

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.  
Biologiske Meddelelser, **XII**, 6.

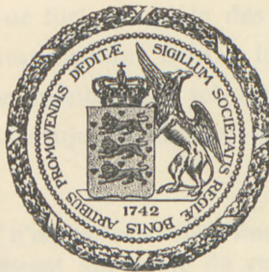
---

IMMUNISATION ACTIVE CONTRE  
LA PESTE AVIAIRE

PAR

S. SCHMIDT, J. OERSKOV ET ELSE STEENBERG

AVEC 1 PLANCHE



KØBENHAVN  
LEVIN & MUNKSGAARD  
EJNAR MUNKSGAARD

1936

Det Kgl. Danske Videnskabsnævn  
Biologiske Meddelelser, KXXIX

---

IMMUNISATION ACTIVE CONTRE  
LA PESTE AVAIRE

S. SCHMIDT, J. OERSKOV et ELSE STRENBORG

AVEC 1 PLANCHE



KØBENHAVN  
LUNOS & NYKJØLLAND

Printed in Denmark.  
Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.

L'immunisation active contre la peste aviaire n'a pas pu être effectuée jusqu'à présent — du moins pas d'une façon générale — quelle que soit la technique utilisée. On le conçoit en considérant tout d'abord l'énorme infectiosité du virus. Il fallait alors, pour préparer un vaccin, essayer d'atténuer par un moyen quelconque le virus, soit par passage sur un animal approprié dans le sens pastorien, soit par un traitement convenable du virus avec des composés chimiques semblables à ceux ayant rendu des services pour d'autres virus (la rage p. exp.). Cependant, il semble qu'aucune de ces routes ne se soient montrées favorables pour le virus de la peste aviaire. Comme C. HALLAUER (Institut du Prof. Doerr où l'on étudie depuis vingt ans la peste aviaire) a donné récemment (*Zeitschr. f. Hyg. & Infekt.* tome 116, 1934, page 456) une revue fort complète des divers essais qui se rapportent à l'immunisation contre la peste aviaire, nous nous abstenons de mentionner ici les multiples tentatives qui ont été faites à ce sujet. M. HALLAUER résume son analyse comme suit :

- 1) Le virus tué n'engendre aucune immunité.
- 2) Par un traitement approprié du virus avec certains composés chimiques, tels le phénol, ou le formol, il semble être possible de transformer le virus en une modification non-pathogène, mais encore immunisante (TODD). Les résultats obtenus avec de tels vaccins sont variables.
- 3) Il ne semble pas qu'un composé déterminé possède une action atténuante spécifique sur le virus. En principe des combi-

naisons fort différentes sont capables d'atténuer le virus, par exemple le formol, le phénol, le tricrésol et l'éther.

4) Probablement la forme sous laquelle le virus se présente joue un rôle. Dans tous les cas on n'a obtenu un vaccin efficace qu'en utilisant du foie ou de la rate de poule infectée. En partant de cette dernière notion, HALLAUER étudie l'action atténuante du tissu de foie sur le virus et, en particulier, l'effet immunisant du virus ainsi affaibli. Les recherches de HALLAUER aboutissent à des résultats fort intéressants, tels que voici:

a) Le virus de la peste aviaire est rapidement inactivé dans des cultures embryonnaires de foie de poule. Tout en perdant son caractère pathogène, le virus conserve un certain pouvoir immunisant.

b) L'atténuation du virus dépend:

- 1) de la quantité du virus mis en œuvre,
- 2) de la prolifération du tissu,
- 3) de la durée de la culture.

c) Le tissu de foie des poules adultes infectées avec le virus peut également servir à la préparation du vaccin dans des conditions semblables.

d) Par une seule injection de 0.5 — 1.0 cc d'un vaccin «utilisable», Hallauer obtient une immunité absolue contre une inoculation massive de virus effectuée 15 jours après la vaccination.

Nous sommes arrivés à des résultats semblables par un tout autre moyen.

Ainsi qu'il a été communiqué récemment<sup>1</sup>, S. Schmidt et J. Oerskov ont démontré que le virus de la peste aviaire est facilement adsorbé sur l'hydroxyde d'aluminium. Les essais ont été effectués notamment avec la souris. Les souris injectées avec un complexe virus-hydroxyde aluminique et qui ont survécu à ce traitement jouissaient d'une résistance — immunité spécifique — plus ou moins prononcée vis-à-vis d'une infection expérimentale avec le virus de la peste aviaire. Un grand nombre d'essais ont fait ressortir qu'il est assez difficile d'immuniser d'une façon générale, même par plusieurs vaccinations, la souris contre la peste aviaire. Cependant, nos expériences sur la souris nous ont encouragés à essayer comment se comportera la poule vis-à-vis d'un traitement analogue.

<sup>1</sup> Acta Pathol. & Microbiol. Scand. 1935, 12, 262.

Or, nos expériences ont démontré, tout d'abord que les mélanges virus-hydroxyde, bien qu'inoffensifs pour la souris, tuèrent régulièrement la poule, ce qui ne doit point nous étonner, vu que la poule — dans nos expériences — s'est montrée environ 20 fois plus sensible vis-à-vis du virus que la souris. Notre virus (souche de Nieschulz) tue régulièrement la poule dans une dilution à 1 p 1000.000 (cerveau virulent), tandis qu'il faut environ 1/50.000 gramme de cerveau pour provoquer une infection mortelle chez 100 pour cent des souris (voie sous-cutanée).

Comme les mélanges de cerveau virulent et d'hydroxyde d'aluminium n'ont pas pu être injectés sans danger à la poule, nous nous sommes adressés d'abord aux cerveaux de souris mortes tardivement après une injection de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Ces cerveaux étaient naturellement atténués. En les mélangeant avec l'hydroxyde d'aluminium nous avons réussi à préparer des complexes à la fois inoffensifs et doués de propriétés immunisantes lorsque injectés à la poule.

Plus tard, nous avons pu mettre en évidence qu'un mélange de virus virulent et d'hydroxyde d'aluminium en quantité modérée perd lentement sa nocivité tout en gardant un pouvoir antigène considérable, de sorte que les poules traitées par une ou plusieurs injections de ces vaccins sont immunisées solidement contre la peste aviaire. Nous allons donner ci-après quelques exemples démontrant comment une telle immunisation a pu être réalisée.

#### I.

Six poules, numéros 56—57—58—59—60—61, reçoivent, le 2 février 1935, 1 cc de virus (suspension de cerveaux provenant de souris mortes 17 à 21 jours après le traitement avec un complexe virus  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) dilué à 1 p 100 et additionné de 20 volumes d'hydroxyde d'aluminium pour 100 volumes de suspension de cerveau,

le mélange étant conservé ensuite à la cave pendant 15 jours avant d'être utilisé. Le 11 mars, les animaux sont injectés avec 1 cc d'un mélange semblable mais préparé avec des cerveaux provenant de souris mortes en 14 à 17 jours. Le 23 mars et le 4 avril, injection des mélanges préparés également avec des cerveaux atténués et additionnés d'hydroxyde d'aluminium. Le 12 avril, vaccination avec 0.2 cc d'un complexe constitué par du cerveau virulent additionné de 20 p 100 d'hydroxyde, le mélange étant conservé pendant 30 jours à 0°. Le 24 avril, injection de 0.1 cc d'un mélange de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  1 p 20, conservé à 0° pendant 7 mois, mais à ce moment virulent pour une poule non immunisée (celle-ci injectée avec la même dose, meurt en 2 jours). Après cette injection, une des poules vaccinées (le no. 57) succombe en 5 jours à la peste aviaire, tandis que les cinq autres restent indemnes.

Puisqu'une poule normale, injectée simultanément, meurt en deux jours, on peut conclure que la poule no. 57 possède une certaine immunité acquise à la suite des injections antérieures. Les cinq poules survivantes reçoivent, le 9 mai, 0.2 cc d'une suspension à 1 p 100 de cerveau virulent dans de l'eau salée sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  et, le 26 juin, encore 0.2 cc d'une suspension de cerveau virulent (1 gramme de cerveau dans 100 cc d'eau salée). Elles restent indemnes.

## II.

Cinq poules sont injectées, le 23 janvier 1935, avec des cerveaux prélevés chez des souris mortes tardivement, 30 à 40 jours après l'inoculation de virus mélangé avec de l'hydrate d'aluminium. On donna à chaque poule un cerveau entier, mais sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  seulement étendu dans de l'eau physiologique. Le 20 février, ces mêmes animaux sont injectés avec 1 cc d'un mélange de 1 gr. de cerveau virulent et de 99 cc d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ , mélange conservé à ce moment pendant 4 mois à 0°. Les 6 mars, on injecte 0.5 cc du mélange, constitué par 1 gramme de cerveau virulent dans 20 volumes d' $\text{Al}(\text{OH})_3$ , mentionné dans l'expérience précédente. Les cinq poules restent indemnes, tandis que la sixième meurt de peste aviaire en 5 jours, montrant ainsi une résistance accrue contre l'infection. Le 9 et le 24 mai, on donna aux cinq poules du virus sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , comme dans l'expérience précédente, sans qu'aucune d'elles ne présente de troubles. Le 26 juin, ces animaux sont exposés à une nouvelle épreuve très sévère, consistant d'une injection de 0.2 cc d'une suspension de cerveau virulent dilué dans

la proportion de 1 p 10 dans de l'eau salée. Elles résistent toutes. Cette série d'animaux est particulièrement intéressante parce que les cerveaux sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  sont incapables de créer de l'immunité notable, comme nous allons le voir bientôt. L'immunité a donc été engendrée dans ce cas presque exclusivement par la seule injection de 1 cc de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  à 1 p 100, mélange atténué par un séjour prolongé à 0°. Nous avons eu d'ailleurs des exemples où une seule vaccination avec un mélange convenable de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  a suffi pour produire une immunité solide:

On prépara une suspension de 1 gramme de cerveau virulent dans 100 cc d'eau salée. On ajouta 50 cc d'hydroxyde d'aluminium et l'on étendit, après lavage, le dépôt dans 100 cc d'eau physiologique. 0.2 cc du mélange récemment préparé tua une poule en 4 jours. Le mélange était conservé pendant 4 jours à 0°. On injecta alors à deux poules respectivement 0.2 cc et 1 cc. L'animal ayant reçu 0.2 cc survécut, l'autre mourut en 4 jours. La première poule fut éprouvée un mois plus tard vis-à-vis de 0.2 cc de virus (1 p 1000 de cerveau virulent) sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  et en resta indemne.

Avec cette même suspension, conservée à 0° depuis sa préparation, on vaccine, le 16 août, deux poules en leur injectant respectivement 1 cc et 10 cc sous la peau. On leur inocule un mois plus tard 1/50.000 gramme (20 doses infectantes) de cerveau virulent. L'animal vacciné avec 1 cc survit à l'inoculation virulente, celui traité avec 10 cc de vaccin meurt en 9 jours, son immunité n'est que partielle, par conséquent.

### III.

Six poules sont injectées à partir du 8 mars jusqu'au 5 avril de cerveaux de souris mortes tardivement. On n'ajoute pas d'hydroxyde cette fois. Il s'agit des cerveaux provenant des souris succombées respectivement en 23, 22, 15 et 9 jours après l'inoculation d'un mélange virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Les animaux ne présentent aucun malaise après ce traitement. Le 9 mai, un mois après la dernière vaccination, on éprouve ces poules vis-à-vis du virus virulent (0.2 cc d'une suspension de cerveau à 1 p 100). Elles meurent en 2 à 6 jours, ce qui démontre que l'inoculation des cerveaux n'a pu créer aucune ou seulement une très faible immunité contre la peste aviaire. L'hydroxyde d'aluminium joue donc un rôle très important et fort intéressant dans ces genres d'expériences.

Ainsi, en immunisant divers lots de poules au moyen de virus-Al(OH)<sub>3</sub>, la constitution et le nombre d'injections ayant varié d'un lot à l'autre, nous avons au commencement du mois d'avril 1935, 21 animaux solidement immunisés. Le 15 août, ils reçurent tous sous la peau 0.5 cc d'une suspension de cerveau virulent à 1 p 10, ce qui correspond à 1/20 gramme de cerveau, dont 1/1000.000 gramme suffisait pour tuer une poule normale en 2 jours. Aucun signe morbide n'est constaté ensuite. Le 23 août on répartit ces animaux en 4 groupes et on donne au premier groupe (6 animaux) 1 cc d'une suspension de cerveau virulent (10 p 100) sous la peau, au deuxième groupe 1 cc dans le tissu musculaire de la cuisse, au troisième groupe 0.2 cc dans la veine de l'aile et au quatrième groupe 0.1 cc sous la dure-mère. Les animaux ont reçu alors respectivement 100.000, 20.000, et 10.000 doses infectantes pour une poule non immunisée. Ils sont tous restés en parfaite santé.

### **Recherche de substances virulicides dans le sang des poules immunisées.**

Le 14 août, avant l'injection de la première dose massive de virus, on prélève un échantillon de sang chez les 21 poules. 0.2 cc du sérum sont mélangés avec 0.2 cc d'une suspension à 1 p 100 de cerveau virulent, et le mélange est injecté par voie intrapéritonéale à des souris. 6 souris reçoivent 0.2 cc du virus sans sérum. Ces témoins, ainsi que 5 des animaux ayant reçu du sérum, meurent typiquement de l'infection, tandis que 16 survivent. Les cinq sérums qui n'ont pu neutraliser le virus sont titrés sur la poule. On mélange 1/50.000 gramme de cerveau virulent avec 1 cc de sérum et on injecte ce mélange sous la peau de cinq poules normales. Elles n'éprouvent aucun trouble, tandis



qu'une poule, ayant reçu la même dose de virus sans sérum, meurt en 36 heures. Le sérum provenant des 16 animaux et dont 0.2 cc neutralisaient 1/500 gramme de cerveau est éprouvé vis-à-vis d'une dose décuple de virus. On mélange 0.2 cc de sérum avec 0.2 cc d'une suspension de cerveau virulent à 1 p 10 (1/50 gramme) et l'on injecte les mélanges dans la cavité péritonéale de 16 souris. Une seule souris survit, les autres succombent à la peste aviaire. Ces essais démontrent ainsi la présence — en quantité variable — de substances virulicides dans le sang des animaux immunisés. Nos résultats concordent avec ceux de HALLAUER, qui trouva dans le sang de toutes ses poules immunisées d'après sa méthode des substances virulicides.

Le 5 septembre, après le traitement très intensif, on prélève de nouveau un échantillon de sang pour titrage. Cette fois le titre neutralisant est plus élevé, ainsi qu'on devait s'y attendre. On mélange 0.2 cc de sérum avec 0.2 cc de suspension de virus (1 gramme de cerveau dans 9 cc d'eau physiologique) et les mélanges sont injectés dans la cavité péritonéale de 21 souris. 10 animaux survivent, les autres meurent typiquement. Les 10 échantillons de sérum sont titrés de nouveau; on prend cette fois la même dose de virus, mais le volume de sérum est réduit au dixième. Tous les animaux injectés avec ces mélanges sont morts. Les onze échantillons sont titrés vis-à-vis d'une dose de virus correspondant à 1/500 gramme de cerveau. 5 échantillons étaient capables de neutraliser cette dose de virus. On voit ainsi qu'il y a une différence remarquable entre le pouvoir antivirulent de sérum des divers animaux bien que ceux-ci aient subi le même traitement. Cela correspond parfaitement avec ce que l'on connaît pour d'autres anticorps (antitoxines des chevaux hyperimmunisés, par exemple).

### Paralysies observées chez des animaux immunisés.

Le plus souvent l'injection des mélanges virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  affaiblis ne donne pas lieu à des phénomènes morbides apparents chez les animaux. Il arrive cependant (rarement) que certains animaux présentent des signes pathologiques qui ressemblent à ceux précédant l'évolution de la vraie infection: perturbation de l'équilibre, diarrhée, cyanose de la crête, somnolence. Mais ces phénomènes sont passagers; ils ne durent qu'un ou deux jours, s'atténuent et disparaissent sans laisser de suites.

D'autre part, nous avons constaté dans quelques rares cas de vraies paralysies survenues après injection du virus sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$  chez des animaux fortement immunisés. Nous avons trois observations et nous mentionnerons ici en particulier une d'elles, poule no. 42 (voir figure I). Cet animal avait été traité comme suit: le 13 février 1935, on lui injecta un cerveau entier provenant d'une souris morte 24 jours après une injection de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Le cerveau était dilué dans quelques centimètres-cubes d'eau physiologique avant l'injection. L'injection ne causa aucun trouble. Le cerveau a donc été presque avirulent. Le 27 février, la poule reçut 0.5 cc d'une suspension à 1 p 100 de virus virulent additionnée de 20 p 100 d'hydroxyde d'aluminium; le 11 mars, injection de 2 cc du même vaccin. Le 20 mars, injection de 0.2 cc de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  récemment préparé à partir d'un cerveau faiblement virulent et le 4 avril, enfin, 0.2 cc de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  1 p 20, mélange qui tua promptement une poule normale. Le 9 mai, on injecta 0.2 cc de suspension virulente (1 gramme de cerveau dans 100 cc d'eau physiologique) sans  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Aucune réaction ne suivit ce traitement. L'animal devait donc à ce moment être



Figure I.



Figure II.

solidement immunisé. Le 28 mai dans la matinée, la poule ne présentait aucun signe anormal, mais à 14 heures on trouva l'animal paralysé dans sa cage; il ne pouvait pas se tenir debout, présentait en outre des spasmes du cou et de l'étouffement. Son état ne s'améliora pas beaucoup pendant la semaine suivante, peut-être les spasmes du cou devinrent-ils moins prononcés, mais les parèses des jambes persistèrent toujours. Le 7 juin l'animal fut tué. L'autopsie ne révéla rien d'anormal. Le sérum renfermait des substances virulicides, car un mélange de 1 cc de sérum et de 1/50.000 gramme de cerveau virulent pouvait être injecté à une poule normale sans produire d'infection. Une autre poule injectée avec un mélange de 1 cc de sérum et 1/5000 gramme de cerveau virulent mourut de peste aviaire.

Dans un autre cas (figure II), nous avons constaté des paralysies survenir chez une poule déjà une demi-heure après l'injection d'une dose très copieuse — 0.2 cc d'une suspension à 10 p 100 de cerveau virulent. Le tableau clinique était le même que dans le cas précédent. Ces paralysies comportent dans notre opinion un grand intérêt, parce que les poules atteintes spontanément de peste aviaire présentent quelquefois une image pathologique semblable. En outre, nous avons observé ces mêmes phénomènes chez des moineaux injectés de virus en quantités copieuses. Ces animaux présentent surtout des troubles du centre d'équilibre et des parèses des jambes, ils meurent alors subitement, la durée de la maladie étant de 3 à 4 jours en moyenne. Quelques individus échappent à l'infection malgré l'inoculation d'une forte dose de virus.

Ce qui nous frappe dans le cas des poules ci-dessus mentionnées, c'est leur immunité très forte au moment où

surgissent les parèses. Cela ressemble, beaucoup au phénomène constaté antérieurement par nous concernant l'immunité antidiphthérique. L'injection à des cobayes d'une toxine formolée, mais pas transformée tout à fait en anatoxine, peut produire à la fois une immunité spécifique très prononcée et donner lieu à des paralysies tardives. En effet, nous avons pu démontrer (1932) que l'injection d'une telle toxine formolée au cobaye provoque, deux semaines après l'injection, une paralysie du train postérieur. Si l'on injecte maintenant à ces animaux une forte dose de toxine, on ne constatera pas toujours de phénomènes d'intoxication aiguë, ni même un œdème au point de l'inoculation. Si les animaux meurent, cela n'est pas dû à l'injection de la toxine, mais aux paralysies provoquées déjà par le traitement initial avec la toxine insuffisamment détoxiquée. Des animaux soumis à un tel traitement peuvent renfermer dans leur sang de l'antitoxine spécifique en quantités considérables<sup>1</sup>. Nous nous sommes demandé, par conséquent, si ces paralysies tardives observées chez les poules immunisées ne seraient pas dues à une intoxication qui a débuté avant que l'immunité ait pu s'établir. Il est cependant intéressant de noter que, dans un des cas observés, la paralysie est apparue à la suite de l'injection d'une dose massive de virus; elle semble être déclenchée par l'introduction du virus, ce qui ressemble à un choc ou à un phénomène allergique. Dans l'infection spontanée, on observe également parfois des paralysies; l'infection expérimentale, au contraire, présente en général un type suraigu sans paralysies.

<sup>1</sup> Nos résultats obtenus avec la toxine formolée ont été confirmés plus tard par Ramon, Debré et Uhry (Annales de l'Institut Pasteur 1934, 102, 3.

### L'importance de la répartition du virus dans l'hydroxyde d'aluminium.

Dans notre première communication nous avons insisté sur le tableau fort curieux que présente les souris injectées des mélanges virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Si l'on injecte un certain nombre d'animaux sous la peau avec 0.2 cc, par exemple, d'un mélange constitué par 1 gramme de cerveau virulent dans 100 cc d'hydroxyde, on verra quelques animaux mourir typiquement en 4 à 6 jours; d'autres meurent tardivement en 10, 15, 20 et 30 jours et un certain pourcentage survit, sans présenter aucun signe morbide. Nous avons toujours pensé que cela était dû à ce que le virus ne fût pas distribué d'une façon assez uniforme dans l'hydroxyde. Nos mélanges ont été préparés soit en triturant directement le cerveau virulent dans l'hydroxyde, soit en triturant d'abord le cerveau avec un peu de poudre de quartz, et en centrifugeant ensuite la suspension. Le centrifugat seul a donc été mélangé avec l'hydroxyde. Nos centrifugeurs ordinaires ont une allure de 3 à 4000 tours par minute seulement, et il était donc possible que la suspension avait renfermé des particules trop grandes. Quand on considère l'énorme infectiosité de ce virus — 1/50.000 gramme de cerveau virulent introduit sous la peau d'une souris tue l'animal — il est compréhensible que quelques animaux succombent malgré la présence de l'hydroxyde.

Nous avons répété, par conséquent, nos expériences, ayant eu recours cette fois à un ultra-centrifugeur d'une capacité de 15.000 tours par minute. Un gramme de cerveau virulent a été trituré soigneusement avec de la poudre de quartz et 9 grammes d'eau bidistillée. Le mélange fut centrifugé à 15.000 tours pendant 15 minutes et le liquide

surnageant fut séparé. On le mélangea ensuite avec 9 parties d'hydroxyde d'aluminium de la manière suivante: L'hydroxyde fut versé dans un gobelet en verre où se trouvait une turbine-mélangeur électrique. Celle-ci étant mise en mouvement, la suspension de virus fut introduite, goutte par goutte, au moyen d'une pipette et l'agitation fut continuée pendant 15 minutes. Le mélange fut alors distribué en »venules«<sup>1</sup>. Avec ce mélange 2 séries de souris à 10 individus chacune ont été injectées. La première série reçut 0.2 cc du mélange non dilué. La seconde 0.2 cc du mélange préalablement dilué à 1 p 10 avec de l'eau physiologique. Aucun de ces animaux ne contracte l'infection. La poule, au contraire, est tuée soit par injection du mélange dilué, soit par le mélange non dilué. Mais il faut se souvenir que la poule est beaucoup plus sensible que la souris vis-à-vis du virus. L'immunité, cependant, n'était pas plus prononcée chez ces animaux que chez ceux ayant survécu dans nos essais antérieurs faits avec des mélanges virus-hydroxyde aluminique. Un mois après la vaccination on rechercha l'immunité en inoculant aux souris vaccinées 0.2 cc d'une suspension de virus à 1 p 100. Toutes les souris vaccinées avec le mélange dilué ont succombé, mais avec un retard dans l'évolution de l'infection. Les animaux ayant reçu le mélange virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  non dilué, avaient une résistance plus prononcée. 5 sont morts dans le même délai que les témoins, 2 ont présenté une infection retardée et 3 sont restés indemnes. Cela est d'accord avec ce que nous avons constaté antérieurement: par une seule injection de virus  $\text{Al}(\text{OH})_3$  on peut immuniser au maximum 50 p 100 de souris contre une dose massive de virus administrée un mois après la vaccination.

<sup>1</sup> Tubes évacués, munis d'une canule fine, qui servent à prélever des échantillons de sang chez l'homme (Behring-Werke, Marbourg).

### Conservation du virus sur l'hydroxyde d'aluminium.

Nos essais préliminaires avaient permis de constater que le virus de la peste aviaire se conserve beaucoup mieux dilué dans l'hydroxyde d'aluminium que dilué dans de l'eau physiologique. Un examen plus approfondi nous a appris que la concentration de l'hydroxyde joue un rôle prépondérant à cet égard. Ainsi, la dilution du complexe virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  ci-dessus mentionné, qui contient 9 p 100 seulement d'hydroxyde, était assez instable. Récemment diluée, cette suspension tue une poule à la dose de 0.2 cc. Après être conservée à 0° pendant 3 jours, 0.2 cc ne produisent pas d'infection. Après conservation pendant 6 jours l'injection de 1 cc tue une poule en 5 jours (son cerveau est virulent). Après 8 jours de conservation 5 cc sont inoffensifs, et après 19 jours le mélange est très atténué, puisqu'une poule injectée avec 15 cc ne présente rien d'anormal. Au contraire, le virus à 1 p 100 contenant 90 p 100 d'hydroxyde est plus stable. Conservé pendant 32 jours à 0°, ce mélange injecté à la dose de 0.2 cc tue une poule en 5 jours. Une pareille dose du même mélange, conservé pendant 44 jours, ne produit pas d'infection, mais 1 cc du mélange conservé pendant 48 jours à 0° tue une poule en 5 jours. Conservé à 22° C, le mélange est moins stable. Après 16 jours de conservation, on peut injecter, sans produire une infection, 15 cc à une poule.

L'épreuve de l'immunité de ces divers animaux (toujours injection de 1/50.000 gramme de cerveau virulent, ce qui constitue 20 doses sûrement infectantes) nous a appris que le mélange dilué — renfermant 9 p 100 d'hydroxyde et 1 p 1000 de virus — perd avec le caractère pathogène son



pouvoir immunisant. Il en est de même pour le mélange à 1 p 100 de virus lorsqu'il est gardé à la température de laboratoire. Pour préparer un vaccin efficace il faut laisser le complexe virus-hydroxyde séjourner à basse température, 0 à 5° par exemple. Dans ces conditions la pathogénité baisse lentement, le pouvoir immunisant persiste — au moins à un degré remarquable.

A la première vue, ces résultats ne semblent pas être d'accord avec ceux antérieurement communiqués<sup>1</sup>. Il faut certainement chercher l'explication de cette divergence dans le mode de préparation des suspensions. Dans nos premiers essais sur la stabilité des mélanges virus-Al(OH)<sub>3</sub>, nous avons trituré le cerveau virulent directement dans l'hydroxyde. Dans le second cas le cerveau a été trituré avec de la poudre de quartz, et puis la suspension a été traitée dans l'ultracentrifugeur. Par ce procédé on a probablement débarrassé le virus de certaines substances qui, en présence de l'hydroxyde, jouent un rôle pour la stabilité (car il faut bien se souvenir qu'une suspension de cerveau dans de l'eau physiologique perd rapidement sa virulence).

### **Identité immunologique de diverses souches de virus à différente pathogénité.**

Nous avons utilisé jusqu'à présent dans nos expériences une souche de virus qui est fortement pathogène pour la souris. Ce virus tue régulièrement la souris avec une dose de 1/5000 gramme de cerveau virulent. Même la dose 10 fois plus réduite est capable d'infecter un nombre considérable, 50 p 100 d'animaux. Ces résultats se rapportent à l'injection sous-cutanée. La pathogénité de ce virus ne semble pas

<sup>1</sup> Voir Acta Pathol. & Microbiol. Scand. 1935, 12, 262.

avoir remarquablement diminué vis-à-vis de la poule, malgré le grand nombre de passages qu'il a subis sur la souris, puisque 1/1000.000 gramme de cerveau suffit pour tuer une poule. D'autre part, les passages sur la poule (au moins quelques passages, car nous ne savons pas encore s'il est possible d'affaiblir le virus vis-à-vis de la souris par des passages successifs de poule à poule) n'influent pas sur la virulence vis-à-vis de la souris.

Ayant eu à notre disposition un certain nombre de poules immunisées avec du cerveau de souris en combinaison avec l'hydroxyde d'aluminium, nous avons cru intéressant de rechercher si ces animaux résisteraient également à l'inoculation d'un virus entretenu exclusivement sur la poule. Un tel virus a été mis, très obligeamment, à notre disposition par M. le Prof. Doerr à Bâle. Nous avons fait d'abord avec ce virus trois passages successifs sur la poule. Le cerveau de la dernière poule fut prélevé immédiatement après la mort, et l'on en prépara une suspension constituée par 1 gramme de cerveau dans 10 cc d'eau. La suspension était centrifugée et filtrée sur papier. 21 poules immunisées reçoivent maintenant chacune 0.5 cc de la suspension sous la peau, ce qui correspond à 1/20 gramme de cerveau. On injecte à des poules normales des doses correspondant à 1/30.000, 1/100.000, 1/300.000, 1/1000.000 et 1/3000.000 gramme de cerveau. Elles sont toutes mortes en 1 jour et demi à 2 jours. Le virus est donc très virulent. Cependant aucune des poules immunisées n'ont présenté la moindre réaction. Elles sont donc absolument immunes, aussi contre cette souche de virus. Le virus, au contraire, semble être peu virulent pour la souris, car 3 souris ayant reçu de la suspension à 1 p 10, 0.2 cc (correspondant à 1/50.000 gramme de cerveau) sous la peau

et 3 autres injectées de la même dose dans la cavité péritonéale sont restées indemnes, sauf une de celles ayant reçu le virus sous la peau.<sup>1</sup>

### Recherche des anticorps virulicides dans les œufs des poules immunes.

Respectivement le jaune et le blanc d'un œuf pondu par une des poules immunes est mélangé avec 1/50.000 gramme de cerveau virulent, et les mélanges sont injectés sous la peau de deux poules. Deux autres poules sont injectées avec des mélanges semblables mais préparés à partir d'un œuf provenant d'une poule non immunisée. En outre, une poule reçoit 1/50.000 gramme de cerveau dilué dans de l'eau salée. Ces trois derniers animaux sont morts après 2 jours environ. Les deux premiers ne présentent aucun signe morbide pendant la première semaine. Au neuvième jour, on trouve la poule ayant reçu le virus mélangé avec le blanc d'œuf, morte sans qu'elle ait présenté aucun symptôme la veille. La tête du cadavre avait cependant bien l'aspect caractéristique, mais pour plus de sûreté on préleva le cerveau et l'on en injecta une petite quantité à une poule normale. Celle-ci succombe en 2 jours de peste aviaire typique. La poule traitée par le mélange virus-jaune d'œuf n'a présenté rien d'anormal.

<sup>1</sup> Le cerveau de cette souris morte 12 jours après l'injection fut délayé dans 2 cc d'eau physiologique et l'on injecta de cette suspension 0.2 cc à une poule et 0.2 cc à 6 souris, 3 par voie sous-cutanée et 3 par voie intra-péritonéale. La poule reste normale. Les trois souris ayant reçu l'injection sous la peau et deux de celles injectées dans la cavité péritonéale ne présentent pas non plus de signes morbides, tandis que le sixième animal meurt en 6 jours. Son cerveau est injecté à une poule qui meurt en 2 jours. Un peu de son cerveau est inoculé à une nouvelle poule, celle-ci succombe typiquement en 24 heures. Il semble donc que ce virus peut infecter seulement des souris particulièrement sensibles.

Le pouvoir neutralisant de deux autres œufs pondus par des poules immunisées a été dosé, mais cette fois on employa une quantité de virus dix fois plus grande (1/5000 gramme de virus) que dans la première expérience. Dans l'un des cas et le blanc et le jaune de l'œuf pouvaient neutraliser complètement le virus, dans l'autre cas seul le jaune de l'œuf était capable d'empêcher l'infection, la poule ayant reçu le virus mélangé avec le blanc de l'œuf est morte en 3 jours, c'est-à-dire dans le même délai qu'une poule normale, injectée avec le virus seul. Ces expériences démontrent ainsi la présence en quantités considérables des anticorps virulicides dans les œufs des poules immunisées. Il semble que ces anticorps se trouvent notamment dans le jaune de l'œuf.

### Conclusions.

1. Le cerveau de souris ayant succombé tardivement après une injection de virus de la peste aviaire en mélange avec de l'hydroxyde d'aluminium, a une virulence relativement faible. Une inoculation de tels cerveaux chez des poules n'engendre aucune, ou bien seulement une très faible immunité. Si l'on mélange, au contraire, la suspension de cerveau avec une quantité convenable d'hydroxyde d'aluminium, on peut, par une série d'injections, obtenir une immunité solide contre l'infection.
2. Des mélanges de cerveau virulent et d'hydroxyde d'aluminium perdent — laissés à basse température et à l'obscurité — lentement leur pathogénité vis-à-vis de la poule. Le pouvoir immunisant, au contraire, persiste, sinon intégralement au moins à un degré remarquable, pendant des mois. Même une seule injection de ces complexes peut dans certains cas produire chez la poule

- une immunité fort solide contre la peste aviaire expérimentale.
3. Les poules vaccinées, d'après la technique mentionnée ici, supportent des doses énormes de virus virulent, non seulement administrées par voie sous-cutanée ou intramusculaire, mais aussi par voie intra-veineuse et même sous-dure-mérienne.
  4. Les animaux vaccinés avec la souche ayant servi à toutes nos expériences (Nieschulz & Bos) se sont montrés également réfractaires contre l'inoculation avec des doses massives d'un autre virus (Doerr) qui a été entretenu exclusivement sur la poule. La différence essentielle entre ces deux souches de virus est que le premier est fortement pathogène et pour la poule, et pour la souris (quel que soit le mode d'introduction), tandis que le second, très dangereux pour la poule, se montre au contraire peu virulent vis-à-vis de la souris.
  5. Toutes les poules renferment — mais en quantités variables — des anticorps virulicides dans leur sang. Cela était démontré par le fait que le sérum des animaux pouvait neutraliser *in vitro* le virus de la peste aviaire.
  6. Nous avons constaté dans quelques rares cas des paralysies survenues chez des poules fortement immunisées. Dans un cas, ce phénomène a été observé à la suite d'une injection copieuse de virus. Il y a là une analogie avec les paralysies constatées antérieurement par l'un de nous chez les cobayes activement immunisés avec une toxine diphtérique formolée, mais incomplètement détoxiquée. Les animaux, bien que présentant des paralysies sévères, renfermaient des quantités remarquables d'antitoxines dans leur sang.
  7. En préparant des mélanges de virus- $\text{Al}(\text{OH})_3$  il importe

que le virus soit distribué d'une façon uniforme dans l'hydroxyde, si l'on veut obtenir des complexes à propriétés constantes. On s'adresse alors de préférence à un ultra-centrifugeur qui permet de séparer du virus les grosses particules protéiniques ou lipoïdes qui peuvent renfermer des quantités abondantes de virus.

8. Les œufs pondus par des poules activement immunisées renferment des anticorps virulicides. Il semble que ces anticorps soient liés en particulier au jaune de l'œuf.

(Institut Sérologique de l'Etat).

### Bibliographie.

Hallauer, C.: Zeitschr. f. Hyg. 1934, **116**, 456.

Schmidt, S. & Oerskov, J.: Acta Pathol. & Microb. Scand. 1935, **12**, 262.

Oerskov, J. & Schmidt, S.: Revue d'Immunologie, 1935, **1**, 353.

