

# PREMIERE PARTIE

## MALADIES CONTAGIEUSES NON PARASITAIRES

### SUR UNE NOUVELLE MÉTHODE DE VACCINATION CONTRE LA PASTEURELLOSE DES BOVINS ET DES BUFFLES

par

L. DELPY et R. RASTEGAR

Sous le nom de Pasteurellose bovine, on désigne des états pathologiques très différents. Par exemple Jenes et Little (1921) ainsi que Tweed et Edington (1950) étudient des affections localisées à l'appareil respiratoire, et qui se rattachent à la broncho-pneumonie infectieuse de Nocard. En pareil cas, les *Pasteurella* isolées sont généralement peu pathogènes et souvent incapables de provoquer expérimentalement la maladie typique chez des animaux de même espèce. Les septicémies hémorragiques véritables, causées par les *Pasteurella*, sont des infections à évolution rapide, et sans localisation viscérale définie. Le Barbone du buffle ou encore la Pasteurellose bovine à forme œdémateuse rentrent dans cette catégorie et permettent d'isoler des souches de *Pasteurella* très virulentes, qui, inoculées aux bovidés, déterminent l'évolution de la maladie typique.

En Iran, le Barbone des buffles, et la Pasteurellose œdémateuse des bovins sévissent chaque année en certaines régions et entraînent une mortalité élevée. Les souches auxquelles nous ferons allusion proviennent de ces foyers. Le problème s'est donc posé de mettre au point un vaccin actif et stable, pouvant être utilisé dans la pratique avec autant de sécurité que le vaccin charbonneux, par exemple.

Les seuls vaccins dont un *contrôle expérimental* ait prouvé l'efficacité contre des souches réellement virulentes de *Pasteurella* sont le Lysat bactériophagique de d'Hérelle et le Louet et le vaccin sensibilisé de Jacotot. Le premier suppose l'isolement préalable d'un bactériophage actif, ce qui n'est point toujours facile. Le second se conserve peu de temps et nécessite l'emploi de sérum antipasteurellique dont la préparation est particulièrement fastidieuse. Nous avons donc repris l'étude de la question.

## I. — MICROBIOLOGIE

Nous étudierons ici trois souches isolées en partant de la moelle osseuse de bovins et de buffles, morts de septicémie hémorragique ordinaire bien caractérisée. Les os nous ont été envoyés par nos confrères, MM. les D<sup>rs</sup> Jacob, Mir Damadi et Zidon, à qui nous adressons nos remerciements.

La souche « N » a été obtenue directement par culture de moelle osseuse d'un bœuf, en bouillon peptone et gélose nutritive.

En ce qui concerne les souches K et R, les premières cultures, provenant de la moelle osseuse de buffles, étaient souillées par *Staphylococcus aureus* et *Bacterium coli*, et ont dû être passées sur lapin, procédé qui permet de retrouver en hémoculture les souches de *Pasteurella* suffisamment virulentes.

Ces trois souches n'ont pas présenté entre elles de caractères différentiels appréciables. Les souches bubalines K et R se sont montrées cependant plus exubérantes que la souche bovine N.

*Réactions biochimiques*

*Bouillon salé à 4 p. 100* : pas de culture.

*Eau de levure* : pas de culture.

*Lait* : Pas de coagulation après vingt-cinq jours, mais acidification légère.

*Gélatine* : pas de liquéfaction.

*H<sub>2</sub> S* : pas de noircissement de la gélose au plomb.

*Hémolyse* (gélose au sang à 6-8 p. 100, et bouillon au sang) : Les hématies de mouton, veau, cheval, lapin, cobaye, ne sont pas hémolysées, après deux jours d'étuve.

*Indol* : constamment produit en vingt-quatre heures en eau peptonée (peptone Chapoteaut).

*Action sur les hydrates de carbone*

Les solutions d'hydrates de carbone, stérilisées par filtration, ont été ajoutées dans la proportion de 1 p. 100 à de l'eau peptonée stérilisée (peptone Chapoteaut 30 p. 1.000). Nous avons employé comme indicateur le bleu de bromothymol et les cultures ont été observées pendant vingt-cinq jours. Le tableau I résume les résultats obtenus.

TABLEAU I

Aktion des trois souches de *Pasteurella* sur divers hydrates de carbone  
(Durée d'observation: 25 jours)

	PASTEURELLA-BUBALISEPTICA		P. BOVISEPTICA
	Souche «K»	Souche «R»	Souche «N»
Arabinose . . . . .	o	o	o
Xylose . . . . .	+	+	+
Rhamnose . . . . .	o	o	o
Glucose . . . . .	+	+	+
Levulose . . . . .	+	+	+
Galactose . . . . .	+	+	+
Mannose . . . . .	+	+	+
Maltose . . . . .	o	o	o
Saccharose . . . . .	+	+	+
Lactose . . . . .	o	o	o
Raffinose . . . . .	o	o	o
Amidon . . . . .	o	o	o
Dextrine . . . . .	o	o	o
Inuline . . . . .	o	o	o
Glycérine . . . . .	+ (12 j.)	+ (20 j.)	+ (17 j.)
Dulcitol . . . . .	o	o	o
Mannitol . . . . .	o	o	o
Sorbitol . . . . .	+ (2 j.)	+	+
Adonitol . . . . .	o	o	o
Erithritol . . . . .	o	o	o
Inositol . . . . .	o	o	o
Salicine . . . . .	o	o	o

Nota. — + Veut dire acidification sans gaz en vingt-quatre heures.

o Veut dire réaction négative.

J Précédé d'un nombre indique le jour d'apparition du virage.

Nous n'avons rien noté de particulier en ce qui concerne l'aspect des cultures, la morphologie des germes et leurs réactions tinctoriales.

Dans l'ensemble, les caractères biochimiques permettent de classer ces trois souches dans le groupe III de Jones(1921). Cependant, le mannitol n'est pas fermenté, tandis que le glycérol l'est constamment mais lentement. Tweed et Eddington (1930) ont d'ailleurs étudié deux souches qui fermentaient le glycérol. D'autre part, Ries et Nobrega (1936) donnent parmi les caractères de *Pasteurella avicida* groupe II, une fermentation tardive de cet alcool.

*Pouvoir pathogène*

Les souches N, K et R, sont extrêmement pathogènes pour le veau, le mouton, le lapin et le cobaye.

Une émulsion préparée en partant de cultures sur gélose, et titrant environ 100 millions de germes au centimètre cube, tue constamment le veau à la dose de 1/500<sup>e</sup> et même 1/1.000<sup>e</sup> de centimètre cube. Les sujets meurent en vingt-quatre à trente heures avec des lésions très caractérisées de septicémie hémorragique œdémateuse.

Avec 1/10.000<sup>e</sup> de centimètre cube de la même émulsion, on tue à coup sûr le lapin, en moins de vingt-quatre heures.

## II. — ESSAIS D'IMMUNISATION

## A. — Antigènes constitués par des microbes tués

1<sup>o</sup> Cultures virulentes formolées.

Expérience No 1.

a) Préparation de l'antigène. — On émulsionne en eau physiologique formolée à 5 p. 1.000 des cultures de quarante-huit heures, sur gélose nutritive, de *Pasteurella bovisptica* souche N. Cette émulsion qui renferme approximativement 150 millions de germes par centimètre cube est laissée sept jours à 37°.

b) Matériel d'épreuve. — Émulsion identique, mais en eau physiologique non formolée.

3 veaux de 18 mois à 2 ans, et 2 moutons de 2 ans reçoivent, sous la peau, des doses variables de l'antigène qui ne détermine aucune espèce de réaction. Ces cinq animaux et 2 témoins sont éprouvés treize jours plus tard. Le tableau II présente les résultats de l'expérience.

TABLEAU II

SUJETS	DOSES DE VACCIN	EPREUVE		RÉSULTATS	OBSERVATIONS
		effectuée après	avec (1)		
Veau 6-26 . . .	1 cmc.	13 j.	2 cmc.	mort 48 h.	Immunité antérieurement acquise
6-27 . . .	2	"	" "	" "	
6-28 . . .	10	"	" "	" 24 h.	
Mouton 5-232 .	1	"	1 "	" "	
5-233 .	2	"	" "	" "	
Veau 6-6 bis . .	Témoin	"	2 "	" "	
Mouton 5-218 .	"	"	1 "	résiste	

(1) On n'a pas déterminé par avance la D. M. M. de cette émulsion pour veau et mouton.

Ainsi 6 animaux sur 7 (5 vaccinés et un veau témoin) succombent en l'espace de vingt-quatre à quarante-huit heures avec les lésions locales et générales typiques et on retrouve le germe inoculé dans le sang et la moelle osseuse. Seul, le mouton témoin résiste, peut-être en raison d'une immunité naturelle préalablement acquise.

Cette expérience, en confirmant les résultats obtenus en particulier par Jacotot (1927), nous prouve que *Pasteurella bovisepctica* traitée par le formol perd simultanément sa virulence et ses propriétés antigéniques.

Signalons, cependant, qu'en vue de la production de sérum correspondant, nous avons réussi à vacciner le veau et l'âne par injection de doses importantes et répétées de cultures formolées.

Ces animaux ont, par la suite, résisté à l'inoculation du microbe vivant sans présenter d'accidents sérieux.

## 2° Cultures virulentes tuées par chaleur.

### Expérience No 2.

*Préparation de l'antigène.* -- Une émulsion en eau physiologique de *Pasteurella bovisepctica* souche N, est préparée comme les précédentes. Un titrage préalable montre que 1/500<sup>e</sup> de centimètre cube, soit environ 300.000 corps microbiens, tue à coup sûr un veau de 18 mois. Cette quantité d'émulsion constitue la *Dose sûrement mortelle* (D. S. M.) bien certainement supérieure à la *Dose minima mortelle* (D. M. M.) qu'il nous a paru impossible de déterminer avec certitude.

L'antigène est constitué par cette émulsion, stérilisée par un chauffage de vingt minutes à 60-62°.

Le matériel d'épreuve est constitué par l'émulsion non chauffée, l'unité étant la dose sûrement mortelle (D. S. M.) définie ci-dessus.

Le tableau III présente les résultats de l'expérience.

TABLEAU III

NUMÉRO DES ANIMAUX	DOSES DE VACCIN	EPEUVE		RÉSULTATS
		Dates	Doses	
Veau 6-289 . .	2 cmc.	20 <sup>e</sup> j.	10 D. S. M. « Souche K »	mort en 24 heures
» 6-296 . .	1 »	20 <sup>e</sup> j.	5 D. S. M. « Souche N »	» »
» 6-308 . .	Témoin		1 D. S. M. « Souche K »	» »
» 6-310 . .	»		1 D. S. M. « Souche N »	» »

Cet antigène ne confère visiblement aucun degré d'immunité. Nous avons d'ailleurs ultérieurement, en expérimentant un antigène saponiné (voir expérience XII, et tableau XI) employé comparativement, une fois de plus, des cultures tuées par la chaleur. Les résultats ont confirmé ceux de l'expérience II.

### B. — Antigène constitué par des agressines naturelles

Divers auteurs ayant fait connaître la possibilité de vacciner contre la Pasteurellose bovine en utilisant des agressines naturelles ou artificielles, nous avons voulu vérifier si l'énorme quantité de liquide d'œdème que l'on peut obtenir sans difficultés par inoculation expérimentale du veau, possède des propriétés immunisantes.

#### *Expérience No 3.*

a) *Préparation de l'antigène.* — Les tissus de tumeur et l'œdème du point d'inoculation, prélevés sur un veau mort de Pasteurellose expérimentale, sont passés immédiatement au Latapie. Nous avons additionné la pulpe et le liquide obtenus, de leur volume d'eau physiologique et nous avons laissé macérer pendant quarante-huit heures. Après avoir été décanté et dégrossi le liquide obtenu fut filtré sur bougie L3 (Pression 25 mm. de mercure).

Le filtrat, dont l'asepsie fut vérifiée par ensemencement en bouillon et gélose, fut conservé en ampoules.

b) *Inoculation et épreuve.* — Deux veaux du pays, les nos 6-21 et 6-22, reçoivent le premier: 10 cmc., le second: 1 cmc., de ce produit sous la peau. Aucune réaction locale ni générale n'a suivi l'inoculation.

Le quinzième jour le veau 6-21 est éprouvé avec 1 cmc. d'une culture en bouillon de la souche « N ». Il meurt en vingt-quatre heures avec les lésions classiques de pasteurellose suraiguë.

En présence de ce résultat, on a jugé inutile d'éprouver le veau 6-22 qui avait reçu une quantité d'agressine dix fois moindre.

### C. — Antigènes constitués par des microbes vivants et de virulence atténuée

#### 1° *Microbes atténués par vieillissement.*

#### *Expérience No 4.*

*Préparation de l'antigène.* — Des cultures en bouillon ont été laissées de vingt à trente jours à l'étuve, puis quinze jours à la température du laboratoire. Elles étaient au bout de ce temps encore vivantes et un dépôt muqueux, difficile à dissocier, s'était formé au fond des tubes. Cet antigène ne détermine aucune espèce de réaction et, comme le montre le tableau IV, un des sujets éprouvé avec 5 D. S. M. est mort dans les mêmes conditions que le témoin.

TABLEAU IV

SUJETS	DOSES DE VACCIN	ÉPREUVE		RÉSULTATS	OBSERVATIONS
		Date	Doses		
Veau 6-167 . .	1/10 de cmc.	32 j.	5 D. S. M.	mort en 36 h.	non éprouvé
» 6-53 . . .	1/5 de cmc.				
» 6-154 . . .	1/10 de cmc. re-piquage en bouillon de 24 heures				
» 6-175 bis .	Témoin		1 D. S. M.	mort en 36 h.	non éprouvé

Nous n'avons pas jugé utile de poursuivre nos recherches dans cette direction, car un procédé d'immunisation basé, par exemple, sur la pratique de plusieurs injections successives, ne peut être considéré, surtout en Iran, comme satisfaisant.

D'autre part, en supposant que l'on obtienne cet heureux degré d'atténuation qui ferait d'une culture virulente un antigène actif et inoffensif, il faudrait encore stabiliser le vaccin, afin d'assurer sa conservation aux diverses températures extérieures. Ceci, en l'état actuel de nos connaissances, paraît impossible.

## 2° *Microbes atténués par culture en liquide d'œdème spécifique.*

### *Expérience No 5.*

a) *Modifications subies par Pasteurella bovisepctica, au cours de cultures successives en liquide d'œdème (Agressines naturelles)*

Le milieu a été préparé en broyant les tissus œdématisés prélevés au niveau de la lésion locale de veaux morts de Pasteurellose expérimentale. Le liquide ainsi obtenu fut ajusté à pH 7,5 et filtré sur bougie L3. Après avoir vérifié la stérilité du milieu, nous avonsensemencé notre souche «N» en partant d'une culture en bouillon poptone, à raison de 11 gouttes pour chaque tube d'agressine.

Après vingt-quatre heures à 37°, les cultures sont toujours très faibles et un louche à peine perceptible apparaît dans le milieu, en même temps qu'un dépôt léger et granuleux se produit au fond du tube.

Ce dépôt augmente les jours suivants, mais le milieu devient clair ou reste à peine troublé, il n'est jamais muqueux ni adhérent à l'anse de platine, mais au contraire granuleux et se dissocie partiellement par agitation du tube. Cette agitation détermine un trouble net avec présence de petits granules qui n'ont pu être dissociés.

Nous n'avons jamais observé dans ces cultures, la formation de collerette, ni de voile léger en surface, qui est à peu près de règle dans les cultures en bouillon ordinaire.

*Aspect microscopique.* — Au bout de vingt-quatre heures les *Pasteurella* ont généralement très peu changé de forme, mais leur nombre est plus faible que dans les cultures

en bouillon ordinaire. Les jours suivants et au cours des passages successifs elles prennent la forme de cocci ou de bacilles courts, souvent auto-agglutinés, en amas, et se colorant plus difficilement. On voit enfin de très rares formes dégénérées, sans espace clair central, longues ou en massue.

*Modification de la virulence.* — Au premier passage en agressine la *Pasteurella* n'est pas sensiblement atténuée et on tue les veaux inoculés avec 1/10 de cmc. d'une culture vieille de 10 jours.

Pour éviter l'effet d'un vieillissement prolongé à l'étuve, nous avons pratiqué des repiquages en agressine le neuvième ou le dixième jour de culture.

Au deuxième passage, l'atténuation n'est pas davantage appréciable et le veau inoculé avec 1/10 de cmc. d'une culture vieille de 10 jours meurt de pasteurellose.

Au troisième passage le microbe s'atténue d'une façon sensible à partir du sixième jour d'étuve et, alors que 1/10 de cmc. d'une culture de six jours tue le veau en quarante-huit heures, la même dose d'une culture de dix jours n'a pas tué deux veaux sur deux.

Cependant, la marge d'atténuation n'est pas très grande et 1/5 de cmc. du troisième passage au dixième jour de culture tue le veau en trente-six heures.

Enfin un repiquage du troisième passage en bouillon ordinaire ne tue plus le veau à la dose de 1/10 de cmc.

Le tableau V résume la marche d'atténuation et le résultat des épreuves.

TABLEAU V

No DES SUJETS	DOSÉS INOCULÉES	MATÉRIEL	RÉSUL- TATS	EPREUVE		RÉSUL- TATS
				Dates	Doses	
Veau 6-97 . .	1/10 de cmc.	1 <sup>er</sup> Pass., 9 <sup>e</sup> j.	mort 48 h			
• 6-136 . .	•	2 <sup>e</sup> Pass., 10 <sup>e</sup> j.	•			
• 6-103 bis	•	3 <sup>e</sup> • 6 <sup>e</sup> j.	•			
• 6-152 . .	•	• 10 <sup>e</sup> j.	résiste	33 <sup>e</sup> j.	5 D.S.M.	mort en 4 jours
• 6-187. .	1/5	•	mort 36 h.			
• 6-175 bis	témoin	•			1 D.S.M.	mort en 36 h.

#### Expérience No 6.

Dans cette expérience nous avons obtenu une atténuation appréciable de *Pasteurella bovisseptica* souche «N» au deuxième passage et à partir du dixième jour de culture. Le tableau VI résume les résultats de l'expérience.

TABLEAU VI

No DES SUJETS	DOSES	MATÉRIEL	RÉSULTATS	ÉPREUVE		RÉSULTATS
				Date	Doses	
6-33 6-44	1/10 de cmc. 1/10 de cmc.	1 <sup>er</sup> pass., 7 <sup>e</sup> j. 2 <sup>e</sup> pass., 10 <sup>e</sup> j.	mort en 48 h. résiste	15 j.	2 D. S. M.	Réveil de Theileriose (1)

En résumé, l'atténuation de *Pasteurella boviséptica* par culture en liquide d'œdème spécifique est très lente, mais sûre. Elle est appréciable au second ou au troisième passage quand chaque passage est effectué au dixième jour de culture.

Après trois passages et un mois d'étuve elle n'est cependant pas très importante puisque 1/5 de cmc. du dernier passage est capable de tuer le veau en trente-six heures.

Enfin, *Pasteurella boviséptica* atténuée dans ces conditions ne provoque ni réaction apparente ni immunité solide. En effet, sur deux veaux ayant résisté à l'inoculation du microbe au deuxième et au troisième passage, l'un éprouvé avec 2 D. S. M. résiste malgré un accès concomitant de theileriose, mais l'autre, éprouvé avec 5 D. S. M., succombe avec une survie de trois jours sur le témoin.

#### D.— Antigènes constitués par des microbes vivants et virulents additionnés de diverses substances

Nous avons utilisé, d'une part, les *corps gras*, dont Ramon et ses collaborateurs ont su tirer un si grand parti, d'autre part, la *sygonine*. À l'origine nous n'attendions pas de ces substances une action directe sur le microbe, mais nous espérions que leur action sur l'organisme des sujets inoculés se traduirait par un blocage des germes virulents au point d'inoculation, et par l'installation de l'immunité, selon le mécanisme mis en lumière par Ramon.

<sup>10</sup> *Microbes enrobés dans des excipients gras.*

*Préparation des antigènes.*—La quantité voulue de corps microbiens

(1) L'accès de theileriose a commencé le troisième jour après l'inoculation d'épreuve et a duré huit jours. Le sujet était exposé aux piqûres de tiques depuis vingt-cinq jours lorsqu'il a été inoculé et était en période d'incubation.

évaluée en D. S. M., et préalablement suspendue en eau physiologique, a été incorporée, soit à de l'huile d'olive de fabrication iranienne, qui est neutre au tournesol, soit à de l'huile d'olive médicinale de fabrication anglaise, soit au mélange huile-lanoline préparé selon la formule de Ramon :

Lanoline . . . . .	6 gr.
Huile d'olive . . . . .	14 gr.

*Expérience No 7.*

Dans cette expérience, les excipients gras ont été additionnés d'une D. S. M. de *Pasteurella bovisseptica* souche «N». Les inoculations pratiquées sous la peau de l'encolure ou dans les plis sous-caudaux furent suivies par une faible réaction locale, sans aucune réaction générale. Le tableau VII montre que vingt-cinq jours plus tard, les sujets vaccinés ne présentaient aucune immunité appréciable.

TABLEAU VII

No DES SUJETS	Nature de L'excipient et Dose injectée	NOMBRE DE D. S. M.	RÉSULTAT	EPREUVE		RÉSULTATS
				Date	Dose	
Veau 6-185 . .	huile (1 cmc.)	1	résiste	30 <sup>e</sup> j.	5 D. S. M.	mort 35 h.
» 6-188 . .	huile-lanol.1cmc.	1	»	»	»	»
» 6-180 . .	huile1 cmc.	1	»	»	»	non éprouvé
» 6-183 . .	huile-lanol.1cmc.	1	»	»	»	»
6-175 bis	témoin				1 D. S. M.	mort 36 h.

*Expérience No 8.*

L'expérience 7 nous avait montré que les *Pasteurella*, enrobées dans un corps gras, perdent leur pouvoir virulent, au point qu'une D. S. M. se montre totalement inoffensive. L'inoculation d'une telle dose n'ayant été suivie d'aucune immunité, nous avons recherché s'il était possible d'obtenir un meilleur résultat en augmentant le nombre de microbes.

Dans ce but nous avons préparé les antigènes suivants:

- a) 4 D. S. M. de *P. bubaliseptica* souche «R» dans 2 cmc. d'huile d'olive.
- b) 4 D. S. M. de *P. bubaliseptica*, souche «R», dans 2 cmc. du mélange huile-lanoline.
- c) 6 D. S. M. de *P. bovisseptica*, souche «N», dans 1 cmc. d'huile d'olive.

Le tableau VIII montre que dans ces conditions la présence des corps gras n'a pu empêcher l'évolution de l'infection mortelle.

TABLEAU VIII

No DES SUJETS	NATURE DE L'EXCIPIENT	QUANTITÉS INJECTÉES	RÉSULTATS	OBSERVATIONS
Veau 6-225 . . .	Huile d'olive	6 D. S. M. (1 cmc.)	mort 3 jours	
» 6-334 . . .	Huile d'olive	4 D. S. M. (2 cmc.)	mort 2 jours	
» 6-348 . . .	Lano-huile	4 D. S. M. (2 cmc.)	mort 4 jours	

\*\*\*

Ces expériences nous ayant permis de constater que, par ailleurs, les *Pasteurella* sont tuées en moins de quarante-huit heures, dans l'huile ou la lanoline, ce qui rend nécessaire l'utilisation de l'antigène dans les heures qui suivent sa préparation, nous avons renoncé à l'utilisation des excipients gras.

2° *Microbes vivants et virulents en suspension dans une solution de saponine.*

a) *Préparation des antigènes.* Une série d'essais pratiqués sur des veaux nous ont permis de déterminer que 0,5 à 1 cmc. d'une solution à 5 p. 100 de saponine Poulenc exempte de microbes provoquent, en injection sous-cutanée, une assez forte tuméfaction, bien localisée, sans tendance à la suppuration ni à la nécrose, qui se résorbe progressivement en une vingtaine de jours.

Nos antigènes ont été préparés en ajoutant à cet excipient, au moment de l'inoculation, la dose voulue de *Pasteurella*.

b) *Influence du point d'inoculation.* Nous savions, et nous avons vérifié au cours de l'expérience présente, qu'une D. S. M. de *Pasteurella* agit de façon identique, quel que soit le point d'inoculation choisi. Il est surprenant, et il nous paraissait dès l'abord difficilement explicable, que le lieu d'inoculation paraisse jouer un rôle important dans le seul cas où le microbe est suspendu dans une solution de saponine.

Si, en effet, deux veaux sont inoculés avec le même antigène constitué par une D. S. M. de *Pasteurella bouiseptica* en suspension dans une solution de saponine, on constate que celui qui est inoculé sous la peau de l'encolure succombe aussi vite que le témoin, tandis que celui qui est inoculé sous la peau des plis sous-caudaux résiste.

En outre, l'inoculation dans la région sous-caudale est suivie par

une réaction locale sans gravité et par une brève hyperthermie, et elle confère au sujet vacciné un état d'immunité qui lui permet de résister, après douze jours, à une forte inoculation d'épreuve.

Les constatations, qui précèdent, résultent de l'expérience 9. résumée par le tableau IX.

Cependant, les recherches récentes de G. Ramon et de ses collaborateurs, sur l'influence des substances adjuvantes dans l'immunité peuvent, nous semble-t-il maintenant, expliquer ces différents faits. En effet, lorsque les germes vivants, en suspension dans la solution de saponine, sont introduits dans le tissu conjonctif *très lâche* de l'encolure, ils y cultivent abondamment et peuvent aisément envahir l'organisme d'où la mort rapide de l'animal. Par contre, lorsque l'inoculation est faite dans le tissu sous-cutané très dense des plis sous-caudaux, la réaction inflammatoire qui s'installe du fait de la saponine est limitée, la densité du tissu s'oppose à la diffusion des germes, seuls les produits solubles qu'ils élaborent dans le foyer inflammatoire limité, ou qui résultent de leur lyse, sont résorbés et sont, sans doute, responsables de l'immunité solide qui s'établit ainsi :

TABLEAU IX

No DES SUJETS	DOSE INJECTÉE	LIEU D'INOCULATION	RÉSULTATS	ÉPREUVE		RÉSULTATS
				Date	Dose	
Veau 6-41 bis .	1 D. S. M. saponine	encolure	mort 48 h.			
" 6-117 . . .	" "	"	mort 36 h.			
" 6-50 . . .	" "	queue	résiste	13 <sup>e</sup> j.	1 D. S. M.	résiste
" 6-116 . . .	" "	"	"	21 <sup>e</sup> j.	5 D. S. M.	résiste
" 6-113 . . .	1 D. M. M. (témoin)	queue	mort 24 h.			
" 6-85 . . .	" "	encolure	mort 36 h.			

Les résultats encourageants de cette expérience sont malheureusement limités dans leur application par deux ordres de faits :

1<sup>o</sup> Si l'antigène injecté dans les plis sous-caudaux renferme *deux* D. S. M. de *P. bovisepitica*, au lieu d'une seule, l'infection se généralise et le sujet meurt de Pasteurellose. Par conséquent, une erreur de vaccination peut entraîner des accidents sérieux.

2<sup>o</sup> Les solutions de saponine à 5 p. 100 suppriment la vitalité de *Pasteurella bovisepitica* en moins de quarante-huit heures. Après ce délai, les suspensions sont stériles et les ensemencements restent négatifs.

Nous avons envisagé la possibilité de délivrer aux vaccinateurs.

en ampoules séparées, la suspension microbienne et la solution de saponine qui eussent été mélangées au moment de l'emploi. La suite de nos recherches nous a fort heureusement dispensés d'avoir recours à ce procédé dont les inconvénients ne nous échappaient nullement.

E. — *Méthode nouvelle de vaccination basée sur l'emploi d'un lysat microbien saponiné*

L'action antiseptique rapide de la saponine sur nos *Pasteurella*, nous conduisit à des recherches plus précises sur la résistance de ces microbes.

Si l'on met une quantité déterminée de *Pasteurella boviséptica* en suspension dans de l'eau physiologique, et que l'on stérilise par vingt minutes de chauffage à 60-62°, l'on constate, pendant les heures suivantes, que les microbes se déposent lentement au fond du tube. Après vingt-quatre heures, il s'est constitué un culot assez important mais le liquide reste néanmoins trouble.

Si la même quantité de microbes est suspendue dans une solution de saponine à 5 p. 100, il ne se forme pas de dépôt, mais on assiste à un éclaircissement progressif du milieu. La comparaison des deux suspensions après vingt-quatre heures est très démonstrative et on ne peut éviter de penser qu'il s'est produit, dans la solution de saponine, une *lyse microbienne*, comparable à celle qui résulte de l'action du bactériophage.

Si les deux tubes sont laissés quelques jours à l'étuve, aucune modification n'apparaît dans la suspension en eau physiologique. Dans la saponine, au contraire, se produit un léger précipité, qui, à l'examen microscopique ne renferme que des corps microbiens extrêmement rares, et qui peut être d'origine chimique. Le culot constitué dans la suspension en eau physiologique est formé par des *Pasteurella*.

A cette première observation correspondent les expériences suivantes:

*Expérience No 10.*

L'antigène est constitué par une très forte quantité de corps microbiens, soit 500 D. S. M. de *Pasteurella boviséptica*, souche N, en suspension dans la solution de saponine à 5 P. 100. Ceci représente en volume: 1 cmc. de suspension microbienne pour 9 cmc. de solution de saponine.

Après vingt-quatre heures, cette préparation est stérile et nous la conservons huit jours à la température du laboratoire.

Le veau 6-197 reçoit sous la peau 1 cmc. de cet antigène. On observe les jours suivants une réaction locale nette mais bien limitée et une brève réaction thermique. Le dix-huitième jour, la réaction locale a disparu et l'animal est éprouvé par injection sous-cutanée de 5 D. S. M. de *Pasteurella boviséptica*, souche N. Il supporte parfaite-

ment cette inoculation, tandis qu'un témoin qui avait reçu une seule D. S. M. du même microbe meurt en vingt-quatre heures (témoin 6-175 bis).

*Expérience No 11.*

L'antigène a été préparé tout comme dans l'expérience précédente, à la même concentration microbienne et en employant la saponine Poulenc. Il a été conservé neuf jours à la température du laboratoire. Cette expérience, qui avait pour but de déterminer la dose optima de l'antigène, est résumée par le tableau X.

TABLEAU X

No DES VEAUX	QUANTITÉ DU VACCIN	ÉPREUVE		RÉSULTATS
		Date	Dose	
Veau 6-227 . . .	1 cmc. s. c. enclure	20 <sup>e</sup> jour	10 D.S.M.	résiste
» 6-228 . . .	2 cmc. s. c. enclure	15 <sup>e</sup> jour	5 D.S.M.	résiste
» 6-229 . . .	3 cmc. s. c. enclure	19 <sup>e</sup> jour	10 D.S.M.	résiste
» 6-196 bis	témoin	28-7-16	1 D.S.M.	mort 24 heures

Les veaux inoculés avec 2 et 3 cmc. d'antigène ont présenté des réactions locales assez importantes (tuméfaction de 15 cm. de diamètre), et leur température s'est maintenue pendant vingt-quatre heures au-dessus de 40°, sans autre altération de l'état général. Le veau inoculé avec 1 cmc. a présenté une réaction locale plus faible, et n'a pas eu de fièvre.

Les 3 sujets ont également bien supporté l'inoculation d'épreuve de 5 et 10 D. S. M. de *P. bovisepti* a souche N, alors que le témoin est mort en vingt-quatre heures après inoculation d'une seule D. S. M.

*Expérience No 12.*

L'antigène a été préparé avec une saponine différente, marque Riedel, mais à la même concentration microbienne que dans les essais précédents. En même temps nous avons préparé une suspension identique en eau physiologique, qui fut stérilisée par chauffage.

L'antigène saponiné ne se montra stérile que le sixième jour, alors que la saponine Poulenc tue la totalité des microbes en vingt-quatre heures.

Les résultats de l'expérience sont résumés par le tableau XI.

TABLEAU XI

No DES VEAUX	NATURE DE L'ANTIGÈNE	DOSES	RÉSULTATS	ÉPREUVE		RÉSULTATS
				Date	Doses	
Veau 6-215 bis	M. saponinés	2 cmc.	résiste	25 <sup>e</sup> j.	50 D. S. M.	résiste
» 6-216 bis	M. tués par la chaleur	2 cmc.	»	25 <sup>e</sup> j.	» »	mort 24 heures
» 6-223 . .	» »	2 cmc.	»	28 <sup>e</sup> j.	10 D. S. M.	mort 24 heures
» 6-219 bis	» »	2 cmc.	»	30 <sup>e</sup> j.	3 D. S. M.	mort en 3 jours et demi
» 6-284 . .	témoin				1 D. S. M.	mort en 24 h.

Il se trouve tout d'abord confirmé que les corps microbiens tués, mais non lysés, sont sans action.

En second lieu, l'antigène préparé avec la saponine Riedel, dont l'action bactéricide et lytique est lente, a provoqué une réaction locale diffuse et intense, accompagnée d'une hyperthermie de 105, pendant vingt-quatre heures. L'immunité conférée a permis à notre sujet de supporter, sans aucun trouble, l'inoculation de 50 D. S. M. de *P. bovis-septica*, souche N, alors que le témoin (6-284) est mort en vingt-quatre heures après avoir reçu une seule D. S. M.

*Expérience No 13.*

Nous avons utilisé les antigènes suivants :

I. Même antigène que dans les expériences précédentes.

II. Antigène renfermant une quantité double de microbes, soit 1 000 D. S. M. (2 cmc d'émulsion) dans 8 cmc. de solution de saponine. Poulenc à 5 p. 100.

Ces deux antigènes étaient stériles après avoir séjourné quarante-huit heures à l'étuve, mais ont été conservés douze jours à la température du laboratoire. Les sujets ont reçu des doses différentes, comme le montre le tableau XII.

TABLEAU XII

No DES ANIMAUX	DOSE ET NATURE DU VACCIN	RÉACTIONS POSTVACCINALES	ÉPREUVE		RÉSULTATS
			Date	Dose et nature	
6-298 V . .	1 cmc. antigène No I	R. locale accept.	17 <sup>e</sup> j.	30 D. S. M. souche K	résiste
6-297 V . .	2 cmc. »	» » »	26 <sup>e</sup> j.	30 D. S. M. souche N	»
6-299 V . .	2 cmc. » No II	R. locale assez forte	22 <sup>e</sup> j.	15 D. S. M. souche K	»
6-291 V . .	2 cmc. » »	R. locale forte. R. générale faible	22 <sup>e</sup> j.	30 D. S. M. souche K	»
6-279 V . .	2 cmc. » »	R. locale accept.	23 <sup>e</sup> j.	60 D. S. M. souche K	mort
6-308 V . .		Témoin souche K		1 D. S. M. souche K	»
6-310 V . .		» » N		1 D. S. M. souche N	»

Cette expérience appelle les remarques suivantes :

1<sup>o</sup> Tous les veaux ont fait une réaction locale nette et une hyperthermie de courte durée. Cependant, la réaction a été plus forte chez les sujets qui ont reçu l'antigène II: l'un d'entre eux présentait encore après un mois une tumeur indolore, grosse comme le poing, qui a d'ailleurs disparu vers le quarante-cinquième jour, sans laisser de traces.

2<sup>o</sup> On remarquera que 4 veaux ont été éprouvés avec une souche nettement différente de celle qui a servi à préparer les antigènes : les antigènes ont été préparés avec *P. bovisseptica* souche N, et ces animaux ont été éprouvés avec *P. bubaliseptica* souche K. Une seule D. S. M. de chacune de ces souches a tué les témoins en vingt-quatre heures, tandis que nos vaccinés ont parfaitement supporté 30 D. S. M.

Il est donc permis de supposer que notre antigène possède une certaine plurivalence, ce qui, en matière de Pasteurellose, est important.

3<sup>o</sup> Un veau éprouvé avec 60 D. S. M. est mort de Pasteurellose. Rappelons, cependant, que nos D. S. M., sont certainement bien supérieures à la dose *minima mortelle stricte*

### CONSERVATION DU VACCIN

#### Expérience No 14

Nous avons essayé l'efficacité de nos antigènes après trente et soixante-cinq jours de conservation, sans aucune précaution, à la lumière et à la température du laboratoire.

Le veau 6-221, vacciné avec 2 cmc. de cet antigène conservé depuis trente-cinq jours, supporte ultérieurement sans aucune réaction l'inoculation de 50 D. S. M. de *P. bovisseptica*.

Le veau 6-292, vacciné avec 2 cmc. du même antigène conservé depuis soixante-cinq jours, supporte sans réaction l'inoculation de 50 D. S. M.

Dans les deux cas les témoins (6-284 et 6-310) sont morts vingt-quatre heures après inoculation d'une seule D. S. M. de la même souche.

### VACCINATION PAR LE LYSAT FILTRÉ

#### Expérience No 15.

L'examen des suspensions microbiennes en milieu saponiné nous avait permis de conclure à un phénomène de lyse et à la libération de molécules douées de propriétés antigènes. Pour plus de certitude, nous avons filtré notre antigène sur bougie L2 et inoculé 3 veaux, selon le tableau suivant (tableau XIII).

TABLEAU XIII

No DES VEAUX	DOSES DE FILTRAT INOCULÉ	ÉPREUVE		RÉSULTATS
		Date	Dose	
Veau 6-262 bis .	3 cmc.	24 <sup>e</sup> jour	2 D. S. M.	résiste
» 6-285 bis .	2 cmc.	25 <sup>e</sup> jour	5 D. S. M.	»
» 6-286 bis .	2 cmc.	27 <sup>e</sup> jour	15 D. S. M.	mort en 48 h.
» 6-349 . . .	témoin		1 D. S. M.	mort en 24 h.

On remarquera qu'une dose de filtrat égale à la dose normale d'antigène total (2 emc.) a permis à un veau de résister à l'inoculation de 5 D. S. M., tandis qu'un autre est mort après inoculation de 15 D. S. M. D'autre part, un veau préparé par injection de 5 emc. de filtrat a parfaitement supporté 2 D. S. M. La valeur immunisante du filtrat, et par conséquent la présence de substances antigéniques filtrables ne font aucun doute. A dose égale, le filtrat est moins actif que l'antigène total. Ceci résulte, croyons-nous, d'un appauvrissement quantitatif par fixation de l'antigène au réseau filtrant. Il est improbable, en effet, que les corps microbiens qui résistent à l'action de la saponine aient un rôle dans l'installation ou le renforcement de l'immunité. Dans aucune de nos expériences nous n'avons vu ces corps microbiens intacts se comporter comme des antigènes : vivants et virulents, ils tuent, morts ou atténués ils sont sans aucune action. Ce point n'a d'ailleurs qu'une importance théorique.

Des expériences X, XI, XII, XIII et XIV, nous concluons :

Une solution de saponine à 5 p. 100 lyse en moins de quarante-huit heures *Pasteurella bovisseptica*. Le lysat est doué de propriétés antigéniques telles qu'une injection de 1 à 2 emc. permet à un veau réceptif, de résister sans aucun trouble à l'inoculation de 50 D. S. M. de *Pasteurella bovisseptica*, pratiquée après douze jours.

Les doses peuvent être doublées sans inconvénients sérieux pour le sujet. Le lysat conserve ses propriétés après un séjour *minimum* de soixante-cinq jours à la température du laboratoire. Enfin les sujets vaccinés avec un antigène d'origine bovine sont immunisés contre une souche bubaline d'origine géographique différente.

Le lysat saponiné présente donc toutes les qualités exigibles d'un vaccin, et ne paraît pas moins efficace que le lysat bactériophagique.

Une première campagne de vaccination a été entreprise, dont les résultats seront publiés ultérieurement.

## SOMMAIRE

1<sup>o</sup> Nous nous sommes proposés de transformer en vaccins utilisables avec sécurité dans la pratique courante, des souches de *Pasteurella* extrêmement virulentes et provoquant chez des bovidés des enzooties meurtrières de septicémie hémorragique œdémateuse.

2<sup>o</sup> Nous n'avons pas réussi à conférer aux bovidés un degré d'immunité appréciable en utilisant :

a) Des corps microbiens tués par la chaleur ou par le formol. (Expériences I et II.)

b) Le liquide d'œdème spécifique (agressines naturelles). (Exp. III.)

c) Les microbes atténués par vieillissement (exp. IV) ou par culture en liquide d'œdème (exp. V). Cette dernière méthode permet cependant d'atténuer graduellement *P. bovisseptica*, tout en lui conservant un certain pouvoir immunisant (exp. VI.)

d) Les microbes *vivants et virulents*, suspendus dans des corps gras ou une solution de saponine à 5 p. 100. (Exp. VII, VIII, IX). Nous montrons qu'il est cependant possible d'obtenir un certain degré d'immunité, en inoculant en des points déterminés les microbes suspendus en solution de saponine.

5° Nous avons obtenu un vaccin inoffensif, actif et stable, en soumettant *in vitro* à l'action d'une solution de saponine à 5 p. 100 des *Pasteurella bovisseptica* virulentes. La saponine exerce sur le microbe une action lytique comparable, quant à ses résultats, à celle du bactériophage. Les animaux qui ont reçu 1 ou 2 cmc. de ce vaccin sont, après une réaction très acceptable, en état de subir sans dommages l'inoculation de 50 doses sûrement mortelles de *Pasteurella bovisseptica*, les témoins étant régulièrement tués en vingt-quatre ou quarante-huit heures par une seule de ces doses. (Exp. X à XV.)

