

ARTICLES ORIGINAUX

Effet de la pression osmotique sur la multiplication du virus de la peste bovine en culture cellulaire

P. BOURDIN et A. LAURENT

RÉSUMÉ

Une solution contenant 70 p. 100 de Hanks LAYE et dont la valeur osmotique est égale à 219 milliosmoles, appliquée pendant 2 h 30 à des cellules rénales d'embryon de veau inoculées depuis 3 jours avec le virus de la peste bovine, augmente de façon appréciable le titre de ce virus.

EATON et SCALA (1956) pour le virus Influenza, puis TOLSKAYA et coll. (1966) pour le virus poliomyélitique, ont remarqué une inhibition de la multiplication de ces virus en culture cellulaire lorsque les cellules infectées sont soumises à l'action d'un milieu hypotonique. Ces auteurs ont montré que cette inhibition était en relation avec une diminution de la pression osmotique.

Il a paru intéressant d'étudier l'action de la pression osmotique sur des cellules rénales d'embryon de veau inoculées avec un Paramyxovirus, le virus de la peste bovine. Les virus de ce genre sortent de la cellule au niveau de la membrane, comme l'ont montré COMPANS et coll. (1966) pour le Para-Influenza et PRO-VOST et coll. pour la peste bovine. Ce dernier a observé la formation de bourgeons viraux dès la 14^e heure après l'infection. Des modifications de la pression osmotique au niveau de la membrane cellulaire peuvent donc avoir une influence sur la libération des particules virales dans le milieu extérieur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Cultures cellulaires.

La technique de culture cellulaire mise au point par PLOWRIGHT et FERRIS (1959) pour la multiplication du virus pestique sur cellules rénales d'embryon de veau a été utilisée pour l'ensemble des expériences. Les cellules sont mises en culture dans des flacons de 250 ml de type « pharmacie » avec du milieu de Hanks LAYE contenant 10 p. 100 de sérum de veau, à raison de 25 ml par flacon et incubées à 37 °C. Au bout de 48 heures, ce milieu est renouvelé avec cette fois 5 p. 100 de sérum de veau. Le tapis cellulaire est inoculé à la 72^e heure et le milieu d'entretien est constitué par du Hanks LAYE., auquel on ajoute 2 p. 100 de sérum de bœuf et 3 p. 100 de bicarbonate de soude à 55 p. 1.000. Tous ces milieux contiennent des antibiotiques à raison de 100 UI de pénicilline, de 100 gamma de streptomycine et de 150 UI de mycostatine par millilitre.

2) Virus.

Le virus est constitué par la souche Kabete O adaptée aux cellules rénales d'embryon de veau par PLOWRIGHT et FERRIS (1959) et c'est son 103^e passage qui est employé.

3) Inoculation.

Les cultures cellulaires âgées de 3 jours sont vidées de leur milieu et mises en contact pendant 30 mn avec 1 ml de suspension virulente contenant 320.000 DICT 50. Au bout de ce temps, et suivant leur destination, les flacons sont remplis avec, soit 25 ml de milieu d'entretien, soit 25 ml de solution hypotonique.

4) Solutions hypotoniques.

Il est pris comme bases, pour la préparation des solutions hypotoniques, d'une part le milieu de Hanks LAYE dont la pression est estimée à 100 p. 100, d'autre part l'eau distillée stérile dont la pression osmotique est estimée à 0 p. 100. Il est préparé des solutions de Hanks LAYE contenant 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 p. 100 d'eau distillée. La pression osmotique de chacune de ces solutions a été calculée à l'osmomètre. Les résultats obtenus en milliosmoles sont consignés dans le tableau ci-dessous.

fait sur tubes roulants. La DICT 50 est calculée selon la méthode de REED et MUENCH (1938).

PREMIÈRE EXPÉRIENCE

D'après les titrages effectués par PLOWRIGHT et FERRIS (1959) (1963) et les études personnelles faites au microscope électronique, il est démontré que le virus de la peste bovine se répand de façon importante dans le milieu extérieur dès le 3^e jour, avant même que son effet cytopathogène ne soit visible au microscope optique. En conséquence, il a semblé intéressant dans un premier temps, d'essayer l'action de milieux hypotoniques, dont la pression osmotique décroît régulièrement de 100 p. 100 à 10 p. 100, sur des cellules inoculées depuis 3 jours. Le contact milieu hypotonique-cellule infectées a été fixé arbitrairement à 2 h 30. Après ce temps, les flacons sont rincés trois fois avec du Hanks LAYE, puis le milieu d'entretien est remis. Milieux hypotoniques et milieux de rinçage sont soigneusement additionnés d'antibiotiques dans les proportions déjà précisées. Les flacons sont récoltés lorsque l'effet cytopathogène atteint 80 p. 100 des cellules et les liquides virulents sont conservés à -20°C jusqu'au titrage. Pour

TABLEAU N° 1

Milieu Hanks-Lactalbumine extrait de levure	Eau distillée	Pression osmotique	Valeur en p. 100 de La.Y.E.
Pur	0	307	100 p. 100
90 ml	10 ml	278	90 "
80 -	20 -	249,5	80 "
70 -	30 -	219	70 "
60 -	40 -	179	60 "
50 -	50 -	158	50 "
40 -	60 -	130	40 "
30 -	70 -	94,5	30 "
20 -	80 -	64	20 "
10 -	90 -	30,5	10 "
0 -	100 -	0	0 "

5) Titrage du virus.

Le virus est récolté lorsque le tapis cellulaire est détruit à 80 p. 100. Les flacons sont conservés à -20°C en attendant le titrage qui est

chaque série d'expériences, les titrages sont effectués sur les cellules d'un même embryon et un témoin est mis en parallèle à titre comparatif.

RÉSULTATS

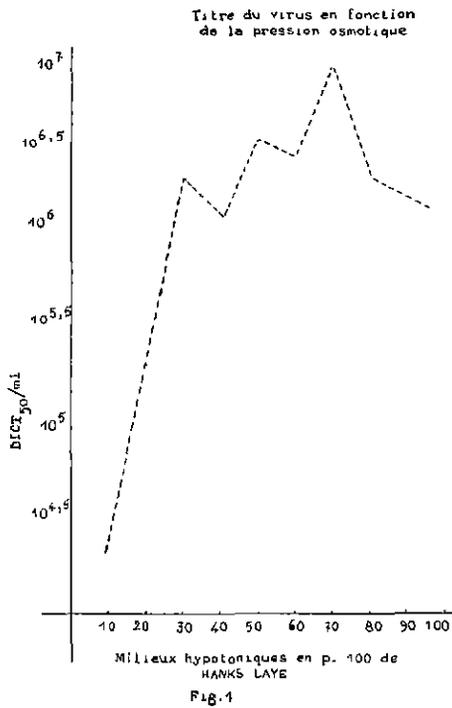


Fig. 1. — Les solutions hypotoniques ont été appliquées au bout de 3 jours d'infection, pendant 2 h 30.

L'examen de la figure 1 nous montre que le virus est présent en quantité plus importante dans les cultures ayant subi l'action d'un milieu hypotonique contenant 70 p. 100 de H. LAYE (pression osmotique : 219 milliosm.).

DEUXIÈME EXPÉRIENCE

D'après les résultats de la première expérience, il s'est avéré intéressant d'étudier l'influence d'une solution hypotonique à 70 p. 100 de H. LAYE à divers temps de la multiplication du virus. Cette solution est introduite 30 mn, 24, 48 et 72 h après l'inoculation et laissée en contact 2 h 30. Les conditions de lavage, d'entretien, de récolte et de titrage sont les mêmes que précédemment.

RÉSULTATS

L'examen de la figure 2 permet de constater que la solution hypotonique mise en contact

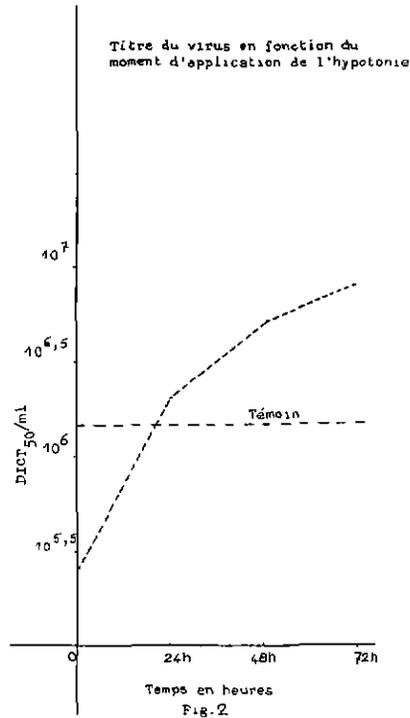


Fig. 2. — La solution hypotonique contient 70 p. 100 de HANKS LAYE, et a été appliquée pour chaque temps pendant 2 h 30.

avec les cellules trois jours après l'inoculation exalte de façon importante la multiplication du virus. On peut voir également que cet effet est progressif suivant le stade de la replication virale.

TROISIÈME EXPÉRIENCE

Les deux expériences précédentes ont mis en évidence que l'introduction d'une solution hypotonique contenant 70 p. 100 de Hanks LAYE, 3 jours après l'inoculation du tapis cellulaire, exaltait la replication du virus pestique. Le temps de contact cellules infectées, solutions hypotoniques fixé arbitrairement est, de 2 h 30. Il reste à vérifier si une variation de ce temps peut aussi influencer la multiplication. Dans ce but, les temps de contact ont été de 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 et 33 h. Au-delà de ce délai, les cellules présentaient des lésions dues à un effet toxique.

Pour chaque série d'expériences, le titrage est fait sur des cellules provenant d'un même

embryon. Les titres sont comparés au titre d'un liquide virulent témoin n'ayant subi aucun traitement.

RÉSULTATS

Les résultats réunis dans la figure 3 confirment que pour obtenir une augmentation du titre du virus pestique, il convient de laisser agir la solution hypotonique entre 2 et 3 h.

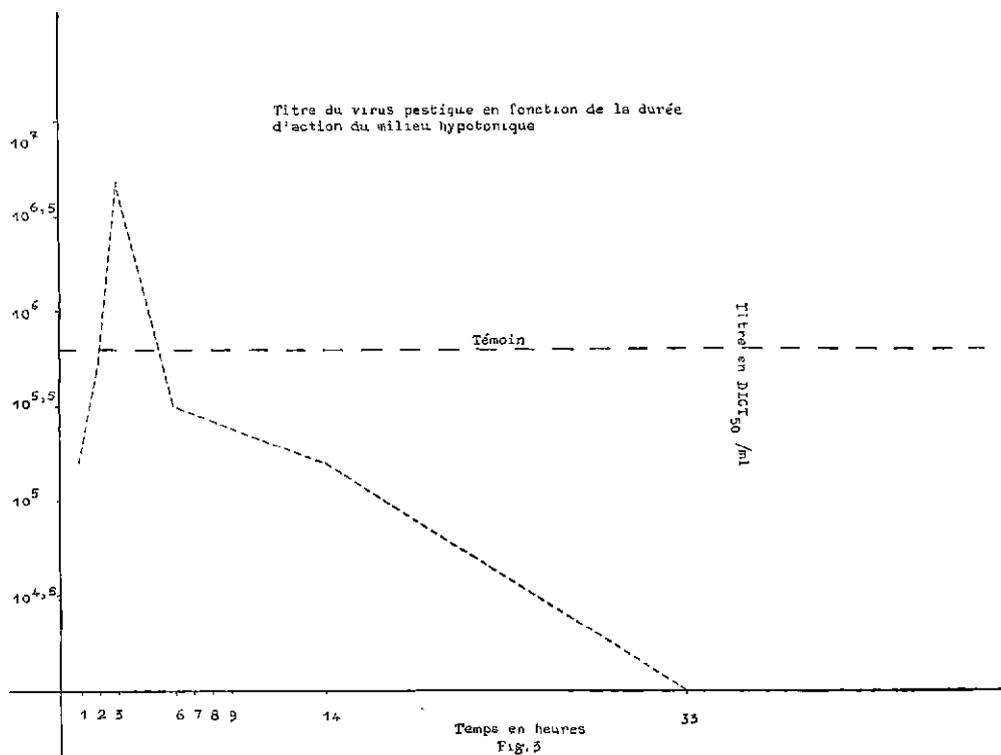


Fig. 3. — La solution hypotonique est à 70 p. 100 de HANKS La. Y. E. et a été appliquée au 3^e jour de l'inoculation.

mais qu'elle est exaltée pour les concentrations voisines de 70 p. 100 (Fig. 1).

2) pour un milieu hypotonique contenant 70 p. 100 de H. LAYE, cette replication est inhibée au début de l'inoculation des cellules et est augmentée à partir de la 24^e h pour devenir maxima au 3^e jour (Fig. 2). Cette observation semble indiquer que l'action d'un milieu hypotonique défavorise la pénétration du virus dans la cellule, mais facilite sa sortie, particulièrement au 3^e jour, époque à laquelle le virus cultivé dans des conditions normales est déjà abondant dans le milieu extérieur.

DISCUSSION

Les expériences précédentes montrent que :

1) suivant la valeur de la pression osmotique donnée en p. 100 de H. LAYE, la replication du virus pestique sur cellules rénales d'embryon de veau est inhibée pour de faibles concentrations (10, 20 p. 100) sans changement pour les concentrations avoisinant 50 p. 100 et 100 p. 100,

3) La durée d'action d'un milieu hypotonique à 70 p. 100 de H. LAYE 3 jours après l'inoculation est aussi un facteur important puisque pour un temps de contact de 1 h, la sortie du virus est faible, qu'elle est importante pour un temps de 2 à 3 h, et qu'elle diminue progressivement pour des temps compris entre 6 et 33 h (Fig. 3). On peut penser que la solution hypotonique appliquée trop longtemps altère la membrane cellulaire, la rendant impropre à assurer son rôle primordial dans la formation complète du virus. Il est difficile d'expliquer l'inhibition résultant de l'application de la solution hypotonique pendant 1 h.

CONCLUSION

Contrairement aux observations de EATON et SCALA (1956) pour le virus Influenza et TOLSKAYA et coll. (1966) pour le virus poliomyélique, dans des conditions bien précises, il est possible d'obtenir une augmentation de la

replication du virus de la peste bovine par l'abaissement de la pression osmotique.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux
Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches vétérinaires du Sénégal, Dakar-Hann.*

SUMMARY

Effect of the osmotic pressure on the multiplication of rinderpest virus in cell culture

The titre of rinderpest virus inoculated in calf embryo kidney cells for three days has been increased by action for two and a half hours, of a 70 per cent Hanks LAYE solution at 219 milliosmoles osmotic pressure.

RESUMEN

Efecto de la presión osmótica sobre la multiplicación del virus de la peste bovina en cultivos celulares

Se colocan durante 2 h 30 células renales de embrión de ternero inoculadas desde 3 días con el virus de la peste bovina en una solución cabiendo 70 p. 100 de HANKS LAYE y cuyo valor osmótico es de 219 miliosmoles.

Esta solución aumenta notablemente el título del dicho virus.

BIBLIOGRAPHIE

COMPANS (R.W.), HOLMES (K. V.), SAMUEL (D.), CHOPPIN (P. W.). — **An electron microscopic study of moderate and virulent virus cell interactions of the Para-Influenza virus SV5.** *Virology*, 1966, **30** : 411-26.
EATON (M. D.) et SCALA (A. R.). — **Reversible effect of hypotonic solutions on growth of influenza virus in tissue culture.** *Proc. soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1956, **92** : 289-97.
PLOWRIGHT (W.), et FERRIS (R. D.). — **Studies with Rinderpest virus in tissue culture.** *J. comp. Path.*, 1959, **69** : 151-76.
PLOWRIGHT (W.), et FERRIS (R. D.). — **The growth of virulent and attenuated strains**

of rinderpest virus in primary calf kidney cells. *Arch. f. Virusforschung*, 1963, **XIV** : 431-48.
PROVOST (A.), QUEVAL (R.), et BORREDON (C.). — **Quelques recherches fondamentales sur le virus bovipestique.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **18** (4) : 371-83.
REED (L. J.) et MUENCH (H.). — *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27** : 493.
TOLSKAYA (E. A.), AGOL (V. I.), VOROSHILOVA (V. I.), LIPSKAYA (G. Yu.). — **The osmotic pressure of the maintenance medium and reproduction of Poliovirus.** *Virology*, 1966, **29** : 613-21.