

ARTICLES ORIGINAUX

Quelques recherches fondamentales sur le virus bovipestique

par A. PROVOST, R. QUEVAL et C. BORREDON (*)

RÉSUMÉ

Les auteurs ont montré à l'aide des techniques d'inhibition des acides nucléiques par les pyrimidines halogénées que le virus bovipestique était un virus à acide ribonucléique.

Les inclusions intracytoplasmiques qu'il détermine en cultures cellulaires sont de nature ribonucléoprotéique ; elles portent la spécificité antigénique du virus.

La replication du virus est uniquement endocytosomique, sans participation mitochondriale. La libération s'effectue par bourgeonnement de la surface cellulaire.

Tous ces caractères rapprochent le virus bovipestique du groupe des myxovirus, sous-groupe para-influenza.

C'est en 1902 que Nicolle et Adil Bey démontraient la nature ultrafiltrable du contagement bovipestique. Depuis lors une floraison de travaux a vu le jour, ayant trait à la nature et la biologie du virus ; il n'est point dans notre propos de les passer en revue.

Mais, corollaire de l'extraordinaire développement qu'a connu la virologie depuis quinze ans et conséquence directe de l'application à cette science des techniques de cultures cellulaires, un certain nombre de données ont été proposées concernant la structure intime de la particule virale, son métabolisme et son mode de replication dans les cellules infectées. Nous ne retiendrons que quelques points de recherches récentes ; ils seront discutés en détail dans cette note.

Le virus bovipestique appartiendrait, selon COOPER (5), au groupe des désoxyvirus (virus à acide désoxyribonucléique) dans lequel il se rann-

gerait avec le virus de la rougeole et celui de la maladie de Carré, à côté du virus de l'herpès.

Cependant, à la suite des études de morphologie virale faites au microscope électronique par PLOWRIGHT, CRUICKSHANK et WATERSON (14), ce dernier auteur n'hésite pas à ranger le virus bovipestique dans le groupe des myxovirus, à côté des virus de la maladie de Newcastle et des oreillons (18). Il reconnaît néanmoins que des études ultérieures devront préciser la nature chimique de l'acide nucléique du virus.

Par ailleurs, BREESE et DE BOER (3) font connaître le résultat d'études de microscopie électronique et indiquent que le virus se développe dans les mitochondries des cellules infectées.

Le propos de cette note est de préciser et compléter ces différentes données. Le présent exposé envisagera donc les points suivants :

1^o La nature de l'acide nucléique du virion bovipestique.

(*) Aide technique de Mme C. FERREOL et de M. D. ALLOUM.

2° L'histochimie des inclusions cytoplasmiques produites par le virus en cultures cellulaires. On sait qu'en cultures cellulaires (rein de veau, de mouton, cellules testiculaires, cellules He La), le virus bovinepestique détermine la formation d'inclusions cytoplasmiques et plus rarement intranucléaires. Il partage cette propriété avec tous les myxovirus. Toutefois, l'accord n'est pas complet sur la nature chimique des inclusions cytoplasmiques. Certains, comme LÉPINE, CHANY, DROZ et ROBBE-FOSSAT (9) y voient des amas d'acide ribonucléique ; d'autres n'établissent aucune correspondance entre elles et la présence d'un acide nucléique. Il nous a paru intéressant de nous faire une opinion pour les inclusions du virus bovinepestique.

3° La synthèse et la libération des virions par les cellules productrices de virus bovinepestique. En 1963, BREESE et DE BOER (3) ont étudié au microscope électronique les premiers stades de la maturation du virus bovinepestique dans les cellules de rein de veau en cultures cellulaires. Ils n'ont pu apporter aucune précision ni sur l'adsorption du virus infectant sur la membrane cellulaire, ni sur les phénomènes accompagnant l'entrée du virus dans la cellule, mais ils notent qu'après une période d'éclipse de 3 heures, on commence à trouver des images électroniques d'aspect viral dans des plages cytoplasmiques altérées, en même temps qu'apparaissent des formations syncytiales.

À la 24^h heure après l'infection, on rencontre des particules virales osmiophiles dans les mitochondries, qui seraient donc les lieux de synthèse de la nucléocapside virale ; ces particules sont de deux tailles : les unes de 40-60 m μ ne représenteraient qu'un précurseur ou un « virus incomplet » alors que les particules de 150-300 m μ seraient le virion. Ces amas s'étendent et grossissent les jours suivants, donnant des sortes d'inclusions cytoplasmiques sans architecture définie. Aucun détail n'est donné sur la maturation ni sur le processus de libération du virus, les auteurs suggérant que celle-ci se fait par lyse de la cellule.

Ce dernier point nous apparaît cependant comme extrêmement important, car c'est l'un des critères de classification d'un virus dans un groupe, notamment dans le groupe des myxovirus (6).

I. — TECHNIQUES GÉNÉRALES

I. — Nature de l'acide nucléique du virus bovinepestique

Nous avons suivi deux techniques.

A. — Fluorescence des cultures cellulaires colorées par l'acridine orange

On sait que l'orange d'acridine, colorant métachromatique, donne à l'examen en lumière ultraviolette une fluorescence verte des protéines contenant de l'acide désoxyribonucléique, alors que celles contenant de l'acide ribonucléique apparaissent avec toute une gamme de fluorescence rouge. Bien que le mécanisme intime de ce phénomène soit inconnu, on peut s'en servir pour typer les acides nucléiques (1).

Des cultures cellulaires de rein d'embryon de veau sont réalisées sur lamelles dans des tubes de Leighton. Quand la culture est confluite, on infecte avec la souche de virus bovinepestique RPKO/BK 34 à une multiplicité d'infection de 1 : 100 environ, puis on remet en culture.

Quand apparaissent les lésions cytopathiques (cellules étoilées, polycaryocytes), on retire des lamelles des tubes et on les fixe pendant 30 minutes dans le liquide de Carnoy ; on passe 15 minutes dans l'alcool absolu, puis 15 minutes dans l'alcool à 95° et on colore pendant 30 minutes dans une solution d'acridine orange au 1 : 2.000 dans un tampon acétate à pH 4,5. On lave ensuite 30 minutes dans le tampon sans colorant, puis on monte sur une lame en inversant la lamelle sur une goutte de tampon. On lute les bords à la paraffine et on examine au microscope en lumière bleu-violette (microscope Zeiss statif G équipé d'une lampe Osram HBO 200 à filtre d'excitation BG 12 et d'un filtre d'arrêt OG 5).

B. — Essais d'inhibition de la synthèse du virus

Les pyrimidines halogénées (5-fluoro, 5-bromo et 5-iodo-2'-déoxyuridine) inhibent la replication cellulaire des virus à acide désoxyribonucléique (16). En effet, ces pyrimidines halogénées bloquent la transformation de l'acide désoxyuridilique en acide thymidilique lors de la replication de l'ADN (*), et partant bloquent la forma-

(*) Dans la suite de cet exposé, nous emploierons les signes ADN et ARN pour acide désoxyribonucléique et acide ribonucléique.

tion des virus à acide désoxyribonucléique. La synthèse de l'ADN, et par là celle du virus, peut toutefois reprendre si l'on dépasse ce stade et que l'on apporte la thymidine préformée. Le développement des virus à acide ribonucléique n'est pas inhibé par les pyrimidines halogénées.

Cette technique, recommandée par COOPER (5) comme étant un critère de différenciation entre virus à ADN et ARN, a permis de déterminer de façon indirecte la nature de l'acide nucléique de nombreux virus.

Le principe de l'expérience consiste à ajouter des dilutions de 5-iodo 2'-désoxyuridine (ou IDU) à des cultures cellulaires infectées soit par le virus bovine pestique (virus à acide nucléique inconnu) soit par le virus vaccinal (virus à ADN connu), puis à en traiter certaines par une solution de thymidine ; on titre ensuite le virus dans les cultures.

Cultures cellulaires. — On trypsinise par les méthodes classiques des reins d'embryon de veau ; les cellules sont mises en cultures en milieu de Eagle MEM contenant 10 p. 100 de sérum de veau, soit dans des boîtes de Roux de 1 litre, soit dans des tubes de Leighton contenant une lamelle.

Lorsque les cultures cellulaires sont confluentes, on infecte 6 boîtes de Roux et 18 tubes à lamelles avec la souche du virus bovine pestique adapté à la culture cellulaire RPKO/BK 34, à la multiplicité d'infection de 1 : 100 environ. Après adsorption à 37° C pendant 1 heure 30 environ, on rince très soigneusement trois fois de suite les tapis cellulaires avec le liquide de Hanks ; puis :

— Dans une boîte de Roux et 4 tubes à lamelles, on répartit 100 ml de milieu de Eagle sans sérum auquel on ajoute 1 ml d'IDU à 10^{-3} M en eau distillée ; l'IDU est donc à la concentration finale de 10^{-6} M/ml de milieu.

— Dans une boîte de Roux et 4 tubes à lamelles, on répartit 100 ml de milieu de Eagle sans sérum auquel on ajoute 0,1 ml d'IDU à 10^{-3} M en eau distillée ; la concentration finale d'IDU est ainsi de 10^{-6} M/ml de milieu.

— Dans une boîte de Roux et 4 tubes à lamelles, on répartit 100 ml du milieu précédent à 10^{-6} M d'IDU/ml auquel on ajoute 1 ml de thymidine (*) à 10^{-3} M.

(*) La 5-iodo-2'-désoxyuridine et la thymidine nous ont été fournies par N. B. C., Cleveland 28, Ohio, U. S. A.

— Dans 3 boîtes de Roux et 6 tubes à lamelles, on répartit 100 ml de milieu de Eagle sans sérum sans aucun autre ingrédient. Un même nombre de boîtes de Roux et de tubes à lamelles sont infectés par le virus de la neuro-vaccine entretenu par ovoculture au Laboratoire ; les cellules sont remises en culture, après 3 lavages au Hanks, dans les mêmes milieux que décrits ci-dessus.

Observation et titrage. — Les 4, 5 et 6^e jours après l'infection, on colore à l'hématoxyline-éosine après fixation au Duboscq-Brazil une lamelle de chacune des cultures pour suivre la progression de l'effet cytopathique.

Le 6^e jour, on titre les différents liquides de culture : dilution décimale de 10^{-1} à 10^{-6} ; infection de couches cellulaires en tubes avec 0,1 ml de chaque dilution à raison de 5 tubes par dilution ; après une heure d'adsorption, on ajoute 2 ml de Eagle à 10 p. 100 de sérum. On lit 12 jours plus tard après avoir changé deux fois de milieu. On calcule les titres selon la méthode de REED et MUENCH.

2. — Histo chimie des inclusions cytoplasmiques produites par le virus en cultures cellulaires

Des cultures cellulaires de rein d'embryon de veau sont réalisées et infectées comme il a déjà été indiqué, à la multiplicité de 1 : 10 environ. Vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures après l'infection, on prélève des lamelles des tubes et on colore à l'hématoxyline-éosine après fixation au mélange de Duboscq-Brazil.

D'autres lamelles sont traitées selon le procédé de BRACHET et les variantes de techniques de LISON (12) pour la mise en évidence des acides nucléiques par la coloration au vert de méthyle-pyronine. Avec la pyronine dont nous disposons (*), il nous a paru préférable de ne pas réaliser l'extraction chloroformique sur le mélange vert de méthyle-pyronine, mais uniquement sur la solution de vert de méthyle.

Suivant ensuite les recommandations de LISON, on procède aux temps suivants :

Fixation au liquide de Carnoy, coloration au vert de méthyle-pyronine à pH : 4,5 et à la tem-

(*) Pyronine R. A. L., Prolabo, 12, rue Pelée, Paris 11^e.

pérature de $+2^{\circ}\text{C}$; déshydratation à l'alcool butylique tertiaire et montage. On apprécie la couleur des inclusions cytoplasmiques dont la présence a été mise en évidence sur les préparations précédentes : l'ADN se tiendra en vert et l'ARN en rouge.

La spécificité de cette réaction colorée est affirmée par un traitement de nouvelles lamelles de cultures à la ribonucléase. Après fixation à l'alcool-éther, on immerge pendant une heure les lamelles dans une solution de ribonucléase à 0,01 p. 100 (*) en tampon phosphate porté à 55°C ; on laisse digérer à cette température, puis on rince et colore au vert de méthyle-pyronine comme plus haut.

3. — Synthèse et libération des virions bovipestiques par les cellules productrices de virus

Cultures cellulaires. — Cellules de reins d'embryon de veau de première explantation obtenues et mises en culture ainsi qu'il a été dit précédemment. Elles sont cultivées dans des boîtes de Roux de 1 litre.

Virus. — Virus bovipestique souche RPKO/BK à son 34^e passage en culture cellulaire.

Lorsque la couche monocellulaire est confluente, on infecte pendant 1 h à 37°C avec 1 ml non dilué (multiplicité d'infection 1 : 1 environ), on rince deux fois au Hanks puis on remet le liquide de culture.

Préparations pour la microscopie électronique. — A des temps variables après l'infection cellulaire : 1, 2, 3, 6, 9, 14, 24 heures ; 2, 3, 4 jours, on fixe le tapis cellulaire à l'acide osmique tamponné selon PALADE, puis on décolle la couche cellulaire fixée à l'aide d'une spatule de caoutchouc. Après déshydratation dans différents bains d'alcool, les cellules sont incluses dans l'araldite ; en quelques circonstances, on inclut dans une trame de nucléohistone selon la technique de HUBERT, CARASSO et FAVARD (7) avant d'inclure dans l'araldite.

Les coupes sont exécutées sur microtome Servall Porter-Blum, montées sur grilles sans membrane support. Elles sont « colorées » pendant 90 secondes à 3 minutes dans une solution fraîche d'acide phosphotungstique à 2 p. 100 dans l'alcool

éthylque absolu additionné de quelques gouttes d'acétone jouant le rôle de mouillant (2).

Elles sont ensuite lavées à l'alcool éthylique absolu. Les coupes sont observées sur microscope RCA EMU 3C à des grossissements de 10.000 à 40.000 (*).

Quelques coupes sont colorées à l'hydroxyde de plomb.

II. — RÉSULTATS

I. — Nature de l'acide nucléique

Une fluorescence rouge brique extrêmement brillante se manifeste dans le cytoplasme de certaines cellules des cultures infectées par le virus pestique. Elle est très intense, plus orangée dans les cellules multinucléées.

Dans certaines cellules normales non infectées, on note une fluorescence rouge sombre ; elle n'a pas l'intensité de celle des cultures infectées.

Dans les deux sortes de cultures, les noyaux ont une fluorescence verte ; elle tire au vert émeraude dans les cultures infectées.

Les résultats enregistrés sont en définitive assez décevants car si l'on constate bien une augmentation de la fluorescence rouge dans les cultures infectées, signe probable d'une augmentation de l'acide ribonucléique, les images microscopiques ne sont cependant pas assez tranchées pour pouvoir attribuer au seul virus pestique la fluorescence rouge des cultures infectées. Des précisions sont apportées par les essais d'inhibition de la synthèse du virus.

A l'examen des lamelles des cultures infectées avec le virus bovipestique, on note l'apparition de l'effet cytopathique classique du virus le 4^e jour ; il est pratiquement total le 6^e.

Les couches cellulaires infectées de neurovaccine et mises en cultures dans les deux dilutions d'IDU ne présentent aucune altération notable ; tout au plus remarque-t-on un aspect sale des cultures, vraisemblablement dû à leur entretien

(*) Il nous est agréable de remercier ici M. A. BERKALOFF, Maître-assistant à la Faculté des Sciences de Paris, qui a bien voulu se charger d'exécuter les coupes et les photomicrographies électroniques.

(*) Ribonucléase N. B. C., Cleveland, Ohio, U. S. A.

dans un milieu sans sérum. Les cultures de neurovaccine entretenues dans un milieu à l'IDU et à la thymidine montrent par contre dès le 4^e jour des plages de rétraction de la couche cellulaire bordées de nombreuses cellules en voie de nécrose. Ces lésions s'accroissent les 5^e et 6^e jours. Elles sont identiques à celles des cultures témoins infectées de vaccine et cultivées dans ce Eagle simple.

Les titrages du virus pestique donnent le même titre ($10^{8,7}/0,1$ ml) dans tous les échantillons : Eagle normal, avec IDU, avec IDU plus thymidine.

Les titres du virus de la neurovaccine sont donnés dans le tableau suivant :

Titrage du virus bovipestique et du virus vaccinal

Virus	Addition au milieu de			
	Rien	IDU 10 ⁻⁶ M	IDU 10 ⁻⁵ M	IDU 10 ⁻⁸ M + Thym. 10 ⁻⁵ M
Peste bovine ..	10 ^{8,7} (*)	10 ^{8,7}	10 ^{8,7}	10 ^{8,7}
Neurovaccine.	10 ^{4,2}	10 ^{1,8}	0	10 ⁴
(*) Titre par 0,1 ml.				

La conclusion est donc nette : alors que l'IDU inhibe la synthèse du virus vaccinal, virus à ADN (absence d'effet cytopathique et de synthèse du virus là où il y a IDU, présence et production virale là où il n'y en a pas ou là où il est supplémenté de thymidine), cette même IDU reste sans effet sur la synthèse du virus bovipestique (mêmes lésions et mêmes titres dans tous les échantillons).

2. — Histochimie des inclusions cytoplasmiques

Dès les premières 24 heures après l'infection et bien avant que n'apparaissent les polycaryocytes, on remarque avec la coloration à l'hématoxyline-éosine des cellules dont le cytoplasme devient fortement basophile tandis qu'apparaissent en leur sein de petites inclusions éosinophiles.

Dès la 48^e heure apparaissent les syncytia avec les énormes inclusions cytoplasmiques en forme de « carte de géographie ».

Avec la coloration au vert de méthyle-pyronine, les inclusions cytoplasmiques apparaissent rose saumoné dès les premières 24 heures, s'élargissant en une flaque de même couleur dans les cellules multinucléées le jour d'après. Les noyaux sont colorés en vert, le fond du cytoplasme est à peine rose.

Après traitement par la ribonucléase, seule persiste la teinte verte des noyaux. La coloration des inclusions a disparu. On note d'ailleurs des trous dans le cytoplasme à l'endroit où auraient dû être les inclusions.

Aucune inclusion n'est colorable dans les cellules non infectées ; seul le fond cytoplasmique apparaît en rose très pâle.

3. — Synthèse et libération des virions

a) Résultats analytiques

Les échantillons examinés 6 heures après l'infection montrent déjà quelques modifications cellulaires (planche 1). Si l'ensemble de l'architecture cellulaire est intact, on remarque néanmoins l'apparition de saccules ergatoplasmiques remplis de particules opaques aux électrons ; la paroi de ces vésicules est bordée de ribosomes. On note également la présence d'un agrégat hétérogène, particulaire, dense, sans paroi propre. Mis à part ces néo-formations, ni le cytoplasme ni le noyau ne montrent d'altérations. Les mitochondries ne paraissent pas touchées. Tout au plus remarque-t-on une légère extraction, vraisemblablement due à un séjour trop prolongé dans les bains d'alcool (cette extraction n'est en effet pas visible sur les coupes effectuées aux temps suivants). On peut observer quelques pédicelles sur les membranes cellulaires.

Les échantillons de la 14^e heure après l'infection (planches 2 et 3) montrent l'évolution du processus dont on devinait la genèse au temps précédent. Les noyaux restent inchangés. Par contre, les vésicules ergatoplasmiques ont fortement augmenté de taille ; leur paroi présente toujours quelques ribosomes restés intacts. Les particules qui les remplissent ont augmenté de volume ; il arrive même qu'elles fassent éclater la paroi de la vésicule (planche 3) et se répandent dans le cytoplasme. La taille de ces particules

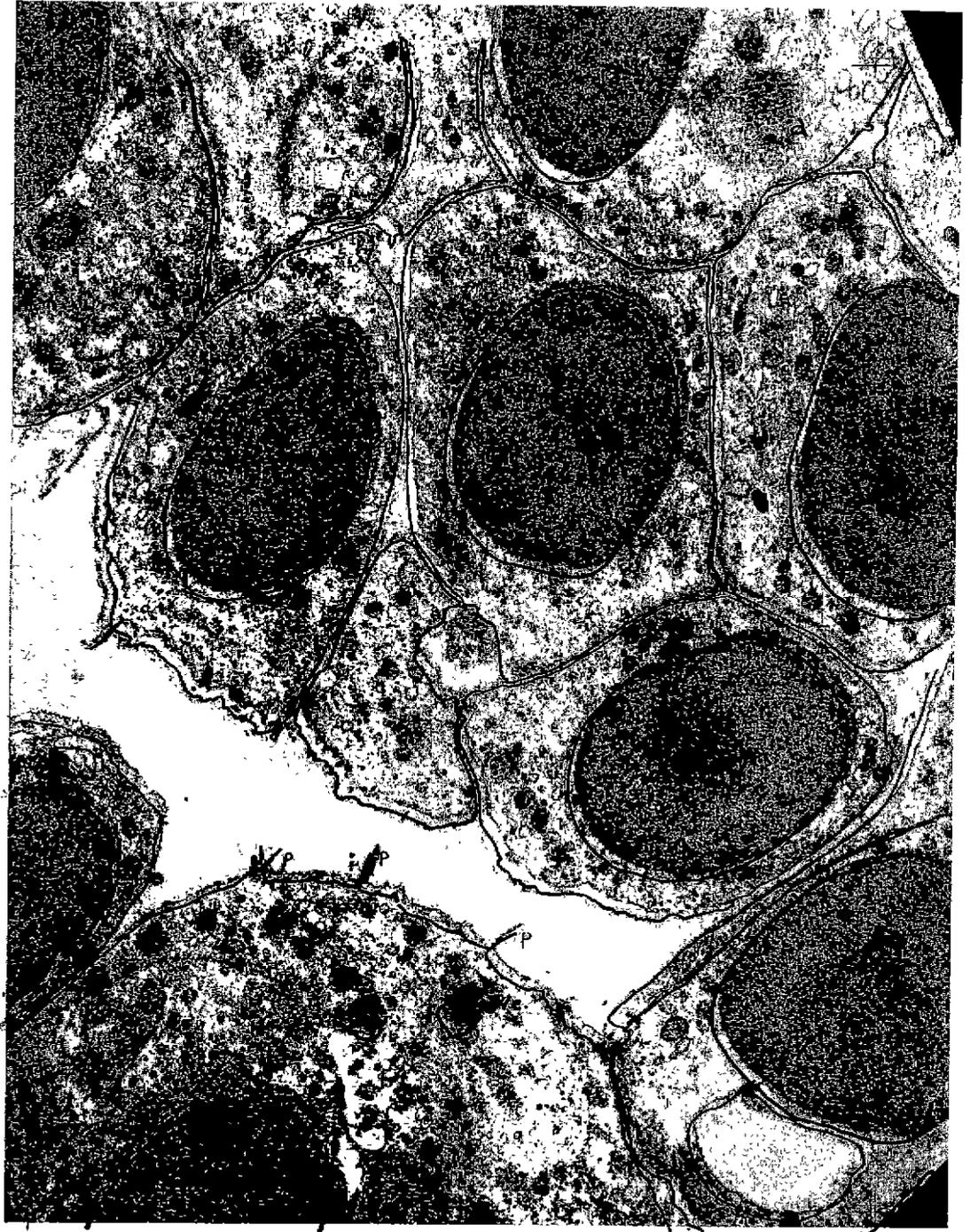


PLANCHE 1, G. : 10.000 × 2/3

A noter la présence d'un amas ribonucléique (a) et de vésicules ergatoplasmiques (ve) ; présence de quelques pédicelles.

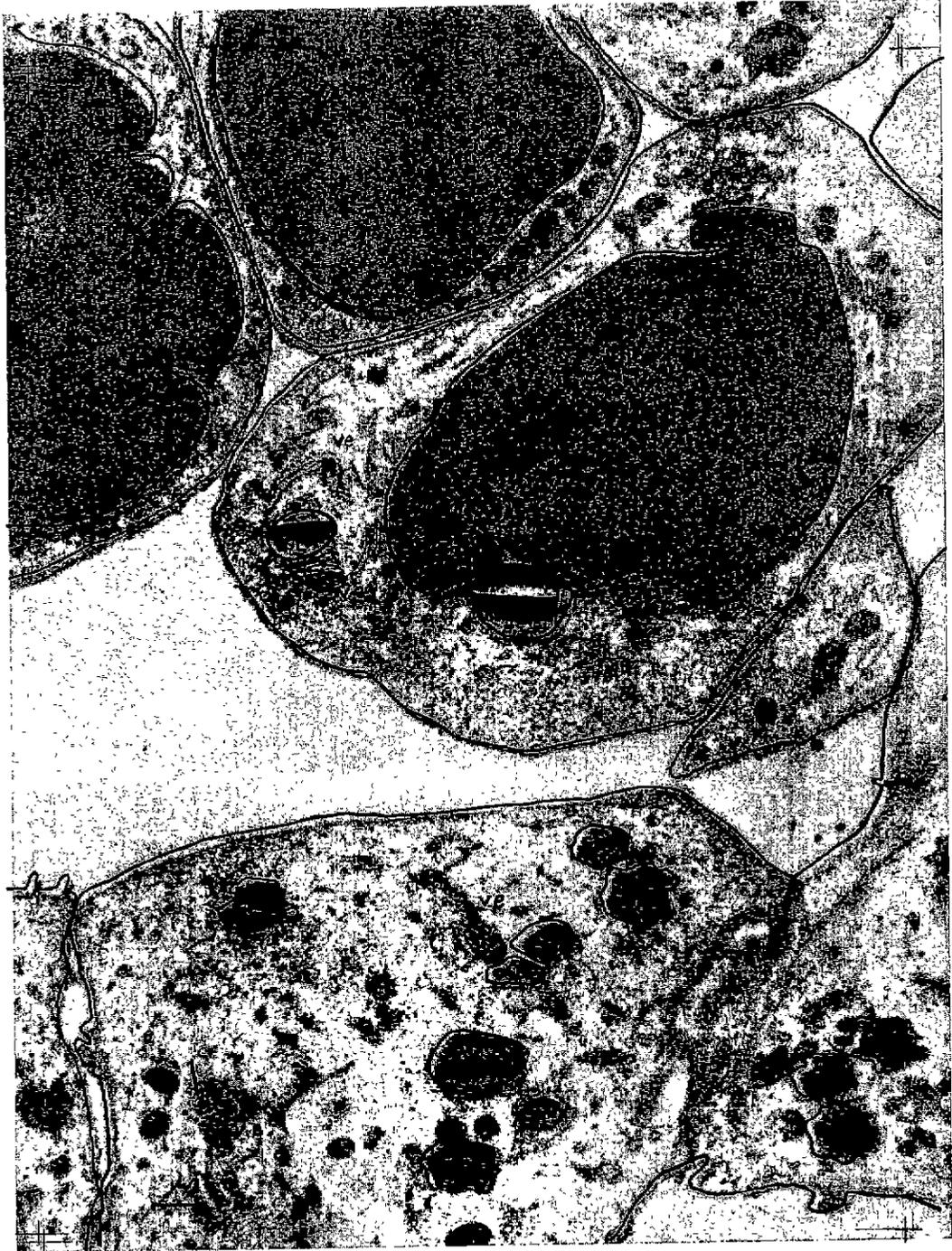


PLANCHE 2. G. : $10.000 \times 2/3$

On remarquera la présence de vésicules ergatoplasmiques (ve) les unes intactes, les autres rupturées. Présence de globules lipidiques (gl) et de cristaux d'acide phosphotungstique (cr) venant de la fixation.



PLANCHE 3. G. : $40.000 \times 2/3$

Détail de la planche précédente.

On note que les mitochondries (mi) sont intactes. On voit très nettement la présence de bourgeons viraux (bv) avec le nucléoïde central. La fusion cellulaire semble s'opérer en deux endroits.

intracytoplasmiques se situe entre 50 et 75 μ . Les mitochondries sont parfaitement normales ; on n'y remarque aucun processus dégénératif.

La surface cellulaire montre des villosités renfermant un filament central dense aux électrons (planche 3) ; ce sont des bourgeons viraux, analogues à ceux que l'on retrouve dans la libération cellulaire d'autres myxovirus (2, 15).

Il est par ailleurs remarquable de constater que se produisent déjà des processus de fusion cellulaire. On notera sur la planche 3 qu'en deux endroits les membranes cellulaires se sont fondues. Les ponts intercellulaires qui existent semblent bien être des fusions cellulaires et non pas un aspect particulier du desmosome, que l'on aperçoit d'ailleurs très bien sur la planche 3, à droite des bourgeons viraux.

Il n'y a pas de progrès notables à la 18^e heure sur le stade précédent (planche 4) ; on remarque deux bourgeons viraux avec nucléoïde central. Une partie de la membrane cellulaire commence à « friser », à se recouvrir de villosités. Le noyau ne semble prendre aucune part au processus.

A la 24^e heure, la formation et la libération des virions se précisent. Quelques images de la planche 5 sont frappantes. Les membranes cellulaires sont recouvertes de villosités et de pédicelles donnant un chevelu cellulaire sectionné par la coupe ; des pédicelles sont vus perpendiculairement, d'autres tangentielllement. Certains contiennent en leur centre des structures centrales parfaitement assimilables à des nucléocapsides virales. Il existe également de nombreux virions libres à nucléocapsides enveloppées ; certaines de ces enveloppes présentent des spicules périphériques ; la taille des virions varie de 100 à 200 μ . A remarquer également une forme virale allongée rappelant les formes en bâtonnet des myxovirus, de 600 μ de long sur 120 de large environ.

Mais on note d'autres faits intéressants en examinant cette figure. On remarque en effet des amas de particules virales, les unes libres dans le cytoplasme, les autres encore incluses dans des vésicules ergatoplasmiques. En regardant la photo, d'un peu loin, on voit alors que ces particules dessinent deux inclusions cytoplasmiques, sans architecture propre, incluant en leur sein des mitochondries. On retrouve ainsi ces petites inclusions cytoplasmiques éosi-

nophiles à structure hétérogène vues dès les premières 24 heures en microscopie optique, et dont nous avons montré qu'elles étaient constituées d'acide ribonucléique. Remarquons une fois encore que les mitochondries paraissent intactes.

Les stades ultérieurs n'ont pu être exploités correctement. La majorité des cellules est en effet infectée, libérant du virus et par là devenant fragiles ; elles tombent littéralement en ruine lors des inclusions.

Ce point ne semble pas spécialement à regretter car les phénomènes intéressant la synthèse et la libération du virus se sont passés dans les premières 24 heures.

b) Résultats synthétiques

La conduite de l'expérience ne nous permet pas d'apprécier comment s'effectue la fixation des virions sur la membrane cellulaire ni l'entrée du virus dans la cellule. Par contre, elle fournit des indications sur sa replication et sa libération.

Sur le plan morphologique, le noyau ne semble jouer aucun rôle dans la synthèse du virus ; celle-ci semble être uniquement cytoplasmique.

Elle nous paraît débiter dans des ribosomes bordant le réticulum endoplasmique. Il se crée ainsi une vésicule ergatoplasmique sans que les mitochondries prennent part morphologiquement au processus. Ces vésicules ergatoplasmiques grossissent en même temps que leur contenu augmente de volume ; certaines se rupturent dans le cytoplasme, laissant échapper des nucléocapsides virales. Le rassemblement des vésicules ergatoplasmiques hypertrophiées, de nucléocapsides virales libres et de mitochondries conduit à la constitution de ce qu'il nous semble être une inclusion intracytoplasmique ; c'est en fait un amas d'acide ribonucléique viral. Il ne semble toutefois pas nécessaire, ni à la synthèse ni à la libération du virus, que se forment ces amas-inclusions.

A la faveur des courants endoplasmiques, ces amas passent près de la membrane cellulaire. Celle-ci doit alors subir des modifications structurales particulières (formation de spicules que l'on voit en bas, à gauche de la planche 5) et laisse échapper les virions par une floraison de pédicelles néo-formés.



PLANCHE 4. G. : 33.000 x 2/3

Coloration au plomb. Les mitochondries (mi) sont intactes ; on remarque la présence d'un lysosome (L) ; l'ergatoplasme (e) est apparent. A noter des bourgeons viraux avec nucléoïde central et le début de « frisure » de la membrane cytoplasmique.

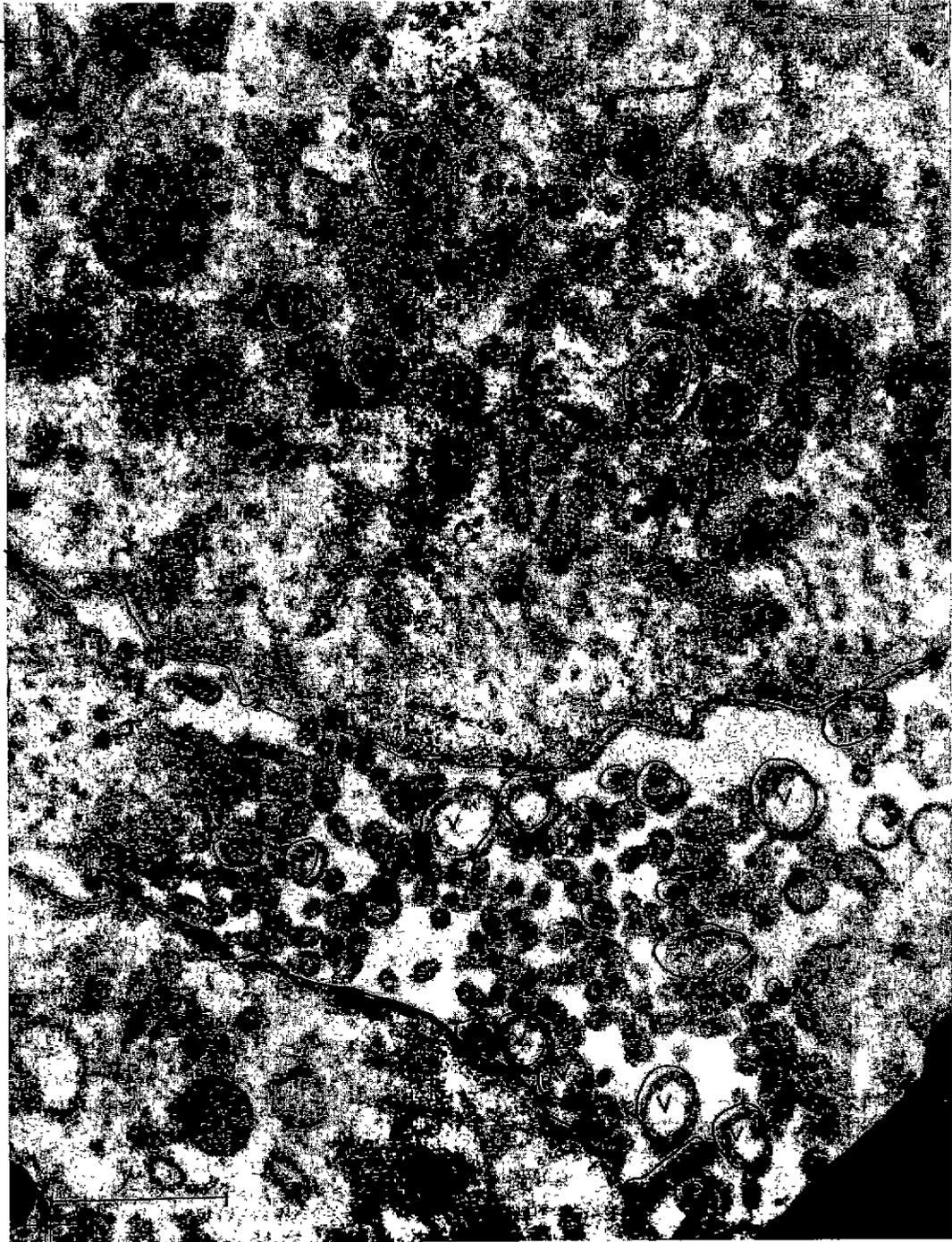


PLANCHE 5. G. 40.000

Les mitochondries (mi) sont intactes. On a indiqué par un pointillé l'amas de particules intracytoplasmiques qui semble correspondre à une inclusion. Très nombreuses villosités (v) coupées perpendiculairement ou tangentielllement, les unes vides, les autres avec nucléoïde central. Très nombreux virions (nv) libres ; une forme en bâtonnet (fb).

Chaque virion se retrouve libre dans le milieu ayant entraîné avec lui des fragments de membrane cellulaire. Les « plaies cellulaires » se colmatent par contact de deux « plaies » entre elles et fusion des cytoplasmes. Ainsi se trouveraient constitués les polycaryocytes.

Il est possible que la libération des virions s'effectue de façon continue, non pas selon un plan déterminé, mais au hasard des brassages cellulaires et du passage des particules virales près de la membrane cellulaire. Cette manière de voir rend compte à la fois de ce que l'on sait du titre élevé du virus intracellulaire et de la lenteur de sa libération.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Notre expérience d'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique a des analogies avec celle de HAMPARIAN, KETLER et HILLEMANN (6) qui ont également utilisé le virus vaccinal comme type de virus à ADN. Les titres obtenus dans nos essais peuvent paraître un peu faibles ($10^{5,2}$ /ml) mais on ne doit pas oublier qu'il s'agit de la primo-culture cellulaire d'un virus d'ovoculture. Quoi qu'il en soit d'ailleurs, nous retrouvons les résultats des auteurs précités (6) ainsi que ceux de SALZMAN (16) : le virus vaccinal, virus à ADN a sa replication inhibée par l'IDU.

De l'expérience faite avec le virus bovipestique se dégage la conclusion que ce dernier est un virus à acide ribonucléique car sa replication n'est pas inhibée par l'IDU. Cette constatation infirme l'hypothèse de COOPER (5) selon laquelle les virus du groupe rougeole- peste bovine-maladie de Carré sont des désoxyvirus. Notre conclusion permet d'étayer celles de LAM et ATHERTON (8) d'une part, de LÉVINE et OLSON (10) d'autre part, qui ont montré que le virus morbilleux, proche parent du virus pestique, est un ribovirus ; dans les expériences de ces auteurs, l'IDU s'est révélé incapable d'inhiber la synthèse du virus de la rougeole, comme ce même composé s'est montré incapable de le faire dans les nôtres pour le virus bovipestique.

L'étude histochimique des inclusions cytoplasmiques apporte des renseignements complémentaires. Lorsqu'elle est complétée par l'épreuve de la ribonucléase, la coloration au vert de

méthyl-pyronine indique spécifiquement la présence d'ARN.

Il a été dit que l'intensité de la coloration était en rapport avec la teneur en ARN du substrat (12). Il est non moins certain que le pH de la solution colorante influence l'intensité de la coloration. C'est pourquoi nous ne voudrions tirer aucune conclusion sur la teneur en ARN des grandes inclusions du virus pestique, nous contentant de noter simplement la présence de cet acide nucléique.

La coloration saumonée se retrouve dans les petites inclusions observées au bout de 24 heures aussi bien que dans les grosses inclusions des polycaryocytes ; il est d'ailleurs remarquable que ces dernières inclusions se colorent moins brillamment que les petites. Leur absence des cultures témoins laisse le droit de penser que ces inclusions sont en rapport avec la présence du virus et qu'éventuellement elles représentent des agrégats de particules virales.

Cette opinion, basée sur la présente expérience, est à rapprocher de celle de LIESS (11) qui, par la méthode des anticorps fluorescents, a vu apparaître dès la 12^e heure après l'infection des petits points de fluorescence spécifique du virus pestique dans le cytoplasme des cellules ; ces points s'élargissent par la suite en plaques fluorescentes plus larges qui occupent très exactement la place des inclusions cytoplasmiques.

Il semble donc hors de doute que dans le cas du virus bovipestique les inclusions cytoplasmiques qui apparaissent sont des amas d'acide ribonucléique ayant la spécificité immunologique du virus.

Si l'on rapproche cette conclusion de celle à laquelle nous avons abouti dans la première partie de cette étude sur la nature de l'acide nucléique du virus, on est conduit à se demander si la synthèse de l'ARN viral et la constitution des virions n'est pas uniquement cytoplasmique ; seule, la microscopie électronique pourrait apporter la réponse.

Des observations réalisées avec cette technique découlent les réflexions suivantes.

La replication endomitochondriale qu'avaient décrite BREESE et DE BOER (3) n'a jamais été apparente dans nos observations ; nous avons souligné que les mitochondries ne semblaient jamais être touchées. Bien plus, à l'examen des clichés du travail de BREESE et DE BOER,

il semble que ce soit dans des vésicules ergatoplasmiques identiques à celles que nous avons décrites et non dans des mitochondries (absence de crêtes dans ces formations), que prennent naissance les particules qu'ils appellent « virus-like ». Les deux théories seraient en fait d'accord.

Cette interprétation a le mérite d'être en accord avec ce que l'on sait de la replication des virus du groupe virus para-influenza (15) et leur libération par des pédicelles cellulaires néoformés et non par lyse cellulaire comme le supposaient BREESE et DE BOER. Il semblerait dans cette optique que le matériel intracytoplasmique ribonucléoprotéique mis en évidence par la coloration au vert de méthyle-pyronine représente, sinon les virions, du moins un précurseur du virus ; il en aurait même la spécificité antigénique (11).

La théorie que nous avons avancée sur la formation des polycaryocytes par fusions cytoplasmiques aux endroits de plaies cellulaires est basée uniquement sur des observations mor-

phologiques. Elle ne se trouve pas en contradiction avec d'autres observations antérieures (17) relatives à la présence d'une hémolysine virale déterminant la formation de syncytia sans celle de virus. On peut fort bien penser que cette hémolysine est nécessaire au virion pour se libérer du pédicelle ; la plaie cellulaire formée par cette hémolysine se répare alors par fusion cytoplasmique.

Nos résultats confirment pleinement l'hypothèse de WATERSON (18) qui rangeait le virus bovipestique parmi les myxovirus du groupe para-influenza sur le vu de sa morphologie. La nature de son acide nucléique, sa replication endocellulaire mais aussi sa libération par des bourgeons de la surface cellulaire, la durée de ce phénomène, la morphologie des virions néoformés, sont autant d'arguments qui permettent maintenant de l'affirmer.

*Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux.
Laboratoire de Recherches Vétérinaires
de Farcha, Fort-Lamy, Tchad.*

SUMMARY

Some fundamental researches on the rinderpest virus

The authors have shown by inhibition method of nucleic acid with halogen pyrimidines that the rinderpest virus was a ribonucleic acid virus.

Intracytoplasmic inclusions determined by it in cells culture are of ribonucleoproteic nature. These inclusions are antigenically specific of the virus. The virus replication is only endocyttoplasmic, without mitochondrial participation. The release of virus is carried out by budding of cellular surface. From all these characteristics, the rinderpest virus is nearly allied with the myxovirus group, para-influenza sub-group.

RESUMEN

Algunas investigaciones fundamentales sobre el virus bovipestico

Mediante técnicas de inhibición de los ácidos nucleicos por pirimidinas halogenadas, los autores mostraron que el virus bovipestico era un virus con ácido ribonucléico. Las inclusiones intracitoplasmicas que este determina en cultivos celulares tienen un modo ribonucléico ; Contienen la especificidad antigenica del virus.

La « replication » del virus es únicamente endocitoplasmica, sin participación mitocondrial. La liberación se efectua por brote de la superficie celular. Todo estos caracteres aproximan el virus bovipestico del grupo de los mixovirus subgrupo para-influenza.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARMSTRONG (J. A.) et NIVEN (J. S. F.). — Fluorescence microscopy in the study of nucleic acids. *Nature*, 1957, **180**, 1335-36.
2. BERKALOFF (A.) et COLOBERT (L.). — Modifications de l'ultrastructure de la membrane cytoplasmique des cellules de rein de veau infectées par *Myxovirus influenzae B*. *J. Microscopie*, 1963, **2** : 57-70.
3. BREESE (S. S.) et DE BOER (C. J.). — Election microscopy of rinderpest virus in bovine kidney tissue culture cells. *Virology*, 1963, **19** : 340-8.
4. CAPSTAR (D. L.), DULBESSO (R.), KLUG (A.), LWOFF (A.), STOKER (M. G. P.), TOURNIER (P.) et WILDY (P.). — Proposals, in: *Basic Mechanisms in animal virus biology*. Cold Spring Harbour symposia on quantitative biology, 1962, **27** : 49.
5. COOPER (P. D.). — A chemical basis for the classification of animal viruses. *Nature*, 1961, **190** : 302-5.
6. HAMPARIAN (V. V.), KETLER (A.) et HIL-LEMAN (M. R.). — Recovery of new viruses (coryzavirus) from cases of common cold in human adults. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1961, **108** : 444-53.
7. HUBERT (M. T.), CARASSO (N.) et FAVARD (P.). — Méthode de rassemblement de petits organismes en suspension pour l'inclusion dans les milieux visqueux. *J. Microscopie*, 1962, **1** : 163-6.
8. LAM (K. S. K.) et ATHERTON (J. G.). — Measles virus. *Nature*, 1963, **197** : 820-1.
9. LEPINE (P.), CHANY (C.), DROZ (B.) et ROBBE-FOSSAT (F.). — Cytopathogenic effects of two newly recognized myxovirus strains. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1959, **81** : 62-72.
10. LEVINE (S.) et OLSON (W.). — Nucleic acids of measles and vesicular stomatitis viruses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1963, **113** : 630-1.
11. LIESS (B.). — Fluoreszenzserologische Untersuchungen an Zellkulturen nach Infektion mit Rinderpestvirus. *Zentral. Bl. Bakt. I (Org.)*, 1963, **190** : 424-44.
12. LISON (L.). — *Histochimie et cytochimie animale*. 3^e éd. Gauthiers-Villars, Paris, 1960 : 384-737.
13. MORGAN (C.), HOWE (C.), ROSE (H. M.) et MOORE (D. H.). — Structure and development of viruses observed in the electron microscope. III. Influenza virus. *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 171-81.
14. PLOWRIGHT (W.), CRUICKSHANK (J. G.) et WATERSON (A. P.). — The morphology of rinderpest virus. *Virology*, 1962, **17** : 118-22.
15. RECZKO (E.) et BOGEL (K.). — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Verhalten eines vom Kalb isolierten Parainfluenza-3-Virus in Kälbernierenzellkulturen. *Arch. ges. Virusf.*, 1962, **12** : 404-20.
16. SALZMAN (N. P.). — The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. *Virology*, 1960, **10** : 150-3.
17. WARREN (J.), JENSEN (K.) et MASON (R.). — The syncitial viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1962, **101** : 520-6.
18. WATERSON (A. P.). — Two kinds of myxoviruses. *Nature*, 1962, **193** : 1163-4.