurs d'identification du virus de la peste porcine*  
 (Tableau récapitulatif)

Virus	Pouvoir pathogène Pour le porc dans les conditions expérimentales	Température optimale de développement	Cinétique de développement					Résistance à 56°C
			« <i>t<sub>l</sub></i> »	Durée du cycle	Production de virus	Taille des plages		
Alfort .....	++ très pathogène (mortalité)	39°-40°C	42,5°C	15 h	intense ( $\geq 10^7$ )	grandes	Groupe I (résistant)	
ALD .....	++ très pathogène (mortalité)	ND	ND	ND	intense ( $\geq 10^7$ )	grandes		
D .....	} plus ou moins pathogène	35°-39°C	41,5°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes	Groupe II	
P 18 .....		ND	ND	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes		
H 41 .....		ND	ND	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes		
H 104 .....		37°C	40°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes		
H 798 .....		37°-38°C	30°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes		
H 908 .....		35°-37°C	39,5°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes		
331 .....	} plus ou moins pathogène	35°C	40,5°C	20 h	moyenne ( $\approx 10^6$ )	petites	Groupe II Groupe II Groupe II Groupe III Groupe II	
« O » .....		ND	ND	ND	assez faible ( $\leq 10^6$ )	petites		
Suvac .....		ND	ND	ND	faible ( $\leq 10^5$ )	petites		
GPE .....		37°-38°C	40°C	long	assez faible ( $\leq 10^6$ )	petites		
« S » .....		ND	ND	ND	faible	petites		
H 128.8 .....	} non pathogène	33°-34°C	40°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes	Groupe III (fragile)	
U 14-U 19 .....		ND	ND	ND	intense ( $> 10^6$ )	grandes	Groupe III (fragile)	
U 610 .....		33°C	39°-39,5°C	15 h	intense ( $> 10^6$ )	grandes	Groupe III (fragile)	

Nous possédons donc un outil précieux permettant de préparer des souches vaccinales dont on peut contrôler et assurer efficacement l'homogénéité et la stabilité génétique.

Le pouvoir pathogène d'un virus est en rapport avec la quantité de virus produite par chaque cellule infectée, le nombre de cellules atteintes par le virus et par la persistance du virus hors de l'organisme (qui détermine le pouvoir de contagion). Les facteurs évalués *in vitro* : rendement thermique, vitesse de multiplication, stabilité du pouvoir infectieux du virus, interviennent simultanément dans la pathogénie de l'infection.

*Reçu pour publication en janvier 1972.*

## SUMMARY

### SWINE FEVER : *IN VITRO* IDENTIFICATION FACTORS (GENETIC MARKERS) OF THE VIRUS IN RELATION TO PATHOGENICITY FOR THE PIG

*In vitro* identification factors (genetic markers) of swine fever virus have been evaluated using immunofluorescent techniques of virus titration in cell culture in a comparative study of the *in vitro* properties of fully virulent wild virus, weakly virulent virus, cold-attenuated mutants and of various living vaccine strains. The temperature for optimal development, the multiplication rate in « PK 15 » cells and the heat resistance of infectivity at 56°C are the three parameters allowing differentiation of the strains without recourse to inoculation of the pig.

Fully pathogenic viruses are characterized by rapid multiplication connected with intense infective particle production and the formation of large fluorescent cell plaques at about 39-40°C as well as by heat resistance of infectivity at 56°C.

Conversely, non-virulent strains show optimal development at 33-34°C, slow virus multiplication connected with low production of infective particles, formation of small plaques as well as by loss of infectivity at 56°C.

## РЕЗЮМЕ

Классическая чума свиней : факторы идентификации *in vitro* (генетические маркеры) вируса в связи с патогенной способностью у свиньи.

Благодаря технике титрования вируса в клеточной культуре при помощи иммунофлуоресценции, сравнительное изучение свойств *in vitro* дикорастущих вирусов с полной вирулентностью, вирусов с ослабленной вирулентностью, ослабленных холодом мутантов и нескольких штаммов живых вакцин, позволило обнаружить идентификационные факторы (генетические маркеры) *in vitro* вируса классической чумы свиней. Оптимальная температура развития, скорость размножения в клетках «РК 15» и сопротивление инфекционной способности при 56 °С, являются тремя характеристиками, при помощи которых можно различить штаммы, не прибегая к необходимости инокуляции свинье.

Быстрое размножение связано с интенсивностью образования инфекционных частиц и с образованием больших зон флуоресцентных клеток приближаясь к 39-40 °С, также как и сопротивление инфекционной способности при 56 °С характеризуют вполне патогенные вирусы.

Наоборот, оптимальное развитие при 33-34 °С, медленное размножение вируса с слабым образованием инфекционных частиц при образовании маленьких зон, так же как и слабые инфекционные способности при 56 °С характерны *in vitro* для вирусов лишённых патогенной способности для свиней.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AIKEN J. M., HOOPES K. H., RHODES M. B., TWIEHAUS M. J., 1967. Nonspecificity of fluorescent antibody test for distinguishing hog cholera strains. *J. amer. veter. med. ass.*, **150**, 59.
- ASSO J., AYNAUD J.-M., PORTALIER R., 1966. Sensibilité à l'acidité des souches de virus aphteux non pathogènes. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **262**, 585.
- ASSO J., AYNAUD J.-M., PLART M. F., 1966. Étude de quelques mutants de virus aphteux obtenus par culture à basse température. *Ann. Inst. Pasteur*, **110**, 233.
- ASSO J., AYNAUD J.-M., GORHE D., 1966. Rapports entre la résistance à la chaleur et le pouvoir pathogène pour le porc de différents clones de virus aphteux. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **262**, 1604.
- ASSO J., 1967. *Étude de quelques mutants du virus de la fièvre aphteuse*. Thèse de Doctorat ès sciences naturelles, Paris.
- AYNAUD J.-M., 1968. Étude de la multiplication *in vitro* d'un clone du virus de la peste porcine. *Rech. vétér.*, **1**, 25.
- AYNAUD J.-M., 1969. Relations entre la cinétique de développement *in vitro* du virus de la peste porcine et le pouvoir pathogène pour le porc. *Bull. Off. Internation. Épis.*, **72**, 575.
- AYNAUD J.-M., LEJOLLY, J. C., GALICHER C., 1970. Relations entre la résistance à la chaleur et le pouvoir pathogène pour le porc de différents virus de la peste porcine classique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **270**, 1408.
- AYNAUD J.-M., ASSO J., 1970. La souche lapinisée dite « chinoise » du virus de la peste porcine classique. *Rec. Méd. vétér.*, **146**, 119.
- BACHRACH H. L., BREESE S. S., CALLIS J. J., HESSE W. R., PATTY R. E., 1957. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **95**, 147.
- BOSE H. R., CARL G. Z., SAGIK B. P., 1970. Separation of Sindbis virus plaque-type variants by calcium phosphate chromatography. *Arch. ges. Virusforsch.*, **29**, 83.
- BURGE B. W., PFEFFERKORN, E., R., 1966. Isolation and characterization of conditional lethal mutants of Sindbis virus. *Virology*, **30**, 204.
- CHEVILLE N. F., MENGELING W. L., ZINOBER M. R., 1970. Ultrastructural and Immunofluorescent studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera. *Lab. Invest.*, **22**, 458.
- CHEVILLE N. F., MENGELING W. L., 1969. The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever). Histologic immunofluorescent, and electron microscopic studies. *Lab. Invest.*, **20**, 261.
- COLLINS K. E., 1960. Enhancement of infectivity of hog cholera virus. *Amer. J. Veter. Res.*, **21**, 472.
- DANNER K., BACHMANN P. A., 1970. Multiplication and spread of swine fever virus strain Munich-1 in PK 15-cell cultures. *Zbl. Veter.-Med.*, **17**, 353.
- DELAGNEAU J. F., 1970. Effects of temperature on viral RNA synthesis and RNA polymerase activity in a foot-and-mouth disease virus system. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **32**, 318.
- DIMMOCK N. J., 1967. Differences between the thermal inactivation of picornaviruses at « high » and « low » temperatures. *Virology*, **31**, 338.
- DRAKE J. W., LAY P. A., 1962. Host controlled variation in NDV. *Virology*, **17**, 56.
- DUBES G. R., CHAPIN M., 1956. Cold adapted genetic variant of polioviruses. *Science*, **124**, 586.
- DUBES G. R., CHAPIN M., TOLBERT O., 1960. The genetic relationships between the thermostability of poliovirus and its *in vivo* response. *Arch. ges. Virusforsch.*, **10**, 315.
- GORET P., PRECAUSTA P., PERRENOT F., 1971. Étude d'un virus-vaccin modifié contre la peste porcine classique préparé à partir d'une souche « chinoise » adaptée à la culture de cellules rénales d'agneau. *Rec. Méd. vétér.*, **147**, 937.
- HASPEL M. V., SUGIARA A., 1971. Heat stability of influenza viral infectivity as a host-controlled phenotype. *Arch. ges. Virusforsch.*, **35**, 308.
- HORZINEK M., MUSSGAY M., 1969. Studies on the nucleocapsid structure of a group A arbovirus. *J. Virol.*, **4**, 514.
- HOZINSKY V. I., SEIBIL V. B., PANTELEVA N. S., MAZUROVA S. M., NOVIKOVA I. A., 1966. Characterization of some genetic variants of measles virus on the bases of markers rct 40 and T 50. *Acta. Virol.*, **10**, 20.

- IZAWA H., NAGABAYASHI T., SOEKAWA M., 1971. A mutant of hog cholera virus in the virus-carrier cell cultivated at a lower temperature. *Zbl. Vet.-Med.*, **18**, 197.
- KIRN A., BRAUNWALD J., 1964. Sélection par passages à basse température d'un variant « froid » à virulence atténuée du virus vaccinal. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 427.
- KORN G., LIEBKE H., 1967. Der Nachweis von schwervirulentem schweinepestvirus mit der HEIC-Methode und immunofluoreszenz nach Zellkulturpassagen. *Zbl. Vet.-Med.*, **14**, 49.
- KUBIN G., 1967. *In vitro* Merkmale der Schweinepestvirus. *Zbl. Vet.-Med.*, **14**, 543.
- LAB M., KIRN A., 1969. Variation de la thermosensibilité du développement du virus Sindbis en fonction du système cellulaire. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **268**, 2624.
- LEFTHERIOTIS E., PRECAUSTA P., CAILLIÈRE F., 1971. Étude d'une souche modifiée de virus de la peste porcine adaptée à la culture cellulaire de rein de mouton et son utilisation comme virus vaccin. *Rev. Méd. vétér.*, **122**, 1-33.
- LEJOLLY J. C., 1971. Résultats non publiés.
- LWOFF A., LWOFF M., 1960. Sur les facteurs du développement viral et leur rôle dans l'évolution de l'infection. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **98**, 173-203.
- MAASSAB H. F., 1969. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus. *J. Immunol.*, **102**, 728-732.
- MACKENZIE J. S., 1969. Virulence of temperature sensitive mutants of influenza virus. *Brit. med. J.*, **3**, 757.
- MARGALITH M., MARGALITH E., GOLDBLUM N., 1969. Genetic characteristics of Echovirus type 9 strains: Association of mouse virulence with other genetic markers. *J. Gen. Virol.*, **4**, 379-384.
- MAYER V., 1965. Study of virulence of the tick-borne encephalitis virus. IV. Thermosensitivity of virions and its relationships to other genetic markers. *Acta-Virol.* **9**, 397.
- MAYER V., SLAVICK I., 1965. Chromatography of tick-borne encephalitis virus variants on hydroxylapatite. *Virology*, **26**, 369.
- MAYER V., SLAVIK I., 1966. Thermostabilization of the tick-borne encephalitis virus. *Virology*, **29**, 492.
- MIRCHAMSY H., RAPP F., 1969. Role of interferon in replication of virulent and attenuated strains of measles virus. *J. Gen. Virol.*, **4**, 513.
- MIRCHAMSKY H., TASLIMI H., 1967. Some properties of avirulent cold variants of African Horse sickness virus. *Res. veter. Sci.*, **8**, 195-200.
- MENDELING W. L., 1968. A fluorescent microplaque assay for hog cholera virus. *Arch. ges. Virusforsch.*, **23**, 27-39.
- MENDELING W. L., DRAKE L., 1969. Replication of hog cholera virus in cell culture. *Amer. J. veter. Res.*, **30**, 1817.
- MENDELING W. L., PIRTLE E. C., PACKER R. A., 1970. Persistent infection of an established porcine kidney cell line with selected strains of hog cholera virus. *Amer. J. veter. Res.*, **31**, 2019-2024.
- MENDELING W. L., PACKER R. A., 1969. Pathogenesis of chronic hog cholera-host response. *Amer. J. veter. Res.*, **30**, 409.
- MENDELING W. L., CHEVILLE N. F., 1968. Host response to persistent infection with hog cholera virus. *Proc. U. S. Livestock. San. Ass. 72 ND Ann. Meet.*, 283.
- NOBUTO K., 1969. Development of new hog cholera live virus vaccine. XXXVII<sup>e</sup> session générale du Comité de l'O. I. E., Paris, 19-24 mai 1969.
- PAPAEVANGELOU G. J., YOUNGNER J. S., 1961. Correlation between heat-resistance of polioviruses and other genetic markers. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **108**, 505-507.
- PEROL-VAUCHEZ Y., TOURNIER P., LWOFF M., 1961. Atténuation de la virulence du virus de l'encéphalomyocardite de la souris par culture à basse température. Influence de l'hypo- et de l'hyperthermie sur l'évolution de la maladie expérimentale. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **253**, 2764.
- PHILLIPS C. E., 1966. Safety testing hog cholera live virus modified vaccines. *Proc. U. S. Livestock. San. Ass.*, 302-309.
- PLOWRIGHT W., PARKER J., 1967. The stability of African Swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Arch. ges. Virusforsch.*, **21**, 383.
- RAPP F., 1964. Plaque differentiation on replication of virulent and attenuated strains of measles virus. *J. Bacteriol.*, **88**, 1448.
- RUIZ-GOMEZ J., ISAACS A., 1963. Optimal temperature for growth and sensitivity to interferon among different viruses. *Virology*, **19**, 1-7.
- SASAHARA J., KUMAGAI T., 1965. Live virus hog cholera vaccine in Japon. F. A. O. I. E. *International meeting on hog cholera and African swine fever.*, Rome.
- SASAHARA J., KUMAGAI T., 1966. Development of tissue culture living hog cholera vaccine. *Jap. Agric. Res. Quart.*, **1**, 24-26.
- SASAHARA J., KUMAGAI T., SHIMIZU Y., FURUUCHI S., 1969. Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. *Nation. Inst. animal. Health. Quart.*, **9**, 83-91.
- SCHERRER R., AYNAUD J.-M., COHEN J., BIC E., 1970. Étude au microscope électronique du virus de la peste porcine classique (hog cholera) dans des coupes ultra fines de cellules infectées *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **271**, 620.

- SCHERRER R., 1971. *Morphogenèse du virus du fibrome de Shope et sa perturbation par des températures supraoptimales*. Thèse de Doctorat ès sciences, Faculté des Sciences, Paris.
- SCHLOER G. M., HANSON R. P., 1968. Relationship of plaque size and virulence for chickens of 14 representative Newcastle disease virus strain. *J. Virol.*, **2**, 40-47.
- SHIMIZU Y., FURUUCHI S., HAYASHI S., KUMAGAI T., SASAHARA J., 1965. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. *Amer. J. veter. Res.*, **31**, 1787.
- SIMPSON R. W., HAUSER R. E., 1968. Effect of heat on virions of wild type Sindbis virus and a thermostable mutant. *Virology*, **34**, 361.
- SPEIR R. W., ALIMINOSA K V., 1963. pH, protein and Semliki forest virus infectivity. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **114**, 168.
- STEVENS J. M., 1970. Arbovirus replication in mosquito cell lines (singh) grown in monolayer or suspension culture. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **134**, 356.
- TEEBKEN D. L., AIKEN J. M., TWIEHAUS M. J., 1967. Differentiation of virulent, attenuated and inactivated hog cholera viruses by fluorescent-antibody technique. *J. amer. veter. med. Ass.*, **150**, 53-58.
- WALLIS C., MELNICK J., 1962. Cationic stabilization, a new property of enteroviruses. *Virology*, **16**, 504-505.
- WALLIS C., MELNICK J., RAPP F., 1965. Different effects of MgCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub> on the thermostability of viruses. *Virology*, **26**, 694.
- YOUNGER J. S., 1957. Thermal inactivation of poliovirus variants. *J. Immunol.*, **78**, 282.
-