

A mes Parents et Beaux Parents

A ma femme et mes enfants

A toute ma famille

A Monsieur le Professeur J. GUILLAUME,
Professeur à la Faculté des Sciences de Lille,
qui nous a accueilli à l'Institut de Microbiologie
et nous fait le grand honneur de bien vouloir
accepter la présidence de notre jury de thèse.
Nous lui exprimons notre très profond respect
et toute notre gratitude.

Qu'il veuille trouver ici un témoignage de notre
vive reconnaissance pour sa profonde compréhension
humaine des circonstances.

A Monsieur le Professeur ROUSSEAU
Professeur à la Faculté des Sciences de LILLE
qui a bien voulu examiner notre travail
et siéger à notre jury.

Nous lui adressons nos respectueux remerciements
et l'expression de toute notre déférence.

A Monsieur le Professeur Pierre GORET
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Président de l'Académie Vétérinaire
Membre de l'Académie de Médecine.

Son accueil bienveillant au service des Maladies Contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, sa direction éclairée, son incessant intérêt porté à notre travail, son souci de nous en laisser le fruit, sont les motifs de l'admiration que nous lui portons, de toute la gratitude que nous lui exprimons, de la reconnaissance que nous lui devons et de la très profonde et respectueuse sympathie que nous lui manifestons.

Nous lui serons toujours reconnaissant de nous avoir aidé dans notre carrière et d'avoir bien voulu participer à notre jury de thèse.

Ces mots sont insuffisants pour traduire tous nos sentiments.

Nous sommes très obligé à Monsieur le Docteur-
Vétérinaire René GAUMONT, Chef de Service au
Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires,
d'avoir bien voulu participer à notre jury de
thèse,

en témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur Bernard TOMA, Chef de Travaux, Agrégé de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
en lui exprimant toute notre gratitude pour l'aide généreuse, précieuse, compétente et de tous les instants qu'il nous a apportée et les cordiaux rapports qui nous ont réunis.

Nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance et nos vifs remerciements.

Notre reconnaissance va également à Madame le Docteur Anne MORAILLON, Laboratoire de l'INRA de la Chaire de Pathologie Médicale des Equidés et Monsieur le Docteur Jean-Claude MONTEIL, Chef de Travaux à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

Nous présentons nos vifs remerciements à Monsieur le Docteur J. MAURIN, Chef du Laboratoire au Service des virus de l'Institut Pasteur de Paris pour son aide et les sagaces conseils que nous avons reçus de lui.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et adresser nos vifs remerciements aux nombreux confrères ou collègues qui ont avec célérité et compétence répondu à nos demandes pour l'envoi des sérums étudiés dans l'enquête épidémiologique. Leur liste est trop longue pour être inscrite dans son intégralité.

Nous présentons nos remerciements à Messieurs Denis FROMAGEOT, et François ANDRE, chef de Travaux à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort Henri SALMON, Yves RICHARD et Philippe GIRARD ainsi qu'à Mademoiselle Annick HERVY, Ingénieur de recherche de l'INRA de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour leur aide et leurs conseils.

Nous sommes heureux de remercier les membres du personnel technique du service des maladies Contagieuses de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, tout spécialement Mesdemoiselles Annie FIOUX, Colette HUGUET et Mireille DAUDE.

Nos vifs remerciements à Monsieur le Docteur Yehia EL GAMAL, Conseiller Culturel et Directeur d'émission scolaire d'Egypte en France et tous les membres du bureau culturel pour leur indispensable et généreux appuis.

Notre reconnaissance est acquise :

- A Monsieur l'Inspecteur Général MORNET (Institut National de la Recherche Agronomique) qui a bien voulu nous faire bénéficier d'une bourse de recherches.
- A Monsieur le Professeur CHARTON, Directeur de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.
- A la Société d'Encouragement pour l'amélioration des races de chevaux en France (Directeur J. ROMANET).
- A Monsieur le Docteur MOUSTAF TOULBAH, Directeur de l'Académie de Recherches Scientifiques et Technologique au Caire. EGYPTE
- A Monsieur le Docteur Amin ZAHER, Ministre adjoint. Ministère de l'Agriculture. EGYPTE.
- A Monsieur le Docteur Mahmoud ZEIN EL DIEN, Sous secrétaire d'Etat Ministère de l'Agriculture. EGYPTE.
- A Monsieur le Docteur Saied ELSABAN, Directeur des Laboratoires de Recherches Vétérinaires du Caire.
- A Monsieur le Docteur Talard FOUAD, Sous-Directeur des laboratoires de recherches Vétérinaires. Institut des sérums et vaccins. Ablassia. LE CAIRE.
- A Messieurs les Docteurs Helmy AYOUB et Abdel Moneim EZZAT; Anciens Directeurs des Laboratoires de Recherches Vétérinaires. LE CAIRE. EGYPTE.

"I THINK, PROBABLY THE VIRUS OF EQUINE INFECTIONS ANEMIA IS ONE OF THE MOST INTERESTING, INTRIGUING, ENTICING, EXCITING AND HEART-BREAKING. I'VE EVER WORKED WITH".

(SAURINO)

"OF ALL THE KNOW DISEASES AFFECTING THE HORSE POPULATION IN THE WORLD, THE EQUINE INFECTIONS ANEMIA (EIA) REMAINS THE CLASSIC ENIGMA DISEASE".

(MOORE)

INTRODUCTION

L'anémie infectieuse des équidées est apparemment une maladie en voie de disparition en France. En effet, le nombre de foyers observés chaque année au cours de ces dernières décennies a diminué progressivement pour s'annuler finalement en 1968.

Et cependant l'importance de cette maladie est loin d'être négligeable. D'abord parce qu'elle a "changé de visage" et qu'elle sévit non plus sur des chevaux de trait comme autrefois, mais sur des animaux de course ou de sport dont la valeur, pour certains sujets, peut se chiffrer par dizaines de millions. En suite parce que l'on peut penser que cette disparition n'est qu'apparente et provisoire lorsque l'on connaît les surprises que réserve un tel virus.

Au surplus, cette maladie présente un remarquable intérêt dans le cadre de la pathologie comparée.

Au cours de ces dernières années, plusieurs foyers d'anémie infectieuse ont été identifiés au Laboratoire du Service des Maladies Contagieuses de l'Ecole d'Alfort et différentes souches ont été isolées.

La première étape de recherches sur l'étude du virus responsable de cette maladie, passe forcément par l'obtention d'un matériel viral le plus concentré et le plus pur possible.

En effet, pendant longtemps, les différents auteurs qui ont étudié ce virus n'ont disposé que d'un matériel relativement impur, constitué par du sérum de cheval "en crise". Or, ce n'est qu'à partir d'un matériel purifié et concentré que peuvent être envisagées des études plus poussées de la structure et des caractéristiques physicochimiques du virus. L'étape préliminaire consistait alors en la réalisation de façon répétée de cultures de leucocytes de cheval restant en survie pendant plusieurs semaines. En effet, la plupart des chercheurs ayant étudié la culture du virus de l'A.I. reconnaissent que seuls, les leucocytes de cheval permettent la replication du virus. Nous avons rapporté les modalités techniques de cette culture, décrite précédemment (69).

Le travail présenté actuellement dans cette thèse concerne des recherches sur le virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval et une étude sérologique et immunologique de la maladie et enfin, application au diagnostic pour une enquête épidémiologique en France.

Comme nous le verrons plus loin, ce virus est encore à l'heure actuelle l'un des plus mal connus. Quand nous avons commencé notre travail, la nature de son acide nucléique, son type de symétrie, sa structure pour ne citer que des éléments essentiels restaient inconnus.

Un tel sujet d'étude offre donc un champ d'investigation extrêmement large... mais assez délicat en raison des difficultés que l'on éprouve pour caractériser la présence du virus, hormis l'inoculation au cheval, méthode facile mais combien onéreuse!

La pathogénie encore fort obscure de cette anémie d'origine virale, unique en pathologie comparée, et la prolifération massive et généralisée d'éléments lymphoïdes, (à tel point que l'auteur Américain SQUIRE (94) n'hésite pas à la classer parmi les maladies "lymphoprolifératives" à côté de lymphomes, de myélomes, de la maladie Aleoutienne, etc... et que les docteurs Japonais YAMAGIWA et ONO emploient même le mot leucémie), peuvent inciter à prendre le virus de l'anémie infectieuse comme un modèle d'étude de maladies à prolifération cellulaire anormale d'origine virale.

Enfin dans le domaine du diagnostic de la maladie, il n'existe aucun critère précis et les lésions tant macroscopiques que microscopiques et biochimiques ne sont nullement spécifiques.

Nous allons traiter dans une première partie les connaissances acquises d'une part sur le virus de l'ANEMIE INFECTIEUSE (A.I.E)

D'autre part nous allons étudier, l'état actuel des principales connaissances portant sur le diagnostic et l'EPIDEMIOLOGIE de la maladie, puis nous exposerons dans une seconde partie, les Techniques, les résultats et les commentaires qui découlent de nos recherches personnelles sur l'étude du virus de l'anémie infectieuse des équidés, les diagnostics sérologiques et Immunologiques et enfin les résultats de l'enquête épidémiologique de la maladie en France selon le plan détaillé qui suit :

P L A N

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

I. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE DES EQUIDES (A.I.E.)

- A. Propriétés physiques et action des agents physiques.
 - 1. Filtration et Ultrafiltration
 - 2. Ultracentrifugation
 - 3. Adsorption
 - 4. Action de la température
- B. Morphologie
- C. Propriétés chimiques et action des agents chimiques.
- D. Culture du virus
 - 1. Culture in vivo
 - 2. Culture in ovo
 - 3. Culture en culture cellulaire
- E. Etude du virus en culture cellulaire
 - 1. Passage en série et effet cytopathogène du virus
 - 2. Interférence avec d'autres virus
- F. Virulence

II. DIAGNOSTIC ET EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE

- A. Diagnostic de l'A.I.E.
 - 1. Diagnostic sérologique
 - a. Réaction de fixation du complément
 - b. Réaction de neutralisation
 - c. Réaction d'hémagglutination
 - d. Réaction de précipitation
 - 2. Diagnostic allergique
- B. Etude épidémiologique

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES

Introduction : But du travail et plan général des recherches entreprises.

Matériel :

- 1 - Souches virales
- 2 - Systèmes cellulaires
- 3 - Milieux de culture
- 4 - Produits de laboratoire
- 5 - Matériel spéciaux
- 6 - Chevaux
- 7 - Sérums des chevaux

Techniques :

- A) Les principales modalités de la technique de mise en culture de leucocytes de cheval
- B)
 - 1 - Inoculation aux cultures de leucocytes
 - 2 - Passage en série
 - 3 - Autres systèmes cellulaires
- C) Etudes du virus de l'A.I.E.
 - 1 - Détermination de la nature d'acide nucléique
 - a) Par l'emploi de la 5 I.D.U.
 - b) Emploi de d'acridine-orange
 - 2 - Filtration
 - 3 - Microscope électronique
- D) Isolement et étude d'un herpès virus équin
 - 1 - En culture cellulaire
 - 2 - Action de la 5 iodo 2 désoxyuridine
 - 3 - Etude du pouvoir pathogène, antigène et immunogène
- E) Etude de l'antigène du virus de l'A.I.
 - 1 - Préparation de l'antigène A.I.
 - 2 - Obtention de l'antigène A.I.
 - 3 - Thermostabilité de l'antigène
 - 4 - Action des produits chimiques
 - 5 - Etude de la spécificité de l'antigène produit
 - 6 - Electrophorèse de l'antigène
 - 7 - Fractionnement sur colonne sephadex
- F) Préparation de sérum hyperimmun anti Anémie infectieuse
- G)
 - 1 - Technique de précipitation en gélose
 - 2 Microprécipitation en milieu gélifié

- H) Réaction d'hémagglutination conditionnée
- I) Réaction d'allergie vis à vis du virus de l'A.I.
 - 1 - Pouvoir allergène du virus de l'A.I.
 - 2 - Essais d'inactivation de l'antigène

RESULTATS

Chapitre I - Replication du virus de l'A.I.E.

- A) En culture de leucocytes du cheval
 - 1 - Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval
 - 2 - Passages en série sur leucocytes de cheval
 - 3 - Epreuve de la replication viral par inoculation au cheval
- B) Autre système cellulaire

Chapitre II - Etude du virus de l'A.I.E.

- A) Nature de l'acide nucléique
 - 1 - Action de la 5 iodo 2 désoxyuridine
 - 2 - Emploi de l'acridine-orange
- B) Filtration
- C) Etude au microscope électronique

Chapitre III - Isolement et étude d'un herpèsvirus équin

- a - Isolement du virus
- b - Effet cytopathogène
- c - Etude en culture cellulaire
- d - Nature de l'acide nucléique
- e - Pouvoir pathogène, antigène et immunogène
- f - Microscopie électronique

Chapitre IV - Etude du pouvoir antigène du virus de l'A.I.

- A) Préparation de l'antigène
 - 1-a) Détermination du tissus fournissant le meilleur antigène
 - b) Localisation de l'antigène
 - 2 - Obtention d'un antigène liquide du virus de l'A.I.E.
 - a) Inoculation de chevaux en vue de la préparation de l'antigène.
 - b) Traitement des rates fournissant l'antigène.
 - c) Facteurs conditionnant le pouvoir antigène
 - d) Résultats obtenus avec les rates provenant des chevaux sacrifiés à différents stades de la maladie.

B) Vérification de la spécificité de l'antigène obtenu.

- 1 - Réactions sérologiques de l'antigène avec différents sérums
- 2 - Absorption de l'antigène avec des sérums antiviral de l'A.I.E.
- 3 - Absorption des anticorps d'un sérum hyrimmun anti A.I.E. par l'antigène A.I.E.
- 4 - Identité de l'antigène A.I.E. dans les extraits de différentes rates.
- 5 - Rapport entre l'antigène A.I.E. et d'autres antigènes
- 6 - Vérification de la spécificité de la réaction sérologique par inoculation au cheval sensible.

C) Caractéristiques de l'antigène A.I.E.

- 1 - Action des produits chimiques
- 2 - Thermostabilité de l'antigène
- 3 - Fractionnement sur colonne séphadex

D) Electrophorèse de l'antigène

Chapitre V - Diagnostic sérologique

A) Réaction de précipitation en milieu gélifié

- I - Caractères des lignes de précipité spécifiques
- 2 - Caractères et identification des lignes non spécifiques
- 3 - Augmentation de la sensibilité de la réaction grâce à l'antigène liquide.
 - a) Comparaison du pouvoir précipitant de l'antigène liquide et de l'antigène solide.
 - b) Détermination de la dose optimale d'antigène-anticorps (titrage de l'antigène)

B) Réaction d'hémagglutination conditionnée

C) Technique de micro- méthode de précipitation

Chapitre VI - Recherche de l'allergie vis à vis du virus de l'Anémie Infectieuse

A) Pouvoir allergène

B) Préparation d'antigène non virulent en vue d'un diagnostic allergique.

Chapitre VII - Cinétique de la réponse sérologique à l'infection

A) Détermination de la date d'apparition des anticorps précipitant après l'infection.

B) Evolution des anticorps précipitant

Chapitre VIII - Application du diagnostic sérologique à une enquête épidémiologique en France.

A) Animaux soumis au sondage épidémiologique.

- 1 - Résultats portant sur des effectifs de chevaux
- 2 - Résultats des examens des sérums conservés au congélateur.
- 3 - Résultats portant sur les sérums reçus récemment.

B) Relation entre les résultats du test de précipitation et l'expression clinique.

C) Rapport entre l'hyperimmunisation et la positivité des réactions.

D) Isolement du virus à partir de chevaux infectés de façon inapparente.

E) Etude de différents facteurs épidémiologiques.

DISCUSSION

Chapitre I - Replication virale et épreuve de replication

A) Culture du virus de l'A.I. en culture de leucocytes de cheval.

B) Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval

- 1 - Sur cellules vivantes
- 2 - Après coloration

C) Valeur de l'effet cytopathogène pour l'appréciation de la replication virale.

D) Autres systèmes cellulaires

Chapitre II : Etude du virus de l'A.I.

A) Nature de l'acide nucléique

B) Filtration

C) Microscope électronique

Chapitre III - Isolement et étude d'un herpèsvirus équin

Chapitre IV - Etude du pouvoir antigène du virus

A) Préparation de l'antigène A.I.

- B) Nature de l'antigène
- C) Spécificité de l'antigène
- D) Unicité de l'antigène précipitant
- E) Réactions non spécifiques
- F) Electrophorèses de l'antigène

Chapitre V - Diagnostic sérologique

- A) Précipitation en gélose et microtechnique
 - 1 - Spécificité du test de précipitation en gélose
 - 2 - Sensibilité du test
 - 3 - Avantages et inconvénients
- B) Autre réaction sérologique "le test d'hémagglutination conditionnée".

Chapitre VI - Recherche de l'allergie vis à vis de l'antigène de l'A.I. des équidés

Chapitre VII - Cinétique de la réponse sérologique à l'infection

Chapitre VIII - Enquête épidémiologique

Conclusions

Bibliographie

PREMIERE PARTIE

- ETAT ACTUEL DES PRINCIPALES CONNAISSANCES PORTANT SUR LE VIRUS DE
"L'ANEMIE INFECTIEUSE DES EQUIDES"

- DIAGNOSTIC ET EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE



I - CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE
DES EQUIDES

L'étude du virus de l'anémie infectieuse est encore très incomplète, les lacunes relatives à sa connaissance s'expliquent par les difficultés de culture et de purification de l'agent pathogène et par l'impossibilité d'étudier le virus sur une espèce animale de laboratoire régulièrement sensible.

A fortiori la place du virus dans la taxonomie ne peut-elle être précisée...

Nous allons passer en revue les principales propriétés du virus de l'anémie infectieuse, laissant la première place à celles qui ont été étudiées par culture de virus en culture de leucocytes de cheval.

Nous ferons de large emprunts à la monographie de GORET et coll (35).

PROPRIETE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE

A - PROPRIETES PHYSIQUES ET ACTION DES AGENTS PHYSIQUES

1) Filtration et ultrafiltration

VALLEE et CARRE (109) établissent, les premiers, le caractère filtrable de l'agent infectieux de la maladie. Le virus traverse les bougies Berkefeld et les membranes d'Elford.

Ses dimensions appréciées par cette dernière technique sont comprises entre 18 et 50 nm (BALOZET) (10).

Par la technique d'ultrafiltration, MOHLMANN et GRALHERR (70), ARAKAWA et coll (2) ont rapporté la taille du virus entre 60 et 95 ou 20 et 60 nm successivement.

Récemment, MOORE et coll (73) également par la technique d'ultrafiltration indiquent une taille de 30 nm pour le virus de l'anémie infectieuse. (cf. Morphologie du virus) comme preuve ils rapportent la transmission de la maladie chez les chevaux réceptifs, l'inoculation se traduisant par des signes cliniques et des lésions d'anémie infectieuse non équivoques.

2) Ultracentrifugation

MOHLMANN et GRALHERR (70) estiment, par ultracentrifugation, les dimensions du virus entre 60 et 95 nm NAKAJIMA et coll (83) ont étudié le virus de l'A.I. par centrifugation en gradient de densité de chlorure de Cesium. Ils ont obtenu, pour la densité du virus, des chiffres compris entre 1,14 et 1,20 g/ml avec un pic à 1,16 et 1,17 g/ml.

3) Adsorption

Le virus s'adsorbe sur particules de noir animal, sur kaolin, sur hydrate d'alumine, sur hématie de cheval et plus irrégulièrement sur hématies de poulet.

4) Action de la température

Le virus contenu dans le sang résiste plus d'un mois à la température du laboratoire (CARRE et VALLEE (19)). Entre 0° et + 2°C le virus conserve sa virulence deux ans et à - 15°C quatre ans (GUARINI (40)).

A 56 ou 58°C, le virus résiste une heure (HEMPEL (42)), mais il est inactivé durant le même temps à 60°C (commission Japonaise (25) ; par contre GAINER et coll (34) ont vérifié qu'à cette température 60°C durant le même temps (1 heure) le virus n'est pas inactivé.

Une stérilisation absolue est obtenue par ébullition pendant 15 minutes (KESTER (53)).

B - MORPHOLOGIE

La morphologie du virus de l'anémie infectieuse est encore mal connue. Des particules ont été photographiées au microscope électronique par divers chercheurs.

REAGAN et coll. (89) observent ainsi des particules sphériques dans le sédiment obtenu par centrifugation à 52 000 tours/minute pendant 3 heures de sérum de cheval infecté ; ces particules auraient des dimensions comprises entre 11 et 59 nm.

ISHII et coll. (50) notent également que le sérum de cheval infecté renferme des particules de 20 à 50 nm visibles au microscope électronique après ultracentrifugation. BEUST (12) n'obtient aucune image virale dans ces mêmes conditions.

TABUCHI et coll. (98) opérant sur un matériel virulent représenté par des cellules du système réticulo-histiocytaire, détruites par ultrasons et centrifugées, remarquent au microscope électronique, des particules sphériques ayant un diamètre moyen de 22 nm. Des chevaux traités avec ce même matériel, dilué à 10^{-5} , réagissent par des signes cliniques superposables à ceux de l'anémie infectieuse.

Il semble toutefois, à la lumière d'essais ultérieurs, que des éléments de ferritine aient été pris pour des particules virales lors de l'examen microscopique. Des recherches s'avèrent nécessaires (ISHII (49) pour séparer plus sûrement les particules de ferritine de celles susceptibles de représenter le virion.

OLEINIK (87) retrouve dans les hématies hémolysées de cheval, des corpuscules de 50 nm de diamètre, présumées être le virus de l'anémie infectieuse.

GAINER (33), décrit dans le foie de chevaux atteints d'anémie infectieuse une disposition en mosaïque de particules de 25 nm ressemblant à des virus, cette observation a été décelée grâce au microscope électronique.

NAKAJIMA et coll. (81) rapportent la mise en évidence des particules sphériques de 90 à 140 nm dans le surnageant et dans les cytoplasmes de leucocytes mis en culture infectée.

HENSON et coll. (44) signalent l'existence de particules virales de 70 nm de diamètre chez des macrophages de culture de leucocytes.

MOORE et coll. récemment (73) indiquent une taille inférieure à 32 nm pour le virus de l'anémie infectieuse.

En analysant toutes ces expériences on est frappé par la disparité des résultats obtenus sur la morphologie du virus.

C - PROPRIETES CHIMIQUES DU VIRUS DE L'A.I.E.

La nature de l'acide nucléique de l'A.I.E. est resté inconnu jusqu'en 1969 date à laquelle nous l'avons établie : (type ARN) (103). La même année MOORE (72) rapporte que l'acide nucléique viral est du type ADN. Par contre NAKAJIMA et coll. (84) utilisant la technique du marquage isotopique concluent qu'il s'agit du type ARN.

Nous allons exposer dans ce texte les raisons qui nous permettent d'affirmer qu'il s'agit bien du type ARN.

ACTION DES AGENTS CHIMIQUES

Le chloroforme (commission Japonaise (25) (HEIERMANN (46) (BALOZET (7), le toluène (commission Japonaise (25), la glycérine (BALOZET (8), le fluorure de sodium (BALOZET (6) semblent pratiquement sans action sur le virus.

Contrairement aux observations antérieures (BALOZET (6) il a été récemment prouvé que le virus est sensible à l'éther : traité par cette substance, le virus de l'anémie infectieuse se montre incapable de reproduire la maladie après inoculation au cheval réceptif (NAKAJIMA et coll. (80) et MOORE (72).

L'action du phénol et celle du formol varient selon la concentration de ces produits et la température à laquelle on les fait agir sur le virus.

La saponine à 1 p. 100 entraîne la destruction du virus en moins de 24 heures (BALOZET (11). Le taurocholate de sodium à la concentration de 2,5 p.100 dans le sérum est actif (commission Japonaise (25).

Le ricinoleate de sodium à 1 p. 100 l'inactive en moins de 15 mn (BALOZET (9). En revanche la bile se montre sans effet (BALOZET (6).

NAKAJIMA et coll. (81) ont récemment étudié l'action de la trypsine, de la ribonucléase sur le virus.

Ce dernier s'est montré résistant à l'action de la trypsine. La ribonucléase et la désoxyribonucléase à une concentration de 20 g/ml ne modifient pas le titre du virus.

D - CULTURE DU VIRUS

Nous envisagerons successivement la culture du virus IN VIVO, IN OVO et en culture cellulaire, en développant largement ce dernier aspect.

1) Culture in vivo

De très nombreux essais portant sur les espèces animales les plus diverses ont été entrepris. De l'ensemble de ces expériences rapportées dans la monographie de GORET et coll. (5) on peut extraire la conclusion de ces auteurs "L'unanimité semble se faire à l'heure actuelle sur la notion suivante : aucune espèce animale, en dehors des équidés, n'est régulièrement sensible à l'inoculation du virus de l'anémie infectieuse".

Dans ces conditions on comprend les difficultés qu'ont éprouvés les différents chercheurs, à mettre en évidence la présence du virus dans un prélèvement ou dans une substance, et par suite, tout l'intérêt qui s'attache à l'obtention de culture virale en culture cellulaire.

2) Culture in ovo

Tous les essais de la culture du virus in ovo se sont soldés par un échec. HALLAUER et coll. (41), STEIN et coll. (59), DREGUSS et LOMBARD (29), TABUCHI et coll. (89).

Un virus semble toutefois avoir été fixé au bout de huit passages sur oeuf embryonné par ARAKAWA et coll. (3) mais ces résultats n'ont pas été confirmés.

3) Culture en culture cellulaire

De très nombreuses cellules ont été étudiées en vue d'obtenir la replication du virus de l'A.I.

WATANABE (110) employait des cellules de coeur, de foie, de rein, de poumon et de rate d'un foetus de poulain.

KOBAYASHI (54) a utilisé la glande surrénale, le rein, les ganglions lymphatiques et la rate de poulain. Aucun effet cytopathogène n'apparaissait dans les cultures de ces différents types de cellules. Cependant le virus avait dû se multiplier puisque les inoculations à des chevaux sains, de liquides de culture du cinquième passage, pour le premier auteur du huitième

passage, pour le second se révélèrent positives et provoquaient l'apparition des signes cliniques de la maladie.

Culture en leucocytes de cheval

WATANABE (III) obtient une destruction des cellules au bout de 11 jours en passant la souche Wyoming et la souche Goshun 6 fois sur culture de leucocytes de cheval.

ISHITANI (52) observe 7 à 9 jours après l'inoculation du virus en culture de leucocytes, une agglomération, une dégénérescence et un détachement des cellules de la paroi de verre.

MOORE (74-75) note un effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval caractérisé par une migration des leucocytes et la formation de petites amas de cellules séparés entre eux par des zones dépourvues de cellules. Cet auteur a réalisé la même année, dix passages en série de deux souches de virus de l'A.I.

KOBAYASHI et KONO (56) résument ainsi les principaux aspects de l'effet cytopathogène : apparition de cellules globuleuses, à structure granulaire, agglomération des cellules dégénérées, puis détachement du verre.

Les quatre souches employées par ces auteurs, souches German, Goshun, New-Hampshire et Wyoming provoquent exactement le même effet cytopathogène en culture de leucocytes.

L'effet cytopathogène apparaît plus rapidement lorsque le virus a subi plusieurs passages en cellule. Ainsi KOBAYASHI et KONO (56) obtiennent un effet cytopathogène en 10 à 14 jours après inoculation du sérum du cheval infecté à des leucocytes ; lorsque ces cellules sont infectées à l'aide d'une souche de virus ayant déjà effectué 10 passages en culture de leucocytes, l'effet cytopathogène apparaît au 6ème jour après l'inoculation lorsque la concentration de l'inoculum est importante, et environ en 2 semaines lorsque de faibles quantités de virus sont inoculées aux cellules. Ces auteurs ont également montrés la variation de réceptivité des leucocytes en fonction de l'âge de la

culture. Ainsi plus les cellules sont infectées tardivement après leur mise en culture, plus l'effet cytopathogène apparait lentement ; il est donc souhaitable d'infecter les leucocytes peu de temps après leur mise en culture.

Les résultats portant sur la culture du virus en culture de cellules KB, Hela etc.... n'ont à notre connaissance, jamais été confirmés, sauf par SAURINO et coll. (91).

GAINER et coll. (34) ont obtenu en 1965 une multiplication de virus de l'anémie infectieuse dans les thymocytes du cheval et une interférence avec le virus vaccinal après dix passages dans ces cellules.

A l'heure actuelle, les cellules de choix pour la replication virale in vitro sont les cellules de moelle osseuse et surtout les leucocytes du cheval. De nombreux auteurs ont essayés de préciser les conditions d'une telle culture.

(KOBAYASHI et coll. (56), (WATANABE (111) et nous même (69). Récemment MOORE et coll. (76) ont adapté une culture de leucocytes de cheval par passage en séries (76). Cette culture de leucocytes révèle la présence et la propagation du virus de l'A.I.E.

E - ETUDE DU VIRUS EN CULTURE CELLULAIRE

a) Passage en série et effet cytopathogène du virus

KOBAYASHI (54) réussissait 17 passages du virus en culture de leucocytes de cheval. Il obtenait un effet cytopathogène sur ces cellules, qui se traduit par une dégénérescence des cellules suivie d'un décollement de la paroi du verre. L'action sur ces cellules n'est cependant pas aussi marquée qu'avec la plupart des virus cytopathogènes car les lésions apparaissent tardivement (rarement avant le 7ème jour) et la comparaison avec les tubes de cellules témoins est toujours nécessaire. Cette comparaison doit permettre d'éviter la confusion avec un éventuel effet cytopathogène dû à un virus orphelin présent chez les chevaux sains ayant fourni les leucocytes (KONO et KOBASHI (58) (59).

Dans le but de juger la replication virale en culture de leucocytes de cheval certains auteurs préfèrent la recherche de l'antigène fixant le complément dans les cultures infectées (HENSON et coll. (44) d'autres se sont adressés au phénomène d'interférence avec le virus vaccinale ou le virus de la stomatite vésiculeuse (GAINER et coll (34) et (ELZEIN et coll. (31).

YUROV (112), CRAWFORD et coll. 1971 (26) se sont adressés à la technique d'immunofluorescence directe en utilisant comme anticorps les sérums marqués des chevaux infectés en phase chronique d'A.I. et comme antigène la culture de leucocytes infectés.

Cependant le résultat le plus sûr de la replication virale dans la culture de leucocytes de cheval reste dans la reproduction de la maladie en retour au cheval neuf.

b) Interférence avec d'autres virus

Des artifices ont été utilisés pour révéler plus facilement la présence du virus au sein des cellules.

Ainsi GAINER et coll. (34) font état d'une interférence entre le virus de l'anémie infectieuse passé en culture de thymocytes de cheval et le virus vaccinal.

Par la technique des plages, ils obtiennent une réduction de 50 p.100 des plages obtenues avec le virus vaccinal lorsque les cultures ont été infectées antérieurement par le virus de l'anémie infectieuse.

Cette réduction est inhibée par l'emploi d'un sérum contenant des anticorps anti-virus de l'anémie infectieuse.

YUROV (112) rapporte que la croissance de virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) en culture de leucocytes de cheval est favorisé par l'infection antérieure de ces cellules par le virus de l'A.I.

Cette particularité pourrait conduire à employer ce phénomène d'interférence pour la détection souvent mal aisée du virus de l'anémie infectieuse.

F - VIRULENCE

La mesure de la virulence d'une souche de virus de l'anémie infectieuse est difficile. En effet, ni la forme clinique de la maladie apparue après inoculation, ni la longueur de l'inoculation, ne permettent de porter un jugement définitif sur l'agressivité d'une souche. Ainsi, du sang prélevé chez un animal atteint d'une affection inapparente, provoque chez des chevaux des formes graves rapidement mortelles en même temps que des formes légères et ce, semble-t-il, dans la même proportion que le ferait le sang prélevé au cours d'un accès violent chez un animal atteint d'une forme aiguë (BALOZET (11)). On ne peut guère tenir compte de la durée de l'incubation pour apprécier la virulence.

II - DIAGNOSTIC ET EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE

Nous envisageons dans cette deuxième partie l'état actuel des principales connaissances portant sur le diagnostic et l'épidémiologie de la maladie. Pour un développement plus complet de ces chapitres, nous renvoyons le lecteur à la monographie sur l'A.I.E. de GORET, MICHEL et TOMA (35).

A - DIAGNOSTIC DE L'A.I.E.

Il n'existe aucun signe critère. Les lésions tant macroscopiques que microscopiques et les modifications biochimiques ne sont nullement spécifiques. Le diagnostic hématologique est sujet à caution. En dehors de la mise en oeuvre de techniques non spécifiques et en l'absence d'animal de laboratoire sensible, seule pouvait être utilisée l'inoculation au cheval, méthode onéreuse fournissant des résultats parfois très tardifs.

Des progrès dans le diagnostic sérologique de la maladie, ont été réalisés au cours de ces dernières années, mais jusqu'à ce jour aucune méthode n'est reconnue officiellement pour le diagnostic.

Nous envisagerons dans le diagnostic expérimental de la maladie, le diagnostic sérologique et allergique, objets d'une partie importante de nos recherches.

1 - Diagnostic sérologique

Différentes techniques sérologiques spécifiques ont été décrites : fixation du complément, réaction d'hémagglutination, séroneutralisation et réaction de précipitation.

a) Réaction de fixation du complément

Elle a fait l'objet de multiples travaux. Il manquait l'existence d'un antigène spécifique. Dans la technique d'ALTARA et coll. (1), l'antigène était constitué par un extrait alcoolique de rate de cheval mort ou sacrifié à la phase aiguë de la maladie. D'autres modifications portent essentiellement

sur l'obtention d'un antigène plus satisfaisant. KONO et KOBAYASHI (60) et ISHITANI (52) utilisent un antigène préparé par inoculation du virus à des cultures de leucocytes de cheval. La réaction de fixation du complément donne de bons résultats à certains auteurs (KONO et coll. (60) et non satisfaisante à certaines autres comme BOULANGER et coll. (15) qui ont conclu que cette réaction n'est pas spécifique de l'agent de l'A.I.E. Il est possible de constater des réactions faussement positives dues à un auto-anticorps développé contre les tissus du cheval.

Récemment KONO et coll (1971) (63) rapportent que 8 souches de virus de l'A.I.E. possèdent un antigène commun fixant le complément, bien que l'on puisse noter quelques différences dans l'intensité de la réaction entre certains antigènes et sérums. Les anticorps fixant le complément augmentent pendant 20 jours après le pic thermique, décroissent et disparaissent en 30 jours ou persistent pendant 60 jours dans certains cas (tableau 1).

L'existence relativement courte des anticorps fixant le complément rend compte de la valeur relative et limitée qu'il faut accorder à cette technique pour son utilisation dans le diagnostic de l'A.I.E.

La valeur de cette réaction pour le diagnostic de l'infection est limitée étant donnée sa courte durée et son absence dans les infections chroniques ainsi qu'après un deuxième contact avec l'agent infectieux.

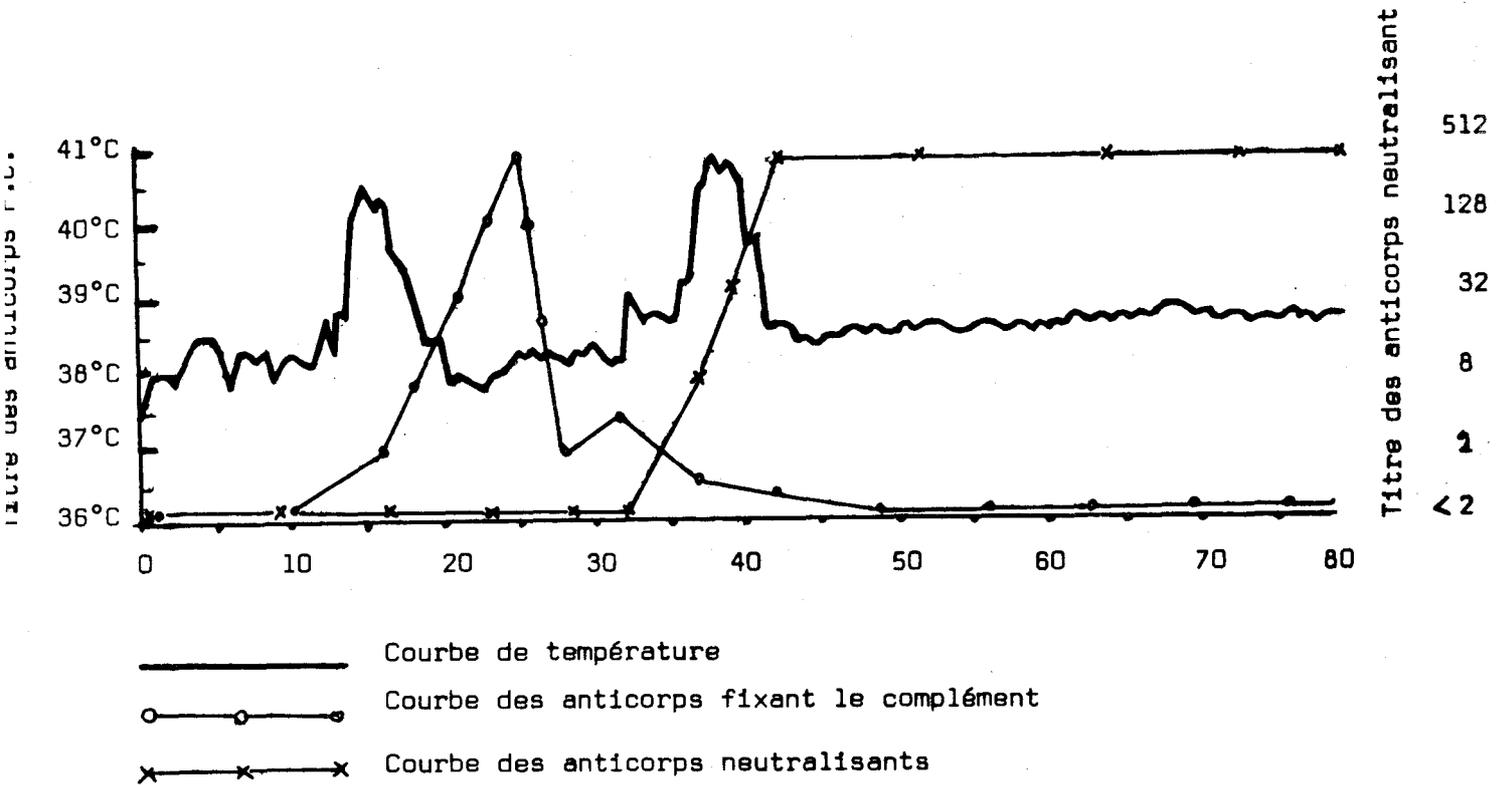
b) Réaction de neutralisation

Elle ne permet aucune application actuelle au diagnostic en raison des irrégularités des réponses données et de l'ignorance relative dans laquelle on se trouve quant aux variations qualitatives ou quantitatives de la virulence des diverses souches de virus.

L'existence des anticorps neutralisants lors de l'A.I.E. est connue. Ils commencent à apparaître entre le 45^e et le 87^e jours après l'injection et atteignent leur maximum entre le 90^e et le 148^e jour (tableau 1).

Récemment KONO et coll. 1971 (63) ont révélé par des tests de neutralisation croisée que 6 souches de virus de l'A.I.E. sont neutralisées spéci-

Tableau 1



Les anticorps fixant le complément augmentent pendant 20 jours, décroissent et disparaissent en 30 jours ou persistent 60 jours dans certains cas.

Les anticorps neutralisants commencent à apparaître entre le 45^e et le 87^e jours après l'infection et atteignent leur maximum entre le 90 et le 148^e jour. (79)



fiquement par un anti-sérum homologue et conclurent que les anticorps sont produits vis à vis de la souche virale inoculée et non contre les souches hétérologues.

c) Réaction d'hémagglutination

L'hémagglutination des hématies de poulet par le sérum de cheval suspect a été proposé (DREGUSS et LOMBARD (29), TACU (99) comme moyen d'étude, les résultats sont trop inconstants pour servir au diagnostic. SAURINO et coll. (91), DITCHFIELDS (27) ont proposé deux techniques d'hémagglutination, sans succès.

d) Réaction de précipitation

La réaction de précipitation en milieu liquide a été l'objet de travaux de plusieurs chercheurs (TIEGLAND (101), MOORE et coll. (75), LIVINSTON et coll. (67). En fait, les opinions convergent pour conclure que ce "précipitin test" n'est pas un bon test de diagnostic de la maladie, en raison du nombre assez élevé de fausses réactions positives et négatives.

La réaction de précipitation en milieu gélifié a été étudié par DREGUSS et LOMBARD (29), FUENTES et SAXER (32), SAXER et FUENTES (93) et SAXER (92), mais sans résultat vraiment convaincant. COGGINS et NORCROSS (24), ont utilisé la même technique en prenant un antigène précédemment étudié par MOHLER (71) et ALTARA et coll. (1). Cet antigène est obtenu à partir d'un tissu de rate provenant d'un cheval mort lors d'une phase aiguë de l'Anémie Infectieuse. On peut noter ici que les rates des animaux morts au cours d'une phase aiguë dans des maladies diverses ont été employées selon la technique de précipitation en gélose comme source d'antigène pour le diagnostic de ces maladies ; citons pour mémoire, le diagnostic de la peste bovine (BOULANGER (14) et celui de la peste porcine africaine (COGGINS et HEUSCHELE (23).

La rate contenant l'antigène est réduite en petits morceaux et conservée à -30°C. Plusieurs fois avant l'emploi, elle est congelée et décongelée sans broyage ni dilution. L'antigène contenu dans le tissu splénique ainsi préparé, a l'inconvénient de diffuser difficilement dans la gélose, ce qui rend parfois le test insensible pour détecter des sérums faiblement positifs :

dans ce cas le tissu antigène ne donne pas les lignes de précipitation souhaitées avec ces sérums. Le deuxième inconvénient de la méthode est de faire apparaître des arcs qu'à partir de la 3e semaine suivant l'injection.

Récemment NAKAJIMA et coll. 1971 (85) ont publié les résultats qu'ils obtenaient avec une technique de précipitation voisine en utilisant comme antigène le milieu de culture de leucocytes concentré environ mille fois. La réalisation pratique de cette technique se heurte à un grand nombre de difficultés, ce qui limite son utilisation au domaine de la recherche fondamentale. Des réactions positives avec des sérums provenant de chevaux inoculés avec des souches différentes du virus de l'A.I.E. ont été obtenues.

Après avoir étudié la réaction de précipitation, nous envisagerons dans une partie de ce travail d'établir la spécificité du test, l'utilisation d'un matériel antigéniquement valable pour augmenter la sensibilité de celui-ci afin d'aboutir à sa standardisation par la réalisation d'un titrage de l'antigène et des anticorps dans des sérums positifs.

2 - Diagnostic allergique

Le pouvoir allergique du virus de l'A.I.E. est mal connu et son utilisation dans le domaine du diagnostic n'a jamais été réalisée. Un essai a été tenté par TORRANCE (107) pour le diagnostic allergique chez deux chevaux atteints d'A.I.E. mais sans succès.

KOROTKIKH (64) poursuit une expérience d'allergie chez des chevaux infectés d'A.I.E. au stade chronique, il rapporte qu'avec 4 - 5 gouttes d'une préparation d'un antigène de composition "inconnue" déposé dans l'oeil, il obtient une réaction positive 3 heures après, avec conjonctivite et sécrétion muqueuse, puis 2 heures plus tard, une sécrétion purulente.

Selon lui, 17 à 32 % des chevaux atteints de l'anémie infectieuse réagissent à ce test. Il n'a, à notre connaissance, jamais été confirmé.

Enfin, GAINER et coll. (34) ont étudié la réaction d'hypersensibilité cutanée chez les chevaux infectés par l'A.I.E., mais ils n'ont pu tirer aucune

conclusion valable. Ils utilisent divers antigènes d'A.I.E. chauffés pendant 1 heure à 60°C pour inactiver le virus. Les auteurs remarquent que l'antigène ainsi traité provoque la maladie chez les chevaux sains : le chauffage pendant 1 heure à 60 °C a été insuffisant pour détruire le virus. Les auteurs notent également la désensibilisation cutanée des animaux par des inoculations répétées

II - Etude épidémiologique :

L'A.I.E. est très largement distribuée dans la population équine mondiale.

Le premier cas en France a été signalé en 1843 par LIGNEE. La maladie ensuite a été rapportée dans de nombreux autres pays européens : Suisse, Allemagne, Belgique, Luxembourg, Autriche, Italie et Yougoslavie.

Aux Etats-Unis la maladie est largement répandue. Le Canada, le Japon et certains pays africains ne sont pas indemnes de la maladie. En France, l'A.I.E. a été signalée chez les chevaux dans divers départements sous une forme explosive atteignant environ la moitié de la population chevaline. La disparition de la symptomatologie chez les chevaux infectés conduit à penser que la maladie a disparu actuellement du territoire Français.

Toutefois, l'examen des bulletins sanitaires prouve que l'infection n'a jamais complètement disparu du territoire français puisque, chaque année, quelques cas sporadiques ont été signalés jusqu'en 1966. Au cours des dernières décennies, le nombre de foyers observé a diminué progressivement pour s'annuler finalement en 1968.

Le diagnostic de la maladie, encore à ce jour n'est pas établi officiellement de par le monde. On se base sur les symptômes cliniques et les résultats de l'examen sanguin ou bien l'inoculation à l'animal réceptif. L'absence d'une méthode de diagnostic simple, codifiée, reconnue par tous en particulier de la forme chronique de la maladie, laisse prévoir la possibilité d'expansion de l'infection dans un pays et entre les pays. Avec la mise au point récente de la technique de l'immunodiffusion, il sera possible de poser un diagnostic de la maladie en particulier chez les chevaux infectés latents. A notre connais-

sance, les pays qui ont utilisé la technique d'immunodiffusion pour le diagnostic de la maladie sont les Etats-Unis COGGINS (L) The blood horse p. 3014 30 Août 1971 (21) et le Canada, ASTROM (E.) The blood horse p. 3009, 30 Août 1971. Nous allons exposer dans une partie de cette thèse, les résultats de nos études sur les sérums des chevaux examinés dans quelques effectifs en France.

° °
°

L'anémie infectieuse des équidés nous apparait donc comme une des maladies animales les plus mal connues et les plus énigmatiques.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES



INTRODUCTION

BUT DU TRAVAIL ET PLAN GENERAL DES RECHERCHES ENTREPRISES

L'étude bibliographique concernant la structure et les propriétés du virus de l'anémie infectieuse des équidés nous a révélé combien ce virus était mal connu ; le diagnostic de la maladie n'était alors nullement spécifique. Nous avons donc tenté d'apporter une contribution pour une meilleure connaissance de ce virus zoophile.

I) Culture du virus sur différents types des cellules

- a) En possession d'une technique de culture de leucocytes de cheval assurant des résultats satisfaisants, après avoir inoculé le virus à des cellules nous avons essayé de préciser un certain nombre de propriétés du virus de l'anémie infectieuse.

L'effet cytopathogène a été observé sur des cellules vivantes et sur cellules leucocytaires fixées et colorées.

Des passages en série de différentes souches de virus de l'anémie infectieuse ont été ainsi réalisés sur des leucocytes du cheval.

Après un certain nombre de passage en série, la preuve de la replication a été apportée par inoculation en retour du cheval.

- b) Nous avons recherché quelle pouvait être l'action du virus sur différents types de cellules K.B., Nil, Rein de singe et pour déterminer si son action est exclusivement orientée sur les cellules leucocytaires de cheval

II) Etude du virus

Des expériences ont été menées afin de vérifier la taille du virus par filtration, car les résultats consignés dans la littérature étaient loin d'être concordant.

Nous avons tenté, à l'aide de coloration par l'orangé d'acridine et l'emploi d'inhibiteurs de l'acide désoxyribonucléique, de préciser la nature de cet acide.

Enfin les préparations de leucocytes infectés ont été soumises à l'examen au microscope électronique afin de tenter l'observation, de particules virales.

III) Contamination des cultures cellulaires par d'autres agents pathogènes (Herpèsvirus)

En effet au cours de nos recherches portant sur le virus de l'anémie infectieuse, nous avons eu l'occasion de voir apparaître un effet cytopathogène dans certains tubes de cultures de leucocytes provenant de chevaux apparemment sains. Des herpèsvirus, souches virales responsables de cet effet cytopathogène ont été isolées, passées en série sur différents systèmes cellulaires et comparées avec la souche P3 de rhinopneumonie et la souche LK de Plummer.

IV - Diagnostic de la maladie

Le diagnostic expérimental de l'anémie infectieuse est demeuré difficile pendant longtemps.

La deuxième étape de nos recherches comprendra l'étude du pouvoir antigène du virus de l'anémie infectieuse, la préparation de l'antigène, la vérification de sa spécificité dans les réactions sérologiques, ses caractères physicochimiques, son fractionnement et son étude électrophorétique.

A) NOUS AVONS TENTE DE METTRE AU POINT DES TECHNIQUES DE SERODIAGNOSTIC POUR L'ANEMIE INFECTIEUSE

1) Précipitation en gélose

Nous avons mis au point une technique à partir d'un antigène liquide permettant un titrage des réactifs qui autorise ainsi une meilleure codification des conditions de la réaction.

NOTA : La cinétique de la réponse sérologique à l'infection par le virus de l'anémie infectieuse a été réalisée par la technique de précipitation en gélose, afin de déterminer la date d'apparition des anticorps précipitant après l'infection.

2) Technique d'hémagglutination conditionnée

Utilisation des globules rouges de chevaux et de moutons, tannés puis sensibilisés par l'antigène liquide évoqué ci-dessus. Très haute sensibilité de cette technique qui facilite une étude sérologique de précision

B) Citons également une technique de recherche de l'allergie vis à vis du virus de l'anémie infectieuse chez les chevaux infectés d'une façon latente et son application pour le diagnostic.

V - Recherche épidémiologique

Nous avons réalisé un sondage épidémiologique sur des chevaux de race et de mode de vie différents provenant de diverses régions de France. Indépendamment des sérums des chevaux infectés de façon naturelle ou expérimentale nous avons ainsi soumis 2 000 sérums de chevaux au test de précipitation en gélose.

Une partie de ces recherches ont fait l'objet des publications qui suivent :

- 1) Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés ;
 - 1) Identification sur le cheval de courses ; Isolement de souches de virus
REC. Med. Vét. 1969, 145, 1055-1068
- 2) Recherches sur l'A.I.E.
 - II) Diagnostic de la forme latente par déclenchement des crises.
Rec. Méd. Vét. 1969, 145, 1213-1227
- 3) Recherches sur l'A.I.E.
 - III) Mise au point d'une technique de culture de leucocytes de cheval
Rec. Med. Vét. 1970, 146, 401-414
- 4) Recherches sur l'A.I.E.
 - IV) Etude du virus obtenu en culture de leucocytes de cheval

Rec. Méd. Vét. 1970, 146, 565-581

- 5) Le diagnostic expérimental de l'anémie infectieuse des Equidés.
Communication au 19e Congrès Mondial Vétérinaire, Mexico, Août 1971, p.775.
- 6) Diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par la technique de précipitation en gélose. Essais de standardisation de la technique et de l'antigène
Communication au 12e Congrès International de Standardisation Microbiologique, Annecy 1971.
- 7) Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse par précipitation en gélose.
I - Mise au point de la technique
Bull. Acad. Vét. 1971, 44, 403-413.
- 8) Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse par précipitation en gélose
II - Premiers résultats d'une enquête épidémiologique en France.
Bull. Acad. Vét. 1971, 44, 415-426.
- 9) Possibilité et spécificité du sérodiagnostic de l'A.I.E. par précipitation en gélose. Technique et application au dépistage de l'infection chronique inapparente.
C.R. Acad. des Sciences. 1971, t.273, p.2721-2724
- 10) Présence d'Herpèsvirus dans les cultures de leucocytes de chevaux sains
Ann. de recherches Vét. 1971, 2, (2), 223-230.

L'ensemble de ce travail sera exposé en passant successivement en revue le matériel employé ; les techniques, les résultats constatés, et sera suivi d'une discussion portant sur l'intérêt des recherches.

MATERIEL

Le matériel utilisé consiste en souches virales, en systèmes cellulaires, en différents milieux de culture et produits de laboratoire et enfin en chevaux et en sérums de chevaux.

1) Souches virales

A) Souches de virus de l'Anémie Infectieuse

- a) Trois souches françaises de virus de l'anémie infectieuse du cheval isolées à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort dans le service des maladies contagieuses ont été employées. Le matériel de départ était représenté par le sérum de chevaux atteints d'anémie infectieuse, prélevé au cours d'une crise.

Ces trois souches sont les suivantes :

- "Vitastéron" (sérum prélevé le 4 Mars 1968)
- "Vent des Prairies" (sérum prélevé le 2 Février 1967)
- "Blanchette" (sérum prélevé le 28 Août 1968)

- b) Une souche américaine due à l'obligeance du docteur MOTT (1)* a également été utilisée. Il s'agit de la souche "Wyoming" provenant de Agricultural Research Service, National Animal Disease Laboratory, AMES, et consistant, d'une part, en sérum lyophilisé (le 1er Septembre 1947) et, d'autre part, en sérum frais de cheval (n°47) prélevé le 15 Novembre 1968.

B) Souches d'herpèsvirus

- a) Virus herpétique équin 1 (VHE 1) : Souche P3 isolée à Alfort en 1968 (BRION et al., à partir d'un avorton de jument. Cette souche est sérologiquement identique à la souche Kentucky B (2)*.
- b) Virus herpétique équin 2 (VHE 2) : Souche LK isolée par PLUMMER et WATERSON à partir du jetage d'un cheval malade.
- c) Souches virales isolées à Alfort au cours de passages en série du virus de l'anémie infectieuse des équidés en cultures de leucocytes de cheval ; Souches C L1, C L2, CL3.

1)* Nous adressons nos vifs remerciements au docteur MOTT

2)* Aimablement fournie par le Docteur J.T. BRYANS.

2) Systèmes cellulaires

Nous avons employé les systèmes cellulaires suivants :

- Culture de leucocytes de cheval préparées selon la technique décrite en détail par ailleurs (69) page p35)
- Cellules NIL expédiées au laboratoire du Professeur GORET par le Docteur DIAMOND (1)* du Wister Institute à Philadelphie
- Cellules KB provenant de l'Institut Pasteur, Paris.
- Cellules de rein de singe, de même provenance.
- Cellules PK 15, cellules rénales de porc. (Laboratoire du Professeur GORET).
- Lignée He La d'origine humaine et lignée BHK 21 (2)*
- Cellules primaires de rein de lapin, d'embryon de chat et de rein de foetus de veau, préparées selon les techniques classiques.

3) Milieux de culture

Les principales substances ayant servi à la préparation des milieux pour ces systèmes cellulaires sont les suivants :

- Sérum de veau (Institut Mérieux).
- Sérum de cheval (Institut Pasteur, Paris)
- Liquide de Hanks (Institut Pasteur, Paris)
- Milieu de Eagle (Institut Mérieux, Lyon)
- Trypsine (Institut Mérieux, Lyon).

4) Produits de laboratoire

Les principaux produits suivants ont été utilisés :

- 5 iodo 2 désoxyuridine (Laboratoire Chauvin-Blanche)
- Thymidine (Merck)
- Héparine (Roche)
- Gélose (Difco)
- Acridine orange
- Filtres millipore de 200 nm, 100 nm, et 50 nm

* (1) Nous exprimons nos bien vifs remerciements au Docteur DIAMOND

* (2) Du commerce

- Noble Agar (Difco)
- Acide borique (Prolabo)
- Tannin à l'Ether (Prolabo)
- Bicarbonate de sodium (Prolabo)
- Séphadex G 200 (Séphadex)
- Carbovax 20 M (Serlabo)

5) Materiels speciaux

- a) Un emporte-pièce métallique comportant 7 tubes, d'un diamètre de 7 mm, et distants les uns des autres de 3 mm.
- b) Lamelles plastiques, perforées de façon à obtenir un trou central et 6 trous périphériques tous équidistants et situés à 4 mm du trou central. Ces trous ont une capacité de 0,015 ml.
- c) Cuve à électrophorèse modèle 2 000 (SEBIA)

6) Chevaux

Différents lots de chevaux ont été utilisés pour nos recherches.

a) Chevaux sains :

15 chevaux sains appartenant au club hippique de l'Ecole Vétérinaire ont été utilisés pour le prélèvement de sang afin de permettre en culture des leucocytes. Races : Française, Anglo-Arabe, et Arabes ; âge : entre 4 et 16 ans ; sexe : mâle et femelle.

b) Chevaux infectés de l'anémie infectieuse

Nous avons utilisé 12 chevaux infectés dans des conditions naturelles ou expérimentales avec le virus de l'anémie infectieuse. Leurs sérums prélevés à différents stades de l'infection (forme aiguë ou chronique) ont été conservés à -30°C, jusqu'à utilisation.

c) Chevaux destinés à la préparation de l'antigène d'anémie infectieuse

Deux chevaux, Edel et Nande, de deux poneys I et II ont été infectés par le virus de l'anémie infectieuse, dans le but de préparer de l'antigène d'anémie infectieuse des équidés

d) Chevaux et poneys utilisés pour des études expérimentales

Les poneys n° 3, 4, et 5 ont été employés pour l'étude sérologique de l'anémie infectieuse et un poulain et une jument pour l'étude du pouvoir pathogène et antigène d'herpèsvirus.

7) Sérums des animaux

2313 sérums de chevaux provenant de diverses régions de France, sont soumis au test de précipitation en vue de l'étude épidémiologique et sérologique de l'anémie infectieuse des équides.

1024 de ces sérums proviennent de 6 effectifs destinés à la préparation de sérums hyperimmuns contre les maladies bactériennes, virales, etc....

773 de ces sérums ont été prélevés sur des chevaux atteints ou suspects de différentes maladies et spécialement de grippe et de rhinopneumonie et stockés pendant 5 ans et quelques mois à -30°C.

Enfin 516 sérums récents d'origine géographique variée provenant de chevaux sains ou atteints de différentes maladies.

TECHNIQUE

A) LES PRINCIPALES MODALITES DE LA TECHNIQUE DE MISE EN CULTURE DE LEUCOCYTES DE CHEVAL

La technique en détail est rapporté et décrite antérieurement (LUKA ISKANDER, 69)

En résumé :

Prélèvement du sang sur héparine (40 u. héparine par ml de sang). Sédimentation du sang dans une éprouvette inclinée à 45° et laissée à la température du laboratoire. Représentation graphique de l'évolution de la sédimentation et prélèvement du plasma lors du ralentissement de la vitesse de sédimentation. (tableau 2). Mesure du volume du plasma et numération des globules blancs. Centrifugation du plasma à 1000 tours/minute pendant 9 mn. Lavage du culot de centrifugation avec du liquide de Hanks. Remise en suspension soigneuse du culot leucocytaire dans une petite quantité de liquide de Hanks.

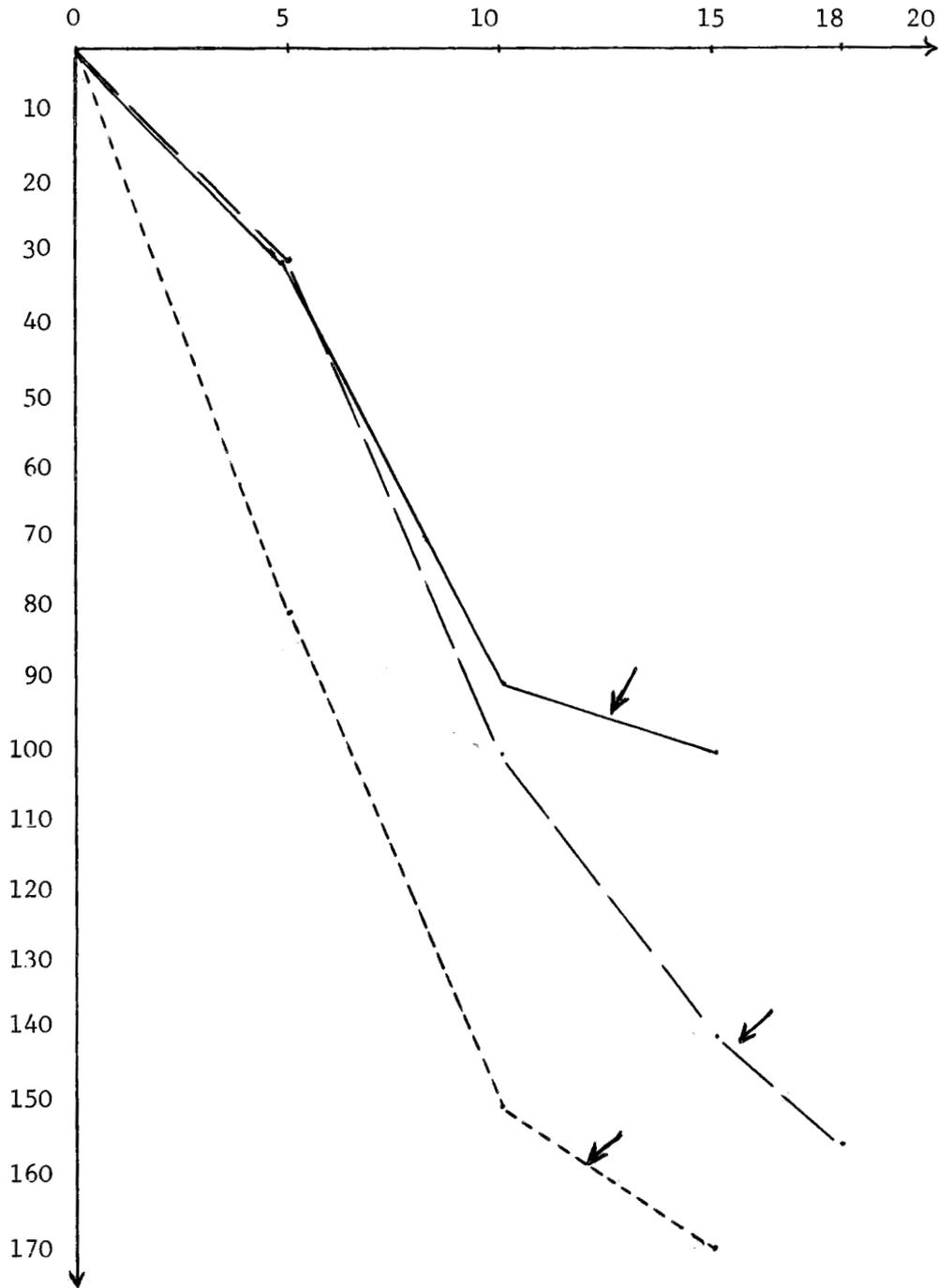
Addition de milieu de culture de façon à obtenir une concentration de 13 millions de leucocytes/ml, dans un milieu contenant :

- 60 % de sérum de veau
- 40 % de liquide de Hanks

Distribution de la suspension des leucocytes agitée en permanence, dans les tubes ou les flacons de culture.

Changement de milieu 24 h après un séjour à 37°. Les cellules sont rincées deux fois avec du liquide de Hanks puis le milieu définitif contenant 80 % de sérum de veau est introduit dans les tubes. Incubation à 37°. Changement de milieu tous les 8 à 10 jours.

Au cours de mise en culture, nous avons constaté de très grandes variations d'un animal à l'autre dans l'aptitude à donner des leucocytes à survie très longue. Nous avons obtenu des survies de leucocytes pendant plus de 40 jours avec le cheval "Pam", par contre, d'autres chevaux, en particulier "Bob",



Hauteur de la
colonne de plasma
en ml.

Tableau 2 : Représentation graphique de la sédimentation sanguine (éprouvette de 500 ml). La flèche représente le moment du prélèvement.



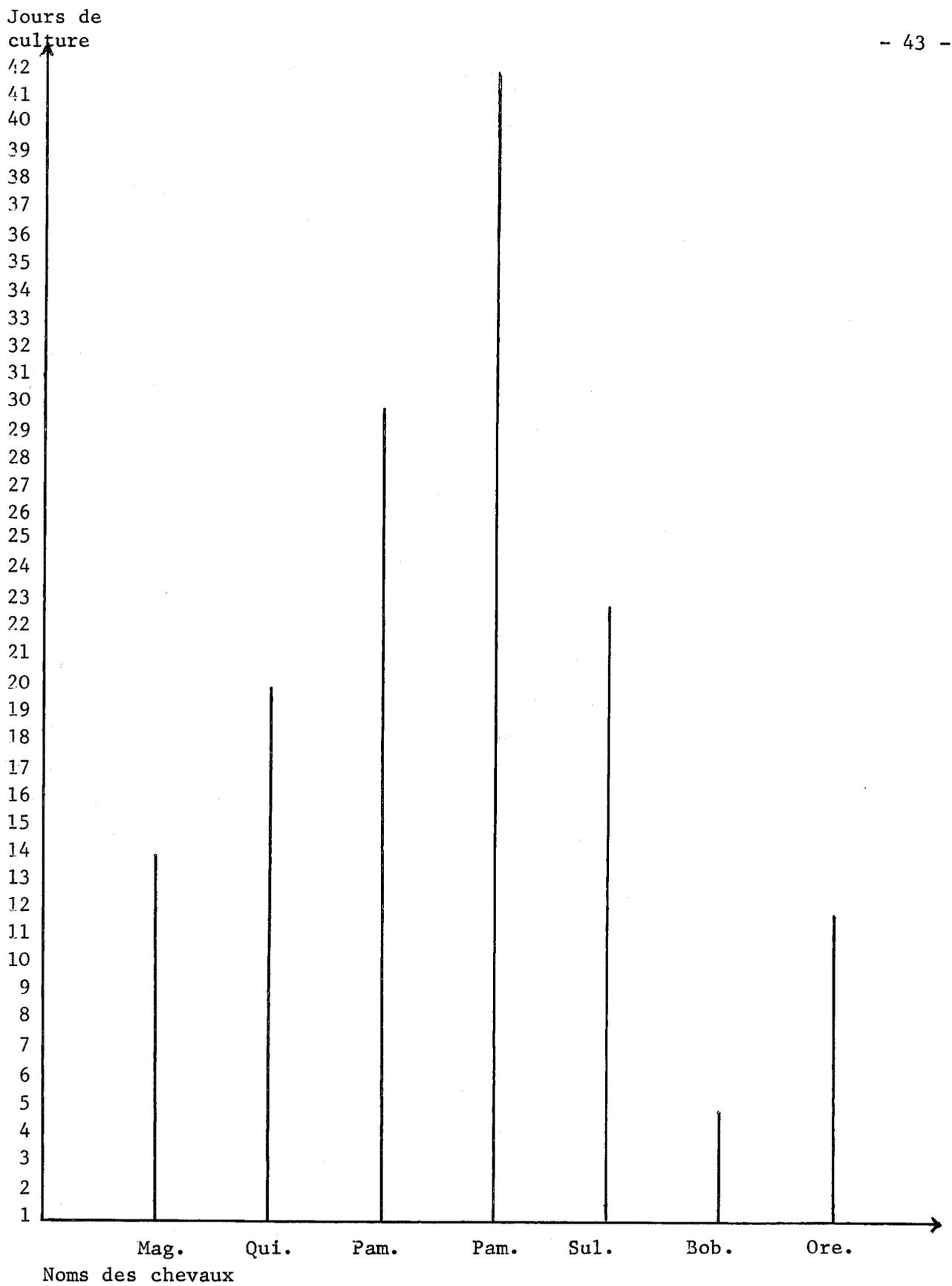


Tableau 3 : Survie des leucocytes provenant de différents chevaux.



"Ore, et "Ult" ont fourni des leucocytes incapables d'une longue survie (tableau 3).

Appréciation de l'état des leucocytes

L'état des leucocytes a été apprécié d'une part pour les cellules vivantes, d'autre part après fixation et coloration. Les tubes ronds et les tubes de Leighton contenant des leucocytes ont été examinés au microscope ordinaire à un grossissement de 100 ; on a utilisé également, pour juger de l'état des cellules, le microscope à optique inversée.

Deux techniques de coloration ont été retenues : la technique de May Grunwald et la technique à l'hémalun éosine.

B 1) Inoculation aux cultures de leucocytes :

La culture de leucocytes est préparée comme il a été indiqué précédemment. Après changement de milieu le lendemain de la mise en culture, les cellules sont prêtes pour l'inoculation. L'examen des tubes ou des flacons de culture au microscope à optique inversée permet de vérifier que le tapis leucocytaire est complet. On utilise des leucocytes âgés de 2 à 5 jours. L'inoculum est introduit dans les tubes à raison de 0,5 ml par tube. Il est laissé pendant une heure à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, on complète à 2 ml le contenu des tubes à l'aide de milieu de survie. Les tubes sont ensuite portés à 37° et le lendemain le milieu est changé.

Parallèlement, une série de tubes témoins est préparée, puis reçoit soit du sérum de cheval sain lorsque les tubes infectés par le virus ont reçu du sérum de cheval atteint d'anémie infectieuse, soit du surnageant d'une culture précédente en leucocytes, lorsque les tubes infectés par le virus ont reçu eux-mêmes le surnageant d'une culture de leucocytes.

Lorsque l'effet cytopathogène est déjà manifeste dans les tubes et que presque toutes les cellules se sont détachées, on congèle et décongèle 3 fois le contenu des tubes en les portant successivement au bain-marie à 37° et dans de la neige carbonique.

B 2) Passage en série :

A la suite de congélation et de décongélation, lorsque l'effet cytopathogène est manifesté, le milieu est alors centrifugé à 8 000 ou 9 000 tours/mn pendant 10 mn pour éliminer les particules cellulaires et le surnageant est utilisé pour le passage suivant. Les tubes témoins subissent exactement le même traitement.

Lorsque plusieurs jours s'écoulent entre la congélation et l'utilisation pour le passage suivant, les surnageants sont conservés à -30°C.

B 3) Autres systèmes cellulaires :

Nous avons employé pour la culture du virus de l'A.I. en dehors de la culture de leucocytes de cheval, les systèmes cellulaires suivants : cellules NIL, cellules KB, cellules rein de singe et cellules rénales de porc PK 15.

Ils ont été utilisés pour étudier un éventuel effet cytopathogène du virus de l'A.I. et rechercher la sensibilité d'autres types cellulaires à ce virus. Les cellules ont été cultivées en tubes à lamelles. Deux séries de tubes ont été employées, les tubes de la première série ont reçu du surnageant d'une passage de la souche vitasterone.

Les autres tubes ont reçu la même quantité de surnageant de culture de leucocytes normaux. L'état des cellules a été observé quotidiennement par fixation et coloration d'une lamelle provenant de chaque série par la technique à l'hémalun éosine.

C) ETUDE DU VIRUS DE L'A.I.

1) Détermination de la nature d'acide nucléique

1 a) Par l'emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine

Afin d'essayer de déterminer la nature de l'acide nucléique du virus on a employé la technique à la 5 iodo 2 desoxyuridine.

On sait en effet que les virus à ADN ont leur culture inhibée en

Présence de cette substance, alors que les virus à ARN peuvent se développer normalement. La thymidine a la propriété de supprimer l'action inhibitrice de la 5 iodo 2 désoxyuridine sur la replication des virus à ADN.

Des tubes ronds contenant des cultures de leucocytes de cheval ont reçu les éléments suivants :

- tubes de la première série : milieu contenant uniquement de la 5 iodo 2 desoxyuridine.
- tubes de la seconde série : milieu contenant uniquement de la thymidine.
- tubes de la troisième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine et de la thymidine.
- tubes de la quatrième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine et inoculation par le virus de l'anémie infectieuse.
- tubes de la cinquième série : milieu contenant de la 5 iodo 2 desoxyuridine, de la thymidine et inoculation du virus de l'anémie infectieuse.
- tubes de sixième série : milieu de culture normal et inoculation du virus de l'anémie infectieuse.
- tubes de la septième série : surnageant d'une culture de leucocytes normaux

Les différents milieux décrits précédemment sont introduits dans les tubes 1 h. avant l'inoculation du virus. L'inoculation est effectuée par l'introduction de 0,7 ml de surnageant de culture de leucocytes infectés et mise en contact pendant 1 h. à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, le milieu est complété à 2 ml.

Les concentrations employées pour la 5 iodo 2 desoxyuridine et la thymidine ont été respectivement de 40 g/ml et de 80 g/ml.

Le milieu est changé 24 h. après l'inoculation, puis les cellules sont observées quotidiennement pendant 15 jours au microscope à optique inversée.

Les mêmes substances aux mêmes concentrations ont été introduites dans le système cellules PK virus de la rhinopneumonie équine afin de vérifier l'inhibition de la replication d'un virus à ADN en présence de 5 iodo

2 desoxyuridine.

1b) Emploi de l'acridine orange

Dans la même optique que précédemment, c'est à dire pour essayer de déterminer la nature de l'acide nucléique viral, on a coloré par l'acridine orange des cultures de leucocytes de cheval ayant reçu du virus de l'anémie infectieuse (5e passage de la souche "Vitastérone" et des cultures de leucocytes témoins. Cette substance donne en effet une fluorescence rougeâtre en présence d'ARN monocaténaire et une fluorescence verdâtre en présence d'ADN.

La technique est la suivante : les tubes à lamelles sont vidés de leur contenu et rincés deux fois à l'aide de tampon phosphate. La fixation des cellules est assurée par l'action de l'alcool absolu pendant 5 mn. Ce dernier est remplacé par de l'alcool à 70° et l'on peut ensuite conserver à +4°C pendant plusieurs jours les lamelles dans cette substance.

Lors de la coloration, la lamelle est sortie du tube, rincée à l'eau distillée, puis placée pendant 15 à 20 mn dans du tampon phosphate. Elle est alors mise dans une solution d'acridine orange à l'obscurité (solution d'acridine orange 1 p. 2 000 dans un tampon de pH 3,09 composé de 50 ml d'acétate de sodium normal et de 48,5 ml d'acide chlorhydrique normal.

L'excès d'acridine orange est ensuite retiré en passant les lamelles successivement dans quatre récipients contenant du tampon. Les lamelles sont montées en présence de tampon frais, sur des lames, et elles sont lutées avec un mélange paraffine-vaseline.

Les préparations sont conservées à l'obscurité à +4°C.

C 2) Filtration

Le surnageant de culture de virus de l'anémie infectieuse en culture de leucocytes de cheval a été filtré sur des filtres millipore dont le diamètre était de 200 nm, 100 nm et 50 nm.

Le filtrat est ensuite inoculé à la culture de leucocytes de cheval. Les tubes des différentes séries ont reçu 0,7 ml de filtrat qui est laissé au contact avec les cellules pendant 1 h. à la température du laboratoire. A l'issue de ce temps, le milieu est complété jusqu'à 2 ml à l'aide du milieu de culture classique. Le milieu est changé au bout de 24 h. L'état des cellules est ensuite suivi quotidiennement pendant 15 jours.

C3) Microscope électronique

Deux cultures ont été préparées pour une étude au microscope électronique des cellules infectées par le virus de l'anémie infectieuse.

Les leucocytes sont répartis à raison de 6 ml de suspension cellulaire dans des flacons de 60 ml. Les cellules de chaque flacon reçoivent 2 ml de surnageant de culture de leucocytes infectés et sont laissés pendant une heure à la température du laboratoire, au contact du virus. Le milieu est ensuite complété à 6 ml et changé 24 h. après l'inoculation.

Trois flacons sont préparés et soumis à l'inoculation de virus chacun à 48 h. d'intervalle. Parallèlement des flacons contenant des cellules témoins sont préparés.

Pour la première expérience, les cellules ont reçu le surnageant du 6e passage de la souche "Vitastérone" en culture de leucocytes de cheval ; pour la deuxième expérience, le surnageant du 4e passage de la souche "Wyoming" en culture de leucocytes.

L'état des cellules est suivi quotidiennement par observation au microscope à optique inversée.

Lors de l'apparition de l'effet cytopathogène sur les cellules des flacons inoculés, on recueille les cellules afin de les soumettre à une fixation, en vue de l'étude au microscope électronique.

Les techniques de fixation et d'inclusion employées par BERNHARD sont les techniques classiques de microscopie électronique pour coupes de cellules.

La fixation est effectuée par action pendant une heure de la glutaral-déhyde à 2,5 % puis pendant une nouvelle heure du tétroxyde d'osmium à 2 %.

L'inclusion a lieu en Epon. La coloration est à base d'uranyle plomb.

D) ISOLEMENT ET ETUDE D'UN HERPESVIRUS EQUIN : (souches virales isolées au cours de passage en série du virus de l'A.I.E. en culture cellulaire).

1) Etude en culture cellulaire :

Les lignées cellulaires Hela d'origine humaine, lignées BHK 21 et NIL de rein de hamsters, lignées Vero et MS de rein de singe et les cellules d'explantation primaire de rein de singe, de rein de lapin, d'embryon de chat et de rein de fœtus de veau sont entretenues en milieu de Eagle enrichi par 10 % de sérum de veau pour la croissance et de 2 % seulement pour l'entretien, à l'exception des cellules primaires de rein de singe maintenues sans sérum après inoculation. Les cellules sont observées tous les jours pour apprécier l'évolution. Régulièrement des lamelles sont fixées et colorées à l'hématoxyline-éosine pour examen microscopique détaillé.

Inoculation des cultures cellulaires

Pour chaque passage, l'inoculat est constitué par l'ensemble de la culture précédente (surnageant et tapis cellulaire) ayant subi trois cycles de congélation et décongélation successifs. Le temps de contact est de 30 mn à la température du laboratoire. Le milieu est ensuite ajouté aux cultures sans élimination de l'inoculat.

2) Action de la 5 iodo 2 désoxyuridine : (I.D.U.) de la souche isolée CLI d'herpèsvirus

L'action de 5 iodo 2 désoxyuridine sur la replication du virus de l'herpès dans des cultures de leucocytes de cheval a été étudiée dans le but de préciser la nature de l'acide nucléique. L'IDU a été utilisée à la dose de 40 g/ml selon la technique décrite précédemment (pour le virus de l'A.I.E.).

3) Etude du pouvoir pathogène, antigène et immunogène

Un poulain de 4 jours et une jument, dépourvus d'anticorps fixant le complément vis à vis de l'antigène du virus de la rhinopneumonie équine (VHE I) ont reçu par voie sous-cutanée 5 ml du 4e passage du herpesvirus CL₁, en culture de cellules rénales de singe contenant 10⁷DL₅₀ CT/ml.

La température rectale et l'état clinique ont été notés quotidiennement pendant les 30 jours suivant l'inoculation.

Un cheval dépourvu d'anticorps fixant le complément en présence de VHE₁ a reçu par voie veineuse la souche CL₁. Son sang a été prélevé 2 et 4 semaines après l'inoculation pour examen sérologique. Les techniques de fixation du complément et de séroneutralisation employées ont été décrites antérieurement (BRION et al. (16 et 17)).

Réactions de la neutralisation croisée avec les sérums anti-virus type I (virus de la rhinopneumonie), anti-virus type 2 (souche LK), anti-virus de karpas et anti-virus souche Hsiung avaient été réalisées afin d'étudier les caractères immunogènes de la souche CL₁ isolée.

E) ETUDE DE L'ANTIGENE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE (A.I.E.)

E1) Préparation de l'antigène anémie infectieuse

Détermination des tissus fournissant la meilleurs préparation antigénique

La rate, le foie, le pancréas, les ganglions mésentériques, le thymus et les poumons ont été prélevés sur des chevaux morts d'anémie infectieuse à la phase aiguë. Ces différents organes ont été traités de la même façon par congélation et décongélation afin de mettre en évidence leur pouvoir antigène. Par ailleurs du sérum de chevaux atteints de la phase aiguë a été employé comme source d'antigène. Tous ces extraits ont été soumis à la technique de précipitation en gélose.

Etude de la localisation de l'antigène :

Des globules rouges, des globules blancs et des cellules spléniques de chevaux atteints de la phase aiguë ont été étudiés de façon à déterminer la localisation du virus. Les globules rouges sont recueillis après sédimentation du sang hépariné et centrifugation à 1 000 tours/minute pendant 7 minutes. Les globules blancs sont recueillis à partir du plasma par centrifugation, sont lavés avec du chlorure d'ammonium à raison de cinq parties pour une partie de leucocyte. Les cellules spléniques sont préparées en broyant de la pulpe splénique dans un mortier en présence de solution de Hanks. La suspension est ensuite filtrée à travers un tamis à pores très fins. Les cellules spléniques sont ensuite lavées par le chlorure d'ammonium. Toutes les cellules sont enfin lavées 2 fois avec de l'eau physiologique à +4°. Par ailleurs on réalise une hémolyse par congélation et de la même manière une lyse des leucocytes et des cellules spléniques.

Le sérum hyperimmun anti-anémie infectieuse dilué 4 fois est ensuite mis en présence d'une quantité égale de chacun des réactifs suivants : globules rouges intacts, globules blancs et cellules spléniques. Globules rouges intacts lavés, globules blancs et cellules spléniques. Globules rouges hémolysés et globules blancs lysés ainsi que cellules spléniques lysées. L'adsorption a lieu pendant 1 heure à 37° avec agitation. On effectue ensuite une centrifugation pour éliminer les cellules ou leurs débris.

E2) Obtention de l'antigène anémie infectieuse

L'antigène utilisé est représenté par des rates de chevaux ou de poneys infectés dans des conditions expérimentales par inoculation d'une forte dose d'une souche très virulente de virus de l'anémie infectieuse, la souche Wyoming. Le cheval Edel reçoit une inoculation de 50 ml de sérum contenant la souche Wyoming, par voie intraveineuse. Le cheval "Naude" est inoculé à l'aide de 300 ml de sang total et de 150 ml de sérum provenant du cheval précédent.

Le "poney 1" est inoculé par 40 ml de sang total et 70 ml du sérum du cheval "Naude".

Le "poney 2" est inoculé à l'aide de 30 ml du sang total et 100 ml du sérum du poney 1 (voir tableau II page 90).

Les rates sont prélevées de 9 à 11 jours après l'infection en fonction de la réaction d'hyperthermie constatée sur les chevaux ou les poneys infectés. Elles sont ensuite conservées à -30°C . On effectue alors 7 à 10 cycles de congélation et de décongélation avant de les utiliser (antigène n°1).

D'autres traitements ont été utilisés pour certaines parties de ces rates. Une partie est broyée à l'aide d'un appareil d'homogénéisation (Ultraturrax) pendant 5 minutes au froid). Elle représente la suspension antigénique n° 2.

A partir de cette suspension, on prépare le surnageant par centrifugation à 27 000 g pendant 30 minutes à $+4^{\circ}\text{C}$. Ce surnageant est utilisé comme antigène n° 3.

Un extrait aqueux de l'antigène est préparé par addition d'un volume égal d'eau distillée à la suspension n°2. Cette émulsion diluée est agitée pendant 3 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ puis centrifugée. Le surnageant est utilisé comme extrait aqueux d'antigène et dénommé antigène 4. L'extrait aqueux antigénique est concentré par lyophilisation ou par dialyse sur carbovax 20 M et constitue l'antigène 5 et l'antigène 6.

Les sédiments des émulsions diluées et non diluées ont été également employés pour une recherche du pouvoir antigène : antigène 7 et 8.

Des extractions à l'alcool, à l'acétone, à l'éther, par le tampon ou par l'acétone-éther ont été préparées pour obtenir des antigènes et comparer leurs pouvoirs avec les antigènes précédents (antigènes 9, 10, 11, 12 et 13). D'autres expériences ont été entreprises pour étudier l'effet du nombre de cycles de congélation et de décongélation sur le pouvoir antigène de la rate utilisée. On a utilisé 2, 5, 10, 15 ou 20 cycles de congélation et de décongélation. L'antigène titré était employé pur ou dilué 2 fois, 4 fois ou 6 fois, 8 fois ou 10 fois. Par ailleurs, nous avons étudié l'action des ultra-sons sur le pouvoir antigène de l'extrait splénique. Le liquide antigénique a été soumis

à l'action des ultrasons pendant 5 minutes à 0,9 kc, puis examiné pour son pouvoir antigène par la technique de précipitation en gélose.

Rates recueillies à différentes époques de l'infection :

Depuis le début de notre étude, nous avons prélevé 8 rates provenant de chevaux morts d'anémie infectieuse à des étapes variées après l'infection. Les rates des chevaux "Edel" et "Naude" ainsi que des poneys 1 et 2 ont été prélevées à la phase aiguë. Les rates des chevaux "Vita" "Blan" "Prairie" et "poney 3" ont été recueillies à la phase subaiguë de la maladie.

12 rates ont été prélevées chez des chevaux normaux et ont été traitées de la même manière que pour la préparation de l'antigène n° 3 décrit ci-dessus. Elles ont servi comme matériel de contrôle pour déterminer la spécificité de l'antigène anémie infectieuse.

E.3) Thermostabilité de l'antigène

Le liquide antigénique a été chauffé à différentes températures pendant des temps variés, depuis 2 h. à 37°C jusqu'à 10 minutes à 100°C.

E.4) Action des produits chimiques : éther et chloroforme.

Des quantités égales d'antigène et d'éther ont été mélangées et laissées à la température du laboratoire pendant 15 minutes. On a ensuite procédé à l'élimination de l'éther par centrifugation pendant 5 minutes à 1 000/tours/mn et élaboration sous vide pendant 10 minutes.

La même expérience a été faite avec le chloroforme.

Action de la trypsine et de la papaïne : on a étudié l'action de ces substances sur l'antigène préparé à partir du poney 2 ; on fait agir 1 goutte de papaïne ou 1 goutte de trypsine à 2 % sur 0,3 ml d'antigène pendant 2 heures à 37°C.

E.5) Etude de la spécificité de l'antigène produit

a) Inhibition du pouvoir antigène par absorption d'un sérum anti anémie infectieuse

A 1 gramme d'antigène on a ajouté différentes quantités de sérums (de 0,5 à 2 ml); le mélange est ensuite laissé une heure à 37° puis on procède à l'élimination du sérum par centrifugation et on étudie le pouvoir antigénique résiduel de l'antigène. L'antigène a été traité exactement de la même façon avec des sérums normaux.

b) Détermination de la quantité d'antigène qui réduit le pouvoir précipitant d'une dose fixée de sérum hyperimmun

Le sérum hyperimmun de référence à la dose de 1 ml a été mis en présence d'antigènes provenant de différents animaux et ne possédant pas le même pouvoir antigénique. Le mélange est laissé 1 heure à 37°C puis centrifugé par 1 000 tours/minute pendant 5 minutes. On a ainsi employé l'antigène nommé Vitast, 1 gramme et 2 grammes ainsi que les antigènes Edel, Prairie et Naude.

c) Identité de l'antigène d'A.I.E. extrait des rates de 3 chevaux.

Trois antigènes différents ont été placés dans des cupules voisines et mis en présence de sérums spécifiques anti-anémie infectieuse de façon à comparer les lignes de précipité obtenues avec chacun d'eux.

d) De la même façon on a étudié les rapports entre l'antigène anémie infectieuse et d'autres antigènes comme ceux de streptocoque, du rouget, du tétanos et de brucella, de rhinopneumonie et d'arterite à virus. Par ailleurs, on a employé l'antigène anémie infectieuse dans le test de précipitation en gélose avec des sérums de chevaux normaux, des sérums de chevaux atteints d'anémie infectieuse ou des sérums de chevaux atteints de différentes autres maladies comme la grippe, la rhinopneumonie, l'artérite à virus et la gourme. Enfin des sérums ont été prélevés sur des chevaux producteurs de sérums hyperimmuns vis à vis de différents antigènes comme le tétanos, le charbon, le rouget, la rage et enfin des antigènes polyvalents à base de bactéries anaérobies.

E.6) Electrophorèse de l'antigène

Les électrophorèses ont été réalisées sur acétate de cellulose (Cellogel Sabia) dans les conditions suivantes :

Tampon véronal à pH 9,2
Tension : 220 volts - 9 mA
Application : 3 μ l d'échantillon
Durée de migration : 75 mn

Après migration les bandes d'acétate de cellulose ont été colorées par le noir acide, puis traitées pour être rendues transparentes et lues au colorimètre à une longueur d'ondes de 565 nm.

20 rates ont été examinées : 12 de chevaux normaux et 8 de chevaux atteints d'anémie infectieuse et prélevées à la phase aiguë ou suraiguë de l'infection. Les rates sont traitées de la même façon pour la préparation de l'antigène c'est à dire 7 cycles de congélation et de décongélation, puis une homogénéisation et une centrifugation à 27 000 g pendant 30 minutes à +4°C. Le surnageant est employé comme antigène et étudié en électrophorèse.

E.7) Fractionnement sur colonne sephadex

Nous avons utilisé un gel Sephadex G 200 (pharmacia) coulé dans une colonne de 50 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre. La filtration a été effectuée dans les conditions suivantes :

hauteur de gel : 30 cm
débit : 30 ml/heure
échantillon : 2,5 ml d'un extrait de rate dilué au 1/2
tampon d'élution : Tris 0,1 M, NaCl 1M, pH 8,0

Le liquide élué à la sortie de la colonne a été étudié au densitomètre à une longueur d'onde de 280 nm et chaque pic ainsi repéré a été utilisé comme antigène après avoir été concentré par lyophilisation. L'antigène est ensuite recherché par précipitation en milieu gélosé.

F) PREPARATION DE SERUM HYPERIMMUN ANTI ANEMIE INFECTIEUSE

La jument "Solit." a survécu à une infection par le virus de l'Anémie Infectieuse après avoir reçu en Juin 1967 du sérum de Cheval mort d'Anémie Infectieuse. Elle n'a jamais présenté de crise d'Anémie Infectieuse. Sa température maximale a été de 39°2. Cependant, l'état d'infection latente a été décelé grâce à la recherche systématique des sidéroleucocytes. Au cours de l'année 1969, elle a reçu plusieurs injections de souche Wyoming de virus de l'Anémie Infectieuse sans présenter la moindre expression clinique. Cette jument a été choisie pour la préparation du sérum de référence hyperimmun anti virus de l'Anémie Infectieuse. Elle a reçu à 2 mois d'intervalle 4 fois 80 ml de sérum contenant le virus Wyoming par voie intraveineuse. 3 jours après la dernière inoculation, 2 litres de sérum ont été prélevés et étudiés en précipitation en gélose pour apprécier la teneur en anticorps du sérum.

G) TECHNIQUE DE PRECIPITATION EN GELOSE

- La gélose est coulée dans des boîtes de pétri en plastique de 88 mm de diamètre.

- Une première quantité de 7 ml de gélose spéciale "Noble" à 2 p. 100 dans un tampon borate est versée dans la boîte ; après prise en masse, on ajoute 18 - 19 ml de la même gélose mais à une concentration de 1 p. 100 dans le tampon borate.

Le tampon est formé par NaOH 2 g
H₃BO₃ 9 g
Eau distillée 1 litre

Le pH est de 8,6.

- A l'aide d'un emporte-pièce métallique spécial comportant 7 tubes, on découpe la partie de la gélose à 1 p. cent sans toucher la couche de gélose à 2 p. 100.

- La gélose découpée est ensuite retirée et l'on obtient alors 7 puits, un au centre et 6 autour. Ils ont un diamètre de 7 mm et sont distants les uns des autres de 3 mm.

- L'antigène est déposé dans le puits central en prenant soin de ne pas en mettre une quantité excessive.

- Le sérum témoin est placé dans deux puits opposés.

- Les quatre autres cupules sont remplies à l'aide des sérums suspects. De cette manière chaque sérum peut être comparé directement avec le sérum témoin positif voisin. Les boîtes de pétri sont laissées à température du laboratoire en atmosphère humide.

- On effectue une première lecture entre 18 heures et 24 heures et une seconde lecture à la 48e heure après la réalisation du test. Les boîtes sont observées sur fond noir et sous éclairage oblique intense.

Parfois la lecture est plus facile après avoir oté l'antigène et lavé la boîte pendant 24 heures dans du tampon à +4°.

Microprécipitation en milieu gélifié

Cette réaction est effectuée sur lames. On pose les lames sur une surface parfaitement horizontale et on applique aux deux extrémités de chaque lame 3 couches de bandes plastique laissant entre elles un intervalle de 5,3 cm. On dépose alors sur la lame 0,8 ml de gélose fondue au bain-marie bouillant et à une concentration de 1 % de gélose dans du tampon borate. On réalise l'étalement de la gélose grâce à une application d'une lame sur la couche de gélose. Il faut prendre soin au cours de cet étalement à ne pas emprisonner de bulles d'air dans la gélose. On laisse ensuite la gélose prendre en masse et on retire alors la lame supérieure. On dépose ensuite sur la gélose la lamelle en plastique comportant les trous et ce en prenant soin de ne pas emprisonner de bulles d'air. La lamelle en plastique comporte 7 cupules dont une centrale. Les cupules sont ensuite remplies de la même façon que pour la technique de précipitation en gélose décrite ci-dessus. Les lames sont conservées à température du laboratoire, on retire les lamelles en plastique et on effectue la lecture.

H) Réaction d'hémagglutination conditionnée

L'antigène est représenté par un extrait de rate provenant de chevaux

atteints d'anémie infectieuse. La meilleure dilution d'antigène pour la réalisation de ce test est de 1/3 200.

Les sérums employés ont été : le sérum positif de référence provenant de la jument "Solit." des sérums de chevaux atteints d'anémie infectieuse dans des conditions naturelles ou expérimentales et à différents stades de l'infection.

Des sérums de chevaux normaux.

Ces sérums sont d'abord mis en présence de globules rouges de moutons, lavés et laissés pendant 30 mn à 37°C en contact de façon à éliminer les agglutinines anti-globules rouges de mouton. Les sérums sont employés aux dilutions de 1/25e puis aux dilutions suivantes de raison 2.

Globules rouges. Les globules rouges sont lavés 3 fois dans un tampon phosphate à pH 7,2 et centrifugé pendant 5 minutes à 1 500 tours/minute. Ils sont ensuite remis en suspension à la concentration de 4 % dans du tampon phosphate à pH 7,2. On a utilisé des globules rouges de mouton et de cheval.

Tannage des globules rouges. Une solution de tannin à l'éther comprenant 5 mg pour 100 ml dans du tampon phosphate pH 7,2 est ajouté en quantité égale à la suspension de globules rouges. L'ensemble est laissé en contact pendant 5 minutes à température du laboratoire. On effectue ensuite une centrifugation pendant 4 mn à 1000 tours/minute et on remet les hématies en suspension dans du tampon phosphate. On effectue un homo-lavage en tampon phosphate et on prépare une suspension de globules rouges à 4 % dans du tampon phosphate à pH 6,3.

Sensibilisation des globules rouges tannés par l'antigène. A 2 ml d'antigène dilué on ajoute une quantité égale de suspension de globules rouges tannés. L'ensemble est laissé au bain-marie à 37° pendant 30 mn et agité deux ou trois fois au cours de ce temps. On effectue ensuite une centrifugation pendant 4 mn à 1 000 tours/minute. On lave alors les globules rouges avec du

tampon à pH 6,3 auquel est ajoutée l'albumine bovine à la concentration de 0,1 %. Après centrifugation on remet les globules rouges en suspension pour obtenir une concentration finale de 2 % dans du tampon phosphate à pH 6,3.

Réaction

On dépose dans chaque tube, 0,5 ml de tampon phosphate à pH 6,3, puis on prépare les dilutions successives du sérum pour obtenir le taux de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, etc... jusqu'à 1/6 400. On ajoute alors une goutte de globules rouges sensibilisés, à la pipette Duclaux, dans chaque tube. On laisse incuber à 37°C pendant 1 heure puis à température du laboratoire pendant 2 heures. On prépare par ailleurs des témoins globules rouges et des témoins globules rouges tannés et sensibilisés. Des sérums de chevaux sains sont utilisés pour un contrôle témoin sérum négatif.

1) Réaction d'allergie vis à vis du virus de l'Anémie Infectieuse

Une série d'expérience a d'abord été réalisée pour déceler la présence d'un état d'hypersensibilité chez les chevaux atteints d'anémie infectieuse. Une seconde série d'expériences a été préparée pour rechercher les modalités optimales d'inactivation du virus de l'anémie infectieuse sans modifier son pouvoir de révéler la réaction allergique.

I.1) Pouvoir allergène du virus de l'anémie infectieuse

Première expérience :

a) On injecte à un cheval atteint de la forme inapparente de l'anémie infectieuse depuis 5 ans, 0,1 ml d'une suspension splénique non chauffée par voie intradermique sur le côté de l'encolure. De l'autre côté de l'encolure on injecte la même quantité d'un extrait préparé dans les mêmes conditions à partir de la rate d'un cheval normal. Les résultats ont été enregistrés par mesure du diamètre de la réaction cutanée au point d'injection après 24 h. et dans les jours suivants. L'épaisseur de la peau avait été mesurée avant l'inoculation

b) 30 jours après cette première expérience, le même cheval recevait l'inoculation de la même suspension antigénique chauffée à 60°C pendant 1 heure et à des dilutions de 1/10, 1/100e, 1/100e; et 1/10 000e. De l'autre coté du

cou, des quantités égales préparées à partir d'une suspension splénique de cheval normal ont été injectées.

Deuxième expérience :

La jument "Solit." a reçu par voie intradermique, 0,1 ml d'antigène splénique provenant de cheval atteint d'anémie infectieuse chauffé pendant 1 h. à 60° et dilué au 5e et au 10e. Elle a reçu par ailleurs les mêmes quantités et dans les mêmes conditions l'antigène préparé à partir d'un cheval sain.

Troisième expérience :

Les chevaux "Sy" et "Solit" ont reçu des inoculations intradermiques de 0,1 ml de suspension de 10 rates de chevaux normaux après chauffage à 60° pendant 2 heures et dilution à 1/15.

Quatrième expérience :

Des poneys normaux ont reçu des injections intradermiques d'antigènes anémie infectieuse et de suspension de rates de chevaux normaux. Trois poneys ont reçu l'injection d'une quantité de 0,2 ml d'antigène dilué au 5e et traité par l'éther pendant 30 minutes à 4°C.

Dans le but de déterminer le type d'hypersensibilité constaté chez les chevaux atteints d'anémie infectieuse, nous avons essayé de retransmettre de façon passive le phénomène d'Arthus. La technique employée a été la suivante ; des lapins reçoivent l'injection de 30 ml de sérum hyperimmun contre le virus de l'Anémie Infectieuse. 3h. après l'injection de sérum on injecte aux lapins 0,1 ml d'antigène splénique d'anémie infectieuse et 0,1 ml de suspension de rate normale par voie intradermique.

2) Essais d'inactivation de l'antigène

a) Action de l'éther sur la pouvoir allergène de la suspension splénique

L'antigène dilué au 1/10e et chauffé pendant 1 heure à 60° est ensuite traité par l'éther pendant 15 minutes à la température du laboratoire avec agitation. Il est ensuite centrifugé à 1 000 tours/minute pendant 5 minutes

et l'on prélève l'éther dont l'élimination est continuée par évaporation sous vide pendant 10 minutes. 0,1 ml de cet antigène a été injecté par voie intradermique aux 2 chevaux déjà cités. Une préparation analogue est réalisée à partir de la rate d'un cheval normal.

Parallèlement sont injectés aux 2 chevaux les antigènes normaux et les antigènes chauffés pendant 1 heure à 60°C mais non traités à l'éther.

b) Effet du chauffage

L'antigène splénique dilué au 1/10e a été chauffé à 60° pendant 2 heures afin de comparer les résultats obtenus lors de l'injection aux chevaux de l'antigène chauffé pendant 2 heures et de l'antigène chauffé pendant 1 heure seulement à 60°C.

c) Traitement de l'antigène par la formaldéhyde et la glycéraldéhyde

L'antigène anémie infectieuse et par ailleurs une suspension de rate de cheval normal, diluée au 1/15e ont été traités par la formaldéhyde à 0,22/1 000 pendant 24 heures à 37°C puis par la glycéraldéhyde à 0,1/1 000 pendant 12 heures à 37° sous agitation. 0,1 ml de chacune de ces préparations ont été injectés par voie intradermique aux chevaux.

J) ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE

Nous avons entrepris un sondage épidémiologique sur les chevaux français par la technique de précipitation en gélose décrite précédemment p.56 dérivée de celle d'Oudin-Ouchterlony, en boîte de pétri en matière plastique, de 85 mm, de diamètre.

La technique est faite à base d'antigène splénique liquide.



RESULTATS

I - REPLICATION DU VIRUS DE L'A.I. DES EQUIDES

A) EN CULTURE DE LEUCOCYTES DU CHEVAL :

1 - Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval

La comparaison des leucocytes inoculés et des leucocytes sains, effectuée soit sur les cellules vivantes, soit après fixation et coloration par l'hémalun éosine, permet d'aboutir aux résultats suivants :

a) cellules vivantes :

Alors que les cellules témoins conservent un aspect normal, les leucocytes infectés présentent, plus ou moins tôt en fonction de degré d'adaptation de la souche aux cultures leucocytaires, un effet cytopathogène. Celui-ci se traduit, sur un tapis de leucocytes vivants, par une modification de l'aspect individuel des cellules qui ont tendance à devenir plus rondes, plus globuleuses avant de se détacher peu à peu de la paroi du verre. Après plusieurs jours de culture, la différence est flagrante entre les leucocytes sains qui forment un tapis complet de cellules largement étalées sur le verre, et les leucocytes infectés qui se retrouvent sous forme de petits groupes de cellules de forme arrondie et séparés entre eux par des espaces libres.

L'effet cytopathogène provoqué par le virus de l'anémie infectieuse apparaît en 14 à 17 jours lors de l'inoculation aux cellules du sérum d'animal atteint d'anémie infectieuse ou lors des tous premiers passages en culture de leucocytes de cheval.

Nous avons constaté la nécessité de comparer constamment l'état des cellules infectées et celui des cellules témoins. De très nombreux facteurs peuvent en effet intervenir qui tendent à diminuer la vitalité des leucocytes en culture, surtout lors de survie prolongée pendant plusieurs semaines.

b) Après coloration :

L'observation des leucocytes après coloration par l'hémalun éosine

permet de confirmer les résultats obtenus sur les cellules vivantes et de préciser l'action pathogène due au virus de l'anémie infectieuse.

Les altérations cellulaires apparaissent après un temps moyen de 8 jours et s'accroissent après 3 ou 4 jours pour aboutir à un détachement de toutes les cellules. Au milieu de leucocytes normaux, on peut distinguer certaines cellules dont le cytoplasme est devenu globuleux, plus fortement coloré par l'éosine et à contour circulaire. Ce phénomène apparaît aussi bien sur les cellules isolées que sur les syncytiums.

Cet effet cytopathogène n'a donc rien de bien caractéristique.

Cependant, dans certaines cultures il nous a été possible d'observer des inclusions intranucléaires éosinophiles ayant tendance à la basophilie dans les derniers stades de l'infection cellulaire. De telles images sont visibles dans les clichés (2 et 3). Nous reviendrons, ultérieurement, dans le chapitre d'isolement d'herpèsvirus sur la signification de telles images.

2) Passages en série sur leucocytes de cheval :

Nous avons pu réaliser les passages suivants :

- 10 passages en série pour la souche "Vitastérone"
- 9 passages en série pour la souche "Blanchette"
- 9 passages en série pour la souche "Vent des prairies"
- 5 passages en série pour la souche "Wyoming".

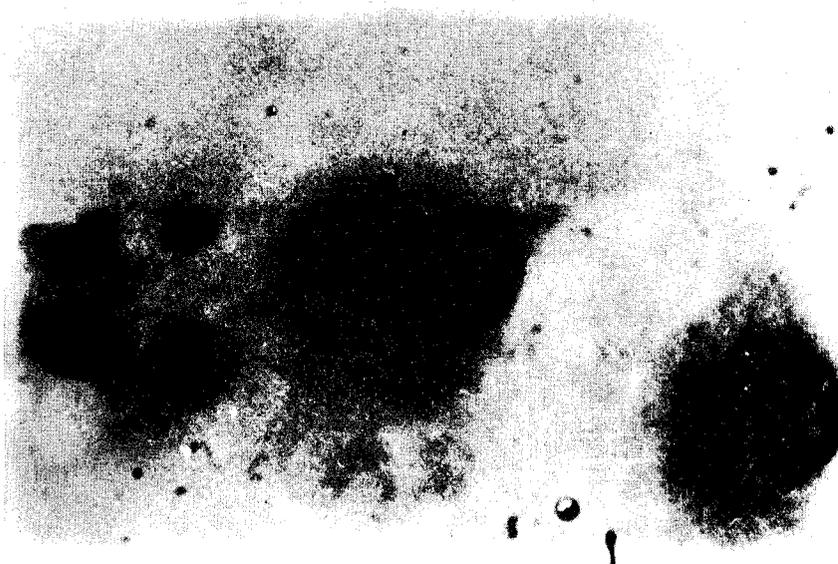
Le délai d'apparition de l'effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval est porté dans le tableau (4).

A la lecture de ce tableau, on constate, comme nous l'avions annoncé précédemment, que l'effet cytopathogène apparaît plus rapidement au fur et à mesure que le nombre de passages augmentent. Ainsi pour la souche "Blanchette", ce délai qui était initialement de 17 jours est progressivement parvenu à 10 jours. De même pour "Vent des Prairies" et "Vitastérone" les délais sont passés respectivement de 16 et 15 jours à 10 jours.

La même constatation se retrouve pour la souche "Wyoming".



Cliché I : Tapis de cellules d'aspect histiomocytaire



Cliché 2 : Inclusions nucléaires dans une autre cellule infectée également par la souche "Vistastéron".



Cliché 3 : Inclusions éosinophiles dans un syncytium infecté
par la souche "Viatstérone".



Tableau 4 : Passages en série de quatre souches de virus de l'anémie infectieuse sur culture de leucocytes de cheval.

Numéro du passage	Souches virales			
	Vitastérone	Blanchette	Vent des prairies	Wyoming
1er passage	15	17	16	15
2e -	11	15	10	11
3e -	10	14	10	8
4e -	10	13	13	12
5e -	13	10	10	10
6e -	11	11	11	
7e -	11	10	10	
8e -	10	12	12	
9e -	<u>12</u> *	10	10	
10e -	10			

Les nombres indiquent en jours le délai séparant l'inoculation des cellules, de la congélation.

* Le surnageant de ce passage a été inoculé à un cheval sain.



3 - Epreuve de la replication viral par inoculation au cheval

La preuve de la replication virale en culture de leucocytes a été apportée grâce à l'inoculation au cheval du surnageant d'une culture après un certain nombre de passages (neuf passages).

Le cheval nommé "Leucocyte" a reçu par voie intraveineuse 10 ml de la souche "Vitastérone" après 9 passages en culture de leucocytes de cheval. La température de ce cheval avait été prise quotidiennement pendant plusieurs semaines et a continuée à l'être après l'inoculation. Parallèlement, des examens sanguins avaient permis de constater l'absence de sidéroleucocytes dans le sang circulant de cet animal et des nombres normaux pour les globules blancs, les globules rouges et la formule leucocytaire.

12 jours après inoculation par voie veineuse de la culture de la souche "Vitastérone" en leucocytes de cheval, le cheval "Leucocyte" a présenté une hyperthermie qui a duré 3 jours, hyperthermie accompagnée de signes de fatigue, de faiblesse générale et de "tuphos".

Les sidéroleucocytes sont apparus en nombre important à la fin de cette crise.

L'évolution de la température et celle des sidéroleucocytes sont portées dans le tableau (5).

Ces résultats (reproduction de la maladie chez l'animal neuf avec une incubation très courte) permettent d'affirmer que le virus de l'anémie infectieuse a pu se multiplier en culture de leucocytes de cheval. Par ailleurs, ces 9 passages en leucocytes de cheval n'ont absolument pas diminués ou modifiés sa virulence pour le cheval. En effet, les résultats obtenus après inoculation à un cheval de la souche "Vitastérone" d'origine portés dans le tableau (6) sont très proches de ceux-ci, notamment en ce qui concerne la durée d'incubation.

En raison du coût élevé de l'apport de cette preuve de succès de la replication virale, nous n'avons pas vérifié ce même point pour les souches

"Blanchettes" et "Vent des Prairies". Cependant, étant donné que dans les tubes de culture, les résultats obtenus sont semblables à ceux constatés pour la souche "Viastérone", nous pouvons sans grande chance d'erreur, penser que les deux souches "Blanchette" et "Vent des Prairies" ont également été passées avec succès en culture de leucocytes de cheval.

Enfin, pour la souche "Wyoming", le nombre de passages en série est encore trop faible (cinq seulement) pour qu'ils soient intéressants d'inoculer la culture à un cheval.

B - Autre système cellulaire

Aucun effet cytopathogène, aucune différence entre les cellules témoins et les cellules infectées par diverses souches d'anémies infectieuses n'a pu être décelé.

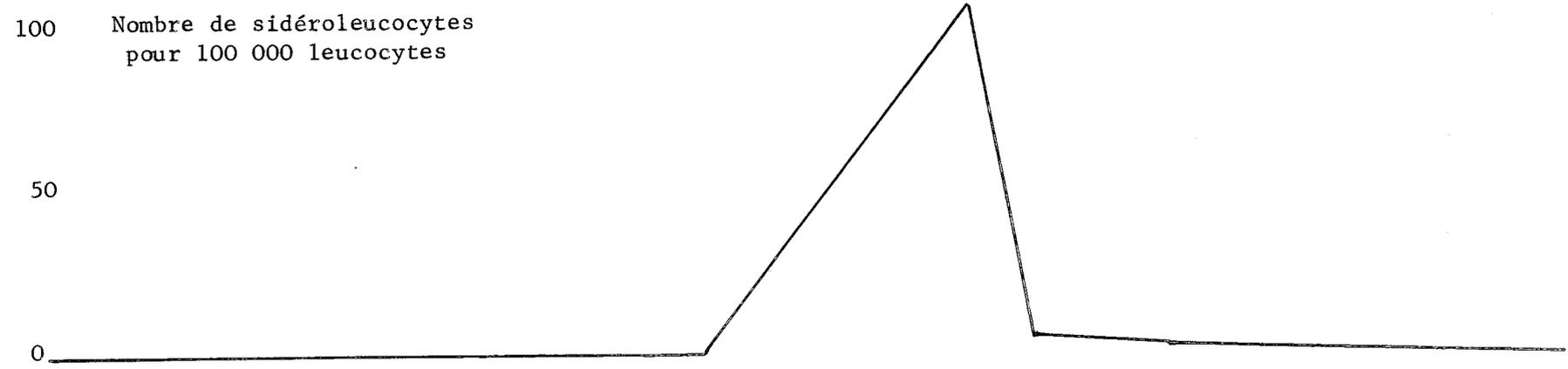
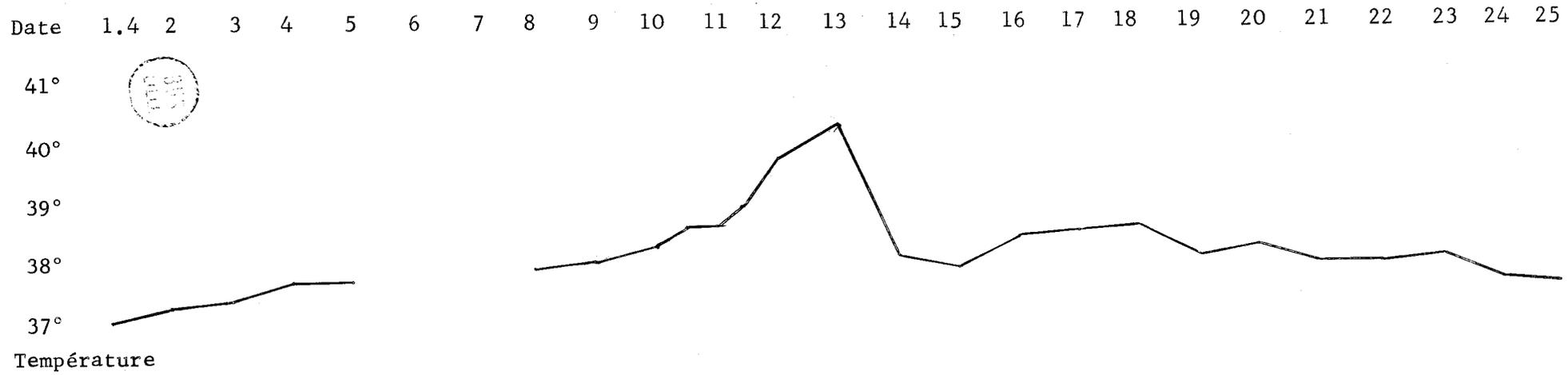
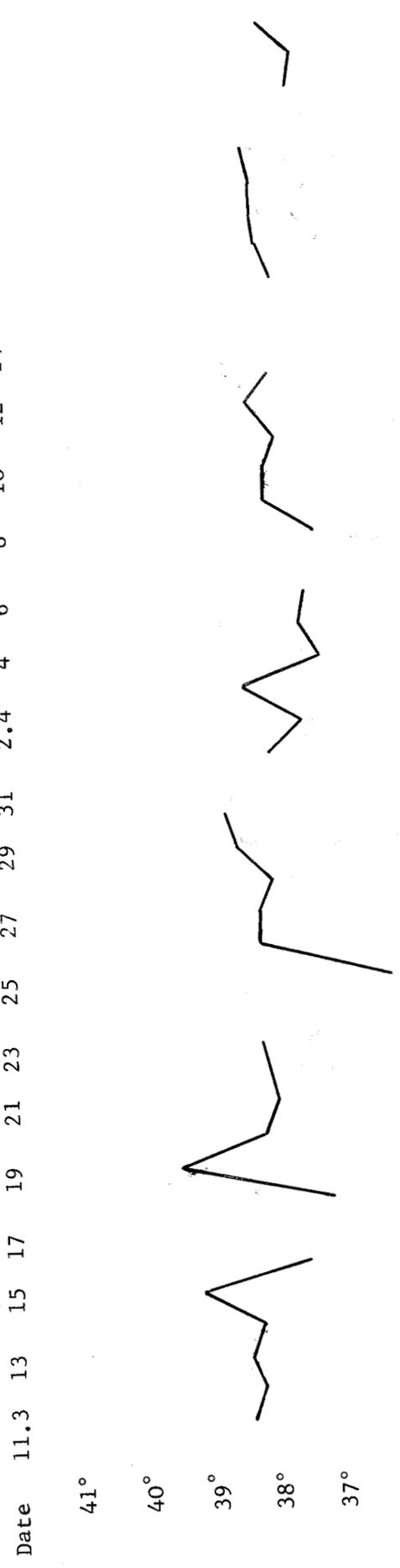


Tableau 5 : Courbes de température et des sidéroleucocytes du cheval.
Leucocyte infecté le 1er Avril avec le surnageant du
neuvième passage en culture de la souche "Vitastérone".



Nombre de sidéroleucocytes pour 100 000 leucocytes.

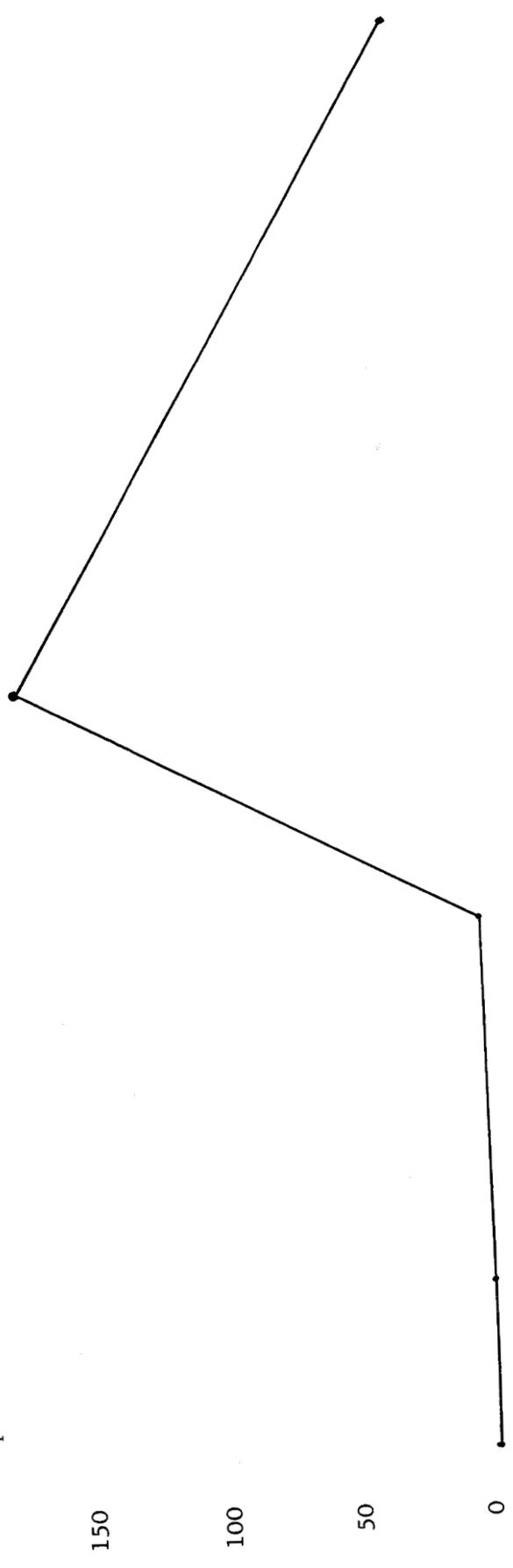


Tableau 6 : Courbes représentant la température et le nombre de sidéroleucocytes observés chez le cheval S.T.T. après injection de la souche Vitastérone le 4 mars.



CHAPITRE II - ÉTUDE DU VIRUS DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE

A - NATURE DE L'ACIDE NUCLÉIQUE

Deux techniques avaient été mises au point afin de tenter de déterminer la nature de l'acide nucléique viral.

1 - Action de la 5 iodo 2 désoxyuridine

Le système de contrôle employé, à savoir virus de la rhino-pneumonie (virus à ADN) cellules PK 15 a donné les résultats escomptés : la 5 iodo-2 désoxyuridine inhibe en effet toute apparition d'effet cytopathogène dans les cellules PK, alors que les cellules infectées, en absence de cette substance, présentent rapidement des inclusions intranucléaires éosinophiles caractéristiques de ce virus du groupe de l'herpès.

Plusieurs expériences ont été répétées afin de confirmer les résultats obtenus avec le virus de l'anémie infectieuse.

Ces résultats montrent que : la 5 iodo 2 désoxyuridine, substance inhibant la synthèse de l'acide désoxyribonucléique n'empêche pas l'apparition de l'effet cytopathogène dans les cultures infectées par le virus d'anémie infectieuse.

Ces résultats sont donc en faveur de l'existence dans ces cultures de leucocytes d'un virus à acide ribonucléique.

L'une de ces expériences a donné les résultats portés dans le tableau 7.

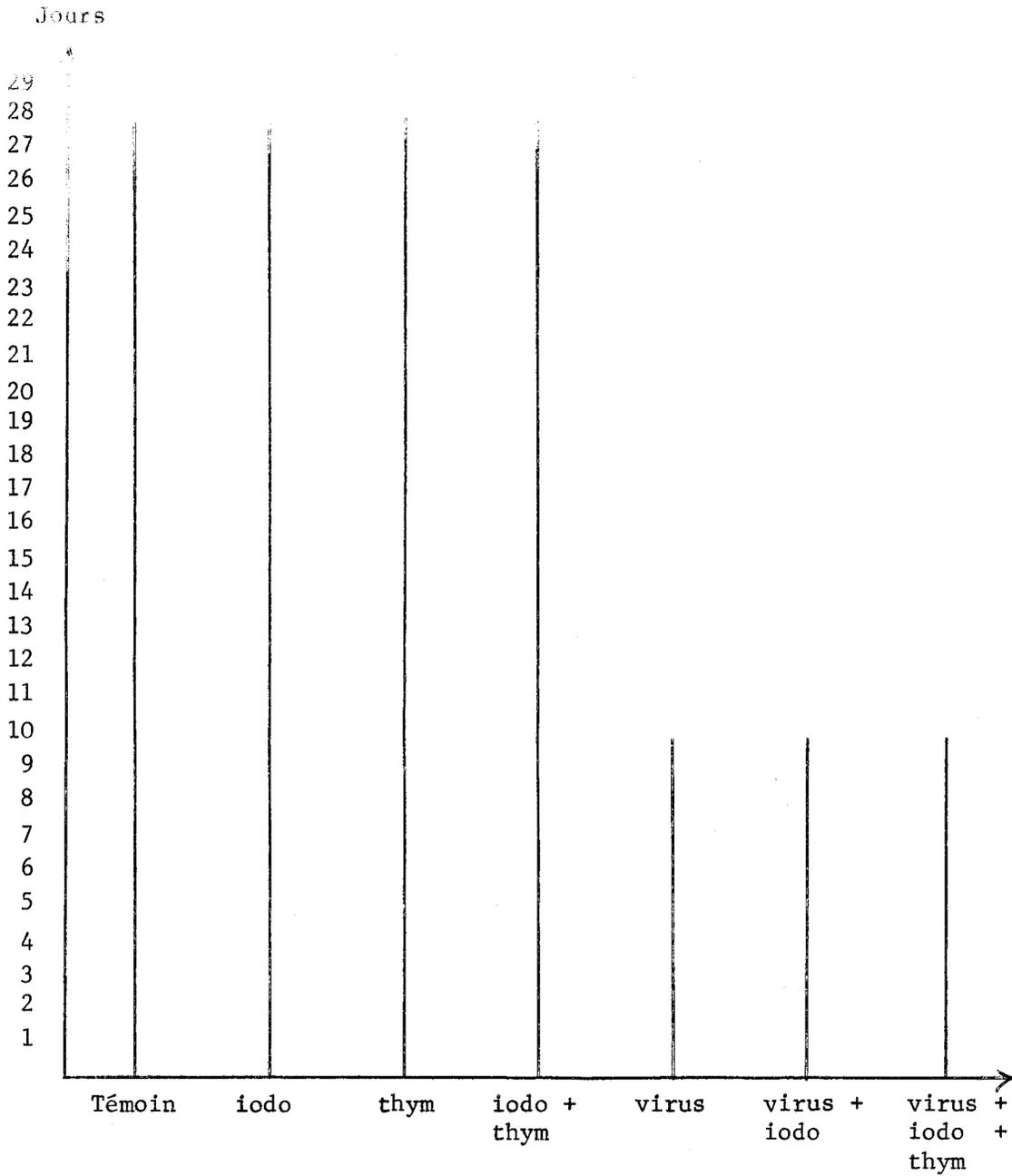


Tableau 7 : Inhibition de la réplication virale par la 5 iodo 2 désoxyuridine : survie des cellules.

iodo : 5 iodo 2 désoxyuridine 40 µg/ml

thym : thymidine 80 µg/ml



2 - Emploi de l'acridine-orange

Quatre séries de 15 tubes à lamelles contenant des cultures de leucocytes de cheval ont été employées de la manière suivante : 3 séries ont été infectées à l'aide du 5ème passage de la souche "Vitastérone" ; la 4ème série servait de témoin.

Les 3 premières séries ont été colorées respectivement par le Giemsa, l'hémalun éosine et à l'acridine orange. Cette façon de procéder a permis de comparer quotidiennement l'état de cellules saines d'une part, et celui de cellules infectées d'autre part, ces dernières étant suivies grâce à trois techniques différentes.

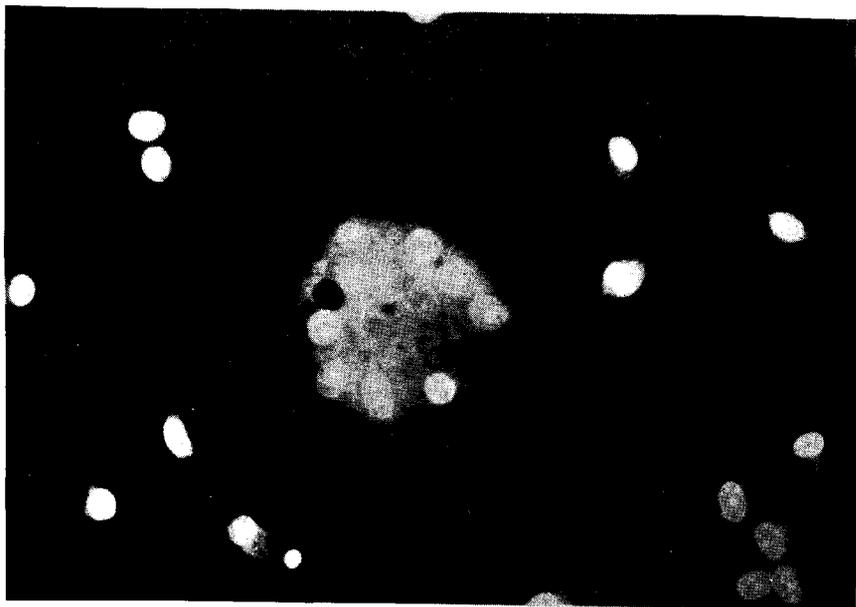
La coloration par l'acridine orange des leucocytes témoins a donné d'excellents résultats. Les cellules isolées et les syncytiums présentaient un fond cytoplasmique orange s'atténuant lentement avec l'âge de la culture, et des noyaux à fluorescence verte très nette au milieu de laquelle on pouvait distinguer le nucléole.

L'aspect de ces cellules est présenté dans le cliché 4.

Les cellules infectées à l'aide du virus de l'anémie infectieuse et colorées par l'acridine orange présentent pendant les premiers jours de culture un aspect semblable à celui des cellules saines. Ultérieurement, on retrouve les mêmes altérations que lors de l'observation après coloration par le Giemsa ou l'hémalun éosine, à savoir une rétraction du cytoplasme qui fixe davantage le colorant, suivie d'une destruction progressive des cellules.

Nous avons pu constater lors de cet essai dans le noyau des cellules l'apparition d'inclusions à fluorescence verte : cliché 5.

Lors de la progression de l'effet cytopathogène, les noyaux pâlisent progressivement pour finalement n'apparaître que comme de véritables "fantômes" d'un vert très pâle au centre d'un cytoplasme globuleux, condensé et jaunâtre.



Cliché 4 : Syncytium coloré par l'acridine orange.



Cliché 5 : Coloration par l'acridine orange de leucocytes infectés par la souche Vitastérone. L'effet cytopathogène se traduit par un rabougrissement des cellules, leur détachement de la paroi de verre ainsi que par des inclusions nucléaires.



Il ne nous a pas été possible de constater soit l'apparition de quantités importantes d'acide ribonucléique dans le cytoplasme, soit d'acide désoxyribonucléique dans le noyau.

Dans ces conditions, il nous est impossible, à l'heure actuelle, de conclure avec certitude quant à la nature de l'acide nucléique du virus de l'anémie infectieuse, d'après les résultats obtenus par la coloration à l'acridine orange.

B - FILTRATION

Les cellules de tous les tubes ayant reçu un filtrat provenant du surnageant d'une culture virale en culture leucocytaire à travers des filtres Millipore de diamètre de 220 nm, 100 nm et même 50 nm, ont présenté un effet cytopathogène.

Cet effet cytopathogène apparaît plus tôt avec les filtrats obtenus sur filtres dont les pores ont un diamètre de 220 nm, que sur les filtres dont les pores ont un diamètre de 100 nm ou de 50 nm (Tableau 8).

D'après ces résultats, il semble possible de conclure que la taille du virus de l'anémie infectieuse est inférieure à 50 nm.

C - ÉTUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

La première expérience portait sur les leucocytes du cheval "Pam" infectés par le surnageant du sixième passage de la souche "VIT".

Dans les cellules âgées de treize jours et infectées depuis huit jours, il a été possible d'observer des particules virales. Celles-ci sont situées dans le noyau, ont un diamètre de 125 nm et ressemblent à des virions du groupe herpès (cliché 8 au chapitre 3 : isolement et étude d'un herpès virus équin).

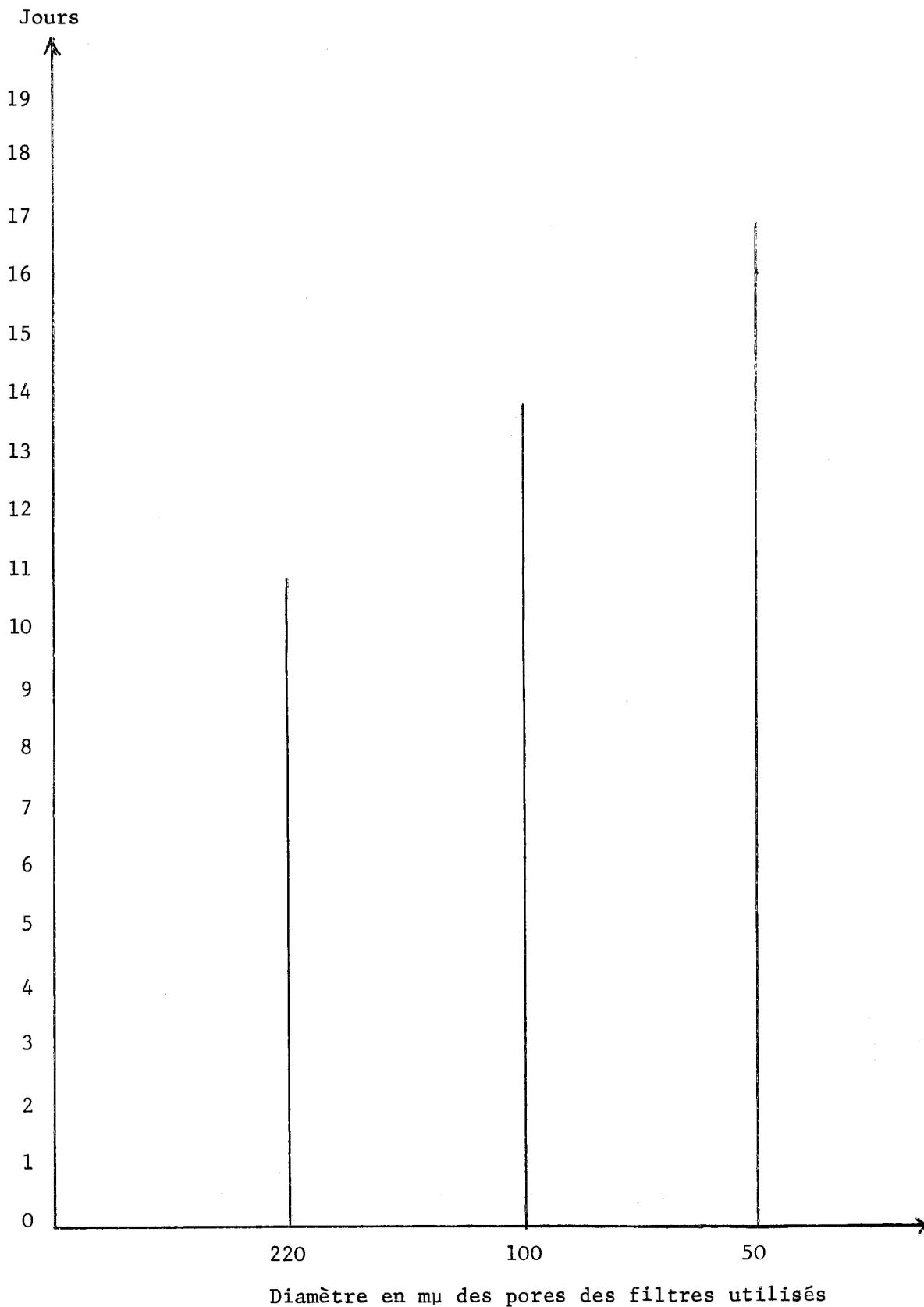
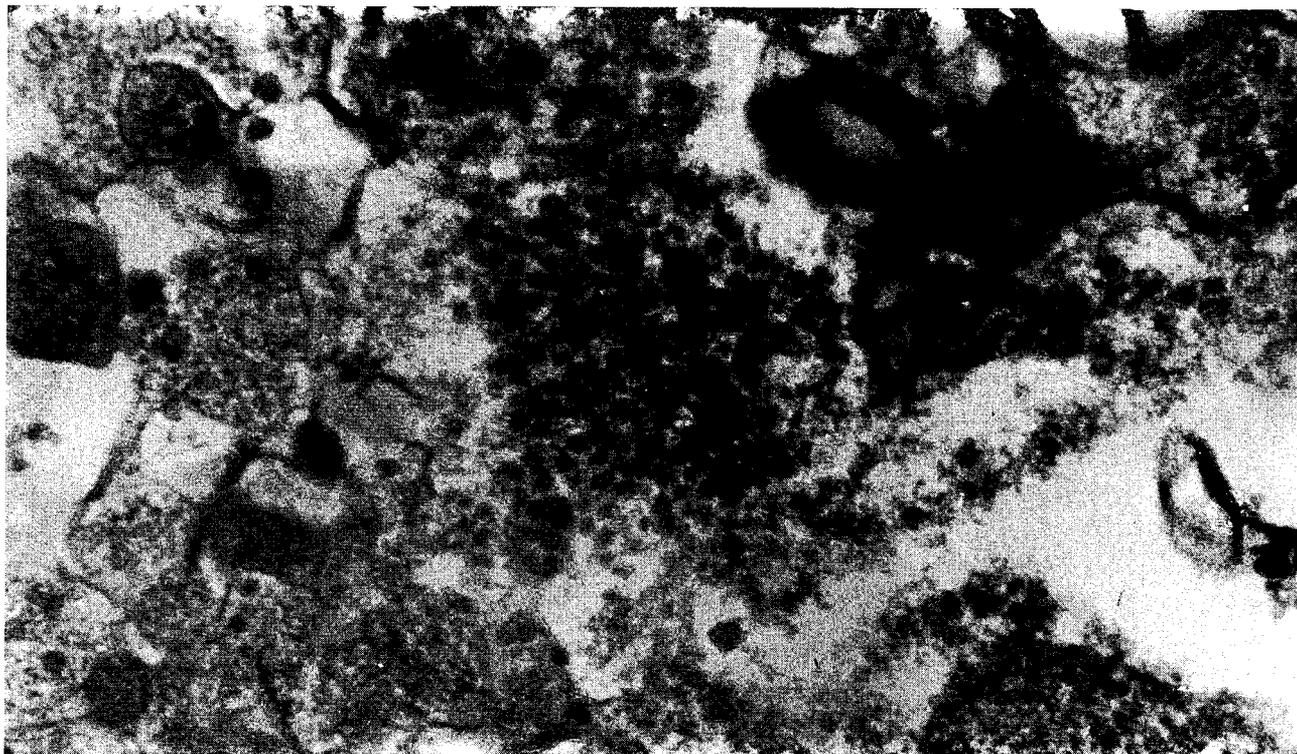


Tableau 8 : Temps nécessaire pour la destruction complète des cellules dans les cultures de leucocytes infectées par différents filtres

La seconde expérience portait également sur les leucocytes du cheval "Pam" mais infectés par le surnageant du quatrième passage de la souche "Wyoming".

Dans les cellules âgées de 12 jours et infectées depuis huit jours, comme les précédentes, ont été observées des images virales complètement différentes de celles décrites page 77. Il s'agit en effet de petites particules de 22 nm réunies selon une disposition cristalline dans le cytoplasme des leucocytes (cliché 6).



Cliché 6 : Particules virales intracytoplasmiques, d'un diamètre de 22 nm groupées de façon régulière au centre du cliché. Leucocytes âgés de 12 jours, infectés depuis 8 jours (Souche "Wyoming" quatrième passage), agrandissement final 60 000.



CHAPITRE III - ISOLEMENT ET ÉTUDE D'UN HERPÈS VIRUS ÉQUIN

A - ISOLEMENT DU VIRUS

Au cours de passages en série du virus de l'A.I.E. "Souche Vitastérone" en culture de leucocytes de cheval, la présence d'un virus contaminant a été suspectée à la suite de l'observation d'inclusions intranucléaires éosinophiles et la formation de polykarions.

Il n'a pas été possible d'identifier le cheval porteur de cette souche isolée nommée "CL₁" du fait que les passages en série comportaient l'inoculation des cultures avec l'ensemble de la culture du passage précédent, que les globules blancs utilisés pour chacun des passages provenaient d'animaux variés et que l'effet cytopathogène peut n'apparaître qu'après plusieurs passages aveugles.

Par la suite, des souches CL₂ et CL₃ ont été isolées et leur origine a pu être déterminée car le même cheval était utilisé comme donneur de leucocytes pour chaque série de passages et que systématiquement un lot de tubes ne recevait rien d'autre que le milieu de culture.

B - EFFET CYTOPATHOGENE

En culture de leucocytes de cheval, l'effet cytopathogène - des souches isolées - se développe lentement, surtout lors des premiers passages. Il se traduit par l'apparition de vastes syncytiums, groupant plusieurs noyaux, voire plusieurs dizaines de noyaux. Ultérieurement, apparaissent de volumineuses inclusions intranucléaires éosinophiles (clichés 2 et 3), puis les cellules se détachent du verre. Le virus se reproduit en cultures rénales de singe après une certaine adaptation, puisque la destruction totale du tapis qui demandait 10 jours à la mise en culture n'était plus que de 6 jours après 4 passages. Dans ces cellules, l'effet cytopathogène débute par la formation de foyers de cellules rondes. Celles-ci sont progressivement détruites et il est noté dans le tapis des "trous qui sont bordés par des cellules dont le noyau contient des inclusions éosinophiles" (cliché 7).

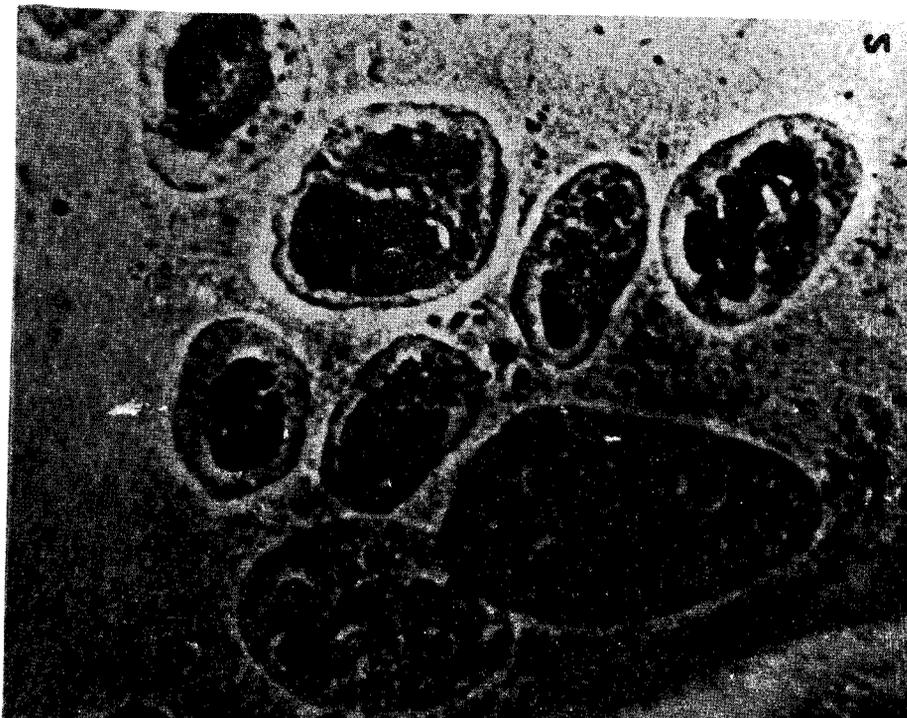
C - ÉTUDE EN CULTURES CELLULAIRES

L'étude du spectre de sensibilité cellulaire des souches CL₁ et CL₂ isolées conduit à les rapprocher du virus herpétique équin (prototype souche LK de Plummer) et à la distinguer du virus herpétique équin 1, agent de rhino-pneumonie équine. Des cellules primaires et secondaires ont été inoculées avec les virus CL₁ et CL₂ dans le but de déterminer le spectre des systèmes cellulaires sensibles à la multiplication de ces souches. Un effet cytopathogène se produit non seulement en cultures de leucocytes de cheval (clichés 2 et 3) et de rein de singe (cliché 7), mais aussi en cultures primaires et secondaires de lapin et d'embryon de chat. Par contre, aucun signe de multiplication virale n'est décelé en cellules rénales de fœtus de veau et dans les lignées Vero, BHK, Hela, Nil et MS. Dans le tableau 9 se trouve résumé l'ensemble des résultats concernant le comportement des différentes souches de virus herpétique en culture cellulaire

Cultures cellulaires	Souches virales		
	P ₃ rhinopneumonie	CL ₁ et CL ₂ Alfort	LK Plummer
CELLULES D'EXPLOITATION PRIMAIRE			
Leucocytes de chevaux.....	+	+	+
Rein de singe.....	+	+	+
Rein de lapin.....	+	+	+
Embryon de chat.....	+	+	+
Rein de fœtus de veau.....	+	0	0
LIGNEES CELLULAIRES			
Vero.....	+	0	0
BHK ₂₁	+	0	0
Hela.....	+	0	0
	(après adapta- tion)		
Nil.....	0	0	0
MS.....	0	0	0

(+) Production d'un effet cytopathogène avec formation d'inclusions de type A.
 (0) Absence d'effet cytopathogène et de formation d'inclusions.

Tableau 9 : Sensibilité de différents systèmes cellulaires vis à vis de 3 souches de virus herpétiques équins.



Cliché 7 : Cellules primaires de rein de singe 3 jours après l'inoculation de la souche CL₂-coloration à l'hémotoxiline et éosine. Inclusions intranucléaires de nombre et de taille variables, certaines d'aspect segmenté. x 540.



Le résultat permet de constater que les systèmes sensibles pour les souches isolées sont exactement ceux de la souche LK, le spectre du virus herpétique de type 1, agent de la rhinopneumonie équine P₃ étant beaucoup plus large.

D - NATURE DE L'ACIDE NUCLÉIQUE

Par la même technique d'utilisation de la 5 IDU pour la détermination de la nature de l'acide nucléique du virus de l'A.I., la 5 IDU inhibe l'effet cytopathogène et la multiplication de la souche virale herpétique, ce qui milite en faveur de l'existence d'acide désoxyribonucléique.

E - POUVOIR PATHOGÈNE, ANTIGÈNE ET IMMUNOGÈNE DE LA SOUCHE CL₁ ISOLÉE

L'inoculation de la souche CL₁ au poulain et à la jument n'a été suivie d'aucun signe clinique ni d'aucune hyperthermie et il n'a pas été possible de déceler d'anticorps fixant le complément vis à vis de l'antigène neutralisant la souche CL₁.

De même, l'autre cheval ayant reçu la souche CL₁ était toujours dépourvu d'anticorps fixant le complément avec le virus de la rhinopneumonie équine, 2 et 4 semaines après l'inoculation.

D'autre part, un sérum de cheval immunisé contre le virus de la rhinopneumonie équine, et titrant 1/256 en séroneutralisation sur cellules rénales de foetus de veau n'a pas neutralisé le virus CL₁ en culture de cellules rénales de singe.

La souche CL₁ ne semble donc pas pathogène pour le cheval et n'entraîne pas la formation d'anticorps spécifiques contre la rhinopneumonie. Inversement, les anticorps neutralisant le virus de la rhinopneumonie ne possèdent aucun pouvoir de neutralisation pour cette souche.

Les résultats de la neutralisation croisée avec les sérums antivirux type 1 (virus de la rhinopneumonie), anti-virus type 2 (souche LK), anti-virus

de Karpas et anti-virus souche Hsiung sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 10) :

Tableau 10

* Souches virales	Sérum anti			
	Type 1	Type 2	Karpas	Hsiung
Type virus 1	+++++	-	-	-
Type virus 2	-	+++++	++	++
Souche Karpas	-	++	+++++	+++
Souche Hsiung	-	+	+	+++++
Souche CL ₁ d'Alfort	-	+++	++	++

- pas de neutralisation

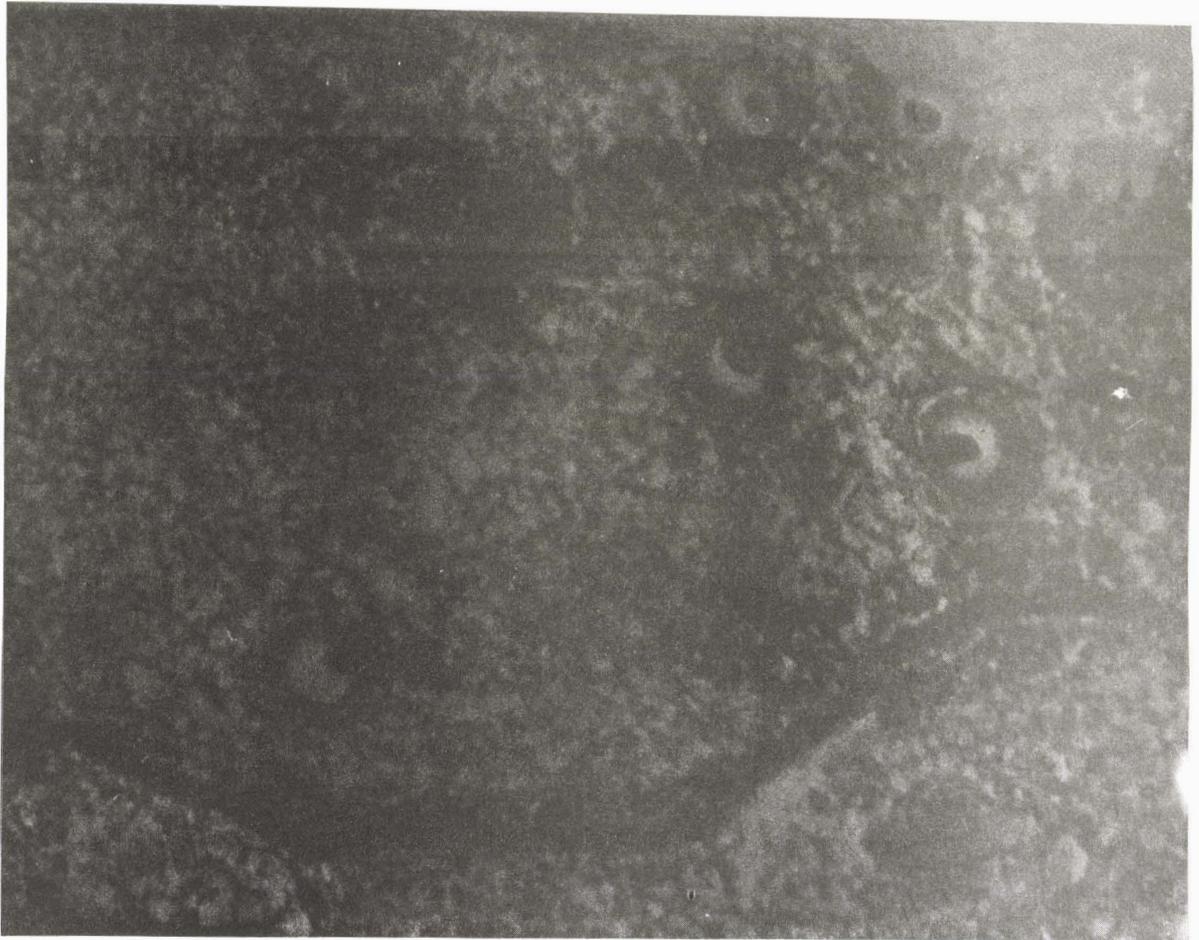
+++++ Degré de neutralisation entre un virus et anti-sérum homologue.

Ce tableau montre un degré limité de neutralisation de cette souche CL₁ par des sérums de type 2, de type 3 virus de Karpas et cytomégalivirus de Hsiung. Absence de neutralisation par le type 1 (virus de la rhinopneumonie).

F - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

1 - L'examen en microscopie électronique de cultures de leucocytes de cheval infecté de "pam" inoculé par le surnageant du sixième passage de la souche "Vitast" âgées de 13 jours et infecté depuis 8 jours a permis d'observer dans les cellules des particules virales. Celles-ci sont situées dans le noyau, ont un diamètre de 125 nanomètres et ressemblent à des virus du groupe Herpès (cliché 8).

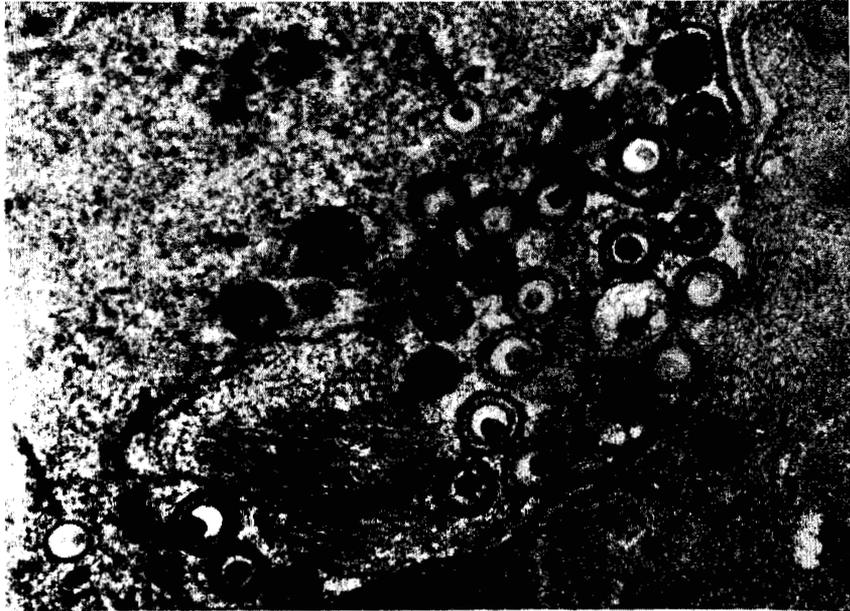
* Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Docteur PLUMMER pour l'aide qu'il nous a apportée dans la réalisation de cet essai.



Cliché 8 : Particules virales intranucléaires, d'un diamètre de 125 nm du groupe de l'herpès. Leucocytes âgés de 13 jours, infectés depuis 8 jours (souche "Vitast" sixième passage). Agrandissement final 60 000.



2 - L'examen en microscope électronique des cellules premières de rein de singe inoculé avec la même souche du virus a permis d'identifier des structures herpétiques typiques (cliché 9).



Cliché 9 : Cellules primaires de rein de singe 5 jours après l'infection par la souche CL₂ montrant des virions intranucléaires matures de type herpès. La nucléocapside est entourée par une enveloppe membranaire.
→ Nucléocapsides non enveloppées D. 51 000



CHAPITRE IV - ÉTUDE DU POUVOIR ANTIGÉNIQUE DU VIRUS DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE

A - PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE

1 a - Détermination du tissu fournissant le meilleur antigène

Des différents tissus prélevés chez les chevaux sacrifiés à la phase aigüe de la maladie, seule la rate a donné des résultats satisfaisants. Foie, poumons, ganglions mésentériques, thymus et même le sérum des animaux à la phase aigüe de la maladie ne se sont pas révélés aptes à fournir un matériel satisfaisant en tant qu'antigène dans la réaction de précipitation en gélose. Seul le pancréas a fourni une très légère ligne de précipité.

b - Localisation de l'antigène

Le sérum hyperimmun spécifique dilué 4 fois et absorbé par les préparations suivantes : globules rouges intacts, globules blancs intacts, globules rouges lavés ou hémolysés, globules blancs lavés ou lysés et cellules spléniques intactes n'a montré aucune diminution de son pouvoir précipitant. Après absorption, il fournit la même ligne de précipitation qu'en l'absence d'absorption. Seule la suspension de cellules spléniques lysées réduit le pouvoir précipitant du sérum hyperimmun utilisé. En effet, après absorption du sérum hyperimmun par la suspension de cellules spléniques lysées, on n'obtient plus de précipité en gélose.

2 - Obtention d'un antigène liquide du virus de l'anémie infectieuse des équidés

a - Inoculation de chevaux en vue de la préparation de l'antigène

Les résultats de l'inoculation de chevaux et de poneys avec des quantités importantes de virus de la souche Wyoming sont mentionnés dans les figures ci-après. La rate est prélevée immédiatement après le sacrifice de l'animal.

Tous les animaux ont été abattus entre le 9ème et le 11ème jour suivant l'inoculation et ont présenté des périodes d'incubation entre 4 et 8 jours. Les rates du poney 2 et du cheval Naude ont donné des meilleurs antigènes que ceux préparés à partir de rates du cheval Edel et du poney 1 (voir tableau 11 et figures 1 et 2).

Animaux	Matériel inoculé	Jour sacrif. après inoc.	Période d'incub.	Température maxi observée	Valeur antigénique
Cheval Edel	50 ml sang	11	8	41° C	++
Cheval Naud	300 ml sang et 150 ml sérum	9	6	40,3°	++++
Poney 1	40 ml sang et 70 ml sérum	9	4	40,4°	+++
Poney 2	30 ml sang et 100 ml sérum	9	4	40,5°	+++++

Tableau 11

L'étude du pouvoir précipitant des extraits préparés à partir de la rate de ces quatre animaux fait ressortir un parallélisme entre l'intensité et la précocité de la réaction thermique et la valeur de l'antigène.

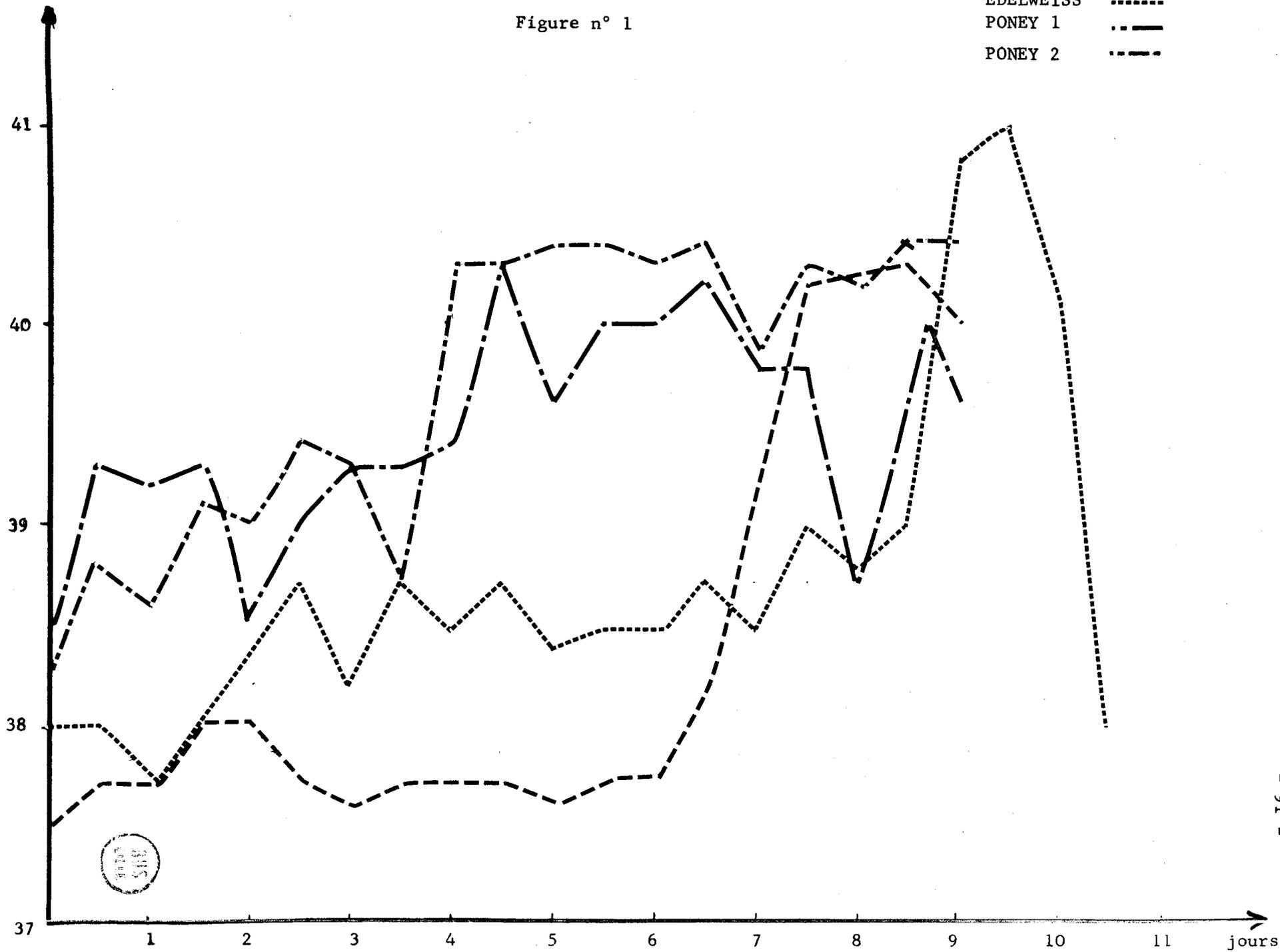
En effet, les 4 antigènes peuvent être classés par ordre de valeur décroissante de la manière suivante : Poney 2, Naudary, Poney 1, Edel, ordre que l'on retrouve pour la réaction thermique. (cf. figures n° 1 et 2).

b - Traitement des rates fournissant l'antigène

De la comparaison du pouvoir antigène des 13 types de préparations évoqués dans les techniques, on peut conclure que la modalité fournissant les meilleurs résultats correspondait à l'antigène n° 3 qui est préparé par homogénéisation du tissu splénique puis centrifugation par 27 000 g pendant 30 mn après les cycles de congélations et de décongélations. Cet antigène nous a donné les meilleurs résultats. Il a été possible de concentrer l'antigène par lyophilisation ou par dialyse. L'extrait aqueux d'antigène s'est révélé supérieur aux

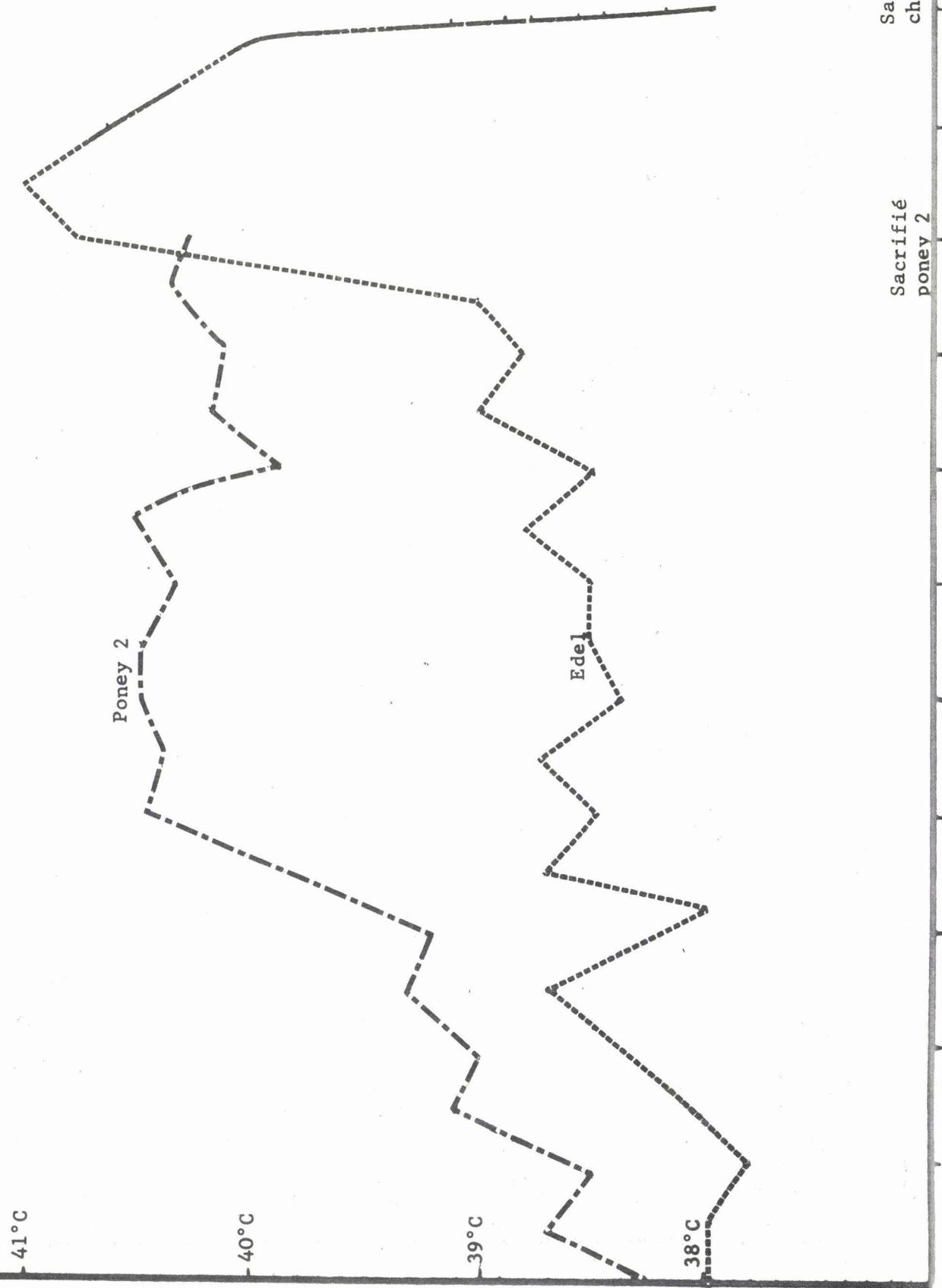
Figure n° 1

NAUDARY - - -
EDELWEISS
PONEY 1 - · - ·
PONEY 2 - · - ·



BUS
LILLE

Figure 2 : Si l'on compare la courbe thermique du poney 2, on note une courte période d'incubation et une hyperthermie persistante avec celle du cheval Edel. On peut noter une corrélation possible entre l'évolution thermique et la qualité de l'antigène obtenu (tableau 11)



autres extraits par le tampon, l'acétone, l'éther, l'alcool ou l'acétone éther mais moins satisfaisant que le surnageant de l'antigène non dilué.

c - Facteurs conditionnant le pouvoir antigénique

c-1 - Effet de la conservation de la rate à - 30° C sur le pouvoir antigénique. L'antigène préparé après 2 ou 3 mois de conservation à - 30° C fournit de bien meilleurs résultats qu'un antigène préparé à partir de la même rate dans les jours qui suivent le sacrifice.

c-2 - Effet du nombre de cycles de congélations et de décongélations sur le pouvoir antigénique. Le tableau suivant montre l'effet du nombre de cycles successifs de congélations et de décongélations sur le pouvoir antigénique de la rate du poney 2. L'antigène a été utilisé pur, dilué au 1/2 ou au 1/4. (Tableau 12).

Dilution de l'antigène	Sérum positifs Nbre de congélations						
		pur	1/2	1/4	1/6	1/8	1/10
Antigène pur	0 congélation	++	++	++	+	±	-
	2 congélations	++	+++	+++	++	+	+
	5 congélations	++++	++++	+++	++	-	++
	10 congélations	++++	++++	+	+	-	±
	15 congélations	++++	++++	++++	+	-	±
	20 congélations	++++	+++	+++	+	+	++
Antigène 1/2	0 congélation	±	+	+	++	++	-
	2 congélations	+	+	++	+++	++	++
	5 congélations	+	+	++	+++	++	++
	10 congélations	+	+	++	+++	++	++
	15 congélations	+	+	++++	++++	++++	++
	20 congélations	+	++	+++	++++	+++	+++
Antigène 1/4	0,5, 5 et 10 congél.	-	-	-	-	-	-
	15 congélations	-	-	-	-	-	±
	20 congélations	-	-	-	±	+	+

Tableau 12

La lecture de ce tableau permet de conclure que l'augmentation du nombre des cycles de congélations et décongélations améliore le pouvoir antigénique du virus de l'Anémie Infectieuse sur le plan de la précipitation en gélose. 15 cycles de congélations et décongélations fournissent d'excellents résultats. Le tableau permet de constater également les différences de résultats obtenus selon que l'antigène est pur, dilué au 1/2 ou au 1/4.

c-3 - Effet des ultra-sons sur le pouvoir antigénique

Le traitement d'un antigène liquide par les ultra-sons à 0,9 Kc pendant 5 mn donne d'excellents résultats et peut remplacer le cycle des congélations et décongélations pour la préparation de l'antigène.

d - Résultats obtenus avec les rates provenant des chevaux sacrifiés à différents stades de la maladie

Des 8 rates prélevées sur les chevaux morts ou sacrifiés d'Anémie Infectieuse, à différents stades de l'infection suraigüe, aiguë ou subaigüe, seules les rates des chevaux en phases suraigües ont montré un pouvoir antigénique satisfaisant. Les rates des autres chevaux ne peuvent pas servir pour le diagnostic de l'Anémie Infectieuse par précipitation en gélose.

Préparation de matériels de contrôle négatif à partir de chevaux sains

12 rates de chevaux sains ont été prélevées et traitées de la même manière que celles utilisées pour la préparation de l'antigène Anémie Infectieuse. Elles ont été utilisées en tant qu'antigène de contrôle négatif. Aucune n'a présenté de précipité en présence des sérums des chevaux atteints d'Anémie Infectieuse.

B - VÉRIFICATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANTIGÈNE OBTENU

1 - Réactions sérologiques de l'antigène avec différents sérums

a - L'antigène Anémie Infectieuse réagit en précipitation en gélose et fournit une ligne de précipité spécifique avec les sérums de chevaux atteints d'Anémie Infectieuse. Il ne réagit pas avec les sérums de chevaux indemnes d'A.I.

b - Il ne réagit pas avec les sérums de chevaux atteints de rhinopneumonie, de grippe, d'artérite à virus, de leptospirose ou de gourme sauf quand ces chevaux sont en même temps infectés par le virus de l'Anémie Infectieuse.

c - L'antigène ne forme pas de lignes de précipité avec les sérums hyper-immuns de chevaux recevant des antigènes correspondant à différentes maladies comme le tétanos, le charbon, le rouget, la rage et des préparations de bactéries anaérobies strictes.

d - Certains sérums d'animaux sains ont fourni des réactions non spécifiques dans une proportion de 2 à 3 %. Ces lignes de précipité non spécifiques sont très facilement reconnaissables (voir pages 10⁴ et 105).

2 - Absorption de l'antigène avec des sérums anti virus de l'Anémie Infectieuse

a - L'antigène spécifique Anémie Infectieuse mis en contact avec un sérum anti Anémie Infectieuse perd son pouvoir précipitogène et par suite, on ne constate plus de lignes de précipité en diffusion de gélose lorsqu'il est mis en face d'un sérum anti Anémie Infectieuse. 1 ml du sérum de référence anti Anémie Infectieuse suffit pour supprimer le pouvoir antigène de 0,5 g de l'antigène Anémie Infectieuse "Naude".

b - 1 ml de sérum de chevaux normaux ne modifie strictement pas le pouvoir précipitant de 0,5 g de l'antigène Anémie Infectieuse "Naude".

3 - Absorption des anticorps d'un sérum hyperimmun anti Anémie Infectieuse par l'antigène Anémie Infectieuse

Nous avons déterminé la quantité d'antigène qui réduit le pouvoir précipitant du sérum hyperimmun anti Anémie Infectieuse. 1 ml de la dilution au 1/4 du sérum spécifique de référence est mis en contact avec l'antigène préparé à partir de différents chevaux atteints d'Anémie Infectieuse. 0,5 g d'antigène Anémie Infectieuse de "Naude" suffit pour éliminer le pouvoir précipitant du sérum hyperimmun de référence. 1 g de l'antigène Anémie Infectieuse "Edel" entraîne une diminution du pouvoir précipitant du sérum de référence

et 2 g de l'antigène supprime complètement le pouvoir précipitant du sérum de référence. En revanche, 2 g de rate normale provenant de différents chevaux ne provoquent aucune diminution du pouvoir précipitant du sérum de référence anti Anémie Infectieuse. Les résultats des absorptions avec les différents antigènes sont mentionnés dans le tableau suivant (tableau 13).

Quantité d'extraits spléniques mis en présence de 1 ml de sérum hyperimmun de référence anti Anémie Infectieuse dilué au 1/4	Lignes de précipité	Précipitant résidu du sérum hyperimmun absorbé
0,2 g d'antigène Naude	Inhibition partielle	++
0,5 g d'antigène Naude	Inhibition complète	-
1 g d'antigène Edel	Inhibition partielle	+
2 g d'antigène Edel	Inhibition complète	-
1 g d'antigène Vitast	Très faible inhibition	+++
2 g d'antigène Vitast	Inhibition partielle	+
1 g d'antigène Prairie	Très faible inhibition	+++
2 g d'antigène Prairie	Inhibition partielle	+
1 g d'antigène Blanche	Inhibition partielle	+
Absorption avec des rates de chevaux normaux	Aucune inhibition	++++
2 g rate de cheval normal n° 1	"	++++
2 g - - - n° 2	"	++++
2 g - - - n° 3	"	++++
2 g - - - n° 4	"	++++
2 g - - - n° 5	"	++++
2 g - - - n° 6	"	++++

Tableau 13

4 - Identité de l'antigène Anémie Infectieuse dans les extraits de différentes rates

Des extraits antigéniques préparés à partir de rates de chevaux ayant reçu la même souche de virus Wyoming réagissant vis-à-vis du sérum hyperimmun anti Anémie Infectieuse et forment des lignes de précipité qui se rejoignent, ce qui indique l'identité de l'antigène obtenu à partir de chevaux différents.

5 - Rapport entre l'antigène Anémie Infectieuse et d'autres antigènes

Nous n'avons pu mettre en évidence aucune relation entre l'antigène Anémie Infectieuse et divers autres antigènes, en particulier l'antigène streptocoque, rouget, tétanos, brucella, rhinopneumonie et artérites à virus. Les chevaux infectés de façon inapparente par le virus de l'Anémie Infectieuse ont été utilisés pour produire des sérums hyperimmuns contre l'antigène rouget. Le sérum de ces chevaux réagit de manière spécifique avec l'antigène rouget et avec l'antigène Anémie Infectieuse en donnant deux lignes de précipité qui se coupent. Cet aspect est représenté par la photo n° 6, page 105.

6 - Vérification de la spécificité de la réaction sérologique par inoculation au cheval sensible

Le mélange des sérums de quatre chevaux ayant fourni une réponse positive au test de diffusion en gélose a été injecté à un poney sain. La maladie a pu être reproduite sur ce poney qui est mort après avoir présenté un ensemble de réactions cliniques, hématologiques et sérologiques permettant d'affirmer le diagnostic de l'Anémie Infectieuse (voir figure n° 8, page 146).

Nous reviendrons ultérieurement sur cette vérification dans le chapitre VIII, D "Isolement du virus à partir de chevaux infectés". (page 139).

C - CARACTÉRISTIQUES DE L'ANTIGÈNE ANÉMIE INFECTIEUSE

1 - Action des produits chimiques

a - Action de l'éther et du chloroforme

Le traitement de l'antigène avec une quantité égale d'éther à + 4° pendant 4 heures ne modifie pas le pouvoir précipitant de l'antigène. La même expérience a été réalisée avec le chloroforme laissé en contact avec l'antigène pendant 1/2 heure à température du laboratoire. Le chloroforme ne modifie pas le pouvoir précipitant de l'antigène Anémie Infectieuse.

b - Action de la trypsine et de la papaïne

0,3 ml d'antigène a été mis en contact d'une goutte de trypsine et de papaïne à 2 % pendant 2 heures à 37°. Dans ces conditions, la trypsine ne modifie pas le pouvoir précipitant de l'antigène tandis que la papaïne le diminue légèrement.

2 - Thermostabilité de l'antigène

Le chauffage de l'antigène à 37° pendant 2 heures, à 45° pendant 30 minutes ou à 50° pendant 10 minutes ne diminue guère le pouvoir précipitant de l'antigène. En revanche, à partir de 20 mn à 50° ou au-delà (60° pendant 10 mn, 70 à 100° pendant quelques minutes), on constate une disparition du pouvoir précipitant de l'antigène comme le montre le tableau suivant (tableau 14)

Température	Temps en mn	Intensité de la ligne de précipité
37°	30	+++
	45°	+++
50°	20	++
	30	+
	10	+
	20	-
55°	30	-
	10	-
	20	-
60°	10	-
	30	-
70°	30	-

Tableau 14 : Action de la chaleur sur l'antigène "Naude" (dilué au 1/2)

3 - Fractionnement sur colonne de Sephadex

Le passage de l'antigène sur colonne de Sephadex a permis d'obtenir 3 pics dont le plus haut (pic 1) correspond à l'antigène, ce qui est en faveur d'un haut poids moléculaire.

B - ÉLECTROPHORÈSE DE L'ANTIGÈNE

L'analyse globale des 20 courbes obtenues avec les 20 extraits de rate de chevaux normaux ou atteints d'anémie infectieuse nous a permis de définir 11 pics dont 3 sont très facilement repérables : les pics 4, 5 et 8 sont présents dans tous les extraits étudiés. En revanche, le pic n° 6 fait défaut constamment dans les extraits de rates provenant d'animaux infectés par le virus de l'anémie infectieuse, alors qu'il est présent dans les extraits de rates d'animaux sains. Ce pic n° 6 est absent aussi bien chez les chevaux infectés depuis peu de temps par le virus de l'anémie infectieuse que chez les chevaux sacrifiés ou morts après une très lente période d'évolution clinique (figures 3, 4, 5 et 6).

En conclusion, l'extrait préparé à partir de rates de chevaux atteints d'une forme suraiguë d'anémie infectieuse se révèle spécifique par précipitation en gélose vis à vis d'un sérum anti-virus anémie infectieuse. Le pouvoir précipitant est détruit par chauffage à 50° C pendant 20 mn mais n'est pas modifié par les solvants ni par la trypsine.



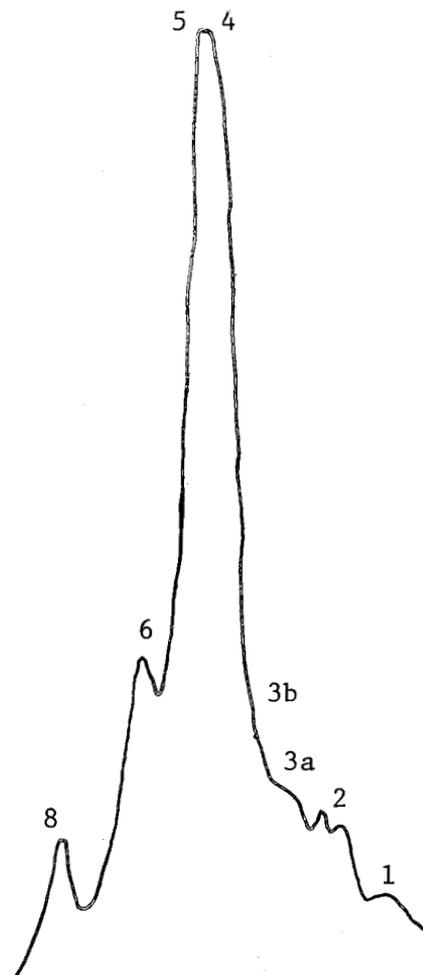
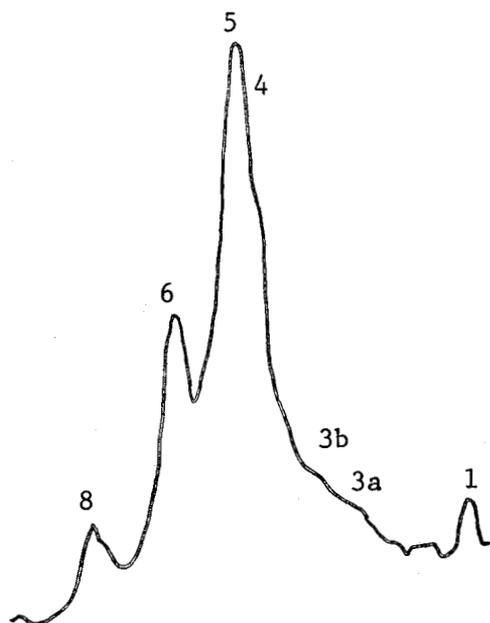


Figure 3 : Suspension rate normale

Figure 4 : Suspension rate normale

Noter l'existence du pic n° 6 dans les deux cas.



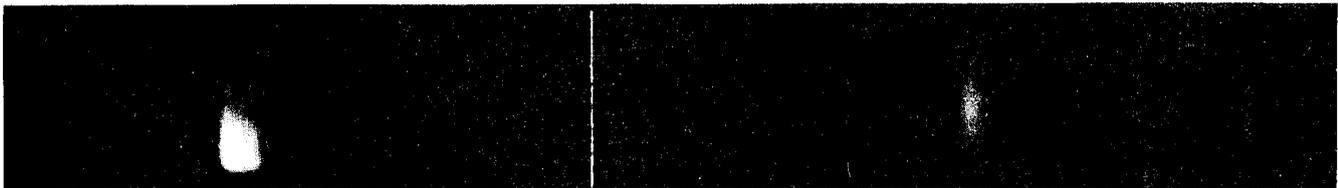
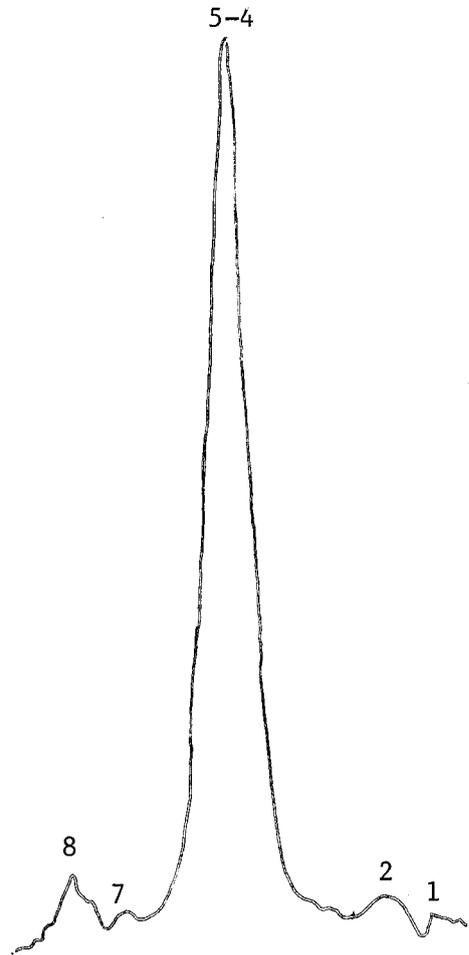
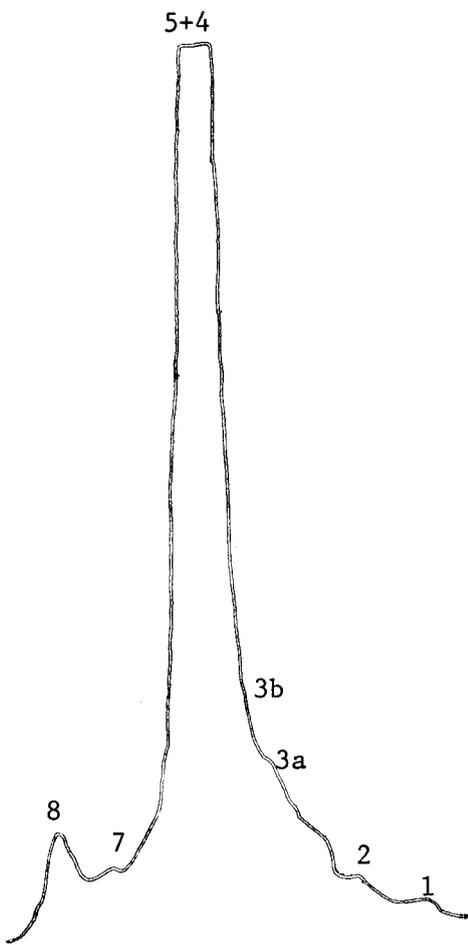


Figure 5 : antigène A.I.E.
Rate du poney 2
(Cas d'infection suraigüe)

Figure 6 : antigène A.I.E.
Rate du cheval Prair.
(Cas d'infection chronique).

Noter l'absence et la disparition du pic n° 6 dans les cas d'A.I.E.



Résultats :

C H A P I T R E V

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Nous avons fait appel à deux groupes de techniques pour le diagnostic sérologique de l'anémie infectieuse : la première représentée par la précipitation en gélose et sa variante sous forme de microtechnique et la seconde, l'épreuve d'hémagglutination conditionnée.

A - REACTIONS DE PRECIPITATION EN MILIEU GELIFIE

Les lignes de précipité fournies par le sérum de référence anti-anémie infectieuse sont déjà visibles 12 h. après le dépôt des réactifs. Le sérum de référence a été choisi pour donner une ligne mince, dense et parfaitement visible. La lecture des résultats doit être poursuivie jusqu'à la 48ème heure après la préparation du test. Il est inutile de prolonger la lecture au-delà de ce temps car l'aspect des lignes de précipité ne se modifie plus. Etant donné la disposition des sérums dans les cupules, chaque sérum étudié peut être comparé directement avec le sérum hyperimmun anti-anémie infectieuse de référence. Les lignes de précipité fournies par les sérums suspects contenant des anticorps sont facilement décelées car elles rejoignent la ligne du précipité fournie par le sérum hyperimmun voisin (photo 1). Lorsque la cupule a reçu un sérum négatif, le précipité fourni par le sérum hyperimmun voisin se développe complètement et vient atteindre la cupule contenant le sérum négatif (photo 2). Il est possible de distinguer 4 types différents de lignes de précipité, 3 correspondant à un précipité spécifique et 1 à un précipité non spécifique.

1) Caractères des lignes de précipité spécifiques

a) Sérum contenant de fortes concentrations d'anticorps anti-virus de l'anémie infectieuse.

Photo 1 : Réunion des lignes de précipité fournies par le sérum positif de référence et les sérums étudiés qui contiennent des anticorps précipitant avec le virus de l'A.I.E. Antigène A.I dans la cupule centrale

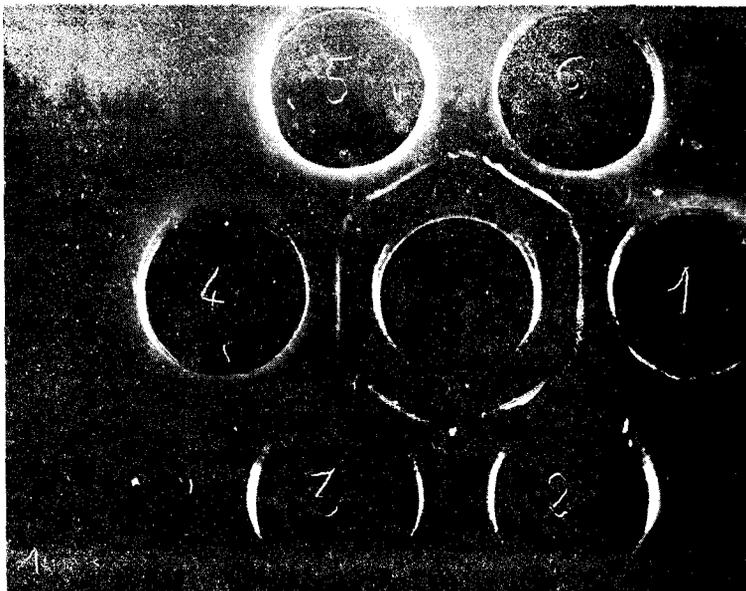


Photo 2 : Cupules 1 et 4 : sérum positif de référence.

Cupules 2 et 5 : sérums positifs fournissant un précipité qui rejoint le précipité du sérum de référence.

Cupules 3 et 6: sérums négatifs

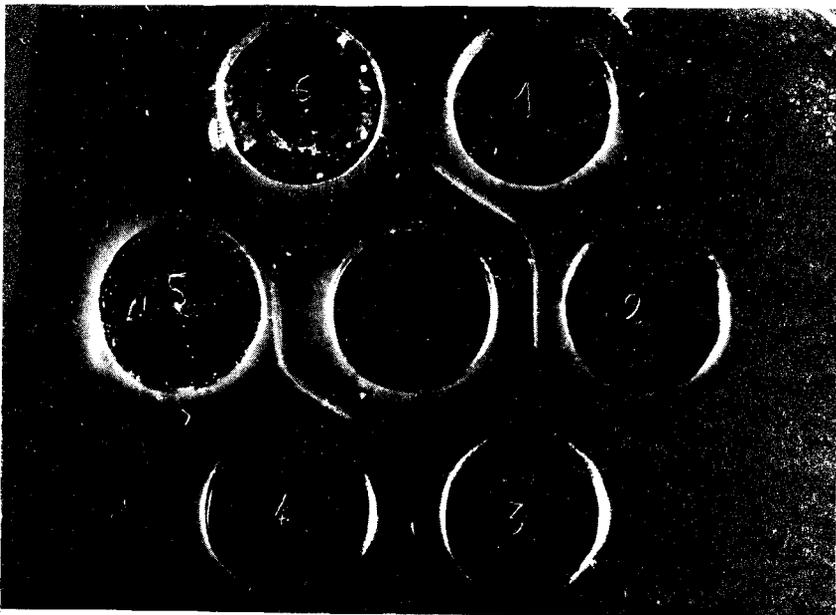


Photo 3 : Cupules 1 & 4: sérum positif de référence.

Cupules 2,3 et 5: sérums négatifs

Cupule 6 : sérums très légèrement positif: déviation de la ligne de précipité du sérum positif de référence.

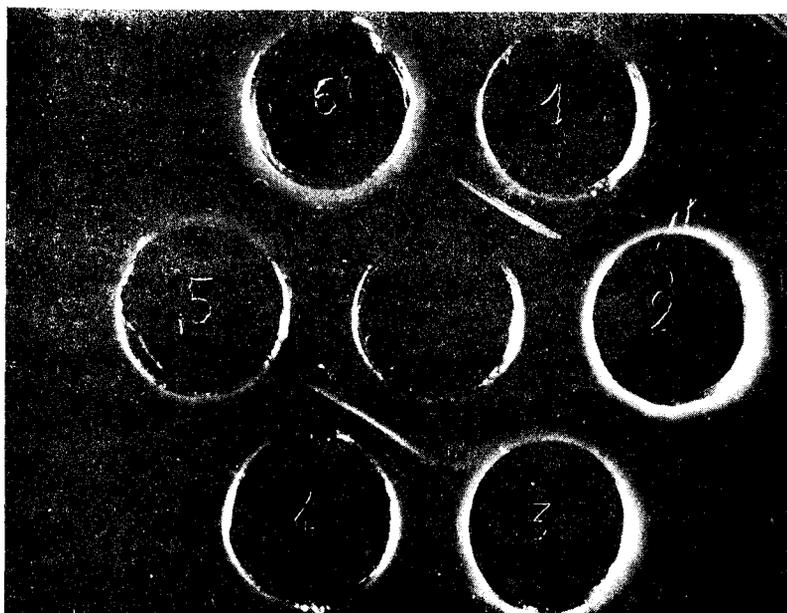


Photo 4 : Inhibition de la ligne de précipité du sérum positif de référence (cupule 1) par deux sérums voisins possédant un titre élevé d'anticorps précipitant avec le virus de l'A.I.
(cupules 2 & 6)

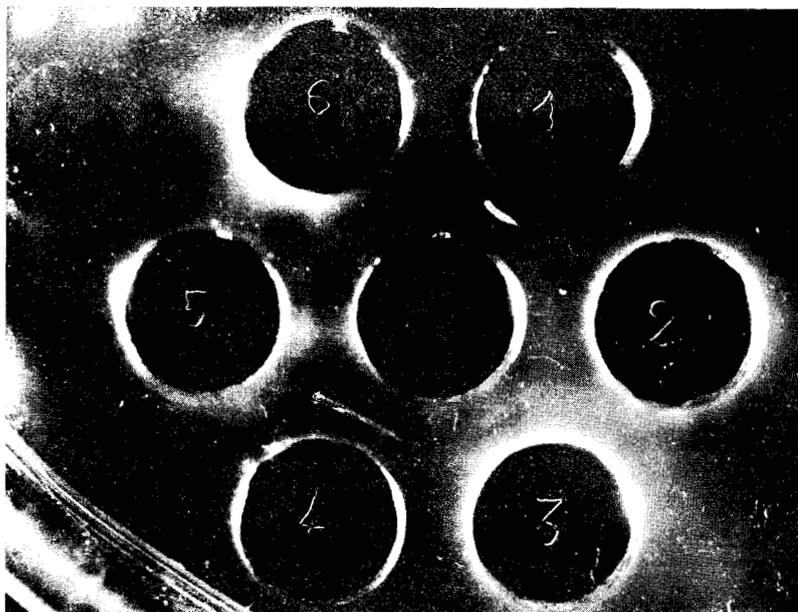


Photo 5 : Ligne de précipitation non spécifique vis-à-vis de la cupule N°2
Cupule 6 sérum très légèrement positif.

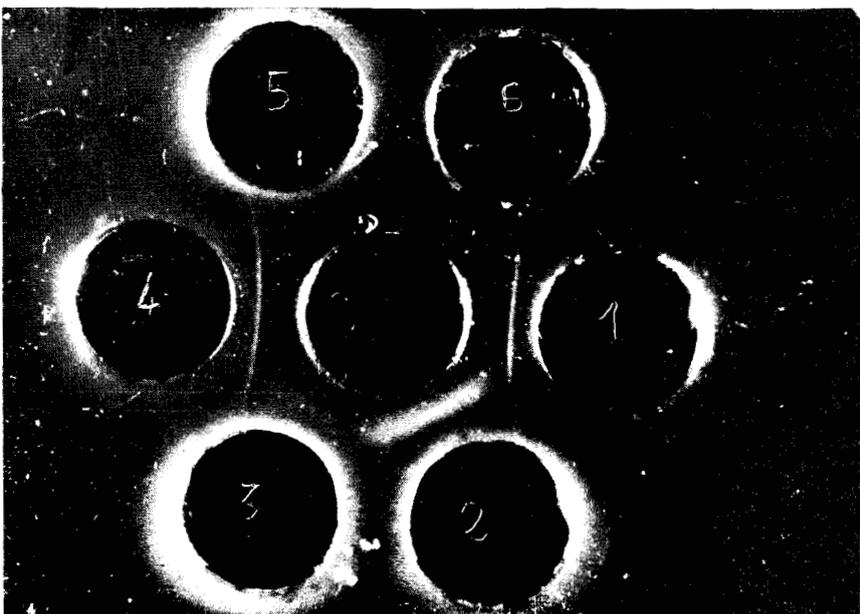
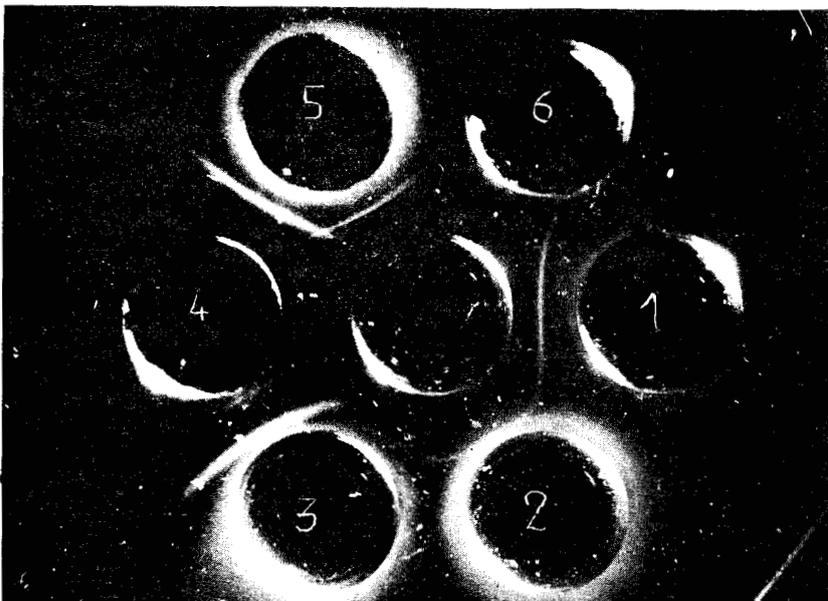


Photo 6 : Cupule centrale :
Antigène A.I.
Cupule 4 : Antigène ayant servi à l'hyperimmunisation des chevaux (Antigène rouget)
Cupule 1: témoin sérum positif d'A.I.E.
Cupule 2: sérum faiblement positif d'A.I.E.
Cupules 3 & 5: sérum cheval hyperimmunisé anti rouget et au même temps infecté A.I.
Cupule 6 : Sérum négatif.
Notons l'apparition des lignes croisées de précipitation par les deux types d'antigènes ce qui traduit la spécificité de la technique



Ces sérums donnent une ligne de précipité assez large, floue et peu distincte ou bien n'entraînent l'apparition d'aucune ligne de précipité à cause d'un excès d'anticorps par rapport à la quantité d'antigène déposé dans la cupule centrale. De tels sérums sont cependant repérés facilement car ils provoquent une inhibition partielle de la ligne de précipité formée par le sérum hyperimmun de référence voisine (photo 4). Il est facile d'apporter la preuve de la présence d'anticorps donné en excès en diluant ce type de sérum au quart et au huitième et en recommençant l'épreuve avec le sérum ainsi dilué. Ces sérums contenant un excès d'anticorps fournissent une ligne de précipité bien nette après dilution au quart ou au huitième.

b) Sérum faiblement positif contenant une faible concentration d'anticorps anti virus d'Anémie Infectieuse.

Les sérums prélevés dans les premières phases de l'infection par le virus de l'Anémie Infectieuse fournissent une réponse faiblement positive. La ligne de précipité observée peut être très mince, très faible et très proche de la cupule dans laquelle a été déposé le sérum. Parfois on ne constate pas de lignes de précipité fournies par de tels sérums mais simplement une inflexion de la ligne de précipité du sérum hyperimmun de référence voisin (photos 3 et 5). Il est cependant possible de confirmer la présence de faibles quantités d'anticorps dans ces sérums par l'une des techniques suivantes : concentration des sérums faiblement positifs grâce à la lyophilisation ou à la précipitation des gamma-globulines. Par ailleurs, il est possible de faire réagir le sérum faiblement positif avec un antigène dilué 2 fois plus. Dans ces conditions une ligne de précipité plus nette apparaît. Enfin la surveillance de l'évolution du taux d'anticorps dans les sérums de tels animaux au cours des saignées suivantes permet de confirmer l'augmentation du taux d'anticorps au cours du temps. (détaillé au chapitre VII cinétique de la réponse sérologique à l'infection page 125).

c) Sérum contenant une quantité d'anticorps anti virus de l'Anémie Infectieuse équivalente à l'antigène utilisé.

Dans ce cas en 24 h. on voit apparaître une ligne de précipité fine, dense et bien distincte qui rejoint la ligne de précipité du sérum hyperimmun de référence voisin (photo 1).

2) Caractère et identification des lignes non spécifiques

Environ 3% des sérums de chevaux que nous avons étudiés fournissent une ligne de précipité non spécifique. Ces lignes de précipité peuvent être facilement distinguées de lignes de précipité spécifiques en raison de leurs caractères qui sont les suivants : en général ces lignes sont plus larges et plus floues que les lignes de précipité spécifique. Les lignes de précipité non spécifiques voisin (photo 5 et 6). Quelques lignes de précipité non spécifiques apparaissent dans les 24 h. qui suivent la réalisation du test mais la plupart d'entre elles visibles plutôt au bout de 48 h. tandis que les lignes de précipité spécifiques sont déjà visibles en 24 h. Les lignes de précipité non spécifiques sont le plus souvent très proches de la cupule contenant le sérum tandis que les lignes de précipité spécifiques se forment en général vers le milieu de la distance qui sépare cupule d'antigène et cupule d'anticorps. Certaines lignes de précipité non spécifiques disparaissent spontanément, notamment après lavage. La répétition du test avec un sérum dilué 2 fois permet bien souvent de faire disparaître ces lignes de précipité non spécifiques. Enfin l'absorption de sérum avec un extrait de rate normale permet de supprimer les lignes de précipité non spécifiques. Ces différences entre lignes de précipité spécifiques et non spécifiques sont résumées dans le tableau suivant : (tableau 15)

Ligne de précipité spécifique	Ligne de précipité non spécifique
1) Identité avec le précipité du sérum hyperimmun de référence	1) La ligne de précipité non spécifique ne rejoint pas la ligne de précipité du sérum hyperimmun de référence
2) Ligne de précipité étroite mince et dense	2) Ligne de précipitation large et floue
3) Apparaît en général en 24 h.	3) Apparaît le plus souvent en 48 h.
4) Située en général vers le milieu séparant cupule d'antigène et cupule de sérum	4) Le plus souvent très proche de la cupule où se trouve le sérum
5) La ligne de précipité spécifique persiste après le lavage	5) Disparaît en général au cours du lavage par tampon borate
6) Obtenue même après dilution du sérum	6) Disparaît en général par dilution du sérum
7) L'adsorption du sérum avec de la rate normale ne supprime pas les lignes spécifiques	7) Disparaît en traitant le sérum par un extrait de rate normale

TABLEAU 15

On peut indiquer que :

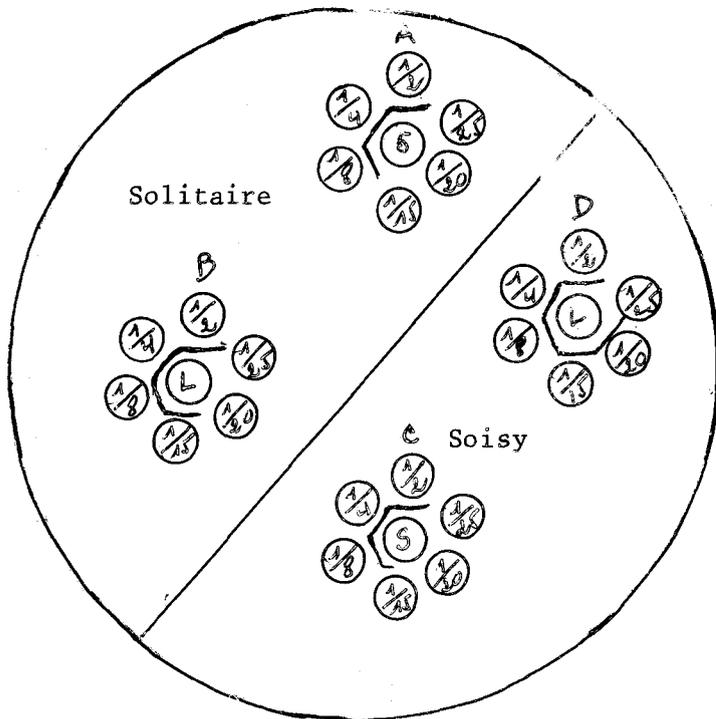
- 1) Le test de précipitation en gélose est absolument spécifique et valable pour la détection de l'Anémie Infectieuse.
- 2) Les différents caractères des lignes de précipité ont été étudiés.
(4 types différents).
- 3) Les sérums prélevés sur des chevaux atteints d'une forme chronique ou latente donne une réponse positive pendant très longtemps
- 4) Le sérum prélevé sur des chevaux à la phase aiguë de la maladie ne contient pas d'anticorps précipitants et ne fournit pas de ligne de précipité.

5) La différenciation entre ligne de précipité non spécifique et ligne de précipité spécifique est facilement réalisée grâce à la comparaison avec le système de référence constitué par le sérum hyperimmun anti-anémie infectieuse.

3) Augmentation de la sensibilité de la réaction grâce à l'antigène liquide.

a) Comparaison du pouvoir précipitant de l'antigène liquide et de l'antigène solide.

La comparaison du pouvoir précipitant de l'antigène constitué par de la pulpe splénique et de l'antigène liquide est représentée dans le diagramme suivant :



1) Disposition antigène dans la cupule centrale

A et C : antigène solide "S"

B et D : antigène liquide "L"

2) Sérums de chevaux atteints d'A.I.E.

Dilution de 1/2 au 1/25

A et B : "solitaire" Jument

D et C : "Soisy"

Ces résultats montrent que l'antigène liquide diffuse plus facilement que l'antigène constitué par de la pulpe splénique et qu'il fournit des lignes de précipité à des dilutions plus importantes d'un même sérum. Ainsi avec le sérum Solit, l'antigène de pulpe splénique fournit un précipité jusqu'à la dilution du sérum au huitième tandis qu'avec l'antigène liquide il fournit ce même précipité jusqu'à la dilution du sérum au quinzième. De même avec le sérum de Sois, l'antigène de pulpe splénique réagit jusqu'à la dilution du sérum au quinzième tandis que l'antigène liquide fournit une réponse jusqu'à la dilution du sérum au vingtième.

b) Détermination de la dose optimale antigène - anticorps (titrage de l'antigène).

Afin de déceler la quantité la plus faible d'anticorps dans un sérum suspect, nous avons procédé à la détermination du titre de l'antigène qui permet encore d'obtenir une ligne de précipité avec une dilution importante d'un sérum. Pour ce faire, différentes dilutions de l'antigène et différentes dilutions de sérums ont été étudiées par la technique de l'échiquier. Les résultats obtenus sont portés dans les tableaux suivants (tableaux 16, 17 et 18).

Sérum \ Antigène	Pur	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/8	1/10	1/12	1/15	1
Pur	+++	++++	+++++	+++++	++++	+++	++	-	-	-	
1/2	-	+	++	+++	++++	+++	+++	++	++	+	
1/3	-	-	+	+	++	++	+++	+++	++	++	
1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

TABLEAU 16 = Titrage du sérum Sol. avec l'antigène liquide " Naud ".

Antigène \ Sérum	Sérum								
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/20	1/25	1/32	
Pur	++	+++	++++	+++	+++	++	-		
1/3	-	-		+++	+++	+++	n.f	++	

TABLEAU 17 = Etude du titrage du sérum Sois avec de l'antigène liquide "Naud"

Antigène \ Sérum	Sérum								
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/12	1/16	1/20	1/25	
Pur	++	+++	++++	±	±	-	-	-	
1/2	-	+	+	++	++	+	+	-	
1/3	-	-	±	+	+	+	+	-	
1/4	-	-	-	±	±	-	±	-	

TABLEAU 18 = Titrage du sérum Sol. avec l'antigène "poney II".

Remarque. - L'intensité des lignes de précipité a été appréciée en fonction d'un nombre de croix.

n.f. = non fait

Sur ces tableaux (16, 17 et 18) on constate l'existence de résultats correspondant au phénomène de zone, par excès de l'anticorps ou d'antigène fait classique pour précipitation avec les sérums de chevaux et les antigènes de nature protéique. Ainsi dans le tableau 16, on remarque que le sérum dilué au 1/10ème ne fournit pas de précipité en présence de l'antigène pur, à cause de l'excès d'antigène, tandis qu'il en fournit avec le même antigène dilué au 1/2 ou au 1/3. De même le sérum pur dilué au 1/2 ne provoque pas la formation de précipité en présence de l'antigène dilué au tiers à cause d'un excès d'anticorps cette fois,

alors qu'après dilution du sérum au 1/8è ou au 1/10è, un précipité net apparaît. En fonction des résultats obtenus avec l'antigène provenant de ce cheval "Naud", nous avons retenu la dilution la plus forte de l'antigène qui permette d'obtenir encore un précipité net, soit la dilution de l'antigène au demi dans ce cas. Cette dilution autorise un dépistage de sérums contenant une faible quantité d'anticorps qui permettrait l'emploi de l'antigène pur (cf. tableau N° 16).

Il est possible grâce à des dilutions de l'antigène liquide, d'introduire une appréciation quantitative de la valeur de l'antigène et d'aboutir à la standardisation de la technique.

C) TECHNIQUE DE MICRO-METHODE DE PRECIPITATION

Les résultats obtenus lors de l'utilisation de la technique de micro-précipitation révèlent que cette technique est plus sensible que la technique classique évoquée ci-dessus.

En utilisant une concentration d'antigène et immune sérum insuffisante pour donner une ligne de précipitation selon la technique classique, on obtient des résultats positifs selon la technique de micro-précipitation.

Ainsi dans les dilutions ci-dessous des lignes de précipitation apparaissent entre :

Antigène

" Naud "	pur	et immune	sérum de référence	"Sol"	dilué au	1/20
"	dilué au	1/2	"	"	"	1/32
"Poney II"	pur	et immune	"	"	"	1/20
"	dilué au	1/2	"	"	"	1/25

Aucune ligne de précipitation ne sont décelables sous les mêmes conditions dans la technique classique (cf. tableaux 16 et 18).

CONCLUSION

La technique de précipitation en gélose avec un antigène liquide d'origine splénique est simple, pratique et spécifique. La nature liquide de l'antigène permet de réaliser un titrage et par suite de rendre la réaction plus sensible grâce à la détermination de la dose optimale d'antigène permettant de déceler la plus faible quantité d'anticorps capable de donner naissance à un précipité visible.

La réaction de précipitation en gélose constitue un progrès considérable pour le diagnostic et le dépistage sur une grande échelle de l'anémie infectieuse des équidés. Elle autorise la réalisation d'une enquête épidémiologique, dont nous donnons ci-après les premiers résultats, et permet la mise en oeuvre d'une prophylaxie rationnelle.

B - REACTION D'HEMAGGLUTINATION CONDITIONNEE

La réaction d'hémagglutination conditionnée s'est révélée beaucoup plus sensible pour la détection de faibles concentrations d'anticorps que le test de précipitation en gélose. Les globules rouges de moutons tannés puis sensibilisés par le virus de l'Anémie Infectieuse, sont agglutinés après mise en contact avec des sérums contenant des anticorps dirigés contre le virus de l'Anémie Infectieuse. Certains des résultats obtenus figurent sur le tableau suivant (tableau 19).

Sérums de chevaux infectés (A.I.E.)	Dilution du sérum							Type de globules rouges utilisés
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	
Sy	+++	+++	++	+	±	-	-	globules rouges de mouton
Solit.	+++	++	++	+	±	-	-	" " "
Soisy	+++	++	+	±	-	-	-	" " "
Leucocyt.	+++	++	+	+	-	-	-	" " "
Vitast.	+++	++	+	±	-	-	-	" " "
Solit.	++++	++++	++++	++++	+++	+++	±	globules rouges de cheval
Sy	++++	+++	+++	+++	++	++	+	" " "

TABLEAU 19

Les globules rouges de cheval se sont révélés plus sensibles que les globules rouges de mouton pour la détection des anticorps anti virus de l'Anémie Infectieuse, ainsi pour les sérums des chevaux Solit. et Sy, les globules rouges de mouton fournissent une réponse positive jusqu'à la dilution des sérums au 1/400 tandis que les globules rouges de cheval fournissent cette réponse jusqu'à la dilution des sérums au 1/16000 ème (tableau 19)

Sérums des chevaux sains	Dilution des sérums						
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Ondis	-	-	-	-	-	-	-
Bambi	-	-	-	-	-	-	-
Magell.	-	-	-	-	-	-	-
Champ.	+	-	-	-	-	-	-
Adelon ^{xx}	++	+	-	-	-	-	-
Neuf	+	+	-	-	-	-	-
Bam.	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU 20 - Hémagglutination conditionnée des globules rouges de mouton avec des sérums de chevaux normaux.

xx - Le sérum de ce cheval a présenté une réaction non spécifique au test de précipitation en gélose.

La plupart des sérums de chevaux normaux fournissent des résultats négatifs et n'agglutinent pas les globules rouges sensibilisés par le virus de l'Anémie Infectieuse, mais cependant, nous avons rencontré parfois, quelques hémagglutinations non spécifiques à des titres relativement faibles (tableau 20).



Résultats :

C H A P I T R E VI

RECHERCHE DE L'ALLERGIE VIS-A-VIS DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSEA) POUVOIR ALLERGENE1ère Expérience

24 h. après l'injection d'antigène Anémie Infectieuse non chauffé à la dose de 0,1 ml par voie intradermique, la diamètre de la réaction était de 3,9 cm tandis que l'injection d'une même quantité de suspension préparée à partir d'une rate de cheval normal n'entraînait aucune réaction. L'injection d'antigène Anémie Infectieuse chauffé à 60° pendant 1 h. et dilué 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} , fournit une réaction aux trois premières dilutions mais non à la quatrième, comme le montre le tableau suivant. Par ailleurs l'injection d'extraits de rate normale traités dans ces mêmes conditions n'entraîne aucune réaction (photo 7 et tableau 21).

Temps	Non chauffé	Antigène chauffé à 60°C pendant 1 heure			
	Pur	1/10	1/100	1/1000	1/10 000
24 h.	3,9	2	1,8	1,8	-
48 h.	3,4	1,9	1,4	-	-
72 h.	3,4	1,3	1	-	-
96 h.	2	-	-	-	-
120 h.	petite nodule	-	-	-	-
Epaisseur de la,peau avant injec.	0,9	0,7	0,6	0,6	0,6

TABLEAU 21 - Diamètre de la réaction allergique en cm à la suite d'injection d'antigène d'anémie infectieuse.



Photo N° 7 - Cheval SY infecté chronique, ayant reçu 0,1 ml d'antigène Anémie Infectieuse par voie intradermique
24 h. après injection, on constate une réaction très importante.



2ème Expérience

L'antigène Anémie Infectieuse chauffé à 60° pendant 1 heure et dilué au 1/5ème et au 1/10ème, fournit une réponse positive chez la jument Solit., comme le montre le tableau suivant (tableau 22)

Temps	Dilution au 1/10		Dilution au 1/5	
	Antigène A.I.	Suspension rate normale	Antigène A.I.	Suspension de rate normale
24 h.	1,9	0,6	2,3	0,6
48 h.	0,9	-	1,4	-
72 h.	0,5	-	0,8	-
96 h.	0,3	-	0,4	-
Epaisseur de peau avant inoculation	0,3		0,4	

TABLEAU 22 - Diamètre de la réaction allergique en cm de la jument Solit.

3ème Expérience

L'injection au cheval Sy et à la jument Solit., d'extraits de 10 rates provenant d'animaux normaux, extraits chauffés à 60°C pendant 2 heures et dilués au 1/15, administrés par voie intradermique à raison de 0,1 ml n'entraîne aucune réaction allergique comme le montre le tableau suivant (tableau 23).

N° des extraits de rates normales	Epaisseur de la peau en cm	
	Avant inoculation	Après inoculation
2	0,3	0,3
3	0,4	0,4
5	0,3	0,3
6	0,4	0,4
7	0,4	0,4
8	0,3	0,3
9	0,4	0,4
10	0,3	0,4
11	0,3	0,4
12	0,4	0,5

TABLEAU 23

4ème Expérience

Deux poneys sains reçoivent par voie intradermique 0,1 ml d'antigène Anémie Infectieuse non chauffé et non dilué. Cette injection n'entraîne aucune réaction. Il en est de même pour une suspension préparée à partir d'une rate normale. 3 autres poneys sains ayant reçu 0,2 ml d'antigène Anémie Infectieuse traitée par l'éther, n'ont également montré aucune réaction.

En conclusion de ces quatre expériences, on peut conclure qu'il existe une hypersensibilité chez les chevaux infectés d'Anémie Infectieuse et en phase chronique, hypersensibilité révélée par l'injection intradermique d'antigène Anémie Infectieuse. Ces mêmes chevaux ne présentent aucune réaction lors d'injection d'extrait de rate normale. Par ailleurs les animaux sains ne réagissent pas à l'injection d'antigène Anémie Infectieuse. Les réactions obtenues

chez les animaux infectés par le virus d'Anémie Infectieuse apparaissent en 18 à 24 h. Il ne s'agit donc pas d'une hypersensibilité du type immédiat. Les expériences réalisées en vue de déterminer l'existence éventuelle d'une hypersensibilité du type Arthus par transmission au lapin se sont soldées par un échec.

B) PREPARATION D'ANTIGENE NON VIRULENT EN VUE D'UN DIAGNOSTIC ALLERGIQUE

L'influence des divers procédés retenus pour inactiver le virus, sur le pouvoir révélateur de l'antigène peut être résumé de la façon suivante :

1°- Action de l'éther et de la chaleur sur le pouvoir révélateur de l'allergie.

L'antigène dilué au 1/10, chauffé pendant une heure à 60°C, et traité par l'éther pendant 15 mn fournit une réaction allergique mais moins importante que celle entraînée par l'antigène non traité. Par ailleurs, l'antigène chauffé pendant 2 heures entraîne une réaction plus faible que celle provoquée par l'antigène chauffé pendant une heure comme le montrent les résultats portés dans le tableau suivant (tableau 24)

Antigène	Peau avant inoculation	Diamètre de réaction allergique en cm		
		24 h.	48 h.	72 h.
<u>Solitaire :</u>				
++ 1) Antigène A.I. chauffé 1 h. à 60° et traité à l'éther	0,3	0,7-1,3	0,6-0,8	0,6-0,6
2) Suspension de rate normale chauffée 1 h à 60° et traitée à l'éther	0,4	0,7-1	-	-
3) Antigène A.I. chauffé 1 h à 60°	0,4	1,9-2,5	1,2-1,7	-
4) Suspension de rate normale chauffée 1 h à 60°	0,4	-	-	-
5) Antigène A.I. chauffé 2 h à 60°	0,4	1,8-2	0,6-0,9	-
6) Suspension de rate normale chauffée à 60° pendant 2 h.	0,3	0,5-0,3	-	-
<u>Sy :</u>				
++ 1) Antigène A.I. chauffé 1 h et traité à l'éther	0,5	1,5-2,4	1,2-1,2	0,9-0,9
2) Suspension de rate normale chauffée 1 h à 60° et traitée à l'éther	0,5	0,7-0,7	-	-
3) Antigène A.I. chauffé 1 h à 60°	0,6	3,3-3,3	1,2-1,2	0,8-0,8
4) Suspension de rate normale chauffée 1 h. à 60°	0,6	-	-	-
5) Antigène A.I. chauffé 2 h à 60°	0,5	1,4-1,4	0,9-0,9	-
6) Suspension de rate normale chauffée 2 h à 60°	0,5	-	-	-

TABLEAU 24 - Etude de l'action du chauffage et de l'éther sur le pouvoir révélateur de l'allergie de l'antigène

++ - Sur ce tableau, on constate que l'antigène A.I.E. chauffé et traité à l'éther fournissent une réponse positive chez la jument " Solit." et le cheval "Sy".



2°) Action de la formaldéhyde et de la glycéraldéhyde sur le pouvoir révélateur de l'allergie de l'antigène.

Le traitement de l'antigène par la formaldéhyde et la glycéraldéhyde a détruit une grande partie du pouvoir révélateur de l'allergie que possédait cet antigène, comme le montrent les résultats portés dans le tableau suivant :
(tableau 25).

Antigène	Epaisseur peau avant inoculat.	Diamètre de la réaction allergique		
		24 h.	48 h.	72 h.
1) <u>Sy</u>				
Antig. A.I. traité	0,4	1,5	0,8	-
Rate normale traitée	0,4	0,9	0,4	-
2) <u>Solitaire</u>				
Antigène A.I traité	0,2	0,5	-	-
Rate normale traitée	0,2	0,5	-	-

TABLEAU 25

CONCLUSION :

A partir des résultats obtenus, il semble que le chauffage de l'antigène pendant 1 heure à 60°C suivi d'un traitement par l'éther, donne des résultats satisfaisants permettant d'inactiver le virus tout en conservant le pouvoir révélateur allergique de l'antigène. (tableau 24 N°1 et 2 en Solitaire et Sy)
Noter que le virus de l'A.I.E. est sensible à l'éther (80), voir page 169.

Résultats :

C H A P I T R E VII

CINETIQUE DE LA REPONSE SEROLOGIQUE A L'INFECTION

Nous avons étudié la cinétique de la réponse sérologique par la technique de précipitation en gélose. Il a été possible de déterminer la date d'apparition des anticorps précipitants après l'infection et par ailleurs la persistance et l'évolution de ces anticorps au cours de l'infection chronique.

A) DETERMINATION DE LA DATE D'APPARITION DES ANTICORPS PRECIPITANT APRES L'INFECTION

Un poney a reçu 0,1 ml de virus de l'Anémie Infectieuse, souche Wyoming par voie intradermique. Il a présenté une première crise d'Anémie Infectieuse, 13 jours après inoculation avec hyperthermie à $41^{\circ}2$, la seconde crise est apparue 5 jours après la première et la fièvre a atteint $41^{\circ}4$, enfin une troisième crise a entraîné la mort de l'animal. (cf. courbe de température) (figure 7). Les résultats de l'étude des prélèvements de sérums effectués sur ce poney au cours du temps, sont les suivants : aucune ligne de précipité ni aucune inhibition de la ligne témoin du sérum positif de référence voisin n'a été enregistrée pour tous les échantillons prélevés avant la première crise de l'animal 13 jours après l'infection.

La première ligne de précipité est apparue au 21ème jour après l'infection c'est-à-dire 8 jours après le premier pic hyperthermique. Le sérum prélevé au 18ème jour après l'infection, c'est-à-dire 6 jours après la première crise entraîne une inhibition légère du sérum témoin de référence placé à côté, cette modification de la ligne de précipité du témoin positif de référence est l'indice de la présence d'une faible quantité d'anticorps dans le sérum du poney au 19ème jour (figure 7) et (tableau 26).

L'ensemble des résultats est porté dans le tableau ci-dessous (tableau 26)

Jours après l'infection	Jour par rapport à l'hyperthermie initiale	Aspect de la ligne de précipité	Appréciat. en croix de la réact. deprecipit.
1er jour	- 12	absent	-
13ème jour	0	absent	-
15ème jour	+ 2	absent	-
17ème jour	+ 4	absent	-
19ème jour	+ 6	pas de ligne de précipité mais déviation de la ligne du témoin positif	+
21ème jour	+ 8	positif	++
23ème jour	+ 10	positif	+++

TABLEAU 26

B) EVOLUTION DES ANTICORPS PRECIPITANTS

L'évolution des anticorps précipitants chez les chevaux infectés par le virus de l'Anémie Infectieuse a été étudiée grâce à des prélèvements effectués sur des chevaux à différentes phases et sur un même cheval sur des prélèvements réguliers au cours de la maladie.

1) Sérums de chevaux infectés en phase suraiguë

Les sérums des chevaux et des poneys destinés à la préparation de l'antigène et qui avaient reçu une forte dose de virus Wyoming ont été prélevés le 9ème jour après l'infection, au cours de la phase suraiguë le jour du sacrifice. De même le sérum de 2 chevaux a été prélevé au cours du premier accès de fièvre. Tous ces sérums ont fourni une réponse négative avec l'antigène dans le test de précipitation en gélose.

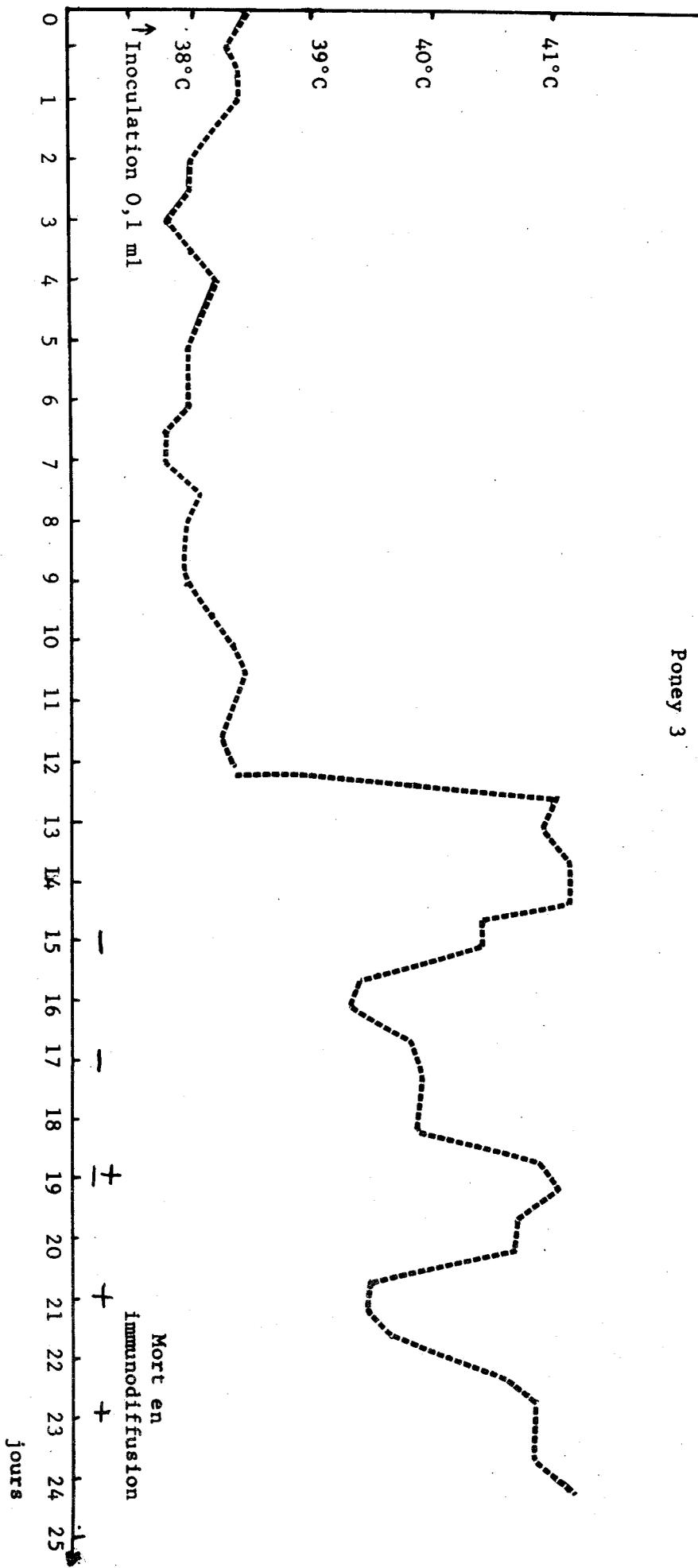


Figure 7 : Courbe de température du Poney 3 et résultats de l'étude de son sérum par l'immunodiffusion.
(+) : Présence d'anticorps précipitant
(-) : Absence d'anticorps précipitant

Anticorps précipitant
 Anticorps neutralisant
 Anticorps fixant le compl.

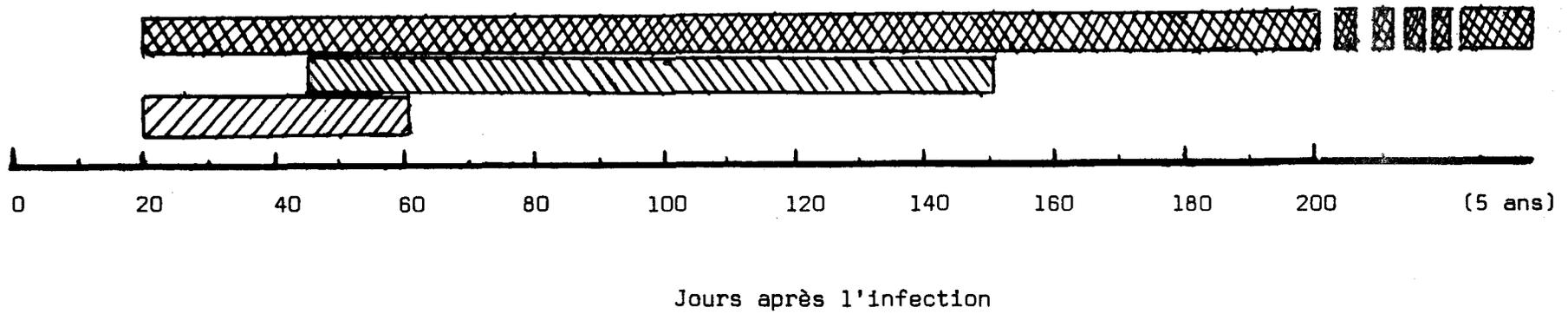
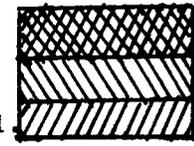


Figure 1B: Cinétique d'apparition des anticorps dans les sérums de chevaux atteints d'Anémie Infectieuse.



2) Sérums des chevaux infectés en phase subaiguë

Tous les sérums étudiés fournissent une ligne de précipité avec l'antigène. Les caractères des lignes de précipité dépendent de la quantité d'anticorps existant dans le sérum.

3) Sérums de chevaux infectés de façon inapparente ou atteints de la forme chronique.

Les échantillons de sérums prélevés sur un cheval ayant présenté 3 crises d'Anémie Infectieuse en 1966, puis passé à l'état d'infection inapparente se sont révélés positifs respectivement 3 mois et demi, 3 ans et 8 mois, 4 ans et 3 mois après la dernière crise. Pendant toute cette période de latence, les sydéroleucocytes ont constamment fait défaut chez le cheval bien que l'infection persiste puisqu'il a été possible de retransmettre la maladie à un cheval sain par inoculation d'un litre de sérum 2 ans après la dernière crise. Par ailleurs, le sérum d'une jument " Solitaire " infectée de façon inapparente dans des conditions expérimentales est resté positif depuis juin 1967, soit près de 4 ans. Tous les sérums de chevaux ayant fourni une première réponse positive se sont montrés ultérieurement capables de donner une réponse positive au test de précipitation. Par suite, il nous semble que les anticorps précipitants persistent dans les sérums des chevaux infectés pendant toute la durée de l'infection de l'animal, c'est-à-dire vraisemblablement pendant toute leur vie (figure 7 B).

Résultats :

C H A P I T R E VIII

APPLICATION DU DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE A UNE ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUEEN FRANCE

Après avoir mis au point un test de précipitation en gélose à base d'antigène splénique liquide, nous avons entrepris un sondage épidémiologique sur les chevaux français. Dans les lignes qui suivent, nous exposerons les résultats obtenus au cours de cette enquête.

A) ANIMAUX SOUMIS AU SONDEGE EPIDEMIOLOGIQUE

Nous nous sommes adressés à des chevaux provenant de diverses régions de France, de race et d'utilisation différentes, apparemment sains ou malades et entretenus dans des effectifs d'importance très variée.

On peut distinguer trois catégories pour les sérums étudiés :

- ceux provenant d'effectifs en général importants et soumis en totalité ou en partie au test de précipitation.

- ceux envoyés à des fins de diagnostic au cours de ces dernières années et qui ont été soumis au test de précipitation après une conservation à - 30°C d'une durée variant entre 5 ans et quelques mois.

- enfin ceux reçus récemment pour diagnostic ou à la suite d'une lettre circulaire envoyée aux vétérinaires spécialistes du cheval exerçant dans les départements où le cheptel équin est fortement représenté.

I° - Résultats portant sur des effectifs de chevaux.

Six effectifs ont été étudiés et 1024 sérums soumis au test de précipitation. Les résultats globaux sont rassemblés dans le tableau N° 27.

A la lecture de ce tableau, on constate que le pourcentage d'infection par le virus de l'anémie infectieuse varie dans de très grandes proportions selon les effectifs : de 0 à 58 p. cent.

Les effectifs N° 1 et 2 sont indemnes. L'effectif N° 3 semble avoir été infecté de façon accidentelle. Le seul cheval réagissant a été abattu.

Les effectifs 4, 5 et 6 sont infectés de façon plus marquée. (Les mesures adéquates ont été prises par les services vétérinaires en accord avec les propriétaires pour arrêter la propagation de l'infection et supprimer la source de virus)

Une partie des chevaux des effectifs 5 et 6 ont été soumis à deux prélèvements à trois mois d'intervalle (juin et septembre 1971).

Les résultats sont portés dans les tableau N° 28, 28 "b", 29 et 30.

Dans l'effectif N° 5, tous les chevaux a sérologie positive en juin et soumis à un prélèvement en septembre ont fourni une réponse positive. Sur les 31 chevaux à sérologie négative ou douteuse en juin, 6 ont répondu positivement en Septembre.

	Examens effectués		Résultats positifs		Pourcentage de chevaux infectés parmi les chevaux étudiés
	Sérums	chevaux	Sérums	chevaux	
Effectif N° 1	25	25	0	0	0
Effectif N° 2	227	227	0	0	0
Effectif N° 3	267	267	1	1	0,4 %
Effectif N° 4	194	176	32	24 (+8)	14,4 %
Effectif N° 5	103	53	35	25	46,6 %
Effectif N° 6	208	143	105	84	58,5 %

TABLEAU N° 27

(Voir page suivante)

TABLEAU N° 27

Résultats du dépistage de l'anémie infectieuse des équidés par examen des sérums à l'aide du test de précipitation en gélose dans des effectifs équin. Le chiffre placé entre parenthèse n'a pas été retenu pour calculer le pourcentage d'infection de l'effectif N° 4 car il correspond à 8 chevaux infectés sur 10 en instance d'achat, qui étaient isolés et n'ont pas été introduits dans l'effectif à la suite de la réponse sérologique.

Nombre de Chevaux fournissant un résultat	Juin 1971	Septembre 1971
Positif	19	16
Négatif	30	25
Douteux	4	0
Total	53	41

Tableau N° 28 - Résultats du test de précipitation effectué en Juin et en Septembre 1971 sur des sérums de l'effectif N° 5. Douze sérums étudiés en juin ne l'ont pas été en septembre.

Résultats sérologiques en Juin 1971	Résultats sérologiques en Septembre 1971	Nombre de chevaux
-	-	25
+	+	10
-	+	3
Douteux	+	3

Tableau N° 28 "b" - Comparaison des résultats obtenus sur 41 chevaux de l'effectif N° 5 soumis au test de précipitation en juin et en septembre 1971.

Nombre de chevaux fournissant un résultat		Juin 1971	Septembre 1971
+	premier groupe	7	16
	deuxième groupe	24	59
-	premier groupe	19	10
	deuxième groupe	43	26
douteux deuxième groupe		1	3
Total		94	114

Tableau N° 29 - Résultats du test de précipitation effectué en juin et en septembre 1971 sur des sérums de l'effectif N° 6 partagé en deux groupes éloignés de plusieurs kms. Seuls 14 sérums dans le premier groupe et 51 sérums dans le second ont été étudiés deux fois.



Résultat sérologique en juin 1971	Résultat sérologique en Septembre 1971	Nombre de chevaux	
		Groupe N° 1	Groupe N° 2
-	-	4	16
+	+	3	19
-	+	7	12
douteux	+	0	1
-	douteux	0	3

Tableau N° 30 - Comparaison des résultats obtenus sur les 14 chevaux d'un groupe et les 51 du deuxième groupe composant l'effectif N° 6, avec le test de précipitation en juin et en septembre 1971.

Comme pour l'effectif N° 5, tous les chevaux à sérologie positive de l'effectif N° 6 qui ont fourni du sang une seconde fois ont été trouvés positifs.

Dans le groupe 1, sur 11 chevaux à sérologie négative en juin, 7 ont donné une réponse positive en septembre.

Dans le groupe 2, sur 32 sérums à sérologie négative ou douteuse, 16, soit la moitié, sont devenus positifs ou douteux.

Ainsi en 3 mois, 20 chevaux sur 40 de l'effectif N° 6 ont vu leur sérologie devenir positive. Il est vraisemblable que ce haut taux de conversion sérologique au cours d'une période de 3 mois est lié à la saison estivale favorable à la pullulation des arthropodes dont on sait qu'ils représentent le " mode habituel" de transmission du virus de l'anémie infectieuse. La détermination du taux de conversion sérologique au cours d'une même période, mais en hiver, devrait confirmer cette hypothèse.

2°- Résultats des examens des sérums conservés au congélateur

773 sérums conservés à - 30°C ont été soumis au test de précipitation en gélose. Ils provenaient de chevaux atteints ou suspects de différentes maladies et tout spécialement de grippe et de rhinopneumonie.

Seuls 5 d'entre eux ont fourni une réponse positive.

Une enquête rétrospective nous a permis d'apprendre que ces sérums prélevés en Janvier et Février 1966 provenaient de 5 chevaux morts ou abattus au cours de l'enzootie d'anémie infectieuse de 1966 qui a été à l'origine de nos recherches sur cette maladie (36).

5 ans a posteriori est donc confirmé, grâce à un test dont nous ne disposions pas en 1966, le diagnostic d'anémie infectieuse qui n'était que soupçonné pour ces 5 chevaux comme le font ressortir les commémoratifs reçus à l'époque pour 3 d'entre eux provenant de 3 écuries différentes :

Cheval N° 1 : sérum prélevé le 26 janvier 1966 : " hyperthermie en trois épisodes depuis novembre 1965, amaigrissement, discrets signes hépatiques, anémie (4 millions de globules rouges par mm³)". Cheval sacrifié le 27 janvier 1966.

Cheval N° 2 : sérum prélevé le 8 février 1966 : " Episodes fébriles graves et durables à deux mois d'intervalle, anémie discrète."

Cheval N° 3 : sérum prélevé le 12 Février 1966 : " Plusieurs épisodes fébriles durables depuis l'automne, anémie discrète (7.000.000 de globules rouges au mm³)".

3°- Résultats portant sur les sérums reçus récemment

Nous avons reçu 516 sérums envoyés par une trentaine de confrères et provenant de chevaux sains ou atteints de différentes maladies précises ou mal définies : gourme, lymphangite, synovite, grippe, emphysème, fatigue...

Un seul sérum a fourni une réponse positive.

B) RELATION ENTRE LES RESULTATS DU TEST DE PRECIPITATION ET L'EXPRESSION CLINIQUE

Dans les conditions expérimentales, la réaction de précipitation en gélose devient positive en moyenne, 20 à 30 jours après l'inoculation. On décèle tout d'abord une faible quantité d'anticorps précipitants, insuffisante pour faire apparaître une ligne de précipité mais capable de provoquer une inflexion de la ligne de précipité du sérum de référence voisin. Puis la quantité d'anticorps augmente et on voit apparaître alors une ligne de précipité.

Pour tous les chevaux suspects et malades depuis peu de temps, nous avons demandé un nouveau prélèvement de sérum espacé de 10 à 15 jours du précédent. En présence d'un cheval qui présente des symptômes depuis 15 jours et dont le sérum fournit une réponse négative au test de précipitation, on peut écarter avec une quasi certitude l'hypothèse d'anémie infectieuse en tant que cause de la maladie observée.

Les sérums des chevaux atteints de maladies les plus diverses ne répondent pas au test de précipitation en gélose avec l'antigène anémie infectieuse. En revanche, des chevaux apparemment en parfaite santé peuvent fournir un résultat positif. La quasi totalité des sérums qui se sont révélés positifs entre nos mains provenaient d'animaux ou d'effectifs pour lesquels à aucun moment, l'hypothèse d'anémie infectieuse n'avait été évoquée (mis à part les 5 sérums signalés plus haut).

Tout au plus peut-on trouver dans certains effectifs une très légère différence dans l'état de santé des animaux porteurs ou indemnes d'anticorps. Ainsi dans l'effectif N° 6, lors de la première série de prélèvements en Juin 1971, le pourcentage des chevaux " fatigués " parmi les chevaux fournissant une réponse positive était supérieur (20 p. cent) à celui similaire parmi les chevaux dépourvus d'anticorps (10,5 p. cent) (cf. tableau N° 31).

Sérodiagnostic	Nombre d'animaux étudiés	Nombre d'animaux en bonne santé	Nombre d'animaux " fatigués "	Pourcentage animaux fatigués animaux sains
Réponse négative	63	57	6	10,5 %
Réponse positive	30	25	5	20 %

Tableau N° 31 - Etude de la relation existant entre la réponse au test de précipitation en gélose et l'expression clinique lors du prélèvement du juin 1971 sur l'effectif N° 6.

Ainsi en France, à l'heure actuelle, il semble que l'anémie infectieuse maladie, soit absente et que seule évolue l'anémie infectieuse, infection inapparente décelable uniquement par examen sérologique.

C) RAPPORT ENTRE L'HYPERIMMUNISATION ET LA POSITIVITE DES REACTIONS

Pour conduire notre étude nous nous sommes adressés à des effectifs de chevaux placés dans des conditions sensiblement identiques : ~~.....~~
~~.....~~ à des hyperimmunisations contre divers antigènes. Le tableau 32 résume les constatations faites dans trois de ces effectifs (N° 3, N° 5, N° 6).

On note chez les chevaux producteurs de sérum anti type A un taux de 15,8 p. cent et chez les chevaux hyperimmunisés avec l'antigène G 51,7 p. cent de réactions positives. Ces constatations pourraient conduire à présumer de l'influence de l'hyperimmunisation et du type de l'antigène employé sur les résultats obtenus. En effet, si l'on compare les effectifs entre eux, il est intéressant de noter que pour l'effectif N° 3 le taux des animaux hyperimmunisés avec l'antigène A et à réaction positive est de 0 p. cent alors qu'il atteint 28,9 p. cent pour l'effectif N° 6. De même l'hyperimmunisation avec l'antigène G se traduit pour l'effectif N° 3 par un taux de réagissants de 0 p. cent alors qu'il s'élève à 68,1 p. cent dans l'effectif N° 5.

D) ISOLEMENT DU VIRUS A PARTIR DE CHEVAUX INFECTES DE FACON INAPPARENTE

Les résultats positifs de toute technique sérologique doivent être confirmés, au moins au moment de la mise au point du test, par l'isolement de l'agent infectieux, surtout en l'absence de toute maladie décelable.

Les preuves de la spécificité antigénique du test de précipitation en gélose ont été apportées au laboratoire, notamment par l'étude de différents couples antigène-anticorps qui ont montré l'absence de communauté antigénique entre le virus de l'anémie infectieuse et d'autres agents pathogènes pour le cheval comme le virus de l'artérite à virus, Streptococcus equi, ainsi que par les techniques d'absorption.

La démonstration a été complétée par l'isolement du virus à partir de sérum de chevaux apparemment sains, mais porteurs d'anticorps et par la reproduction expérimentale de la maladie.

Un poney a reçu par voie veineuse, en deux jours, 2 litres d'un mélange de 500 ml. de sérum de quatre chevaux apparemment sains et ayant fourni une réponse positive au test de précipitation. Les résultats de cette inoculation sont rassemblés sur la figure N° 8 page 145 . Sur ce dernier, on peut constater que le poney a présenté trois crises d'hyperthermie dont la dernière lui a été fatale. L'évolution du nombre d'hématies, l'apparition des sidéroleucocytes et la conversion sérélogique associées au tableau clinique permettent de conclure à l'isolement de virus de l'anémie infectieuse à partir de chevaux apparemment sains.

La maladie a été transmise en série à un autre poney par inoculation de sang prélevé la veille de la troisième crise.

Sérum hyperimmun étudiés	Nb. total de sérums	Nb. de sérums par effectif			Nb. de sérums positifs par effectif		
		N° 3	N° 5	N° 6	N° 3	N° 5	N° 6
Sérum anti type A ⁺	258	116	-	142	-	-	41
" " " B	13	5	8	-	-	-	-
" " " C	10	10	-	-	-	-	-
" " " D	42	27	-	15	-	-	2
" " " E	25	25	-	-	1	-	-
" " " F	4	4	-	-	-	-	-
" " " G	29	7	22	-	-	15	-
" " " H	4	4	-	-	-	-	-
" " " I	11	11	-	-	-	-	-
" " " J	5	5	-	-	-	-	-
" " " K	14	14	-	-	-	-	-
" " " L	1	1	-	-	-	-	-
" " " M	8	-	8	-	-	3	-
" " " N	10	-	10	-	-	-	-
" " " O	0	-	9	-	-	-	-
" " " P	25	-	-	25	-	-	-
" " " Q	9	-	-	9	-	-	-
" " " R	1	-	-	1	-	-	1
" " " S	12	-	-	12	-	-	3
" " " T	1	-	-	1	-	-	-
Total sérum hyperim- mum 20 types	491	229	57	205	1	18	47
					Total: 66 sérums positifs 13,4%		

TABLEAU N° 32

⁺ Ces lettres A, B, ... etc représentent les noms des sérums



E) ETUDE DES DIFFERENTS FACTEURS EPIDEMIOLOGIQUES

De l'ensemble des facteurs épidémiologiques de l'anémie infectieuse dont le test de précipitation en gélose permet de découvrir des aspects nouveaux, on peut évoquer quatre d'entre eux : l'âge, le sexe, la durée du séjour et la place dans l'écurie, c'est-à-dire l'évolution en fonction du temps et de l'espace.

a) Age

Le diagramme représentant la distribution de l'âge des animaux infectés parmi les animaux contrôlés dans l'effectif N° 6 est porté sur la figure- N° 9 page 146 . On peut y constater une distribution assez régulière de l'infection quel que soit l'âge des animaux. La plupart des chevaux de onze ans et davantage sont infectés. Cependant paradoxalement on peut constater que le cheval le plus vieux, âgé de 24 ans, fournit une réponse négative alors que le cheval le plus jeune, âgé d'un an répond de façon positive.

b) Sexe

Dans ce même effectif N° 6, les pourcentages d'infection des mâles et des femelles sont respectivement de 56 et de 61,3 ce qui permet d'affirmer l'absence d'influence du sexe sur la sensibilité à l'infection inapparente dans cet effectif.

c) Durée du séjour et place en milieu infecté

Pour certains effectifs équin, nous avons pu obtenir la date d'introduction de chaque cheval et l'emplacement dans les écuries.

L'étude de la répartition des chevaux à sérologie positive dans la liste chronologique et dans les écuries permet de conclure très rapidement à l'importance primordiale de la disposition dans l'espace et secondairement au rôle du temps de séjour dans l'effectif infecté.

Ainsi l'effectif N° 4 (cf. tableau N° 27) est divisé en trois groupes entretenus dans des bâtiments situés à une vingtaine de km de distance les uns des autres. Toutes les réactions positives ont été enregistrées sur l'un seulement de ces trois groupes tandis que les deux autres étaient indemnes.

Dans l'effectif N° 5 les chevaux sont séparés en deux écuries très proches l'une de l'autre. L'ordre chronologique d'arrivée des chevaux dans chacune de ces deux écuries et leur état vis à vis du virus de l'anémie infectieuse sont rapportés dans le tableau N° 33.

La lecture de ce tableau permet de constater aisément la très forte différence dans le degré d'infection des deux écuries pourtant contiguës.

Tous les chevaux de la première écurie sont infectés à l'exception des deux derniers introduits en juin 1971, après le premier prélèvement, et qui, Octobre, étaient encore dépourvus d'anticorps.

Cependant, pour 4 des chevaux de cette première écurie, l'infection semble être récente puisque la réponse incertaine (3 chevaux) ou négative (un cheval) en juin 1971 était devenue positive trois mois plus tard, en septembre 1971.

La seconde écurie était complètement indemne en juin 1971. L'infection a atteint au cours de l'été deux chevaux dont le sérodiagnostic est devenu positif l'un en septembre, l'autre en octobre. Ces deux chevaux faisaient partie de l'effectif depuis des temps très différents, un an pour l'un, près de 5 ans pour l'autre (tableau N° 33). En revanche, ils étaient tous deux placés près de la porte de l'écurie.

Ainsi le risque d'infection d'un cheval dans une écurie fortement infectée est très élevé. Dans une écurie en début d'infection, le risque semble davantage lié à la place dans l'écurie qu'à l'ancienneté dans l'effectif.

Date d'arrivée des chevaux	Ecurie N° 1	Ecurie N° 2
1964	Positif	
1965		Négatif
1966		Négatif en juin 1971 Positif en septembre
1969	Positif Positif Positif Douteux en juin 1971, Positif en septembre 71 Positif Positif Positif Positif Positif Douteux en Juin 1971, positif en septembre 71 Positif Douteux en juin 71, positif en septembre 71	Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif
1970	Positif Positif Négatif en juin 71, positif en septembre 71 Positif Positif Positif Positif	Négatif Négatif Négatif en juin et sept. 71 positif en octobre 71 Négatif Négatif Négatif Négatif Négatif
1971	Absent en juin 71, négatif en septembre et octobre 71 Absent en juin 71, négatif en Septembre et octobre 71	Négatif Négatif Négatif

Tableau N° 33.- Chronologie d'arrivée des chevaux dans les deux écuries de l'effectif N°5 et résultats du test de précipitation en gélose. Chaque point correspond à un cheval. La place dans l'écurie ne correspond pas à l'ordre d'arrivée



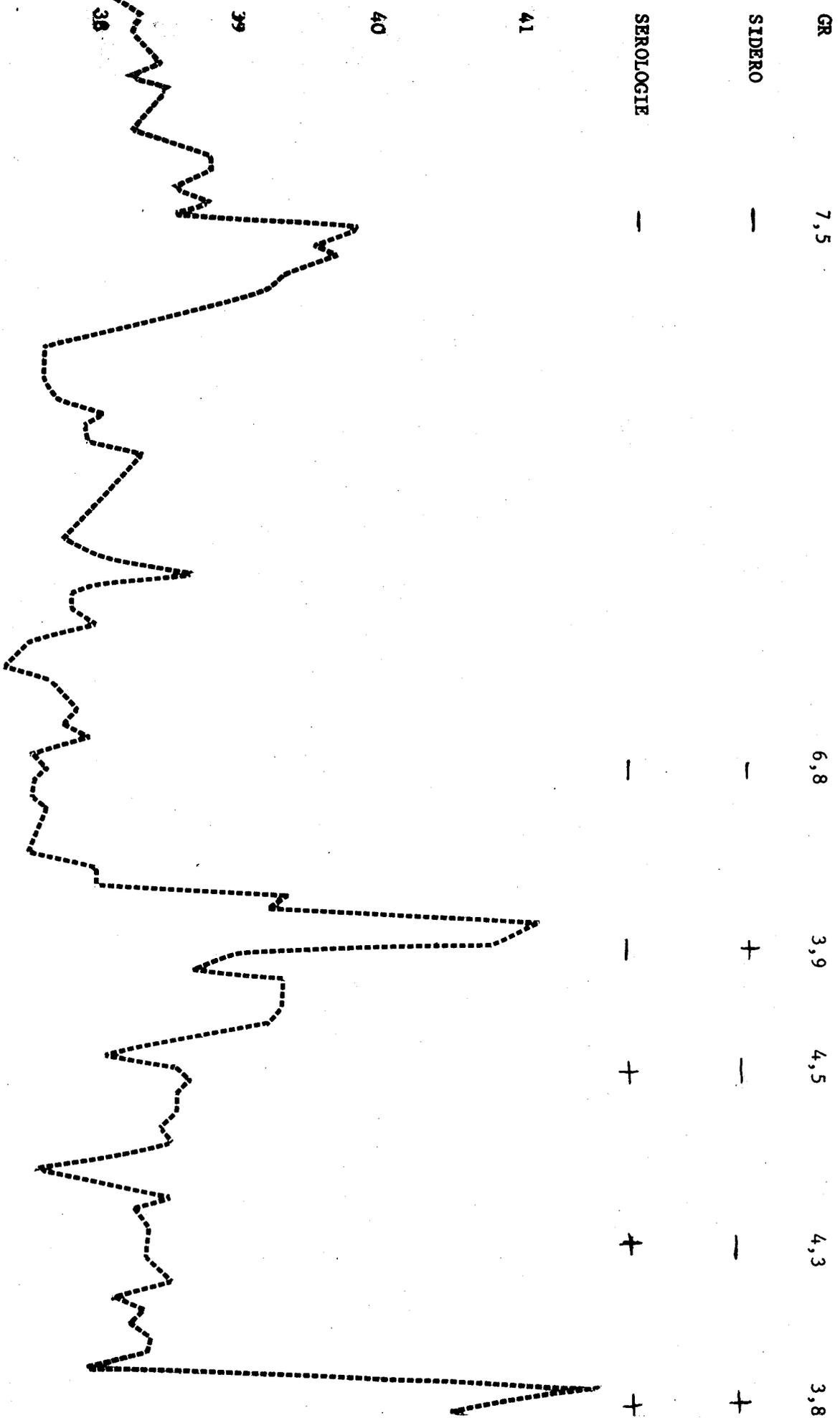
En conclusion, l'emploi du test de précipitation en gélose dans le diagnostic ou le dépistage de l'anémie infectieuse a mis en lumière l'importance jusqu'alors insoupçonnée de l'infection inapparente des chevaux par ce virus et autorise une plus grande efficacité des mesures de prophylaxie.

Ces résultats de l'enquête épidémiologique révèlent un faible taux général d'infection pour des sérums pris au hasard dans de nombreuses écuries et l'existence d'effectifs plus touchés.

Figure N° 8. - Evolution de la température, des anticorps anti AIE, des nombres de globules rouges et de sidéroleucocytes chez un poney inoculé avec du sérum provenant de chevaux sains fournissant une réponse positive au test de précipitation en gélose. Nombre de globules rouges en millions. L'inoculation a été faite au jour 0. Le poney est mort le 53ème jour après avoir présenté trois crises d'A.I.E.

Figure N° 9. - Etude de l'influence de l'âge des chevaux sur l'infection inapparente par le virus de l'A.I.E. dans l'effectif N° 6.

Figure n° 8



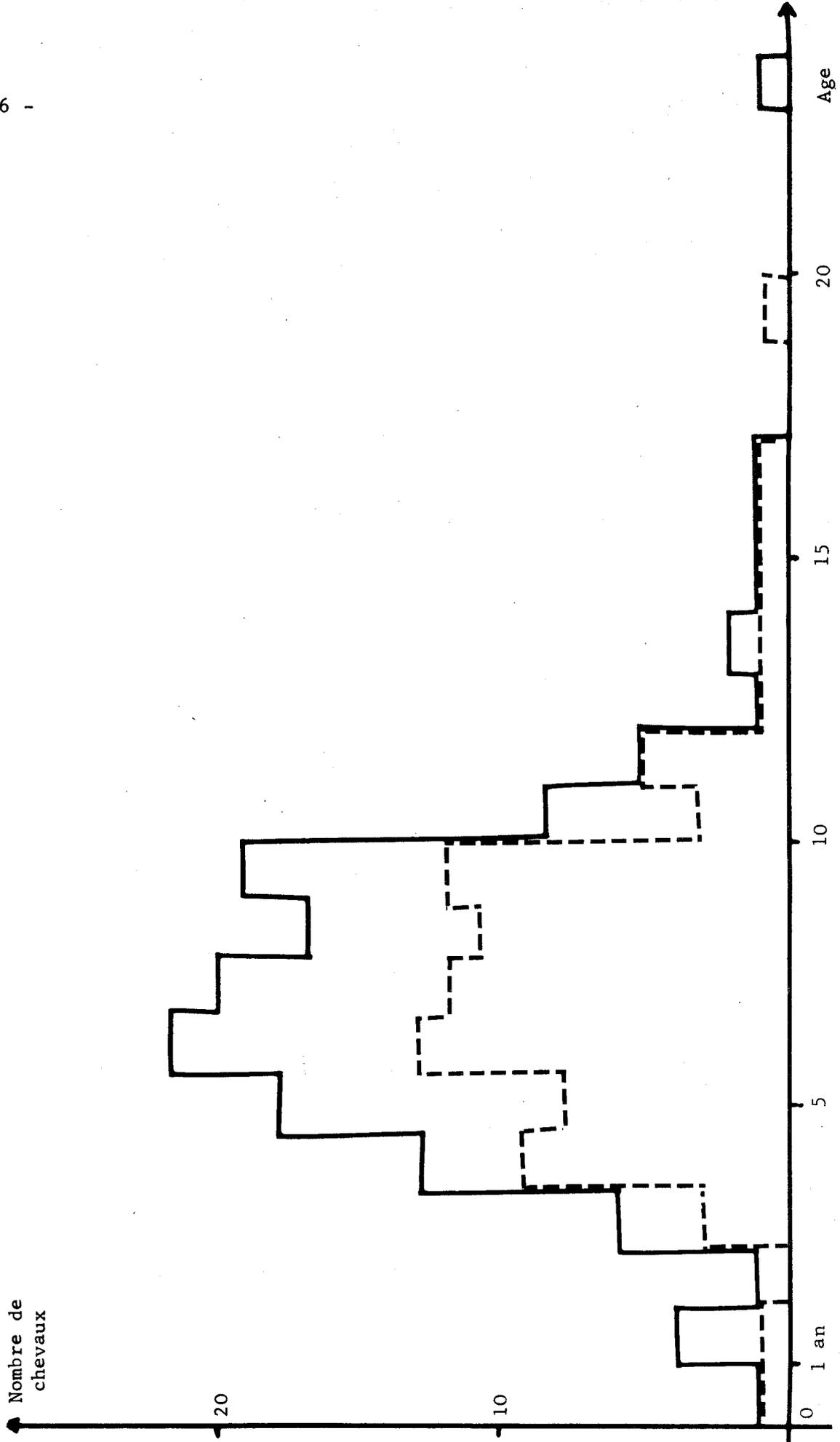


Figure n° 9

D I S C U S S I O N

C H A P I T R E I

REPLICATION VIRALE ET EPREUVE DE REPLICATIONA) CULTURE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE EN CULTURE DE LEUCOCYTES DE CHEVAL

De l'ensemble de ces résultats obtenus sur la répllication du virus de l'anémie infectieuse et par l'épreuve de reproduction de la maladie par inoculation au cheval, on peut conclure que la multiplication du virus dans les leucocytes de cheval in vitro est à l'heure actuelle un fait bien établi. ISHITANI et KONO (52 - 57) ont réalisé aussi plusieurs passages en série. Cependant, GOGGINS et Col. (22) ont signalé leur échec dans ce domaine.

B) EFFET CYTOPATHOGENE SUR LES LEUCOCYTES DE CHEVALI - Sur cellules vivantes

L'effet cytopathogène constaté sur les leucocytes vivants n'a rien de caractéristique. Il apparaît dans des délais variables selon différents facteurs, notamment la concentration initiale du virus et le nombre de passages en leucocytes subis par la souche virale.

Il nous paraît nécessaire d'insister sur l'obligation de comparer les cellules infectées et les cellules témoins. En effet, en l'absence de caractère spécifique de cet effet cytopathogène, il est possible d'attribuer à une action virale toute altération non spécifique des leucocytes mis en culture.

2 - Après coloration

La coloration par le Giemsa ou l'Hémalun éosine a permis de retrouver cet effet cytopathogène non spécifique.

La question se pose de savoir quelle valeur on peut attribuer aux inclusions éosinophiles nucléaires observées avec cette souche de virus de l'anémie infectieuse.

Il faut en la matière faire preuve de la plus grande prudence avant d'avancer une conclusion.

Différentes études nous incitent en effet à une telle prudence. Ce sont les expériences de BODON (13) qui ont montré que pratiquement toutes les souches de virus de la peste porcine classique réputées cytopathogènes étaient en fait contaminées par un adénovirus responsable à lui seul de l'effet cytopathogène observé sur les cellules. Plus récemment, HORZINEK et Col. (48) ont apporté la preuve de la présence de trois virus dans une culture de virus de la peste porcine classique.

Par ailleurs les observations de TOKUI (102) et celles de KOBAYASHI et KONO (58-59) mentionnant l'isolement d'agents cytopathogènes à partir de cultures de leucocytes de cheval sain ou de cellules de fœtus d'équidé incitent également à une grande prudence avant d'attribuer les inclusions nucléaires observées dans les leucocytes de cheval à une action du virus de l'anémie infectieuse.

A ce propos les inclusions nucléaires éosinophiles décrites par KOBAYASHI et KONO (58) et présentées par plusieurs photos dans leurs publications sont très proches de celles que nous avons observées. Deux hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer l'origine de ces inclusions nucléaires.

1ère Hypothèse : Elles sont dues à l'action du virus de l'anémie infectieuse. Une telle hypothèse n'est guère satisfaisante, pour plusieurs raisons. La première

est que les différents auteurs, en particulier Japonais et Américains, ayant étudié la répllication vitale en culture de leucocytes de cheval, n'ont pas observé de telles lésions. Par ailleurs, si l'on croit les résultats de la technique à la 5 ioso 2 désoxyuridine qui sont en faveur d'un acide ribonucléique, il est peu classique d'obtenir une répllication d'un virus à acide ribonucléique avec formation d'inclusion uniquement nucléaire.

Il est certain que si cette hypothèse devait se révéler exacte, elle faciliterait le diagnostic de l'anémie infectieuse par la recherche d'inclusions nucléaires éosinophiles à la suite de l'inoculation de sérum de chevaux suspects d'anémie infectieuse à des cultures de leucocytes.

Nous avons essayé de retrouver de telles inclusions, en inoculant le matériel de départ employé pour les quatre souches de virus, qui ont fait l'objet de cette étude, à des cultures de leucocytes de cheval. Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu retrouver, lors de la primo-inoculation, de telles inclusions. L'origine de leur présence reste donc inconnue. Leur date d'apparition au cours des passages est également indéterminée car les passages ont été réalisés en tubes ronds.

La deuxième hypothèse est basée sur l'intervention d'un autre virus responsable de telles lésions nucléaires, indépendamment de l'action du virus de l'anémie infectieuse. Nos recherches ultérieures sur l'isolement et l'étude d'un herpes virus équin a prouvé cette deuxième hypothèse. cf. chapitre III page 81.

C) VALEUR DE L'EFFET CYTOPATHOGENE POUR L'APPRECIATION DE LA REPLICATION VIRALE

Cette valeur est diversement appréciée. Certains auteurs, en particulier HENSON et Col. (44) préfèrent la recherche de l'antigène fixant le complément dans les cultures infectées, pour juger de la production de virus, car ils estiment qu'une dégénérescence non spécifique des cellules peut être provoquée par différents autres facteurs.

On ne peut que partager ce sentiment étant donné, en particulier, la fréquence avec laquelle sont isolés de leucocytes des cytomégalovirus "orphelins" cytopathogènes. Cependant les réactions sérologiques appliquées au virus de l'anémie infectieuse doivent considérées également avec une certaine prudence car si la réaction de fixation du complément notamment, donne de bons résultats à certains auteurs, par contre, elle se révèle parfois non spécifique. Telle est l'opinion de BOULANGER et Col. (15) qui concluent que les anticorps ainsi révélés chez le cheval ne sont sans doute que des auto-anticorps. DOTCHFIELD (28) aboutit à une conclusion analogue après avoir étudié le test d'immuno adhérence proposé par SAURINO et Col. (91).

D'autres auteurs, en particulier GAINER et Col. (34) EL-ZEIN et Col. (31) se sont adressés au phénomène d'interférence, notamment vis à vis du virus de la stomatite vésiculeuse, pour contrôler la multiplication du virus de l'anémie infectieuse en culture. Cette technique n'est cependant pas spécifique.

Il est donc possible de conclure qu'étant donné l'aspect non caractéristique de l'effet cytopathogène constaté dans les cultures de leucocytes au cours des passages en série, il est nécessaire de contrôler la présence du virus soit régulièrement par la réaction de fixation de complément, soit occasionnellement mais plus sûrement, par l'inoculation au cheval sensible.

D) AUTRES SYSTEMES CELLULAIRES

A l'exception des leucocytes de cheval, les deux seuls systèmes qui semblent avoir permis une répllication du virus de l'anémie infectieuse sont les cellules de moelle osseuse d'une part, et les thymocytes d'autre part. Tous les autres systèmes étudiés se sont révélés inadéquats. Un paradoxe cependant à signaler, celui résultant des travaux de SAURINO et Col. (91) d'après lesquels différentes souches cellulaires, notamment les cellules KB, permettraient d'obtenir un effet cytopathogène et une répllication du virus de l'anémie infectieuse. Mais ces travaux n'ont jamais obtenu de confirmation dans un autre laboratoire. Notre échec en la matière (cellules KB) tend même à infirmer ces constatations.

EL-ZEIN (30) s'est heurté aux mêmes résultats négatifs en employant plusieurs systèmes cellulaires autres que les leucocytes de cheval. Cet auteur en arrive même au point de parler de virus défectif pour l'anémie infectieuse.

Il nous semble donc que seuls soient utilisables à l'heure actuelle les leucocytes de cheval pour l'étude du virus de l'anémie infectieuse en cultures cellulaires. Les travaux de SAURINO et Col. (91) demandent à être considérés avec une grande réserve.

Discussion :

C H A P I T R E II

ETUDE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSEA) NATURE DE L'ACIDE NUCLEIQUE

Les résultats obtenus par l'emploi de la 5 iodo 2 desoxyuridine sont en faveur de l'existence d'un virus à acide ribonucléique : l'effet cytopathogène apparaît même en présence de l'inhibiteur de la synthèse de l'acide desoxyribonucléique, tandis que la culture d'un virus à ADN (virus rhino pneumonie), employé comme système de contrôle, a été inhibée par cette même substance

Les résultats récents de NAKAJIMA et Col. (84) viennent également renforcer les nôtres à la suite de leur étude employant la technique d'isotopes conduisant à la nature ribonucléique du virus.

Il semble que le virus de l'anémie infectieuse de nature ribonucléique, sensible à l'éther, soit voisin de celui de la maladie des muqueuses, de la peste porcine classique et du sarcome de ROUS.

B) FILTRATION

La taille exacte du virus de l'anémie infectieuse n'est pas connue. Il faut en effet se méfier des appréciations portées après étude au microscope électronique, car il a été prouvé (cf. étude de la morphologie virale dans la première partie) que des confusions sont possibles en particulier avec des particules de ferritine.

On peut penser que le virus de l'anémie infectieuse est un petit virus dont la taille est inférieure à 50 nm. Ces résultats sont en harmonie avec ceux de BALOZET (10) 18 à 50 nm, de ARAKAWA et Col. (2) 30 à 60 nm, de REAGAN et Col. (89)

11 à 59 nm, de ISHII et Coll. (49) 20 à 50 nm, de OLEINIK et Coll. (87) 50 nm et de GAINER (34) 20 nm. Tous les auteurs qui avaient utilisé des produits virulents (sérum ou organes) pour leur étude.

C) MICROSCOPE ELECTRONIQUE

A partir du résultat cité dans le chapitre d'isolement d'Herpès-virus, nous avons pu montrer que le virus trouvé dans le noyau des cellules infectées par la souche " Vitast " est un virus orphelin appartenant au groupe de l'herpès. L'étude de ses propriétés permet de le distinguer du virus de la rhinopneumonie équine et de le rapprocher des cytomagélavirus d'origine équine.

En effet, la taille des particules d'herpès virus (125 nm) est nettement plus élevée que celle trouvée par les différents auteurs qui ont étudié le virus de l'anémie infectieuse par filtration, ultracentrifugation et microscopie électronique, ainsi que par nos expériences de filtration sur filtre Millipore dont le diamètre des pores était de 50 nm. Par ailleurs, ce virus possède un acide désoxyribonucléique alors que nos expériences portant sur l'emploi de la 5 iodo 2 désoxturidine tendent à prouver que le virus responsable de l'effet cytopathogène en culture de leucocytes est un virus à ARN.

Il semble donc que l'on puisse conclure avec une quasi certitude que ce virus n'est pas le virus de l'anémie infectieuse, mais, comme nous l'avons montré qu'il s'agit d'un virus latent présent dans les leucocytes mis en culture. Ce virus serait responsable des inclusions nucléaires éosinophiles décrites et rapportées dans les clichés 2 et 3.

Il est difficile pour ne pas dire impossible, de savoir à quel moment, au cours des passages à été " ramassé " ce virus. En effet, les travaux de KONO et KOBAYASHI (58) montrent la latence parfois très longue de ce virus avant qu'il se manifeste. Et peut être même ne se manifeste-t-il qu'en présence d'un autre virus, notamment le virus de l'anémie infectieuse. On peut en effet remarquer que seules les cultures infectées permettent d'observer un tel effet cytopathogène

(inclusions éosinophiliques nucléaires) et ces particules virales alors que les leucocytes témoins, ne présentent ni inclusion cellulaire, ni particules virales nucléaires. Or, la différence essentielle entre cellules témoins et cellules infectées réside dans la présence du virus de l'anémie infectieuse dans les cultures infectées; et cette présence a été prouvée justement pour la souche " Vitast " grâce à l'inoculation en retour au cheval après 9 passages en série en cultures de leucocytes. Il est vraisemblable qu'une étude plus complète, permettra de trouver dans ces cultures, à côté de ces virus orphelins, les virions responsables de l'anémie infectieuse.

Ces virus orphelins sont fréquents chez le cheval, puisque plusieurs chercheurs et nous-mêmes, ont pu isoler plusieurs souches de ce virus à partir des cultures de leucocytes de chevaux sains.

Enfin le virus observé dans le cytoplasme des cellules infecté par la souche Wyoming est-il le virus de l'anémie infectieuse ?

Il semble que l'on puisse penser effectivement que les particules observées dans les cellules infectées par la souche Wyoming (cliché 6) sont des virus de l'anémie infectieuse des équidés.

Les données concordent en effet, il s'agit d'un petit virus (22 nm) à ARN, à développement cytoplasmique. Ceci est en harmonie avec nos résultats de filtration et d'emploi de la 5 iodo désoxyuridine.

Ceci vient également recouper les résultats obtenus par GAINER et Coll.(34) qui ont observé au microscope électronique dans certaines cellules hépatiques d'un poney mort après l'inoculation de la souche Wyoming, une disposition en cristaux de particules mesurant 25 nm.

Discussion :

C H A P I T R E I I I

ISOLEMENT ET ETUDE D'UN HERPES VIRUS EQUIN

Trois souches d'herpès virus ont été isolées dans des cultures de leucocytes préparées à partir du sang de chevaux sains. L'étude des propriétés de l'une d'entre elles, la souche Cl₁ permet de la distinguer du virus de la rhinopneumonie équine et de la rapprocher des cytomagélavirus d'origine équine.

Ces virus isolés sont voisins de ceux isolés par KONO et KOBAYASHI (58-59) dans des cultures de cellules rénales et de moëlle osseuse de cheval et qui appartaient au groupe de l'herpès sans être toutefois des souches de virus de la rhinopneumonie équine.

Ces virus orphelins doivent être fréquents chez le cheval, puisque PLUMMER et WATERSON (88) indiquent avoir isolé une souche d'herpès virus nommée LK, à partir du jetage d'un cheval atteint de troubles de l'appareil respiratoire, et qui est différente des souches du virus de la rhinopneumonie équine. Depuis cette date, de nombreuses publications ont signalé l'isolement d'herpès virus équins distincts du virus de la rhinopneumonie.

Les herpès virus du cheval forment un ensemble complexe dont la classification a été tentée par plusieurs auteurs.

Il ne semble pas que la mise en culture de leucocytes d'autres espèces animales (bovins, porcs...) fournisse aussi fréquemment des souches de ce groupe.

En conclusion, la souche Cl₁ est un virus à DNA présentant en cultures cellulaires un effet cytopathogène caractéristique des herpès virus. Elle ne semble pas pathogène pour le poulain et le cheval adulte, se distingue du virus de la rhinopneumonie équine par réaction de fixation du complément et séroneutralisation et possède le même spectre d'activité en cultures cellulaires que le virus LK de PLUMMER.



Discussion : C H A P I T R E I V

ETUDE DU POUVOIR ANTIGENIQUE DU VIRUS

A) PREPARATION DE L'ANTIGENE ANEMIE INFECTIEUSE

Depuis longtemps des essais avaient été entrepris pour produire un antigène disponible à des fins de diagnostics de l'Anémie Infectieuse, mais la plupart des essais s'étaient soldés par des échecs dûs à la trop faible concentration d'antigène, à son impureté ou à l'obtention de résultats non spécifiques. A partir de nos résultats nous pouvons conclure que le pouvoir antigénique le meilleur repose sur les données suivantes :

1°- Le fait que seule la rate de chevaux atteints de forme suraiguë fournit un très bon antigène. Ni le sérum, ni le foie, ni le pancréas, les poumons ou les ganglions mésentériques ne peuvent être employés dans ce but, bien qu'il ait été démontré d'après KONO et Coll. en 1971 (62) que certains organes comme le foie notamment, contiennent un titre de virus très élevé.

2°- L'inoculation massive d'une souche virulente de virus de l'anémie infectieuse est nécessaire pour obtenir un antigène puissant.

3°- La date de prélèvement de la rate doit être prise en considération. La rate doit être prélevée le plus tôt possible après les jours d'hyperthermie et avant la formation d'anticorps par le cheval infecté de telle sorte que nous avons choisi entre 9 et 11 jours après l'infection. De même pour la préparation d'antigène de la peste bovine à partir de la pulpe splénique (BOULANGER)(14).

4°- Plusieurs cycles de congélation et de décongélation du tissu splénique ou la simple conservation à basse température - 30°C améliore l'antigène par destruction des cellules et libération d'une plus grande quantité du matériel antigénique. Nous avons constaté que 15 cycles de congélation et décongélation fournissent les meilleurs résultats. L'action des ultra-sons sur l'antigène liquide ou solide permet d'améliorer également le pouvoir précipitant.

5°- L'antigène liquide a des avantages par rapport à l'antigène solide. Nous avons trouvé que l'eau distillée permet la meilleure extraction parmi les 6 techniques essayées, mais l'antigène extrait par l'eau distillée est dilué par rapport à l'antigène obtenu par homogénéisation et centrifugation de la rate non diluée.

Grâce à cet antigène liquide nous avons pu améliorer les résultats de la précipitation en gélose en choisissant une dose optimale d'antigène pour détecter les sérums faiblement positifs. Par ailleurs, ceci permet certainement une meilleure standardisation de la technique. Enfin, grâce à cet antigène liquide particulièrement riche en virus nous avons pu utiliser d'autres techniques de diagnostic, en particulier l'hémagglutination conditionnée et la recherche de l'allergie chez les chevaux infectés.

B) NATURE DE L'ANTIGENE

1°- Au cours des essais destinés à étudier la localisation de l'antigène anémie infectieuse et l'existence d'un éventuel antigène de membrane cellulaire, nous avons constaté que seules les cellules spléniques lysées supprimaient les anticorps d'un sérum hyperimmun de référence alors que les cellules spléniques non lysées n'étaient pas capables de diminuer le pouvoir précipitant de ce même sérum. Ceci nous conduit à conclure que l'antigène est surtout localisé à l'intérieur des cellules spléniques et non pas à la surface de ces cellules.

2°- Le fait que les cycles de congélations et de décongélations qui ont tendance à inactiver le virus ne suppriment cependant pas le pouvoir précipitant nous permet de conclure que les virions intacts ne sont pas nécessaires pour la réaction de précipitation en gélose mais qu'il s'agit plutôt de plus petits composants des particules virales complètes qui doivent être libérés et qui interviennent dans les précipitations en gélose.

3°- De la même façon, le fait que le traitement de l'antigène par l'éther ou le chloroforme ne diminue en rien son pouvoir précipitant alors que le virus

est sensible à l'éther nous permet de conclure que la présence de virions complets enveloppés n'est pas nécessaires pour la précipitation en gélose et que l'enveloppe virale elle-même ne doit guère participer à la réaction de précipitation.

C) SPECIFICITE DE L'ANTIGENE

1° - A partir des résultats obtenus sur la spécificité de l'antigène Anémie Infectieuse nous avons constaté :

a) Les sérums de chevaux infectés par le virus de l'anémie infectieuse réagissent avec l'antigène Anémie Infectieuse.

b) L'antigène préparé ne réagit pas avec le sérum de chevaux sains ou atteints de diverses autres maladies que l'A.I.E.

c) Il est possible d'éliminer les précipitines d'un sérum positif par l'absorption avec l'antigène tandis que les extraits préparés dans les mêmes conditions à partir de 12 rates de chevaux sains n'ont pas supprimé le pouvoir précipitant du sérum positif. Inversement, on peut annuler le pouvoir précipitant de l'antigène par contact avec un sérum positif tandis que les sérums normaux n'entraînent aucune modification.

d) La confirmation de la spécificité de la réaction a été apportée par isolement du virus et reproduction expérimentale de la maladie chez le poney à l'aide de sérums fournissant une réponse positive au test de précipitation et provenant de chevaux en apparence sains.

e) Identité des antigènes Anémie Infectieuse préparés à partir des différents chevaux puisque les lignes de précipité obtenues en présence de sérum hyperimmun de référence se rejoignent.

f) Absence de communauté antigénique entre l'antigène anémie infectieuse et certains autres antigènes, notamment de streptococcus équii du bacille du

rouget et le virus de l'artérite à virus.

g) Apparition d'une seule ligne de précipité entre le sérum positif hyperimmun anémie infectieuse et l'antigène correspondant lors de l'emploi en test de diffusion en gélose.

2°- L'étude épidémiologique nous a montré que la présence d'anticorps précipitants est strictement liée à la présence du virus de l'anémie infectieuse chez les chevaux examinés, bien que l'on ne trouve pas de relations entre la positivité du test de précipitation et l'expression clinique de la maladie.

3°- Nous n'avons constaté aucune réaction en précipitation en gélose avec le sérum des chevaux avant l'inoculation, en particulier pour le poney III alors que le sérum de celui-ci a réagit à partir du 21ème jour après l'infection. (inoculé même avec une très faible dose 0,1 ml de sérum virulent par exemple).

A partir de tous ces résultats, nous pouvons conclure à l'étroite spécificité du système antigène anémie infectieuse, anticorps anémie infectieuse.

D) UNICITE DE L'ANTIGENE PRECIPITANT

L'antigène préparé par nos soins à partir de la souche virale Wyoming a permis d'obtenir des réponses positives avec des sérums de chevaux infectés par la souche Wyoming ou par des souches tout à fait différentes, comme notamment les souches françaises. Ceci milite en faveur de l'unicité de la réponse sur le plan sérologique en précipitation en gélose. NAKAJIMA en 1971 (85) a montré également que toutes les souches de virus de l'anémie infectieuse qu'il avait étudiées réagissaient d'une manière identique dans le test de précipitation en gélose. En revanche KONO (1971)(63) vient de montrer tout récemment que par la séroneutralisation il était possible de distinguer les souches de virus de l'anémie infectieuse entre elles. La séroneutralisation permet donc de déterminer des types viraux à l'intérieur de l'espèce du virus de l'anémie infectieuse alors que la précipitation en gélose fournit une spécificité étendue à l'espèce virus de l'anémie infectieuse et ce qui la rend plus applicable pour le diagnostic.

E) REACTIONS NON SPECIFIQUES

Des réactions non spécifiques dans le test de précipitation en gélose ont été obtenues dans un petit pourcentage de cas de l'ordre de 2 à 3 à partir de sérums provenant de chevaux normaux ou atteints d'autres maladies que l'anémie infectieuse. Leur présence peut être décelée très facilement comme nous l'avons mentionné antérieurement. Dans les autres techniques de diagnostic sérologique comme la précipitation en milieu liquide, la fixation du complément, et l'hémagglutination passive, de telles réactions non spécifiques sont beaucoup plus gênantes car elles peuvent entraîner des erreurs de diagnostic. Aussi la présence du sérum hyperimmun de référence dans chaque groupe de cupules lors du test de précipitation en gélose se révèle parfaitement indispensable pour comparer chaque ligne de précipité obtenue à celle résultant du sérum de référence.

Origine de ces réactions non spécifiques :

Ces réactions non spécifiques peuvent être dues à la présence d'anticorps dans les sérums examinés, anticorps dirigés vis à vis de diverses protéines trouvées dans le liquide splénique constituant l'antigène anémie infectieuse. Ainsi SARGENT et Coll. (90) ont montré que l'administration de thioacétamine à des rats entraîne une libération d'antigène spécifique hépatique dans la circulation générale. Ces protéines hépatiques restent dans la circulation pendant 1 ou 2 jours puis elles disparaissent et une semaine plus tard apparaissent des auto-anticorps dirigés contre l'antigène hépatique. Des anticorps de tel type pourraient éventuellement être présents dans le sérum de chevaux normaux et se trouver à l'origine de ces réactions non spécifiques. L'élimination de ces réactions non spécifiques est obtenue par absorption des sérums avec des extraits de rates normales.

F) ELECTROPHORESE DE L'ANTIGENE

Des études électrophorétiques d'échantillons de plasma prélevés quotidiennement sur des chevaux infectés d'anémie infectieuse ont permis de révéler la présence d'une fraction absente chez les chevaux sains. Des variations

ont été constatées et notamment une augmentation du pic juste avant l'élévation de température (MOORE) (72). Les chevaux infectés de façon chronique montrent également un pic correspondant à une protéine anormale même en l'absence de toute élévation de température comme l'ont montré HASUMI (45) et MOORE (72)

Entre nos mains, l'électrophorèse de l'antigène splénique des chevaux infectés d'anémie infectieuse a révélé la disparition d'un pic N° 6 que l'on retrouve en revanche dans les extraits des rates saines.

Il semble que la disparition de ce pic est due à une perturbation dans la transcription de la protéine provoquée par la présence du virus.

Le caractère distinctif entre les deux électrophorèses d'extrait de rate obtenue par biopsie d'animaux sains et malades peut être un moyen simple et rapide pour détecter l'infection.

Discussion :

C H A P I T R E V

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUEA) PRECIPITATION EN GÉLOSE ET MICROTECHNIQUE

La technique de précipitation en gélose s'est révélée la meilleure et le plus spécifique de toutes les réactions sérologiques utilisées pour le diagnostic de laboratoire de l'anémie infectieuse.

1°- Spécificité du test de précipitation en gélose

La spécificité de ce test dépend de la spécificité de l'antigène. L'avantage le plus important de la précipitation en gélose utilisée dans les conditions que nous avons décrites précédemment par rapport aux autres techniques de diagnostic sérologique comme l'amagglutination conditionnée, la fixation du complément et la précipitation en milieu liquide, réside dans la possibilité de l'élimination des réactions non spécifiques fournies par certains sérums. Ceci est obtenu grâce au sérum hyperimmun de référence placé de part et d'autre de la cupule contenant l'antigène, si la ligne de précipité fournie par le sérum suspect rejoint la ligne de précipité de ce sérum de référence, on peut conclure qu'il s'agit d'une action positive spécifique tandis que si elle coupe cette ligne de précipité du sérum de référence, il s'agit en fait d'une ligne de précipité non spécifique. Après avoir étudié la spécificité de l'antigène et apporté la preuve de la spécificité de la réaction antigène liquide et immune sérum par les différentes techniques décrites précédemment, on peut conclure que la spécificité de cette réaction nous apparaît donc totale à l'heure actuelle.

2°- Sensibilité du test

Une augmentation de la sensibilité de ce test est obtenue :

a) par l'usage d'un antigène liquide et la détermination de la dose optimale pour révéler les sérums faiblement positifs. De cette façon le test est plus sensible que lors de l'usage d'un antigène solide.

b) Par l'emploi de la microtechnique de précipitation en gélose qui est très sensible. Ainsi le sérum hyperimmun de référence de la jument Solit. fournit une ligne de précipité à la dilution du 20ème avec l'antigène dilué lui-même au demi lors d'emploi de la technique ordinaire de précipitation tandis qu'il se révèle positif jusqu'à la dilution du 1/32ème avec la microtechnique. La même microtechnique a été utilisée pour rendre plus sensible l'étude de l'antigène rabique par ATANASIU et Coll. (1971)(5).

3°- Avantages et inconvénients du test

a) Avantages

Le premier de ces avantages est sa simplicité comparée aux difficultés rencontrées pour l'isolement du virus à partir de chevaux infectés par inoculation à un autre cheval ou à des cultures de leucocytes de cheval. Le test de précipitation en gélose est également plus simple à réaliser que les autres techniques de sérologie comme l'hémagglutination conditionnée, la fixation du complément en particulier.

Le test de précipitation en gélose n'est pas d'un prix de revient très élevé, il ne nécessite pas de matériel stérile de laboratoire particulier ou d'équipements plus ou moins complexes. Il est bien sûr beaucoup moins coûteux que l'inoculation du cheval en tant que méthode de diagnostic. La précipitation en gélose fournit des réponses positives avec les sérums des chevaux atteints de la forme chronique ou latente et qui ont tous les caractères de la santé. Il est plus efficace pour le diagnostic de la forme chronique que l'inoculation au cheval, en particulier, lors d'inoculation à un cheval sain où les symptômes peuvent n'apparaître qu'au bout d'un très long délai d'incubation et où on peut même ne constater aucune expression clinique si le cheval présente une infection inapparente. Ainsi MOORE (72) a signalé que sur 2 chevaux sensibles, recevant une inoculation de la même dose de sérum provenant d'un cheval infecté d'anémie infectieuse, l'un d'eux réagissait

rapidement avec tous les signes cliniques de la maladie tandis que l'autre ne présentait à aucun moment de réactions thermiques ou de symptômes. Ainsi, bien que la technique d'inoculation au cheval reste le moyen le plus sûr pour le diagnostic de l'anémie infectieuse, il passe cependant au second plan par rapport à la précipitation en gélose. Au cours de notre étude nous avons utilisé le sérum d'un cheval qui avait présenté des symptômes très proches de ceux de l'anémie infectieuse et qui montrait notamment une hyperthermie par crises et une anémie. Aucun sidéroleucocyte n'avait été décelé. Les tests de précipitation en gélose sont restés constamment négatifs lors de l'étude des différents prélèvements de ce cheval. Ces résultats ont été confirmés par inoculation à l'animal sensible. Enfin cette technique est la seule actuellement disponible pour le diagnostic courant ou le dépistage sérologique de la maladie.

b) Inconvénients de ce test.

Un inconvénient de ce test de précipitation en gélose est lié au fait que les sérums contenant de très faibles quantités d'anticorps ne fournissent pas une réponse positive. Il en est de même avec les sérums avant le 20ème jour d'infection. Les sérums contenant ces faibles taux d'anticorps doivent subir une concentration par lyophilisation ou de précipitation des gammaglobulines. Les sérums des chevaux atteints de la forme aiguë doivent être prélevés quelques jours ou une semaine après le premier échantillon.

Nous pouvons conclure de tous ces résultats que le test de précipitation en gélose se révèle spécifique, efficace et sensible pour diagnostiquer l'anémie infectieuse ou effectuer le dépistage des chevaux infectés de façon inapparente.

B) AUTRE REACTION SEROLOGIQUE : LE TEST D'HEMAGGLUTINATION CONDITIONNEE

Le test d'hémagglutination conditionnée s'est révélé, entre nos mains, très sensible et a fourni de bons résultats avec des sérums dilués ou des sérums contenant de faibles quantités d'anticorps. Les globules rouges de cheval se sont montrés supérieurs aux globules rouges de mouton pour la détection des anticorps

anti-anémie infectieuse. Des sérums ont fourni des réactions non spécifiques au test d'hémagglutination conditionnée mais seulement à un titre très faible et pour les première délutions. Nous estimons que le sérum du cheval Adelon qui a fourni une ligne non spécifique au test de précipitation en gélose est à l'origine aussi d'une réaction non spécifique en hémagglutination. La distinction entre réaction spécifique et réaction non spécifique dans le test de l'hémagglutination conditionnée ne peut être réalisée aussi facilement que pour la précipitation en gélose car on ne peut pas introduire le sérum de référence dans le test de l'hémagglutination conditionnée.

Discussion :

C H A P I T R E VI

RECHERCHE de l'ALLERGIE VIS-A-VIS de l'ANTIGENE de l'ANEMIE
INFECTIEUSE des EQUIDES

Des études portant sur l'allergie dans l'Anémie Infectieuse ont été publiées en très petit nombre. KOROTKIKH (64) et DREGUS et LOMBARD (29) ont signalé des réactions allergiques sur les chevaux atteints d'Anémie Infectieuse. Le résultat portant sur la réaction allergique des chevaux atteints d'une forme chronique après injection intradermique de 0,1 ml d'antigène et sur l'absence de réaction des chevaux normaux permettent d'établir l'existence d'une hypersensibilité spécifique chez les chevaux infectés d'Anémie Infectieuse. La réaction provoquée par l'injection d'antigène pur est beaucoup plus marquée que celle induite par les antigènes dilués, chauffés ou traités par l'éther. GAINER et coll. (34) ont montré que le chauffage à 60°C pendant une heure ne suffisait pas pour inactiver complètement une suspension virale. Cependant comme le virus est sensible à l'éther, d'après les expériences de NAKAJIMA (80), on peut penser qu'en utilisant conjointement le chauffage pendant une heure à 60°C et l'action de l'éther, on pourrait obtenir de façon certaine une inactivation du virus, or, un antigène Anémie Infectieuse chauffé pendant une heure à 60°C et traité par l'éther pendant 15 minutes, conserve le pouvoir de révéler l'allergie, comme nous l'avons montré au cours de notre étude. La répétition de l'injection de l'antigène au cheval entraîne au cours du temps une diminution de son aptitude à agir de façon spécifique même lorsqu'il est infecté de façon chronique par le virus de l'Anémie Infectieuse. Une désensibilisation semblable a été signalée par GAINER (34), pour l'Anémie Infectieuse.

L'hypersensibilité existant chez les chevaux infectés par le virus de l'Anémie Infectieuse n'est pas du type immédiat puisque la réaction allergique apparaît en général vers la 18ème heure après l'injection et le maximum est atteint en général au bout de 24 h. L'échec de la transmission passive du

phénomène d'Arthus avec le sérum anti Anémie Infectieuse et l'antigène Anémie Infectieuse chez le lapin semble indiquer que la nature du phénomène allergique constaté chez les chevaux atteints d'Anémie Infectieuse est liée à une hypersensibilité de type retardé.

Discussion :

C H A P I T R E VII

CINETIQUE de la REPOSE SEROLOGIQUE à l'INFECTION

De l'ensemble de nos résultats portant sur la présence d'anticorps précipitant contre l'Anémie Infectieuse chez les chevaux infectés et de leur date d'apparition nous pouvons conclure que:

1) Les anticorps précipitants apparaissent de 20 à 22 jours après l'infection et non avant cette date (figures 7,7''B'') et figure 8.

2) Le sérum de chevaux atteints d'une forme suraiguë ne fournit aucune ligne de précipité et dans ces conditions un deuxième prélèvement doit être effectué 10 à 15 jours après.

3) Les chevaux atteints d'une forme chronique ou latente fournissent un précipité malgré l'absence de symptômes. Il n'existe donc aucun parallélisme entre la positivité du test dans la précipitation en gélose et l'expression clinique. Ainsi la jument "Solit" qui n'a jamais manifesté le moindre signe clinique pouvant être rapporté à l'anémie infectieuse, ni d'élévation de température a donné régulièrement une réponse positive au test de précipitation en gélose et finalement a servi de producteur du sérum de référence. De nombreux chevaux infectés latents ou chroniques, ne présentant aucun signe clinique fournissent une réponse positive au test de précipitation en gélose.

On peut par ailleurs évoquer deux problèmes importants, dont le premier est la relation existant entre la quantité d'anticorps précipitants et la présence de fièvre. Nous n'avons pas constaté de réaction positive avant la première crise d'hyperthermie ou même les 7 jours suivant cette première crise. Récemment NAKAJIMA (79) , en 1971 a trouvé des résultats semblables (10 jours). Il est probable que la première crise qui se traduit par une élévation importante de température et qui correspond à la présence d'une forte concentration de particules virales dans le corps des animaux infectés, entraîne une stimulation du système produisant les anticorps

comme l'a montré USHIMI (108). Par suite, l'apparition des anticorps précipitants semble être une conséquence de la crise d'anémie infectieuse et lui succède au bout de quelques jours.

Le second problème concerne la comparaison du délai d'apparition des anticorps précipitants, des anticorps neutralisants et des anticorps fixant le complément. KONO en 1971 (63) a établi que les anticorps neutralisants commencent à apparaître généralement entre le 45ème et le 87ème jour après l'infection et que ces anticorps neutralisants atteignent leur maximum entre le 90ème et le 148ème jour après l'infection. Les anticorps fixant le complément augmentent rapidement mais disparaissent aussi très vite. Ils apparaissent vers le 20ème jour après le maximum de fièvre et disparaissent en une trentaine à une soixantaine de jours (HENSON et coll.) (43). Les anticorps précipitants eux apparaissent en une vingtaine de jours et persistent ensuite pendant très longtemps, sans doute pendant toute la vie de l'animal (figures 7,7 b et 8).

En résumé, les anticorps précipitants sont indépendants de l'expression clinique de l'infection et persistent dans le sang circulant pendant une très longue période (comme nous l'avons établi précédemment).

Discussion

C H A P I T R E VIII

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE

De l'enquête épidémiologique menée en France, on peut conclure que l'anémie infectieuse n'échappe pas à la règle dite de " l'iceberg " valable pour la plupart des maladies infectieuses et selon laquelle seule une faible partie des cas d'infection s'exprime cliniquement alors que la majorité passe inaperçue. Il convient néanmoins de rester vigilant car les souches à l'origine des infections inapparentes peuvent se montrer parfaitement virulentes et entraîner la mort comme le prouve l'exemple du poney ayant servi à l'isolement du virus à partir de porteurs inapparents.

Etant donné que nous avons mis au point un excellent test de dépistage de la maladie et en raison du risque éventuel d'introduction d'animaux infectés inapparents dans un effectif sain, il nous paraît hautement souhaitable de soumettre le sérum de tout cheval en instance d'achat à un test de précipitation en gélose vis à vis de l'antigène anémie infectieuse. Il pourrait en être de même pour les chevaux importés et destinés à demeurer longtemps en France. Cette dernière mesure éviterait l'importation d'animaux porteurs d'anticorps et donc de virus.

Puisque les premiers résultats de l'enquête épidémiologique en France révèlent l'infection par le virus de l'anémie infectieuse dans quelques effectifs, le développement de cette enquête permettra d'établir avec plus de précision la carte de l'éventuelle infection inapparente des chevaux français et d'autres pays européens.

CONCLUSIONS

A partir des principaux résultats nous pouvons conclure les éléments suivants:

I . ETUDE DU VIRUS DE L'ANEMIE INFECTIEUSE:

- 1 - Le virus de l'anémie infectieuse se multiplie en culture de leucocytes de cheval en entraînant un effet cytopathogène d'apparition plus ou moins tardive selon la concentration virale en cultures cellulaires.
- 2 - Aucun autre système cellulaire employé (cellules KB, NIL, PK 15, cellules rénales de singe) n'autorise l'apparition d'effet cytopathogène.
- 3 - Quatre souches de virus (trois souches isolées à Alfort et la souche américaine Wyoming) ont été passées en série sur leucocytes de cheval. La souche "Vitastérone" après 9 passages en cultures de leucocytes n'a subi aucune modification de son pouvoir pathogène.
- 4 - Les expériences de filtration et d'utilisation de la 5 iodo-2 désoxyuridine amènent à conclure que le virus de l'anémie infectieuse est un petit virus à acide ribonucléique. Ces conclusions sont corroborées par les résultats obtenus par observation au microscope électronique, grâce auquel ont été décelées des particules de 22 nm à disposition cristalline dans le cytoplasme des leucocytes infectés.

II . ISOLEMENT ET ETUDE d'UN HERPES VIRUS:

Un virus orphelin appartenant au groupe herpès à acide désoxyribonucléique (ADN) est apparu dans les cultures où il a été décelé au microscope électronique et par son effet cytopathogène se traduisant par des inclusions éosinophiles nucléaires (souche nommée CLI). Ce virus se distingue du virus de la rhinopneumonie équine par réaction de fixation du complément et séroneutralisation et possède le même spectre d'activité en cultures cellulaires que le virus herpétique équin (prototype souche LK de PLUMMER).

Un degré limité de neutralisation de cette souche CLI par les sérums

anti-virus de KARPAS et antiviral souche HSIUNG (cytomegalovirus) a été apporté par la neutralisation croisée.

Ce virus ne semble pas pathogène pour le poulain et le cheval adulte.

Deux autres souches d'herpès virus nommées CL2 et CL3 ont été isolées dans les cultures de leucocytes préparées à partir du sang de chevaux sains.

III - ANTIGÈNE ANÉMIE INFECTIEUSE:

A - Préparation de l'antigène:

L'obtention d'un bon antigène est assez délicate. Il est préparé à partir de la rate de poneys ou de chevaux inoculés avec une forte dose d'une souche très virulente de virus de l'Anémie Infectieuse (souche Wyoming). Un bon antigène n'est obtenu que lorsque l'animal présente une réaction fébrile sévère (40°C) après une courte incubation, de l'ordre de 3 à 5 jours. La rate est prélevée entre le 9ème et le 11ème jour après l'inoculation.

La rate est broyée, congelée et décongelée 15 fois, puis conservée à -30°C. Le surnageant d'une centrifugation à 27.000 g pendant 20 mn constitue la suspension antigénique. Avant l'utilisation de l'antigène, on procède à son titrage selon la technique de l'échiquier.

L'extrait liquide de rate homogénéisé se montre le plus satisfaisant et le plus puissant de tous les extraits obtenus et également meilleur que le tissu splénique lui-même. Le liquide antigénique permet le titrage de l'antigène et des anticorps grâce auquel on peut détecter la plus faible quantité d'anticorps contenue dans un sérum qui fournit encore une ligne de précipité et d'introduire une appréciation quantitative de la valeur de l'antigène.

L'antigène ne peut être obtenu qu'à partir de la rate. Les autres organes ne se révèlent pas satisfaisants pour la réaction de précipitation en gélose.

B - Spécificité de l'antigène:
 =====

1 - Ces études ont prouvé que l'antigène anémie infectieuse est absolument spécifique dans les réactions sérologiques.

2 - L'antigène préparé ne réagit pas avec le sérum de chevaux sains ou atteints de maladies diverses autres que l'AIE.

3 - Il est possible d'éliminer les précipitines d'un sérum positif par l'absorption avec l'antigène tandis que les extraits préparés dans les mêmes conditions à partir de 12 rates de chevaux sains n'ont pas supprimé le pouvoir précipitant du sérum positif. Inversement, on peut annuler le pouvoir précipitant de l'antigène par contact avec un sérum positif tandis que les sérums normaux n'entraînent aucune modification.

4 - L'étude comparée de divers systèmes antigène - anticorps comprenant notamment Streptococcus equi, le bacille du rouget et le virus de l'artérite à virus ne révèle pas de communauté antigénique avec le virus de l'anémie infectieuse.

5 - Enfin, la confirmation de la spécificité de la réaction a été apportée par isolement du virus et reproduction expérimentale de la maladie chez le poney à l'aide de sérums fournissant une réponse positive au test de précipitation et provenant de chevaux en apparence sains.

C - Caractéristiques de l'antigène anémie infectieuse:
 =====

1 - Le pouvoir précipitant de l'antigène liquide résiste au traitement par l'éther, le chloroforme et la trypsine. Il est diminué après action de la papaïne et disparaît lors d'un chauffage à 50°C pendant 20 minutes au minimum.

2 - L'antigène précipitant n'est pas un antigène de membrane cellulaire ni la particule virale intacte, mais est formé de sous-produits du virion de l'anémie infectieuse.

3 - L'antigène réagit en précipitation en gélose avec le sérum de chevaux inoculés à l'aide de souches différentes de virus de l'anémie infectieuse; l'antigène est donc spécifique de groupe et non pas de souche.

4 - Par fractionnement de l'antigène liquide sur une colonne Sephadex G 200, on a obtenu son passage dans la première fraction ce qui est en faveur d'un haut poids moléculaire.

D - Electrophorèse du liquide antigénique:
 =====

L'antigène anémie infectieuse des équidés se comporte différemment des suspensions spléniques de chevaux normaux. On constate de façon constante une disparition d'une bande dans l'antigène splénique anémie infectieuse par rapport aux extraits spléniques préparés à partir de rates de chevaux sains. Ceci suggère la destruction ou la disparition de certains constituants des cellules infectées par le virus de l'anémie infectieuse.

IV . METHODES DE DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL:

A - Précipitation en gélose:
 =====

Le test est absolument spécifique, simple , rapide et pratique pour le dépistage de l'anémie infectieuse. La constatation d'une ligne de précipité présentant une réaction d'identité avec le précipité voisin du sérum de référence suffit pour établir le diagnostic sérologique. Les lignes de précipité spécifique ont été classées en trois groupes en fonction de la quantité d'anticorps présents dans le sérum examiné.

Il est simple de différencier les lignes spécifiques de bandes non spécifiques de l'A.I.E. parfois rencontrées et qui coupent le précipité voisin de référence.

Une technique de micro-immunodiffusion a été mise au point et se révèle plus sensible que le test classique; elle fournit des réactions positives avec des dilutions plus élevées de sérums. Le microtest nécessite de très faibles quantités de réactifs.

Anticorps précipitants dans les sérums des animaux infectés:

- I - Les anticorps précipitants apparaissent 18 jours après l'infection. Ils persistent pendant une très longue période (5 ans chez un cheval infecté à l'état latent).
- 2 - Les sérums des chevaux à la phase aiguë de l'infection répondent négativement et il est nécessaire de recommencer un prélèvement 2 semaines après pour obtenir une réaction positive.
- 3 - Les sérums de chevaux atteints d'une forme chronique ou latente d'anémie infectieuse des équidés, restent positifs au test de précipitation en gélose, même s'ils présentent les apparences d'une bonne santé.

B - Test d'hémagglutination passive:

=====

Ce test se montre très sensible, notamment lorsqu'on utilise des globules rouges de cheval par rapport aux globules rouges de mouton. Il peut servir dans l'étude de diagnostic des sérums contenant de faibles quantités d'anticorps prélevés au début de l'infection ou pour les sérums dilués.

Par rapport au test de précipitation en gélose, l'hémagglutination passive ne montre pas le même degré de spécificité.

C - Diagnostic allergique:

=====

Chez les chevaux infectés de façon chronique par le virus de l'anémie infectieuse des équidés, l'allergie est révélée par inoculation de 0,1 ml d'antigène liquide par voie intradermique. La réaction se manifeste dans les 24 h qui suivent l'injection. La réponse est du type hypersensibilité retardée. Les chevaux normaux ne réagissent pas lors d'injection de l'antigène anémie infectieuse. Les chevaux atteints d'anémie infectieuse ne présentent aucune réaction lors de l'injection d'extraits de rates de chevaux normaux. L'éther a été utilisé pour inactiver le virus et conserver le pouvoir de révéler l'allergie. Ceci représente une nouvelle méthode de diagnostic de l'anémie infectieuse des équidés.

V - ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE:

Après avoir mis au point le test de précipitation en gélose, nous avons entrepris une vaste enquête épidémiologique visant principalement à dépister l'infection latente du cheval en France. Les résultats du sondage ne laissent pas d'être surprenants.

Nous avons soumis à ce test un peu plus de 2000 sérums de chevaux français provenant de régions très diverses.

Quatre effectifs ont été reconnus infectés, avec toutefois une intensité variable. Dans aucun de ces effectifs l'existence de l'infection n'avait été soupçonnée avant l'examen sérologique.

Hormis les 5 sérums provenant d'animaux cliniquement suspects d'Anémie infectieuse, 134 sérums nous ayant fourni une réponse positive, ont été prélevés sur des animaux apparemment sains. Ceci démontre la prédominance de l'infection inapparente sur la maladie dans le domaine de l'A.I.E.

Une étude de certaines exploitations à 3 mois d'intervalle montre que tous les sérums positifs à la première prise de sang restent positifs ultérieurement; dans un effectif 50 % des sérums négatifs à la première prise de sang étaient devenus positifs trois mois plus tard.

La confirmation a été obtenue par l'isolement du virus à partir de sérums de chevaux apparemment sains, mais porteurs d'anticorps et par la reproduction expérimentale de la maladie.

Ainsi en France, à l'heure actuelle, il semble que l'anémie infectieuse maladie soit absente et que seule évolue l'anémie infectieuse, infection inapparente décelable uniquement par examen sérologique.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ALTARA (I) SERRA (A) et GUARINI (G)
Bull. Off. Int. Epiz. 1953 - 39 - 708
- 2 - ARAKAWA (S) KANEKO (T) SEKI (T) et MUTO (S)
Yokohama. Med. Bull. 1957 - 8 - 48
- 3 - ARAKAWA (S) KANEKO (T) SEKI (T) et MUTO (S)
Jap. Microbiol. 1960 - 4 - 25
- 4 - ASTROM (E)
The blood horse. P. 3009 - 30 Août 1971
- 5 - ATANASIU (P) DATAR (V.R.) LOPEZ (J.H.) WACEI (A.R.) et DELSAL (J.L.)
Revue d'Immunologie - 1971 - 35 - 7
- 6 - BALOZET (L)
Arch. Inst. Pasteur Tunis - 1935 - 24 - 268
- 7 - BALOZET (L)
C.R. Soc. Biol. 1935 - 119 - 65
- 8 - BALOZET (L)
Arch. Inst. Pasteur Tunis - 1936 - 25 - 272
- 9 - BALOZET (L)
Arch. Inst. Pasteur Tunis - 1938 - 27 - 241
- 10 - BALOZET (L)
C.R.AC.SC. - 1939 - 209 - 177
- 11 - BALOZET (L) in LEVADITI (C) LEPINE (P) et VERGE (J)
Maloine Ed. Paris - 1943 p. 843
- 12 - BEUST (F.V.)
Bull. Off. int. Epiz. 1956 - 45 - 620
- 13 - BODON (L)
Acta Vét. Ac. Scient. Hung. 1966 - 16 - 321
- 14 - BOULANGER (P)
Canadian Journal of Comparative medicine 1957 - 21 - 379
- 15 - BOULANGER (P) BANNISTER (G.L.) RUCKERBAUER (G.M.) et CORNER (A.H.)
Rev. Cand. Med. comp. 1969 - 33 N° 2 - 148

- 16 - BRION (A) FONTAINE (M.P.) MORAILLON (A) FONTAINE (M) et MORAILLON (R)
Rech. Vét. 1968 - 1 - 63
- 17 - BRION (A) FONTAINE (M.P.) MORAILLON (A) FONTAINE (M) et MORAILLON (R)
Rec. Méd. Vét. 1968 - 144 - 197
- 18 - BURGER (D) HENSON (J.B.) KOBAYAIHI (K) et GORHAMA (J.R.)
18è Congr. Mond. Vét. Paris 1967 - p. 814
- 19 - CARRE (H) et VALLEE (H)
C.R.AC.SC. 1905 - 141 - 396
- 20 - GOGGINS (L)
Communication personnelle
- 21 - GOGGINS (L)
The blood horse p. 3014 - 30 Août 1971
- 22 - GOGGINS (L) ADLINGER (H) KEMEN (M.J.) NORCROSS (N.L.) NORONHA (F) NUSBAUM (S.R.)
et RICKARD (C.G.)
J.A.V.M.A. 1969 - 155 - 344
- 23 - COGGINS (L) et HEUSCHELE (W.P.)
Am. J. Vét. Res. 1966 - 27 - 117
- 24 - COGGINS (L) et NORCROSS (N.L.)
The Cornell Vét. 1970 - 60 - 330
- 25 - Commission Japonaise
The horse administration Bureau - Tokyo 1914.
- 26 - CRAWFORD (T.B.) Mc. GUIRE (T.C.) HENSON (J.B.)
Archiv. fur. die ges. Virusf. 1971 - 34 - 332
- 27 - DITCHFIELD (W.J.B.)
Can. Vet Journal. 1967 - 8 - 273
- 28 - DITCHFIELD (W.J.B.)
J.A.V.M.A. 1969 - 155 - 349
- 29 - DREGUSS (M.N.) et LOMBARD (L.S.)
Univ. of Pann. Press. Philadelphia 1954 - 203 p.
- 30 - EL-ZEIN (A)
Diss. Abstr. 1968 - 29 B - 297
- 31 - EL-ZEIN (A) MYERS (W.L.) et SEGRE (D)
J. Inf. Dis. 1968 - 118 - 473

- 32 - FUENTES (M.R.) et SAXER (E)
Invest. Vet. 1958 - 10, 11
- 33 - GAINER (J.H.)
First International Conference on equine infections diseases
Stresa - Italy 1966
- 34 - GAINER (J.H.) AMSTER (R.L.) HALL (W.T.) KUHNS (L.J.) et NELSON (S.L.)
69 th Annual Proceedings United States Livestock Sanitary
Association - 1965 - 254
- 35 - GORET (P) MICHEL (C) TOMA (B)
I. Volume Expansion Scientifique Française Paris 1968 - p. 143
- 36 - GORET (P) TOMA (B) BIND (J.L.) et LUKA ISKANDER (G.E.)
Rec. Méd. Vét. 1969 - 145 - 1055
- 37 - GORET (P) TOMA (B) et LUKA ISKANDER (G.E.)
Communication au 19ème congrès Mondial Vétérinaire Mexico
Août 1971
- 38 - GORET (P) TOMA (B) et LUKA ISKANDER (G.E.)
Bull. de l'Académie des Sciences 1971 t. 273 p. 2721
- 39 - GORET (P) TOMA (B) LUKA ISKANDER (G.E.) et BIND (J.L.)
Rec. Méd. Vét. 1969 - 145 - 1213.
- 40 - GUARINI (G)
Bull. Off. Int. Epiz. 1956 - 45 - 190
- 41 - HALLAUER (C) et MOOSBRUGER (G.A.)
Schweiz. Arch. Tierch. 1949 - 91 - 28
- 42 - HENPEL (J)
Zeitschr. Infektionskr. Haustiere. 1909 - 5 - 381
- 43 - HENSON (J.B.) Mc. GUIRE (T.C.) KOBAYASHI (K) et GORHAM (J.R.)
J. Amér. Vét. Méd. Ass. 1967 - 151 - 1830
- 44 - HENSON (J.B.) Mc. GUIRE (T.C.) KOBAYASHI (K) BANKS (K.L.) DAVIS (W.C.) et GORHMA (J)
Proc. 2nd. Int. Conf. Equine Infect. Dis. 1970 - 178
- 45 - HASUMI (K)
J. of Cancer and Virology - 1956 - 1 - 47
- 46 - HEIERMANN (G)
Thèse Vét. Hanovre 1924
- 47 - HEMPEL (J)
Zeitschr. Infektion. Haustiere 1909 - 5 - 381.

- 48 - HORZINEK (M) MUSSGAY (M) MAESS (J) et PETZOLDT (K)
Arch. ges. Virusforsch. 1967 - 21 - 98
- 49 - ISHII (S)
Adv. Vét. Sci. 1963 - 8 - 263
- 50 - ISHII (S) TABUCHI (E) et KATADA (M)
Bull. Off. int. Epiz. 1953 - 39 - 753
- 51 - ISHII (S) TABUCHI (E) OBARA (Z) et KATADA (M)
Bull. Nat Inst. Anim. Health. 1955 - 2 - 97
- 52 - ISHITANI (R)
Proce. I. Int. Conf. on Equine infectious Diseases, Strada
Italie - 1966 p.
- 53 - KESTER (W.O.)
J. Am. Vét. Méd. Ass. 1966 - 148 - 1405
- 54 - KOBAYASHI (K)
Virus Osaka 1961 - 11 - 189
- 55 - KOBAYASHI (K)
Virus Osaka 1961 - 11 - 249
- 56 - KOBAYASHI (K) et KONO (Y)
Nat. Inst. of Anim. Health quart. 1967 - 7 - 8
- 57 - KONO (Y)
Nat. Inst. of Anim. Health Quart. 1968 - 8 - 117
- 58 - KONO (Y) et KOBAYASHI (K)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1964 - 4 - 10
- 59 - KONO (Y) et KOBAYASHI (K)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1964 - 4 - 21
- 60 - KONO (Y) et KOBAYASHI (K)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1966 - 6 - 194
- 61 - KONO (Y) YOSHINO (T) et FUKUNAGA (Y)
Arch. Ges. Virusf. 1970 - 30 - 252
- 62 - KONO (Y) KOBAYASHI (K) et FUKUNAGA (Y)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1971 - II - II
- 63 - KONO (Y) KOBAYASHI (K) et FUKUNAGA (Y)
Arch. Ges. Virusf. 1971 - 34 - 202

- 64 - KOROTKIKH (A.V.)
Vétérinarya, Moscow - 1950 - 27 - N° 12 - 16
- 65 - KRAL (F)
Rec. Méd. Vét. 1933 - 109 - 912
- 66 - LIGNEE (M)
Rec. Méd. Vét. 1843 - 20 - 30
- 67 - LIVINGSTONE (C.W.) MOORE (R.W.) et REDMOND (H.E.)
The Southwestern Vétérinarian - 1966 - 19 - 221
- 68 - LUDHRS (E)
Z. Vet. Kunde. 1919 - 31 - 369
- 69 - LUKA ISKANDER (G.E.) TOMA (B) et GORET (P)
Rec. Méd. Vét. 1970 - 146 - 401
- 70 - MOHLMANN (H) et GRALHEER (H)
Arch. F. Exp. Vet. 1954 - 8 - 199
- 71 - MOHLER (W.M.)
J. Am. Vet. Med. Ass. 1936 - 88 - 624
- 72 - MOORE (R.W.)
Proc. I Inter. Conf. ELIASTRESA - 1966 p. 42
- 72b. MOORE (R.W.)
J.A.V.M.A. - 1969 - 155 - 331
- 73 - MOORE (R.W.) KATADA (M) et REDMOND (H.E.)
Am. J. Vet. Res. 1970 - 31 - N° 3 - 463
- 74 - MOORE (R.W.) LIVINGSTON (C.W.) et REDMOND (H.E.)
The Southwestern Veterinarian - 1966 - 19 - 187
- 75 - MOORE (R.W.) LIVINGSTON (C.W.) et REDMOND (H.E.)
The Southwestern Veterinarian - 1966 - 19 - 217
- 76 - MOORE (R.W.) REDMOND (H.E.) KATADA (M) et WALLACE (M)
Am. J. Vét. Res. 1970 - 31 N° 9 - 1569
- 77 - MORAILLON (A) TOMA (B) GORET (P) BRION (A) RICHARD (Y) et LUKA ISKANDER (G.E.)
Annales de Rech. Vét. 1971 - 2 (2) 223
- 78 - NAGAO (M)
J. Jap. Soc. Vét. Sc. 1923 - 1923 - 2 - 127

- 79 - NAKAJIMA (H) KONO (Y) et USHIMI (C)
The Journal of Immunology - 1971 - 107 N° 3 - 889
- 80 - NAKAJIMA (H) et OBARA (J)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1964 - 4 - 129
- 81 - NAKAJIMA (H) TAJIMA (M) TANAKA (S) et USHIMI (C)
Arch. für die gesamte Virusforschung - 1969 - 28 - 348
- 82 - NAKAJIMA (H) TANAKA (S) et USHIMI (C)
Arch. für die gesamte Virusforschung - 1969 - 26 - 389
- 83 - NAKAJIMA (H) TANAKA (S) et USHIMI (C)
Arch. für die gesamte Virusforschung - 1969 - 26 - 395
- 84 - NAKAJIMA (H) TANAKA (S) et USHIMI (C)
Arch. für die gesamte Virusforschung - 1970 - 31 - 273
- 85 - NAKAJIMA (H) et USHIMI (C)
Infection and Immunity - 1971 - 3 - 373
- 86 - NAKAJIMA (H) USHIMI (C) et OBARA (J)
Nat. Inst. Anim. Hlth. 1967 - 7 - 21
- 87 - OLEINIK (N.K.)
Nanch. Trud. Ukr. Inst. Eksp. Vet. 1959 - 25 - 139
- 88 - PLUMMER (G) et WATERSON (A.P.)
Virology 1963 - 19 - 412
- 89 - REAGAN (R.L.) LILLIE (M.G.) KICKMAN (J.W.) et BRUECKNER (A.L.)
Amer. J. Vet. Res. 1950 - II - 157
- 90 - SARGENT (A.U.) MYERS (J) et RICHTER (M)
J. Immunol. 1966 - 96 - 268
- 91 - SAURINO (R) WADDEL (G.H.) FLYNN (J.H.) et TEIGLAND (M.B.)
J. Am. Vet. Med. Ass. 1966 - 149 - 1416
- 92 - SAXER (E)
Schweiz. Arch. f. Tierch 1966 - 108 - 331
- 93 - SAXER (E) et FUENTES (R.M.)
Schw. Arch. f. Tierh. 1960 - 102 - 232
- 94 - SQUIRE (R.A.)
Blood - 1968 - 32 - 157

- 95 - STEIN (C.D.) et GATES (D.W.)
Am. J. Vet. Res. 1952 - 13 - 195
- 96 - STEIN (C.D.) GATES (D.W.) et ROGERS (H)
Vét. Méd. 1952 - 47 - 229
- 97 - TABUCHI (E)
Hokkaido Prefect. Gov. Rept. of EIA. 1955 - I - 141
- 98 - TABUCHI (E) KATADA (M) et WARASE (H)
Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 1957 - 33 - 91
- 99 - TACU (D)
Luer Stünt Inst. Ser. Vac. Pasteur 1958 - 3 - 555
- 100 - TANAKA (K) et HIRASAWA (K)
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 1962 - 2 - 82
- 101 - TIEGLAND (M.B.)
Proceedings of Fifth Animal Am. Assoc. of Equine Pract. 1959 -
63 - 68
- 102 - TOKUI (T)
Jap. Vét. Res. 1964 - 12 - I
- 103 - TOMA (B) LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P)
Rec. Méd. Vét. 1970 - 146 - 565
- 104 - TOMA (B) LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P)
Comm. au 12 Cong. Inter.de Standerd Microbio. Annecy 1971
- 105 - TOMA (B) LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P)
Bull. Acad. Vét. 1971 (sous press.)
- 106 - TOMA (B) LUKA ISKANDER (G.E.) et GORET (P)
Bull. de l'acad. Vét. 1971 (sous press.)
- 107 - TORRANCE (C.C.)
Amer. J. Vet. Res. 1940 - I - 63
- 108 - USHIMI (C) TANAKA (S) NAKAJIMA (H) YOSHINO (T) et YAMAMOTO (H)
Nat. Inst. Anim. Hlth.Quart. Jap. 1969 - 9 - N° 3 - 165
- 109 - VALLEE (H) et CARRE (H)
C.R.Ac. Sc. 1904 - 199 - 331

110 - WATANABE (S)

Jap. J. Vet. Sci. 1960 - 22 - 190

111 - WATANABE (S)

Jap. J. Cet. Sci. 1966 - 28 - 73

112 - YUROV (K.P.)

Veterinariya, Moscow - 1970 - 10 - 48

II - DIAGNOSTIC ET EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE	23
A - Diagnostic de l'A.I.E.	23
I. Diagnostic sérologique	23
A. Réaction de fixation du complément..	23
B. Réaction de neutralisation.....	24
C. Réaction d'hémagglutination.....	26
D. Réaction de précipitation.....	26
2. Diagnostic allergique	27
B - Etude épidémiologique.....	28
 DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES =====	
<u>INTRODUCTION:</u> But du travail et plan général des Recherches entreprises.....	33
<u>MATERIEL:</u>	37
I. Souches virales	37
2. Systèmes cellulaires.....	38
3. Milieux de culture.....	38
4. Produits de laboratoire.....	38
5. Matériels spéciaux.....	39
6. Chevaux.....	39
7. Sérums des chevaux.....	40
<u>TECHNIQUES:</u>	41
A - Les principales modalités de la technique de mise en culture de leucocytes de cheval.....	41
B -	
I. Inoculation aux cultures de leucocytes.....	44
2. Passage en série.....	45
3. Autres systèmes cellulaires.....	45

C - Etude du virus de l'A.I.E.	45
I. Détermination de la nature de l'acide nuclé- -ique.	
a - par l'emploi de la 5 I.D.U.	45
b - emploi de l'acridine orange.....	47
2. Filtration.....	47
3. Microscope électronique	48
D - Isolement et étude d'un herpès virus équin	49
I. En culture cellulaire.....	49
2. Action de la 5 iodo-2 déoxyuridine.....	49
3. Etude du pouvoir pathogène, antigène et im- -munogène.....	50
E - Etude de l'antigène du virus de l'A.I.E.....	50
I. Préparation de l'antigène A.I.....	51
2. Obtention de l'antigène A.I.....	51
3. Thermostabilité de l'antigène.....	53
4. Action des produits chimiques.....	53
5. Etude de la spécificité de l'antigène pro - -duit.....	54
6. Electrophorèse de l'antigène.....	55
7. Fractionnement sur colonne sephadex.....	55
F - Préparation de sérum hyperimmun anti Anémie Infectieuse.....	56
G -	
I. Technique de précipitation en gélose.....	56
2. Microprécipitation en milieu gélifié.....	57
H - Réaction d'hémagglutination conditionnée.....	57
I - Réaction d'allergie vis-à-vis du virus de l'A.I.	59
I. Pouvoir allergène du virus de l'A.I.....	59
2. Essais d'inactivation de l'antigène.....	60

RESULTATS

<u>CHAPITRE I</u> - Replication du virus de l'A.I.E.....	63
A - En culture de leucocytes de cheval.....	63
1. Effet cytopathogène sur les leucocytes de cheval.....	63
2. Passages en série sur leucocytes de cheval..	64
3. Epreuve de la replication virale par inoculation au cheval.....	68
B - Autre système cellulaire.....	69
<u>CHAPITRE II</u> - Etude du virus de l'A.I.E.....	73
A - Nature de l'acide nucléique.....	73
1. Action de la 5 iodo-2 desoxyuridine.....	73
2. Emploi de l'acridine orange.....	75
B - Filtration.....	77
C - Etude au microscope électronique.....	77
<u>CHAPITRE III</u> - Isolement et étude d'un herpès virus équin....	81
A - Isolement du virus.....	81
B - Effet cytopathogène.....	81
C - Etude en culture cellulaire.....	82
D - Nature de l'acide nucléique.....	84
E - Pouvoir pathogène, antigène et immunogène.....	84
F - Microscopie électronique.....	85

<u>CHAPITRE IV</u> - Etude du pouvoir antigène du virus de l'A.I.E..	89
A - Préparation de l'antigène	89
I. a - Détermination du tissu fournissant le meilleur antigène.....	89
b - Localisation de l'antigène.....	89
2. Obtention d'un antigène liquide du virus de l'A.I.E.	89
a - Inoculation de chevaux en vue de la préparation de l'antigène.....	89
b - Traitement des rates fournissant l'antigène.....	90
c - Facteurs conditionnant le pouvoir antigène.....	93
d - Résultats obtenus avec les rates provenant des chevaux sacrifiés à différents stades de la maladie....	94
B - Vérification de la spécificité de l'antigène ob- -tenu.....	94
I. Réactions sérologiques de l'antigène avec différents sérums.....	94
2. Absorption de l'antigène avec des sérums anti-virus de l'A.I.E.....	95
3. Absorption des anticorps d'un sérum hyrimum anti A.I.E. par l'antigène A.I.E.....	95
4. Identité de l'antigène A.I.E. dans les ex- -traits de différentes rates.....	96
5 - Rapport entre l'antigène A.I.E. et d'autres antigènes.....	97
6 - Vérification de la spécificité de la réac- -tion sérologique par inoculation au cheval sensible.....	97
C - Caractéristiques de l'antigène A.I.E.....	
I. Action des produits chimiques.....	
2. Thermostabilité de l'antigène.....	
3. Fractionnement sur colonne sephadex.....	
D - Electrophorèse de l'antigène.....	

<u>CHAPITRE V</u> - Diagnostic sérologique.....	103
A - Réactions de précipitation en milieu gélifié....	103
1. Caractères des lignes de précipité spécifiques.....	103
2. Caractères et identification des lignes non spécifiques.....	107
3. Augmentation de la sensibilité de la réaction grâce à l'antigène liquide.....	109
a - Comparaison du pouvoir précipitant de l'antigène liquide et de l'antigène solide.....	109
b - Détermination de la dose optimale d'antigène-anticorps (titrage de l'antigène).....	110
c - Technique de micro-méthode de précipitation.....	112
B - Réactions d'hémagglutination conditionnée.....	114
 <u>CHAPITRE VI</u> - Recherche de l'allergie vis-à-vis du virus de l'Anémie Infectieuse.....	117
A - Pouvoir Allergène	117
B - Préparation d'antigène non virulent en vue d'un diagnostic allergique.....	121
 <u>CHAPITRE VII</u> - Cinétique de la réponse sérologique à l'infection.....	125
A - Détermination de la date d'apparition des anticorps précipitants après l'infection.....	125
B - Evolution des anticorps précipitants.....	126
 <u>CHAPITRE VIII</u> - Application du diagnostic sérologique à une enquête épidémiologique en France.....	131
A - Animaux soumis au sondage épidémiologique.....	131
1. Résultats portant sur des effectifs de che-vaux.....	131
2. Résultats des examens des sérums conservés au congélateur.....	136

3. Résultats portant sur les sérums reçus récemment.....	136
B - Relation entre les résultats du test de précipi- -tation et l'expression clinique.....	137
C - Rapport entre l'hyperimmunisation et la positiv- -té des réactions.....	138
D - Isolement du virus à partir de chevaux infectés de façon inapparente.....	139
E - Etude de différents facteurs épidémiologiques...	141
 <u>DISCUSSION:</u>	
<u>CHAPITRE I</u> - Réplication virale et épreuve de replication....	147
A - Culture du virus de l'A.I. en culture de leuco- -cytes de cheval.....	147
B - Effet cytopathogène sur les leucocytes de che- -val.....	147
I. Sur cellules vivantes.....	147
2. Après coloration.....	148
C - Valeur de l'effet cytopathogène pour l'apprécia- -tion de la réplication virale.....	149
D - Autres systèmes cellulaires.....	150
 <u>CHAPITRE II</u> - Etude du virus de l'A.I.....	153
A - Nature de l'acide nucléique.....	153
B - Filtration.....	153
C - Microscope électronique.....	154
 <u>CHAPITRE III</u> - Isolement et étude d'un herpès virus équin.....	157

<u>CHAPITRE IV</u> - Etude du pouvoir antigène.....	159
A - Préparation de l'antigène A.I.....	159
B - Nature de l'antigène.....	160
C - Spécificité de l'antigène.....	161
D - Unicité de l'antigène précipitant.....	162
E - Réactions non spécifiques.....	163
F - Electrophorèse de l'antigène.....	163
<u>CHAPITRE V</u> - Diagnostic sérologique.....	165
A - Précipitation en gélose et microtechnique.....	165
1. Spécificité du test de précipitation en gélose.....	165
2. Sensibilité du test.....	165
3. Avantages et inconvénients.....	166
B - Autre réaction sérologique " le test d'hémag- -glutination conditionnée.....	167
<u>CHAPITRE VI</u> - Recherche de l'allergie vis à vis de l'antigène A.I. des équidés.....	169
<u>CHAPITRE VII</u> - Cinétique de la réponse sérologique à l'infec- -tion.....	171
<u>CHAPITRE VIII</u> - Enquête épidémiologique.....	173
<u>CONCLUSIONS</u>	175
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	181

CLICHES:

1. Tapis de cellules d'aspect histiomonocytaire.....	65
2. Inclusions nucléaires.....	65
3. Inclusions éosinophiles.....	66
4. Syncytium coloré par l'acridine orange.....	76
5. Coloration par l'A.O. de leucocytes infectés.....	76
6. Particules virales de l'A.I.E.....	80
7. Cellules primaires de rein de singe infecté.....	83
8. Particules virales Herpès virus.....	86
9. Particules virales Herpès virus.....	88

PHOTOGRAPHIES:

I à 3. Test d'immunodiffusion par précipitation en gélose.....	104
4 à 6. Test d'immunodiffusion par précipitation en gélose.....	105
7. Cheval "SY" infecté chronique - Diagnostic allergique.....	118

