

YERSINIA PESTIS
VACCIN EV ET CYCLOPHOSPHAMIDE
CHEZ LA SOURIS

par

Edouard-R. BRYGOO et Solo RAJENISON

Voici déjà vingt ans que des auteurs s'intéressèrent au comportement des souches vaccinales vivantes de *Yersinia pestis* chez des sujets soumis à une thérapeutique immunodépressive. Ainsi D.-F.-E. PAYNE et ses collaborateurs, en 1955, démontrèrent qu'une seule injection de cortisone chez des souris inoculées avec la souche EV76 entraînait une généralisation mortelle de l'infection tandis qu'elle restait sans effet sur celles inoculées avec la souche Tjiwidej et la souche A 1122. En 1957, G. GIRARD confirmait qu'une seule dose de cortisone administrée avant l'injection intrapéritonéale de 50 000 germes de la souche EV entraînait la mort de la souris par infection mixte et que *Y. pestis* pouvait être isolé du sang. Cependant, des passages en séries chez des animaux soumis à la cortisone ne modifiaient pas le comportement de la souche chez des animaux normaux. Les observations de T. HAYASHIDA (1957) l'amènèrent à conclure que l'administration d'ACTH entraînait une nette diminution de la résistance des rats blancs à la souche EV. En 1958, S.-L. BLYAKHER confirmant qu'une seule injection de cortisone augmente nettement la sensibilité de la souris aux souches de peste de faible virulence suggérait que cette méthode expérimentale pourrait permettre d'isoler des souches à partir de matériel suspect ne contenant que peu de germes ou de faible virulence. Nous n'avons pas eu connaissance d'une application pratique de cette méthode.

Dans le but d'améliorer les conditions d'isolement des souches de *Yersinia pestis*, à partir du matériel reçu au laboratoire, nous avons, depuis 1969, utilisé deux immunodépresseurs.

En 1969, l'utilisation de la Rubidomycine, tout en mettant en valeur le principe même de la technique, ne nous donnait cependant pas entière satisfaction, les animaux étant trop fragilisés. Par contre, avec la cyclophosphamide (1973), nous obtenions des résultats tels qu'ils permettaient de recommander la technique à tous les laboratoires confrontés aux problèmes de l'isolement de *Yersinia pestis*.

Connaissant d'une part les travaux précédemment cités sur l'augmentation du pouvoir pathogène de la souche EV pour des sujets soumis à une thérapeutique immunodépressive par cortisone ou ACTH, ayant d'autre part la pratique de l'utilisation de la cyclophosphamide nous nous sommes demandés si une vaccination par vaccin EV ne pouvait pas être dangereuse pour un sujet soumis à cet immunodépresseur.

EXPÉRIMENTATION

De novembre 1973 à juillet 1974, nous avons procédé à 6 séries d'inoculations expérimentales en faisant varier différents facteurs.

Nous avons utilisé des souris blanches non sélectionnées, de notre élevage local ; les boîtes, contenant chacune 3, 5 ou 6 souris, étaient tirées au sort au moment des inoculations.

Toutes les injections, vaccin, suspension virulente, solution de cyclophosphamide étaient pratiquées par voie intrapéritonéale, sous un volume de 0,20 ml.

La posologie de la cyclophosphamide est celle que nous avons proposée en 1973. La première injection avait lieu vingt-quatre heures après l'injection vaccinale.

La souche EV 76 a été utilisée sous la forme d'une suspension en eau physiologique à partir d'une culture de 3 jours sur gélose, à 26° C.

L'inoculation d'épreuve utilisait la souche 4/62 de *Yersinia pestis* régulièrement employée pour nos recherches antérieures ; elle intervenait 10 jours après la fin du traitement par cyclophosphamide, soit 16 jours après l'injection vaccinale.

RÉSULTATS

1° *La cyclophosphamide ne permet pas à la souche EV de manifester son pouvoir pathogène*

Dans l'expérience B, deux lots de 12 souris reçoivent respectivement 40 000 et 400 000 germes EV ; l'une de celles inoculées avec la plus forte dose meurt après la deuxième injection de cyclophosphamide. La rétroculture reste stérile.

Dans l'expérience C, 5 des 12 souris inoculées avec 20 000 germes EV meurent en cours d'observation mais il s'agissait d'une infection intercurrente ainsi que le démontrait d'ailleurs la mort de 10 des 12 souris inoculées avec le même vaccin EV, mais tué par chauffage. Les rétrocultures ne permirent pas de récupérer la souche vaccinale chez les 5 animaux morts en cours d'observation.

Dans les 4 autres expériences aucune mortalité n'était observée chez les souris vaccinées et soumises au traitement par la cyclophosphamide.

EXPÉRIENCE

A : 15 souris, par groupe de 3, reçoivent des doses croissantes de vaccin, allant de 600 à $6 \cdot 10^6$ germes ;

D : 15 souris reçoivent 20 000 germes EV ;

E : 20 souris reçoivent 200 000 germes EV ;

F : 35 souris reçoivent 200 000 germes EV.

On peut donc considérer comme établi, qu'à l'inverse de ce que les auteurs ont observé avec la cortisone et l'ACTH, la cyclophosphamide, dans nos conditions expérimentales, ne permet pas à la souche EV de manifester son pouvoir pathogène.

2° *Recherche d'une action de la cyclophosphamide sur le pouvoir immunisant de la souche EV*

De l'expérience A, (doses variables de 600 à 6 millions de germes EV, inoculation d'épreuve variant de 10 à 1 000 DL 50) semblait se dégager un résultat paradoxal : la mortalité après

injection d'épreuve était de 13 sur 15 pour les souris qui n'avaient reçu que de l'EV et seulement de 4 sur 15 pour celles ayant reçu EV et cyclophosphamide, tout se passant comme si la cyclophosphamide potentialisait l'action du vaccin EV. Il était important de chercher à préciser ce point.

Expérience B (tableau I)

Les doses vaccinales sont ici de 40 000 et 400 000 germes. Le contrôle de virulence de la souche utilisée pour l'épreuve donne une DL 100 proche de la dilution 10^{-4} soit environ 40 000 germes. Les différentes données sont rassemblées dans un tableau.

Le rôle protecteur de la cyclophosphamide semble se confirmer puisqu'avec le seul vaccin la mortalité globale est de 18/26 tandis qu'elle n'est que de 9/23 pour les souris traitées par cyclophosphamide. La différence semble particulièrement nette avec de fortes doses d'épreuve : 13/14 contre 4/12, ainsi qu'avec la plus faible dose vaccinale : 9/13 contre 5/12.

TABLEAU I
(Expérience B)

Dose d'épreuve Nombre de DL 100	Souris vaccinées				
	Dose vaccinale	Vaccin seul		Vaccin + cyclophosphamide	
		M	S	M	S
10	$4 \cdot 10^4$	3 (3.3.3)	3	2 (3.3)	4
10	$4 \cdot 10^5$	2 (3.3)	4	3 (1.3.4)	2
100	$4 \cdot 10^4$	6 (3.3.3. 3.4.5)	1	1 (9)	5
100	$4 \cdot 10^5$	7 (3.3.3. 3.3.4.5)	0	3 (3.3.4)	3

M : Mortalité spécifique des souris, nombres et, entre parenthèses, la durée d'évolution de l'affection, en jours
S : Survie.

Expérience C

Nous avons cherché à contrôler les résultats antérieurs en utilisant une faible dose de vaccin (20 000 germes) en même

temps que nous introduisions un témoin supplémentaire avec l'inoculation d'un lot de souris par le vaccin EV chauffé pendant une heure à 60° C. La signification de l'expérience fut compromise du fait d'une importante mortalité non spécifique chez les souris sous cyclophosphamide (10 sur 12 ayant reçu le vaccin chauffé, 5 sur 12 le vaccin vivant).

Avec une suspension de *Y. pestis* virulent de 10^{-4} , tuant 4 souris sur 5 chez les témoins, la mortalité chez les souris vaccinées est de 4 sur 12 pour le vaccin seul, de 3 sur 7 pour le vaccin + cyclophosphamide. Par contre les 14 souris vaccinées avec le vaccin tué (12 sans et 2 avec cyclophosphamide) ne résistent pas à l'inoculation d'épreuve. Le seul fait net qui ressort de cette expérience est la disparition du pouvoir vaccinant de l'EV sous l'action de la chaleur : mortalité de 100 p. 100 (14/14) avec le vaccin chauffé contre une mortalité de 7/19 avec le vaccin vivant.

Expérience D (tableau II)

L'expérience D reprenait les conditions générales de la précédente, les souris étant vaccinées avec seulement 20 000 germes. Les résultats sont consignés dans le tableau. On ne retrouve pas l'action recherchée de la cyclophosphamide mais on doit noter que l'épreuve était particulièrement sévère, la DL 50 se situant vers la dilution 10^{-5} .

TABLEAU II
(Expérience D)

Dilution de la suspension virulente	Témoins Virulence		Souris préparées avec						Vaccin vivant + cyclophosphamide	
			Cyclophosphamide seule		Vaccin seul					
	M	S	M	S	vivant		chauffé		M	S
10^{-3}	7(*)	0(*)	5(*)	1(*)	7	0	6	0	5	1
10^{-2}	10(*)	0(*)	7(*)	0(*)	8	0	6	0	4	0

M : mortalité spécifique, S : survie.
 (*) Les chiffres marqués d'un astérisque correspondent aux totaux cumulatifs (dilution 10^{-3} à 10^{-5} pour la virulence ; 10^{-3} à 10^{-2} pour le traitement cyclophosphamide seule) ; tous les autres indiquent le nombre effectif de souris mises en jeu pour la dilution correspondante.

L'étude de la mortalité des souris traitées par la cyclophosphamide, sans vaccin, est intéressante bien que le petit nombre des animaux mis en jeu oblige à une grande prudence pour l'interprétation des faits. Aux dilutions d'épreuves de 10^{-5} à 10^{-3} (4 000 à 400 000 germes), alors que la mortalité des témoins est de 7 sur 9, avec une durée d'évolution moyenne de 5,1 jours, elle est de 5 sur 9, mais surtout une évolution moyenne de 14 jours. Tout se passant comme si, chez les souris soumises à un traitement par cyclophosphamide, après la phase de plus grande sensibilité au bacille de Yersin (démontrée par les expériences d'inoculation pour diagnostic) intervenait une phase de plus grande résistance.

Expérience E (tableau III)

Pour cette expérience la dose vaccinale est augmentée, les souris reçoivent 200 000 germes de EV 76.

Par suite, soit d'une modification de la virulence de la souche d'épreuve, soit d'une erreur de manipulation, le titrage du pouvoir pathogène donna des résultats paradoxaux. Alors que 5 souris sur 5 étaient tuées à la dilution 10^{-4} , 3 sur 2 survivaient à 10^{-3} et 1 sur 4 à 10^{-2} rendant impossible la détermination d'une DL 100. Par ailleurs, les délais d'évolution étaient considérablement allongés, la mortalité ne commençant que le 3^e jour pour se poursuivre jusqu'au 15^e. Cette expérience ne confirme pas une éventuelle potentialisation du vaccin EV par la cyclophosphamide.

TABLEAU III
(Expérience E)

Dilutions de la suspension virulente	Témoins virulence		Souris préparées avec					
			cyclophosphamide seule		vaccin seul		vaccin + cyclophosphamide	
	M	S	M	S	M	S	M	S
10^{-3}	17(*)	4(*)	9	1	6	4	4	6
10^{-2}	21(*)	1(*)	10	0	7	3	10	0

M : mortalité spécifique ; S : survie.
 (*) Les chiffres marqués d'un astérisque correspondent aux totaux cumulatifs (dilutions 10^{-5} à 10^{-2}) tous les autres indiquent le nombre effectif de souris mises en jeu pour la dilution considérée.

Expérience F (tableau IV)

Nous avons repris les éléments de l'expérience précédente : vaccination avec une forte dose de vaccin EV (200 000) mais augmentation du nombre des animaux mis en expérience.

La diminution de virulence de la souche d'épreuve se confirme introduisant un facteur supplémentaire de discussion. Ici encore, aucune action nette de la cyclophosphamide.

TABLEAU IV
(Expérience F)

Dilutions de la suspension virulente	Témoins virulence		Souris préparées avec					
			cyclophosphamide seule		vaccin seul		vaccin + cyclophosphamide	
	M	S	M	S	M	S	M	S
10 ⁻⁴	11(*)	4(*)	15	0	6	9	4	11
10 ⁻²	20(*)	3(*)	14	1	11	4	12	3
10 ⁻¹	33(*)	2(*)	5	0	3	2	5	0

M : mortalité spécifique ; S : survie.
 (*) Les chiffres marqués d'un astérisque correspondent aux totaux cumulatifs (dilution 10⁻² à 10⁻⁴) ; tous les autres indiquent le nombre effectif de souris mises en jeu pour la dilution correspondante.

DISCUSSION

Le comportement des souris soumises à l'inoculation de souches virulentes de *Yersinia pestis* met vraisemblablement en jeu des processus antagonistes qui sont loin d'être élucidés. En 1969, nous signalions incidemment une observation expérimentale : lorsque l'on inocule à des lots de souris des dilutions croissantes d'une suspension de *Y. pestis*, la mortalité la plus précoce apparaît souvent pour les dilutions moyennes. Les souris recevant un grand nombre de germes mettent parfois plus de temps pour mourir que d'autres qui en reçoivent moins. La répétition de ces faits rend peu probable l'intervention de la seule résistance individuelle. Nous nous demandons s'il ne fallait pas y voir le rôle de la stimulation des défenses de l'organisme par un inoculum important. Nous ignorions alors les observations de T.-R. PARRY (1955, 1956) qui avait observé que des rats blancs inoculés

avec des doses fortes (10^6) mourraient moins rapidement qu'avec des doses faibles (10^4) de bacilles pesteux. Il supposait que ce phénomène d'interférence était dû à une stimulation non spécifique du système de défense de l'organisme.



Nous n'avons pas été capables de confirmer par nos trois dernières expériences l'effet remarquable qui semblait se dégager des premières, à savoir un renforcement apparent de l'action protectrice du vaccin EV lorsque les souris étaient soumises à un traitement par la cyclophosphamide. Mais il faut tenir compte du fait que nous avons, lors des dernières expériences, utilisé une dose vaccinale 10 fois plus forte en même temps qu'intervenait une modification de la virulence de notre souche d'épreuve.

Il y a lieu de retenir également l'effet paradoxal noté dans l'expérience D, où les souris traitées par cyclophosphamide seule, depuis plus de 10 jours, semblaient présenter une résistance plus grande, du moins avec une souche virulente mettant en jeu un petit nombre de germes.

Il pourrait donc être indiqué de reprendre cette expérimentation, après s'être assuré d'une souche hautement virulente pour les épreuves, en cherchant d'abord à mettre en évidence un éventuel état d'hyper-résistance secondaire des souris ayant reçu de la cyclophosphamide depuis plus de 10 jours. Si ce fait était vérifié il pourrait, à lui seul, rendre compte des éléments paradoxaux que nous avons obtenu dans nos premières expériences. Selon Robert Fauve, l'explication des phénomènes observés pourrait se trouver dans le mécanisme très particulier de l'action de la cyclophosphamide. G.-B. Mackaness et coll. (1974) ont en effet établi que ce produit potentialise la réponse des cellules T par suppression sélective des cellules B.

RÉFÉRENCES

- BLYAKHER (S.-L.) 1958. — Utilisation de la souris sous cortisone pour l'étude expérimentale de souches de *P. pestis* de faible virulence. *Z. Mikrobiol. (Mosk.)* **29** (7) 65.
- BRYGOO (E.-R.) et RAJENISON (Solo) 1969. — Essai de sensibilisation de la souris, pour le diagnostic de la peste, par un immuno-dépresseur. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **38** (1) 21-25.

- BRYGOO (E.-R.) et RAJENISON (Solo) 1973. — Amélioration technique du diagnostic expérimental de la peste. L'utilisation de souris sensibilisées par la cyclophosphamide. *Bull. Soc. Path. exot.*, **66** (2) 255-257.
- BRYGOO (E.-R.) et RAJENISON (Solo) 1973 (1974). — L'utilisation de souris sensibilisées par la cyclophosphamide pour le diagnostic expérimental de la peste. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **42** (1) 9-14.
- GIRARD (Georges) 1957. — Cortisone et *Pasteurella pestis* (souches de virulence affaiblie) chez la souris blanche. *Thérapie*, **12** : 15.
- HAYASHIDA (T.) 1957. — Effect of pituitary adrenocorticotropic and growth hormones on the resistance of rats infected with *Pasteurella pestis*. *J. exp. Med.*, **106** : 127.
- PARRY (W.-R.) 1955. — An interference phenomenon caused by *Pasteurella pestis*. *J. gen. Microbiol.*, **13** : XII.
- PARRY (W.-R.) 1956. — An interference phenomenon caused by *Pasteurella pestis*. *J. Hyg. (Lond.)*, **54** : 227.

RÉSUMÉ

Les auteurs démontrent que le traitement par la cyclophosphamide des souris ayant reçu du vaccin EV vivant n'augmente pas le pouvoir pathogène de cette souche.

Ayant observé un certain nombre de résultats paradoxaux sur la sensibilité à l'inoculation pesteuse des souris préalablement traitées par vaccin EV et cyclophosphamide, ils discutent diverses hypothèses pathogéniques.