

ARTICLES ORIGINAUX

Adaptation d'une souche de virus bovinepestique à la culture cellulaire

Premiers résultats

par Y. GILBERT et J. MONNIER

Depuis 1959 sont effectuées à Dakar des expériences sur la culture du virus bovinepestique en cultures cellulaires. La souche jusqu'ici utilisée était celle adaptée par PLOWRIGHT et FERRIS, (1) qui avait permis de réaliser quelques essais d'immunisation de bovins et, surtout, de disposer d'un matériel bon marché pour les expériences de séroneutralisation.

Il a paru intéressant de tenter l'adaptation aux cultures cellulaires de la souche sauvage d'éprouve utilisée au Laboratoire de Dakar, dans le but d'étudier son comportement en culture cellulaire et sur bovins, et de comparer les résultats obtenus à ceux publiés précédemment.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel.

1^o Préparation des suspensions cellulaires.

Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de cellules épithéliales de reins d'embryons bovins en provenance de l'abattoir de Dakar.

L'âge des embryons n'a pas été pris en considération.

Les reins sont décapsulés, la zone corticale est prélevée en petits fragments à l'aide d'un bistouri ; ces fragments sont hachés, lavés 3 fois au PBS*, soumis à l'action d'une solution de trypsine Difco (1 : 250) à 3 p. 1000 pendant 20 minutes à la température du laboratoire, sur agitateur magnétique. La trypsine est éliminée par décantation et remplacée par une solution fraîche de trypsine. La trypsination est poursuivie pendant 5 à 6 heures au réfrigérateur. Au bout de ce

temps, la suspension cellulaire, filtrée sur gaze (4 épaisseurs), est centrifugée à 900 tours/minute, pendant 4 à 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire lavé avec de la solution saline de Hanks additionnée de 10 p. 100 de sérum bovin. Après une dernière centrifugation, le culot cellulaire est mis en suspension à raison de 1 volume pour 200 de milieu nutritif composé de solution de Hanks additionnée de 0,5 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine, et 0,1 p. 100 d'extrait de levure, auquel on ajoute 10 p. 100 de sérum de veau (importé de France) ainsi que des antibiotiques : Pénicilline, 100 UI/ml et Streptomycine 0,1 mg par ml.

Les renouvellements ultérieurs de milieu sont effectués tous les 2 ou 3 jours à l'aide du même milieu, mais la proportion de sérum est ramenée à 5 p. 100 de sérum de bovin (importé de France) au 1^{er} changement, et à 2 p. 100 pour les changements ultérieurs, qui s'effectuent lorsque le virage de l'indicateur coloré indique un pH nettement acide.

2^o Récipients pour culture.

La suspension cellulaire est répartie soit en tubes de verre neutre ou de Pyrex de 18 × 180 à la dose de 2 ml, soit en tubes de Leighton à la même dose, soit en flacons plats pharmacie de 150 ml, à la dose de 15 ml, soit en flacons de 250 ml en verre neutre à la dose de 22,5 ml.

Pour la production de grandes quantités de virus, on utilise des boîtes de Roux de 1 l. recevant 75 ml de suspension cellulaire.

3^o Incubation.

Les flacons et tubes sont placés après répartition de la suspension, en position stationnaire pendant 2 à 3 jours.

Le milieu est alors renouvelé.

Les flacons demeurent immobiles, alors que les

* P B S = Phosphate buffer solution (Dulbecco).

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop. 1962, 15, n° 4.

Reçu pour publication : août 1962.

tubes sont placés sur un tambour tournant (système *roller-tubes*).

La température d'incubation est, selon les cas, de 37° ou 40° C.

4° Souche de virus bovipestique.

La souche de virus bovipestique utilisée est la souche sauvage conservée à Dakar en vue des épreuves. Il s'agit d'une souche isolée en 1957 dans un foyer et passée chaque année sur bovin, conservée sous forme de suspension lyophilisée de rate et ganglions dans du sang infecté. Elle est désignée sous le nom de souche DK.

En vue de l'adaptation de la souche aux cultures cellulaires, un veau réceptif est inoculé avec une ampoule de virus lyophilisé. La réaction thermique débute le 4^e jour suivant l'inoculation, atteint son maximum le 7^e jour. Les lésions buccales apparaissent et le veau est sacrifié le 8^e jour.

Rate et ganglions sont prélevés et servent de matériel de départ.

Méthode de passage du virus.

A) Premier passage.

Des suspensions à 10 p. 100 en milieu de Hanks sont préparées avec la rate et des ganglions, par broyage dans un micro-broyeur du type *mixer*.

Les suspensions sont centrifugées à 2.000 tours par minute pendant 10 minutes et le surnageant constitue l'*inoculum*.

Quatre modes d'infection ont été essayés sur des cultures de cellules âgées de 2 jours, obtenues par trypsination d'un tapis cellulaire provenant de cellules de 1^{ère} explantation.

a) Le flacon est vidé. La suspension de rate est introduite à la dose de 5 ml pour un flacon de 250 ml. Le flacon est placé pendant 4 heures à l'étuve à 37° C. il est alors vidé et le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec de la solution de Hanks.

On renouvelle alors le milieu nutritif (22,5 ml).

b) La même technique est employée pour la suspension de ganglion.

c) Le flacon est vidé. On y introduit 2,5 ml de suspension de rate, on complète avec 20 ml de milieu nutritif et l'on incube à l'étuve à 37° C.

d) La même technique est employée pour la suspension de ganglion.

B) Passages suivants.

Ils sont effectués en principe en ajoutant à une suspension cellulaire 10 p. 100 du milieu nutri-

tif du passage précédent, au moment de la répartition en flacons ou en tubes.

Un certain nombre de passages ont dû être effectués, lorsque des suspensions cellulaires ne pouvaient être obtenues, sur des couches cellulaires déjà constituées, âgées de 2 à 5 jours.

Dans ce cas, après avoir vidé les tubes ou flacons et renouvelé le milieu, on ajoute une quantité de milieu du passage précédent égale au dixième du volume total du milieu contenu dans les tubes ou flacons.

Titrages du virus.

Dans les titrages, le virus est dilué en série décimale dans du liquide de Hanks (dilution 10⁻¹ à 10⁻⁶).

On porte alors 1 ml de chacune des dilutions dans un tube contenant 10 ml de suspension cellulaire. Après le mélange, le contenu de chaque tube de suspension infecté est réparti à la dose de 2 ml dans 5 tubes en verre neutre ou Pyrex de 18 × 180.

Chaque tube reçoit donc 0,2 ml de la dilution considérée.

Pour les titrages plus précis, on recourt à 10 tubes par dilution.

Identification du virus par séroneutralisation.

Le virus à identifier est dilué en une série de dilutions décimales de 10⁻¹ à 10⁻⁶.

Deux séries de 6 tubes sont préparées.

Chaque série reçoit 1 ml des différentes dilutions de virus.

A chacun des tubes d'une série on ajoute 1 ml de sérum antibovipestique préparé soit sur lapin, soit sur bœuf.

Les tubes de l'autre série reçoivent 1 ml de sérum de bovin réceptif.

Après agitation, les tubes sont incubés 1h. au bain-marie, à 37°.

Les différents mélanges sont répartis à la dose de 0,2 cc par tube contenant 2 ml de suspension cellulaire.

On utilise 2 à 5 tubes par mélange.

Le virus est considéré comme neutralisé s'il existe une différence d'au moins 2 log* entre les titres des virus respectivement en présence de sérum normal et de sérum antibovipestique.

* Logarithme à base 10.

Inoculation aux bovins.

Seul a été recherché jusqu'ici le pouvoir pathogène du virus pour le bœuf. En raison des difficultés à se procurer des bovins réceptifs, et du coût de l'expérimentation, il n'a pas encore été effectué de recherches sur le titre du virus obtenu par culture en utilisant le bœuf comme animal d'épreuve.

Les bovins reçoivent 1 ml du milieu non dilué du passage considéré par voie sous cutanée.

Préparations colorées.

Elles sont réalisées à l'aide de tubes de Leighton recevant 2 ml de suspension cellulaire, infectée ou non.

Pour la coloration, les tubes sont vidés, lavés 3 fois au PBS, la couche cellulaire est fixée 3 à 5 minutes au Bouin alcoolique, puis colorée par l'hémalum de Mayer et l'éosine. Montage au baume du Canada.

RÉSULTATS**a) Croissance des cellules à 37° et à 40° C.**

Aucune différence n'a été notée dans le comportement des cultures cellulaires incubées soit à 37° soit à 40° C.

Un léger avantage peut même, semble-t-il, être reconnu à la température de 40° C, en ce qui concerne la rapidité de croissance.

Au delà de 41° C, des signes de souffrance apparaissent chez les cellules aspect : granuleux, retard de croissance, rétraction. La destruction des cellules s'observe à partir de 42°5 ; elle est totale si cette température est maintenue plusieurs heures.

b) Adaptation de la souche DK aux cultures cellulaires.

A la suite de l'infection par des suspensions de rate ou ganglions infectés, les effets suivants sont observés sur le tapis cellulaire :

Méthode a) (suspension de rate en contact pendant 4 heures avec les cellules, puis lavage).

Après 24 heures, un effet toxique limité est observé sur certaines zones de la couche monocellulaire : cellules rétractées, réfringentes qui se détachent du verre. Après trois jours, la prolifération des cellules intactes avoisinantes a comblé les vides. 11 jours plus tard, apparaissent au

sein de la couche cellulaire des cellules géantes multinucléées sous l'aspect de plaques arrondies ou ovalaires de dimensions variables, résultant de la coalescence des cytoplasmes des cellules. Ces cellules géantes s'agrandissent et se creusent de vacuoles 13 à 14 jours après l'infection, la moitié au moins du tapis cellulaire semble lésé.

11 jours après l'infection initiale, un second passage est effectué en mélangeant du milieu nutritif baignant les cellules infectées du premier passage à une suspension cellulaire lors de sa préparation. La série des passages ultérieurs de la souche dérive de cet isolement du virus en culture.

Méthode b) (même technique mais utilisation d'une suspension de tissu ganglionnaire).

Un effet toxique net, se traduisant par la rétraction des cellules et leur décollement, s'observe sur une partie de la couche cellulaire 24 heures après l'infection. 48 heures plus tard se manifestent des modifications cytopathogènes massives. Au tapis continu de cellules jointives, est substitué un réseau formé de cellules de type fibroblastique possédant un léger renflement réfringent entre des prolongements cytoplasmiques longs et fins qui s'anastomosent avec ceux des cellules voisines. La paroi des flacons semble tapissée d'un filet à mailles assez lâches.

L'infection d'une couche de cellules âgées de 5 jours par du milieu nutritif provenant du 1^{er} passage, provoque l'apparition, en 5 jours environ, d'un effet cytopathogène plus ménagé. Entre les mailles du filet s'observent des nappes assez étendues, formées par des cellules géantes, dont, même à l'état frais, on peut distinguer les nombreux noyaux.

Cet aspect inattendu de l'E. C. P.* pouvait faire penser à la présence d'un virus latent dans la suspension ganglionnaire. Une épreuve de séro-neutralisation (SN) à l'aide de sérum hyperimmunum préparé sur lapin, assure l'identité du virus. Les tubes contenant le mélange sérum normal-virus, de même que ceux ayant reçu du virus seul, montrent 6 jours plus tard, un ECP net, alors que les tubes renfermant le mélange sérum antibovipestique-virus ne montrent aucune modification après 12 jours d'observation.

* Effet cytopathogène.

Après cette démonstration de l'effet cytopathogène du virus, les passages ont été abandonnés, l'effet cytopathogène se manifestant dans le même laps de temps que celui observé pour les passages à partir de la rate.

Méthode c et d) = suspension de rate ou ganglion mélangée au milieu nutritif : un effet toxique intense attribué aux extraits d'organes présents dans le milieu est observé sur les couches cellulaires après 24 heures d'incubation. La quasi-totalité des cellules ayant été détruite, les flacons ont été éliminés.

Passages suivants.

Les passages suivants ont été effectués à partir de la série a). Trois passages successifs ont ainsi été effectués ; l'effet cytopathogène (E. C. P.) se manifeste au 2^e passage au bout de 6 jours, et au 7^e passage après 3 jours seulement.

A partir du 3^e passage à 37° C, deux séries de passages ont été effectuées : l'une par passage en série du virus à 37° C, l'autre par passage en série à 40° C.

Que les transferts aient été effectués par addition de milieu du passage précédent à une suspension fraîche de cellules lors de sa répartition, ou qu'ils aient été effectués par addition de ce virus au milieu de renouvellement sur une couche déjà constituée, il n'a pas été constaté de différences dans la rapidité d'apparition de l'E. C. P. Dans le dernier cas cependant, il est à noter que les lésions apparaissent sur les bords de la culture, là où la prolifération cellulaire se poursuit ainsi que l'ont noté PLOWRIGHT et FERRIS (2).

A partir du 15^e passage, l'effet cytopathogène se manifeste dès le 3^e jour par l'apparition de masses arrondies, réfringentes, pourvues de filaments qui s'anastomosent à ceux émis par les cellules voisines. Les multiplications cellulaires sont stoppées, le plus souvent avant qu'une couche cellulaire continue ait été obtenue. C'est pourquoi, il est envisagé de n'inoculer les cellules que 2 jours après leur mise en culture, afin de permettre au tapis cellulaire d'être continu avant qu'intervienne l'action cytopathogène du virus.

Identification du virus.

Les tests de séro-neutralisation effectués après chaque série de 5 passages successifs ont tou-

jours abouti à la neutralisation de l'effet cytopathogène par le sérum contre la peste bovine, quelle que soit l'origine (bœuf ou lapin) de celui-ci.

Titres du virus.

Un certain nombre de titrages a été effectué sur cultures cellulaires au fur et à mesure de la succession des passages. Ils ont porté surtout sur la série maintenue à 40° C. Les titrages du virus contenu dans le milieu nutritif ont été exécutés lorsque l'effet cytopathogène était maximum, c'est-à-dire 6 à 7 jours après l'infection =

A 37° C :

au 3^e passage = titre 10^{5,3} DICT par ml.

au 17^e passage = titre 10^{6,2} DICT par ml.

au 23^e passage = titre 10^{5,6} DICT par ml. (après congélation)

A 40° C :

au 6^e passage = titre 10^{5,5} DICT par ml.

au 10^e passage = titre 10^{5,9} DICT par ml.

au 21^e passage = titre 10^{6,3} DICT par ml.

Une courbe de croissance est établie pour le virus maintenu à 40° C au 23^e passage (Fig. 1).

Persistance du virus.

Du virus peut être mis en évidence dans le milieu nutritif provenant de tubes infectés 28 jours plus tôt.

Effet cytopathogène.

1° *Infection d'une couche cellulaire par une suspension de rate de bovin infecté.*

Au 12^e jour après l'infection, on commence à observer, au sein de la couche cellulaire, des cellules multinucléées dont les noyaux sont, soit groupés en amas de 3 à 20, soit disposés en ligne.

Il existe dans le cytoplasme des masses irrégulières fortement colorées par l'éosine. Par contre, les noyaux ne montrent aucune inclusion.

2° *Infection d'une couche cellulaire par une suspension de ganglion de bovin infecté.*

48 heures après l'infection, la couche cellulaire est dissociée. La paroi du flacon est tapissée d'une sorte de filet formé par des prolongements cytoplasmiques de cellules très allongées, présentant un renflement au niveau du noyau. Au sein de certaines « mailles » se rencontrent des cellules

multinucléées, de petite taille renfermant quelques noyaux dont certains sont pycnotiques.

3^o Effet cytopathogène après 20 passages en culture.

a) Culture à 37° C.

Ces lésions rappellent celles décrites par PLOW-RIGHT et FERRIS (1). Dès le 3^e jour après l'infection de la suspension cellulaire lors de sa mise en culture, on peut voir les limites du cytoplasme s'estomper et disparaître entre des cellules adjacentes ; il se forme de petites cellules multinucléées dont les noyaux en nombre variant de 2 à 10 sont groupés en amas ou disposés selon une ligne.

Quelques inclusions éosinophiles intra-cytoplasmiques de petite taille s'observent également.

Au 4^e jour, apparaissent des cellules arrondies ou ovalaires, réfringentes, pourvues de prolongements cytoplasmiques d'épaisseur et longueur variable, qui s'anastomosent avec ceux de cellules voisines. Ces cellules sont souvent multinucléées. Leur cytoplasme est fortement éosinophile.

Les cellules multinucléées s'accroissent en nombre et en volume. Certaines renferment des vacuoles. Le cytoplasme se charge de masses éosinophiles.

Au 5^e jour, la majeure partie de la surface de la culture est occupée par des cellules multinucléées groupant au maximum 15 à 20 noyaux ; beaucoup en contiennent moins de 10. De nombreuses cellules isolées montrent dans leur cytoplasme des granulations éosinophiles. La croissance cellulaire est déjà arrêtée, et les cellules arrondies diminuent en nombre.

Dans les jours suivants, les syncytiums augmentent en volume par fusion des éléments mitoyens. Ils ont peu de tendance à se vacuoler. Ils se détachent peu à peu de la paroi de verre, et vers le 20^e jour il ne reste que quelques cellules mono ou multinucléées, souvent pycnotiques et au cytoplasme lâche, adhérentes au flacon.

Les modifications du noyau se traduisent dès le 5-6^e jour par la présence d'une tache rose, souvent peu visible sous le réseau de chromatine. Vers le 8^e jour, une grande proportion des cellules présente des inclusions nucléaires de type variable : soit une ou plusieurs taches incolores circulaires qui renferment au centre un point fortement coloré par l'éosine, soit une tache rose

pâle, dont les limites sont assez diffuses, qui occupent les 2/3 du noyau.

Ces inclusions sont moins nombreuses, moins nettes et de plus petites dimensions que celles observées dans les cultures maintenues à + 40° C.

b) Culture à 40° C.

Dans les cultures maintenues à 40° C, dans un premier stade qui va du 3^e au 5^e jour, des cellules rondes, réfringentes apparaissent en même temps que se constituent des amas de noyaux ; dès le 5^e-6^e jour des syncytiums de grande taille se forment ; ils contiennent de nombreux noyaux qui, dans certaines cellules géantes, se groupent en couronne, dans d'autres se rassemblent au centre ou s'alignent dans les parties de cytoplasme qui subsistent entre les vacuoles.

Le cytoplasme de toutes ces cellules renferme des masses éosinophiles importantes.

Les altérations nucléaires sont précoces (5 à 6 jours après l'infection) ; elles n'ont pu être mises en évidence avec netteté qu'avec l'hémalum de Mayer, elles n'étaient pas décelées avec l'hématoxyline de Harris.

Elles se présentent sous différentes formes. Un point fortement coloré par l'éosine, entouré d'un halo clair (certaines cellules en possèdent plusieurs), ou bien une tache plus importante, rose pâle entourée par un halo diffus.

Le nucléole n'est pas altéré.

Dès le 6^e jour après l'infection la proportion de noyaux présentant ces inclusions n'est pas négligeable (10 à 20 % dans les cellules géantes). Il apparaît d'ailleurs que certains syncytiums ne renferment que des noyaux sans inclusion, alors que dans d'autres la presque totalité en contient.

Dans les jours suivants, les altérations nucléaires se modifient ; certains noyaux présentent un centre rose homogène, bordé par un liseré de chromatine basophile ; dans d'autres, les inclusions rose vif entourées d'un halo clair grossissent : au centre une grosse inclusion fortement colorée, entourée du halo clair, bordé d'une mince bordure basophile.

Vers le 8^e-10^e jour après la mise en culture, 60 à 80 p. 100 des noyaux renferment des inclusions, les autres sont en pycnose.

Les cellules ainsi lésées demeurent longtemps adhérentes au verre, et on les retrouve sans changement notable pendant 4 à 5 semaines.

Cependant, au delà du 17^e jour, de nombreux noyaux ne montrent plus qu'un liseré basophile entourant une zone centrale rose vif, homogène, le nucléole apparemment intact étant refoulé vers la périphérie.

Un autre type d'effet cytopathogène s'observe assez souvent dans les cultures en flacons, plus rarement dans les cultures en tube. La couche cellulaire prend un aspect réticulé dès le 4^e jour après l'infection. Il semble que les cellules se rassemblent en traînées anastomosées, laissant entre les mailles de larges plages vides. Au sein des traînées, les cellules sont comprimées, rétractées, il est difficile de distinguer leurs limites. On peut noter la présence, au sein des traînées, et surtout en bordure, de cellules multinucléées contenant des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles.

Cet aspect rappelle celui décrit par ODDO et Coll. (1961) comme « strand forming cytopathic effect », et celui observé lors de l'infection de couches cellulaires par une suspension de ganglions infectés de peste bovine.

Pouvoir pathogène pour les bovins.

a) **Au 10^e passage** en culture, les souches propagées à 37 et 40° C sont inoculées chacune à deux bouvillons.

1^o *Virus à 37° C.*

L'un des bouvillons dont le sérum neutralisait le virus PB à la dilution 1 : 20^e n'a présenté aucune réaction.

Le second, après une incubation de 3 jours montre une médiocre ascension thermique au 4^e jour. La température redescend dès le 5^e jour mais des lésions buccales discrètes apparaissent au 7^e jour. L'animal est sacrifié agonisant ce jour même, et, à l'autopsie présente les lésions caractéristiques de la peste bovine.

2^o *Virus à 40° C.*

Après une incubation de 3 jours l'hyperthermie augmente progressivement jusqu'au 5^e jour. La température demeure en plateau jusqu'au 9^e jour.

Les lésions buccales se manifestent au 8^e jour.

L'un des deux animaux inoculés meurt le 9^e jour, et montre les lésions caractéristiques de la peste bovine. Le second survit, son sérum pré-

levé 14 jours après l'infection neutralise le virus bovine pestique de culture à la dilution 1 : 300.

b) **Au 20^e passage** en culture, seul le virus propagé à 37° C est inoculé à deux bovins.

L'incubation dure 3 jours pour l'un, 4 jours pour l'autre. La température demeure élevée (supérieure à 40° C le matin) pendant 4 à 5 jours respectivement.

L'un des animaux meurt le 13^e jour après inoculation et présente tous les signes nécrotiques de la peste bovine.

Le second se rétablit et survit.

DISCUSSION

L'adaptation aux cultures cellulaires de rein d'embryon bovin de la souche sauvage d'épreuve n'a présenté aucune difficulté. La mise au contact des cellules d'une suspension de ganglions infectés, pendant quelques heures à 37° C, suivie d'un lavage, n'a provoqué qu'un effet toxique limité. Les lésions cytopathogènes intenses apparues en 48 heures ont d'abord fait penser à l'intervention d'un virus latent autre que celui de la peste bovine, mais les épreuves de séroneutralisation ont montré que l'effet cytopathogène était complètement inhibé par le sérum contre la peste bovine. Cependant, il a paru préférable de poursuivre les passages à partir du virus obtenu par infection des cellules par la suspension de rate. Ce court délai d'apparition des lésions cellulaires contraste avec les résultats publiés par PLOWRIGHT et FERRIS (1) pour la souche Kabete «O», par DE BOER (5) pour les souches de PAKCHONG et PENDÍK et par PROVOST (3) qui observent les lésions après 15 à 21 jours de culture. Le premier effet cytopathogène observé sans coloration a consisté en l'apparition de cellules géantes de grandes dimensions qui se sont creusées de vacuoles et ont persisté pendant une très longue période.

Les passages ultérieurs n'ont pas présenté de difficulté. On a seulement observé un raccourcissement progressif du délai d'apparition de l'effet cytopathogène, et après le 15^e passage la multiplication des cellules était arrêtée avant que la couche en soit continue.

A l'état frais, l'effet cytopathogène observé ressemble étroitement à celui que provoque la souche adaptée par PLOWRIGHT et FERRIS :

apparition de foyers constitués par des cellules arrondies, réfringentes, munies de prolongements filamenteux.

La différence la plus notable observée entre la souche adaptée à Dakar et celle adaptée à Muguga porte sur la fréquence et l'importance des inclusions intra-nucléaires. A Muguga, PLOWRIGHT et FERRIS observent en de rares occasions des inclusions du type B de COWDRY, alors que les inclusions provoquées par la souche sauvage de Dakar sont constantes, de grandes dimensions et peuvent être rattachées au groupe A de COWDRY.

Il semble que le maintien à 40° C des cultures conserve à ces inclusions le caractère qu'elles présentaient aux premiers passages, alors que l'incubation à 37° C conduit à une modification de leur aspect : les inclusions sont plus petites, s'apparentent davantage au type B de COWDRY et leur fréquence est moins nombreuse.

Les inclusions observées à 40° C rappellent la disposition « en cocarde tricolore » fréquente dans l'herpès, mais d'autres types d'inclusions sont aussi remarqués.

En ce qui concerne les cellules multinucléées, malgré une recherche portant sur plusieurs centaines de lames colorées à différents stades de culture, il n'a jamais été possible de noter la présence de cellules en voie de division dans les syncytiums (8). Ceux-ci semblent, à notre avis, se constituer par la fusion du cytoplasme de cellules adjacentes et non par division répétée du noyau d'une unique cellule d'origine. Il n'aurait d'ailleurs pas été impossible qu'une cellule en voie de division participe à la formation d'un syncytium et que la division nucléaire ait été stoppée par l'infection ainsi que le suggère ROIZMAN (6).

Les titres de virus obtenus correspondent à ceux publiés par PLOWRIGHT et FERRIS (1) mais sont inférieurs de 1 à 2 log à ceux qu'annonce DE BOER (5). La teneur maxima du fluide baignant les cultures est atteinte au 8^e jour, de même que pour la souche Kabete « O » en culture.

Il est regrettable que la pénurie de bovins réceptifs à la peste n'ait pas permis d'effectuer des titrages comparatifs sur bovins.

Les titres des fluides des cultures maintenues respectivement à 37° et 40° C sont comparables.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène pour le bœuf, la succession des passages à 37° n'a pas encore entraîné au 19^e passage d'atténuation sensible. D'ailleurs DE BOER (5) observe que la souche Pendik au 16^e passage provoque encore des lésions buccales, la diarrhée et la mort, et PLOWRIGHT et FERRIS, constatent que 3 bovins sur 5 inoculés avec le 16^e passage de la souche Kabete « O » succombent ; cette souche ne se révèle atténuée qu'après le 21^e passage.

La seconde série de passage à 40° C a été effectuée dans le but de rechercher l'influence éventuelle de la température d'incubation sur l'évolution du pouvoir pathogène. Celui-ci n'ayant pas encore été sensiblement réduit à 37°, les essais comparatifs entre les deux séries de passages devront être repris lorsque le virus aura subi un plus grand nombre de passages en cultures.

CONCLUSIONS

1. — Une souche de virus bovipestique a été adaptée à la multiplication en cultures cellulaires de rein d'embryon bovin.
2. — Deux séries de passages parallèles ont été effectuées en maintenant respectivement les cultures à 37° et 40° C.
3. — Les cultures infectées présentent des lésions analogues dans l'ensemble à celles décrites par PLOWRIGHT et FERRIS, mais en outre des inclusions nucléaires particulières ont été observées.
4. — Vingt passages en série n'ont pas sensiblement atténué le pouvoir pathogène du virus pour les bovins.

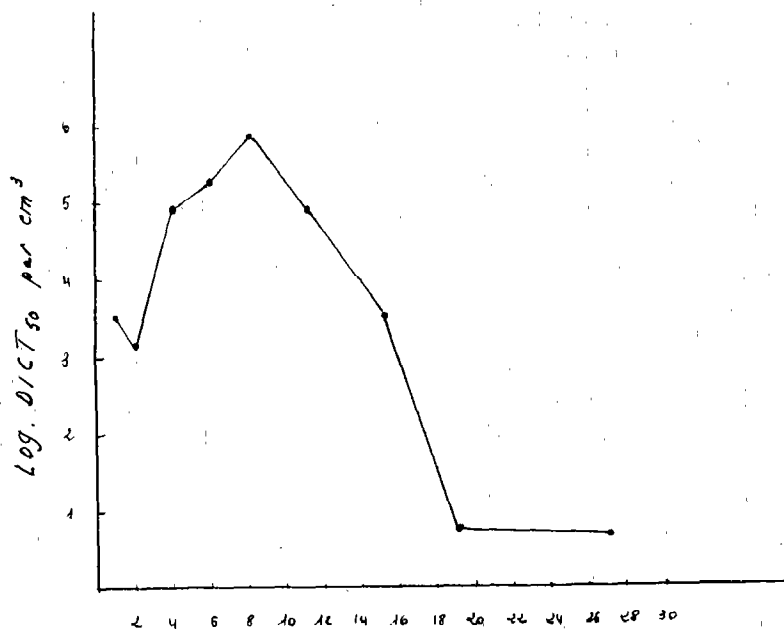
*Laboratoire de recherches vétérinaires
de Dakar-Hann (Rép. du Sénégal)
Service de Virologie.*

SUMMARY

Adaptation of a strain of Rinderpest virus to tissue-culture

1. — A strain of rinderpest virus of bovine origin has been adapted to culture on embryo bovine kidney cells on which it multiplies.

Fig. I - Croissance du virus 2^e passage à 40°C



Nombre de jours après mise en culture (et infection)

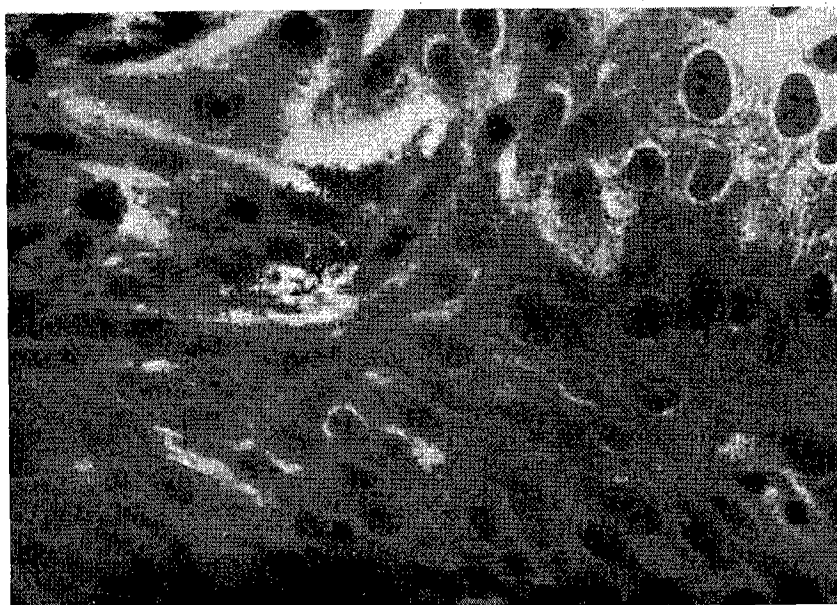


Photo n° 1. — Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon bovin — 5^e jour — × 750



Photo n° 2. — Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon bovin infecté par le virus bovipestique 3^e jour, incubation 40° C, 22^e passage — Formation de cellules géantes, X 500.



Photo n° 3. — Culture de cellules épithéliales de rein d'embryon bovin infectées par le virus bovipestique — 6^e jour, incubation 37° C, 23^e passage
Cellules multinucléées, X 500.

2. — Two parallel series of passages have been made maintaining the culture at 37° C. and 40° C (98.6° F and 104° F) respectively.

3. — The infected cultures present lesions analogue in general to those described by Plowright and Ferris, but in addition certain nuclear inclusion bodies have been observed.

4. — Twenty passages in series have not noticeably reduced the pathogenicity of the virus for cattle.

RESUMEN

Adaptación de una estirpe de virus bovipestífico al cultivo celular

1. — Una estirpe de virus bovipestífico ha sido adaptada a la multiplicación en cultivos celulares de riñón de embrión bovino.

2. — Dos series de pasadas paralelas han sido llevadas a cabo, manteniendo respectivamente los cultivos a 37 y 40° C.

3. — Los cultivos infectados presentan lesiones análogas, en su conjunto, a aquellas descritas por Plowright y Ferris, pero, además, se ha podido comprobar la existencia de ciertas inclusiones nucleares particulares.

4. — Veinte pasadas en serie no han llegado a atenuar de forma apreciable el poder patógeno del virus por lo que respecta a los bovinos.

BIBLIOGRAPHIE

1. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — **Studies with rinderpest virus in tissue culture. I. Growth and cytopathogenicity** *J. comp. path.* (1959) 69 : 152. II. **Pathogenicity for cattle of culture passaged virus** *ibid* : 173.
2. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — **Studies with rinderpest virus in tissue culture. A technic for detection and titration of virulent virus in cattle tissue.** *Res. vet. Sci.* (1962) 3 : 94.
3. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — **Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. The stability of cultured virus and its use in virus neutralization tests.** *Arch. für virusforsch.* (1962) 11 : 516.
4. JOHNSON (R. H.). — **Rinderpest virus in tissue culture. I. Méthode for virus production.** *Brit. Vet. J.* (1962) 118, 107. II. **Serum neutralization tests.** *ibid* : 133. III. **Use of attenuated strain as a vaccine for cattle,** *ibid.* 141.
5. DE BOER (C. J.). — **Adaptation of two strains of rinderpest virus to tissue culture.** *Archiv. for virusforsch.* (1961).
6. ROIZMAN (B.). — **Virus infection of cells in mitosis. I. Observations on the recruitment of cells in Karyo kinesis into giant cells induced by herpes virus and bearing on the site of virus antigen formation.** *Virology* 13, 1961. 387.
7. ODDO (F. G.) FLACCOMIO (R.) SINATRA (A.). — **Giant cell and strand forming cytopathic effect of measles virus lines conditioned by serial propagation with diluted or concentrated inoculum.** *Virology*, 1961, 13 : 550.
8. PROVOST (A.) et VILLEMOT (J. M.). — **Note sur les plasmodes multinucléés rencontrés dans les cultures cellulaires infectées de virus bovipestifique.** *Ann. Inst. Past.* 1961, 101 (2) : 276.