

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1968, 21, 1 (33-48).

Quelques recherches fondamentales sur le virus bovipestique

2. — L'hémagglutinine bovipestique

Relations antigéniques des virus pestiques et morbilleux (*)

par A. PROVOST et C. BORREDON

I. E. M. V. T. Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Farcha, Fort-Lamy, Tchad

RÉSUMÉ

Les auteurs ont mis en évidence l'existence d'une hémagglutinine du virus bovipestique. Ils précisent quelques conditions de son obtention, étudient quelques-unes de ses propriétés physico-chimiques et indiquent que les hématies du singe *Erythrocebus patas* sont les plus sensibles à son action. A côté de l'hémagglutinine paraît exister un autre antigène qui se fixe lui aussi sur les globules rouges de singe mais n'est pas hémagglutinant. Les cultures cellulaires infectées ne présentent pas le phénomène de l'hémadsorption.

L'hémagglutinine pestique n'est pas assimilable aux constituants du précipitogène. L'un des antigènes de ce dernier (antigène thermolabile et inactivé par l'éther) précipite avec un sérum antimorbilleux ; la ligne de précipitation est différente de celle que donne l'hémagglutinine morbilleuse avec ce même sérum. Il semblerait que ce soit par leurs nucléocapsides et non par leurs hémagglutinines que les deux virus entretiennent des communautés antigéniques.

La découverte empirique et fortuite par HIRST en 1941 du phénomène d'hémagglutination des hématies de poulet par les liquides embryonnaires de l'œuf de poule infecté par le virus grippal, a ouvert l'un des plus fructueux chapitres de la virologie contemporaine ; il est hors de propos de le passer en revue ici.

Le phénomène d'hémagglutination — tout au moins pour les familles des *Myxoviridae* et *Para-*

myxoviridae dans lesquelles on tend actuellement à ranger le virus de la peste bovine — est indépendant du pouvoir infectieux du virus, le premier pouvant se manifester sans que le second existe et inversement. L'explication en est apportée par l'ultracentrifugation différentielle et par la microscopie électronique qui montrent que la replication du virus, condition de son pouvoir infectieux, est liée à l'acide nucléique constituant du corps ou « noyau » viral tandis que l'hémagglutination est sous la dépendance de structures de l'enveloppe du virion.

Bien avant que soit connue la nature intime du phénomène, l'emploi de l'hémagglutination

(*) A. Provost, R. Queval et C. Borredon ont publié sous le titre « Quelques Recherches fondamentales sur le virus pestique » un premier article en 1965, Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop., 18, 4 (371-84).

et son inhibition par les sérums antiviraux étaient entrés dans une phase pratique. C'est ainsi que ces techniques sont depuis 20 ans utilisées pour titrer les liquides amniotiques et allantoïques d'œufs infectés par le virus de Newcastle, pour mesurer les anticorps d'oiseaux convalescents de pseudo- peste aviaire ou immunisés contre cette virose. On a même proposé de faire le diagnostic de la maladie de Newcastle en recherchant directement l'hémagglutinine dans les extraits d'organes de poules infectées (17). Il était tentant d'appliquer ces techniques et tout particulièrement cette dernière au virus bovipestique.

Différents chercheurs, dont KUTTLER (14), BROTHERSTON (4), l'un de nous (27) ainsi qu'HUYGELEN (8), se sont efforcés de trouver des propriétés hémagglutinantes à divers extraits d'organes de bovins, de lapins ou d'œufs embryonnés infectés par le virus pestique vis-à-vis des hématies de nombreuses espèces animales. Aucune tentative n'a été couronnée de succès, les hémagglutinations erratiques qui pouvaient se manifester n'étant pas spécifiques car non inhibées par un antisérum bovipestique. Il y a quelques années, PLOWRIGHT (24) concluait après quelques essais en cultures cellulaires, que le virus bovipestique n'était pas hémagglutinant, opinion reprise plus récemment par SCOTT (37).

Les recherches sur le virus de la rougeole, si proche du virus pestique, ont donné matière à réflexion. Les propriétés hémagglutinantes des liquides de cultures cellulaires du virus de la rougeole pour les globules rouges de différents singes, mises en évidence par PERIÈS et CHANY (23), ont conduit aux techniques de mesure des anticorps antimorbilleux dans les sérums (5), aux recherches de WATERSON, ROTT et ENDERS-RUCKLE (42) sur la structure du virion morbilleux et à la confection de nouveaux vaccins non pathogènes inattendus : les préparations d'hémagglutinine purifiée donnent chez l'animal, comme chez l'enfant, naissance à des anticorps qui sont protecteurs et assurent l'immunité (21, 22).

L'hémagglutinine du virus est constituée de sous-unités du peplos viral (synonyme pour : enveloppe externe), à l'exclusion de constituants internes du virion ; WATERSON a pu, en microscopie électronique, assimiler l'hémag-

glutinine à des fragments de peplos portant des spicules périphériques.

Un autre phénomène intéressant est celui de l'hémadsorption des hématites de singes sur les cellules en cultures infectées par le virus de la rougeole (13).

Les relations possibles entre le virus de la rougeole et celui de la peste bovine sont connues depuis que IMAGAWA, GORET et ADAMS (10) ont montré que des sérums de bovins immunisés contre la peste neutralisaient le virus morbilleux en cultures cellulaires. Réciproquement, PLOWRIGHT indiquait (24) que la rougeole de l'enfant s'accompagnait d'une apparition d'anticorps sériques neutralisant le virus pestique adapté aux cultures cellulaires de rein de veau. Enfin, point important pour ce qui nous intéresse, WATERSON, ROTT et ENDERS-RUCKLE (42) démontraient que le sérum d'un bœuf convalescent de peste possédait des anticorps inhibant l'hémagglutinine morbilleuse purifiée, anticorps que l'animal n'hébergeait pas avant l'infection. Ces travaux ont été largement étendus par BÖGEL, PROVOST et ENDERS-RUCKLE (1, 2, 3) qui ont pu en faire une méthode rapide de diagnostic de la peste bovine, tout particulièrement utile pour la confirmation de peste à virus hypovirusants si fréquents en Afrique centrale. Le mécanisme de cette réaction mettant en jeu un anticorps sérique spécifique et un constituant figuré à morphologie connue en microscopie électronique, on pouvait émettre l'hypothèse que des structures identiques existaient sur le virion bovipestique. Cette hypothèse est corroborée par les images obtenues en microscopie électronique du virus pestique par PLOWRIGHT, CRUICKSHANK et WATERSON (25) où des spicules et projections périphériques du peplos, morphologiquement semblables à celle du virion morbilleux, sont parfaitement identifiables.

L'hémagglutinine bovipestique devenait dès lors un « être de raison » qu'il fallait mettre en évidence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Souches de virus.

a) Trois souches de virus bovipestique ont été utilisées : l'une est la souche RPKO/BK de

PLOWRIGHT et FERRIS (26) employée entre ses 35 et 37^e passages en cultures cellulaires de rein de veau, ainsi qu'une variante thermostable de cette souche (31) ; une autre est une souche pathogène DK transmissible par contact entre bovins ; enfin, à l'occasion de quelques essais, on s'est servi de la souche BA de ISHII et TSUKUDA (12) adaptée à l'ovoculture en œuf de poule embryonné.

b) Deux souches de virus de la rougeole ont servi pour ces expériences : la souche MB 113 Y de SCHWARTZ et ZIRBEL (36) adaptée à la culture en cellules bovines ; la souche Measles 4 de M^{me} ENDERS-RUCKLE (6).

2. — Cultures cellulaires.

a) Cellules de rein d'embryon de veau, obtenues et entretenues selon les procédés conventionnels soit en milieu à l'hydrolysate de lactalbumine soit en milieu BEM de Eagle. A ces milieux on ajoute 10 p. 100 de sérum de veau sans anticorps antipestiques ou encore un sérum de veau identique mais dont les hétéro-agglutinines anti-hématies d'*Erythrocebus patas* ont été saturées par séjour avec des globules rouges de cette espèce pendant 2 heures à 37 °C. En quelques circonstances le tapis cellulaire a reçu après infection par le virus uniquement du milieu de Eagle sans sérum.

b) Fibroblastes d'embryons de poulet obtenus par digestion tryptique d'embryons de 9 jours et mis en culture en milieu à l'hydrolysate de lactalbumine à 2 p. 100 de sérum de veau.

c) Cellules de hamster, lignée BHK 21 —C 13, entretenues en milieu de Eagle d'abord à 10 p. 100 de sérum de veau puis à 2 p. 100 lorsque le tapis cellulaire est formé.

d) Cellules humaines, lignée Hela, entretenues en milieu de Eagle à 10 p. 100 de sérum de cheval ; elles servent exclusivement à l'entretien du virus morbilleux.

3. — Traitements des cultures.

Au maximum de l'effet cytopathique engendré par le virus, liquides de culture et tapis cellulaire résiduel obtenu par grattage sont récoltés et congelés à — 20 °C ; ils subissent ensuite

3 cycles de gel-dégel. A partir de là, diverses préparations sont effectuées :

a) Simple centrifugation destinée à sédimenter les gros débris ; le surnageant de la centrifugation entre en expérience.

b) Concentration de ce surnageant au 1 : 20 de son volume primitif par dialyse en sac de collodion à pores de 20 Å contre de la polyvinylpyrrolidone en poudre, puis rétablissement du pH et de l'isotonicité par dialyse contre un tampon aux phosphates $\frac{M}{90}$.

c) Traitement des préparations « a » par le mélange tween 80-éther selon une technique inspirée de celle de NORRBY (18) : addition sous agitation magnétique à 4 °C de 1,25 p. 100 (p/v) de tween 80 ; après agitation pendant 5 minutes, addition à volumes égaux d'éther sulfurique débarrassé de ses peroxydes par le sulfate ferreux ; agitation de 15 minutes à 4 °C ; centrifugation ; collecte de la partie aqueuse dans laquelle on fait barboter pendant 3 heures à température ordinaire un courant d'azote R.

d) Traitement identique des préparations « b » concentrées 20 fois.

e) Traitement des préparations « b » au désoxycholate de sodium selon la technique de NORRBY (20) ; l'addition de 0,05 p. 100 de désoxycholate (p/v) est retenue ; après agitation magnétique du mélange à température ordinaire pendant 15 minutes, on lui ajoute 0,3 p. 100 d'albumine de bœuf en poudre (fraction V) comme stabilisateur.

Selon que l'on part de cultures de l'une ou l'autre souche du virus bovine pestique en cellules bovines, aviaires ou de hamster (BHK 21), cultivées avec ou sans sérum, on obtient toute une variété de préparations qui seront précisées en temps opportun.

A chacune des préparations ci-dessus citées correspond son homologue réalisé selon le même protocole à partir de tapis cellulaires et de milieux non infectés.

Différents traitements physico-chimiques leur ont été appliqués ; ils seront décrits en temps utile.

4. — Globules rouges.

On recueille en solution d'Alsever du sang de bœuf, chèvre, mouton, cheval, lapin, cobaye,

rat, souris, oie, poulet et de singe *Erythrocebus patas*. Après lavages, on prépare des suspensions à 0,4 p. 100 et à 2 p. 100 en tampon phosphaté.

5. — Phénomène d'hémadsorption.

La réaction est réalisée selon la technique de VOGEL et SHELOKOV (40) sur des cellules de rein d'embryon de veau, des fibroblastes aviaires et des cellules Hela infectées par les virus bovipestiques ou morbillieux, en utilisant les suspensions d'hématies à 2 p. 100 des différentes espèces ci-dessus citées.

6. — Hémagglutinine morbillieuse.

On utilise une hémagglutinine commerciale (*).

7. — Production d'immunsérums.

a) Le sérum antibovipestique précipitant est préparé sur lapin avec la souche Nakamura III selon les méthodes conventionnelles (38).

b) Un immunsérum anti-hémagglutinine bovipestique est préparé par inoculation intramusculaire à des lapins du mélange à parties égales du liquide de cultures de cellules bovines infectées avec la souche DK traité par le tween-éther (préparation c) et l'adjuvant complet du type Freund ; les lapins sont saignés un mois après l'inoculation,

c) Un immunsérum précipitant anti-hémagglutinine morbillieuse préparée par le tween-éther et produit sur lapin, nous a aimablement été fourni par le Dr BÖGEL, du Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, Allemagne.

8. — Réactions *in vitro*.

a) Hémagglutination. Elle est réalisée classiquement en tubes par mélange d'un volume (0,2 ml) de dilutions de l'hémagglutinine morbillieuse, ou de l'une des préparations de virus pestique, d'un volume de diluant (tampon phosphaté) et d'un volume d'une suspension d'hématies à 0,4 p. 100. On lit après séjour d'une heure à 37 °C ou de 4 heures à 25 °C. Le titre est exprimé par la dilution donnant 100 ou 75 p. 100

d'hémagglutination ; on exprime ainsi l'unité hémagglutinante (U. H.) par 0,2 ml.

L'inhibition de l'hémagglutination s'effectue par mélange d'un volume de dilutions d'un anti-sérum avec un volume (4 U. H. d'hémagglutinine) puis après maturation du mélange pendant 1 heure à 37 °C, addition d'un volume d'hématies à 0,4 p. 100 lecture après 1 heure à 37° ou 4 heures à 27 °C.

b) Précipitation-diffusion en gélose. Elle suit les normes classiques déjà exposées (30) tant pour la préparation des précipitogènes bovipestiques que la réalisation des tests. L'écart entre les réservoirs est soit de 4 soit de 10 mm. La réaction est effectuée aux températures de 4° et 27 °C.

9. — Préparation de « vaccins ».

Une préparation de virus bovipestique cultivé en cellules d'embryon de veau sans sérum, concentrée 20 fois et ayant subi le traitement au désoxycholate de sodium, est émulsionnée à parties égales avec un adjuvant type Merck A 65 (45) préparé extemporanément.

Une préparation homologue est réalisée avec une hémagglutinine morbillieuse commerciale (préparée par la méthode tween-éther) titrant 5.000 U. H/ml. Chacun de ces « vaccins » est inoculé sous le volume de 2 ml par voie sous-cutanée à la base du fanon de 2 zébus de race bororo ; la sensibilité de ces animaux à la peste bovine a été attestée par le fait qu'ils ont été achetés en République centrafricaine, territoire libre de la maladie depuis de nombreuses années, et par l'absence d'anticorps neutralisant le virus bovipestique dans leur sérum. La cinétique de leur sérologie est suivie par les réactions de neutralisation en cultures cellulaires et d'inhibition de l'hémagglutination morbillieuse (3). Quarante cinq jours après la vaccination, ils reçoivent un aérosol de virus bovipestique virulent souche DK (28) en même temps que 2 témoins.

RÉSULTATS

1. — Essais d'hémagglutination directe.

Après de nombreux échecs au cours de différents essais utilisant les liquides de cultures de la souche RPKO en cellules rénales bovines et toute

(*) BEHRINGWERKE A. G., Marburg-Lahn, Allemagne.

une variété d'hématies de différentes espèces, on a enfin obtenu des hémagglutinations de titre variable dans les conditions suivantes : souche virulente DK, culture de 20 jours en cellules rénales bovines avec un milieu à 10 p. 100 de sérum de veau, concentration des cultures au 1 : 20. Avec cette préparation, l'hémagglutination est évidente avec les hématies de souris (titre 2¹), de rat (2¹), de lapin (2²), de cobaye (2²) et de singe *Erythrocebus patas* (2⁵).

La spécificité du phénomène est confirmée par une inhibition de l'hémagglutination avec un sérum de lapin antibovipestique dont les hémagglutinines naturelles sont au préalable saturées vis-à-vis de l'une ou l'autre des variétés d'hématies ; en présence de cet antisérum, il n'y a plus d'hémagglutination.

Pour ôter tous les doutes quant à une possible activité hémagglutinante du sérum apporté par le milieu des cultures cellulaires, une préparation hémagglutinante est réalisée d'une part avec un milieu sans sérum, d'autre part avec un milieu au sérum de veau absorbé avec une épaisse suspension d'hématies d'*E. patas*. Le phénomène a toujours lieu pour les hématies de cette espèce. Il est bon d'ajouter qu'aucune des préparations réalisées en contrôle avec des cultures non infectées ne montre de propriétés hémagglutinantes.

Dans la suite des expériences (hormis pour l'hémadsorption) et tenant compte que c'est avec les globules rouges de singe que l'on obtient les meilleurs résultats, seules ces hématies seront utilisées.

L'agglutination des hématies de singe est très stable ; il ne paraît pas y avoir d'élution comme pour l'hémagglutinine du virus de Newcastle. Lorsque l'hémagglutination s'est produite, on peut remettre les hématies en suspension en secouant les portoirs ; si on les abandonne de nouveau, l'hémagglutination se reproduit. Le processus peut être plusieurs fois répété.

Il a paru préférable de pratiquer les réactions en tubes de verre plutôt qu'en cupules de plexiglas où les hématies de mammifères ont parfois tendance à donner des figures de pseudo-agglutination (41).

Les titres de l'hémagglutinine obtenue paraissent être relativement modestes pour une préparation concentrée ; divers facteurs d'amélioration possible furent envisagés :

— traitement des hématies par la trypsine. Il a été montré pour les hémagglutinines de certains myxovirus qu'une mucoprotéine présente à la surface des hématies gênait l'hémagglutination ; le traitement par la trypsine permet de s'en débarrasser. On additionne une suspension d'hématies de patas à 3 p. 100 à parties égales avec une solution de trypsine (1 : 250) à 0,03 p. 100 ; on inactive après 130 minutes à 37 °C en ajoutant un volume égal d'inhibiteur de la trypsine (*) puis après lavages, on réalise une suspension à 0,4 p. 100 de ces hématies trypsinées. Le titre obtenu en hémagglutination n'est pas supérieur à celui de la préparation d'hématies de la même saignée non traitées.

Incidemment, on peut faire remarquer ici que l'hyperformolage des hématies d'*E. patas* par la technique de FAUCONNIER les rend inagglutinables.

— modification du substrat cellulaire. Il est de connaissance pratique que la culture des myxovirus et virus apparentés en cellules bovines est généralement accompagnée d'une chute de leur pouvoir hémagglutinant ; ainsi en est-il par exemple pour le virus de Newcastle (9, 34) et la souche MB 113 Y de virus morbilleux. Dans cet esprit, des cultures de la souche DK sont réalisées en cellules de hamster BHK21 — C13 et, après un passage en œuf embryonné, de la souche avianisée BA en fibroblastes de poulet. L'effet cytopathique à cellules étoilées et polycaryocytes apparaît classiquement, en 4 jours pour les cellules BHK 21, en une dizaine de jours pour les fibroblastes aviaires.

Les préparations de ces dernières cultures ne se montrent pas hémagglutinantes vis-à-vis des hématies de singe ni de poulet. Par contre, celles issues des cultures de cellules BHK 21 le sont mais à des titres comparables à celles issues de cellules bovines ; une seule préparation s'est montrée hémagglutinante au titre 2¹⁰ sans que l'on ait pu analyser les facteurs qui ont permis d'atteindre ce titre.

— modification du milieu de culture. Il n'est pas apparu au cours des deux essais réalisés sur le même lot de cellules rénales bovines cultivées, les unes en milieu à l'hydrolysate de lac-

(*) Egg white trypsin inhibitor, N. B. C. Cleveland, Ohio, U. S. A.

talbumine, les autres en milieu de Eagle (avec sérum de veau adsorbé par des hématies de patas dans les deux cas), que le milieu apportait de changement notable ; le titre obtenu pour la préparation concentrée 20 fois n'a été que de 2^3 , ce qui intrinsèquement est faible.

Par contre on a constaté que l'omission du sérum du milieu de culture, outre qu'il débarrassait de l'obligation fastidieuse de la saturation des hétéro-agglutinines, permettait d'obtenir des titres hémagglutinants plus réguliers à condition de recueillir le milieu d'entretien lors de la lyse totale du tapis cellulaire ; on verra pourquoi plus loin.

— Traitement des récoltes. On sait depuis les travaux sur le virus morbilleux que le traitement des préparations hémagglutinantes par le tween 80 immédiatement suivi d'addition d'éther éthylique (7, 19, 42) produit une augmentation des titres hémagglutinants. Ainsi en est-il de l'hémagglutinine bovipestique mais à un degré plus modeste puisque l'on ne gagne qu'une dilution (2^6 au lieu de 2^5). La préparation au tween-éther est inhibée jusqu'à la dilution 2^7 d'un immunosérum antipestique de lapin.

Le traitement de l'hémagglutinine morbilleuse par le désoxycholate de sodium a des effets équivalents à celui du tween-éther (20). Appliqué à l'hémagglutinine bovipestique, il ne permet toutefois pas d'augmenter le titre de la préparation.

En conclusion de ces essais, le protocole de préparation de l'hémagglutinine qui a été adopté est le suivant : infection par la souche virulente DK de cultures cellulaires de rein d'embryon de veau ; dans les trois premiers jours après l'infection, entretien des cellules en milieu de Eagle simple jusqu'à la lyse cellulaire complète ; trois cycles de gel-dégel ; centrifugation pour éliminer les débris ; concentration au 1 : 20 par dialyse sous-pression contre de la polyvinylpyrrolidone en poudre ; restauration du pH et de l'isotonie par dialyse contre un tampon phosphaté ; centrifugation clarifiante ; traitement au tween-éther selon la technique décrite. Les préparations se conservent plusieurs semaines à 4°C .

2. — Essais d'hémadsorption.

En parallèle avec ce qui est connu pour le virus morbilleux (13), il était logique de penser que

les tapis cellulaires infectés de virus pestique devaient présenter le phénomène d'hémadsorption d'hématies sensibles à la surface des cellules productrices de virus. Il n'en est rien. Les essais réalisés avec les souches RPKO/BK, DK et BA dans les systèmes cellulaires cités et en utilisant les hématies de différentes espèces n'ont jamais donné la moindre image d'hémadsorption alors que celle-ci est manifeste pour les hématies de patas avec la souche morbilleuse Measles 4 cultivée en cellules Hela.

3. — Nature physico-chimique de l'hémagglutinine.

Quelques tests simples permettent de s'en faire une idée.

a. — Relation entre le titre infectieux et le titre hémagglutinant. Une préparation de la souche DK obtenue dans les conditions ci-dessus décrites ($\times 20$) est titrée en cultures cellulaires rénales bovines en même temps que la même préparation traitée au tween-éther (T-E) et celle traitée par le désoxycholate de sodium (DSO).

Les titres infectieux des préparations et leur titre hémagglutinant s'établissent ainsi (par 0,2 ml) :

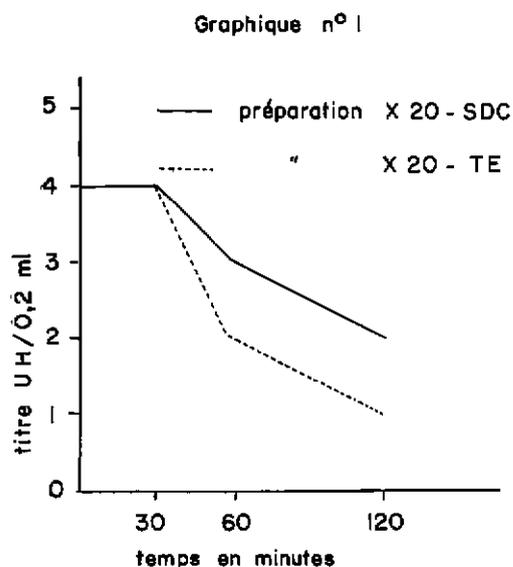
	Titre infectieux	Titre hémagglutinant
Préparation $\times 20$	2^6	2^2
Préparation T-E	0	2^5
Préparation DSO	0	2^4

Il est vraisemblable que le titre infectieux relativement modeste de la préparation concentrée 20 fois s'explique par l'inactivation intervenant au cours de la dialyse.

b. — Traitement thermique. Le chauffage à 56°C des préparations est suivi de leur titrage immédiat. Les chiffres permettent d'établir le graphique 1.

Le chauffage de 30 minutes à 62°C abolit totalement les activités hémagglutinantes des trois préparations.

c. — Traitement par le méta-periodate de sodium (35). On mélange à parties égales une solution $\frac{M}{90}$ de méta-périodate de sodium et de



Graphique 1. Inactivation thermique des préparations d'hémagglutinine bovipestique. En ordonnée, les titres sont portés en \log_2 . X 20 : concentré 20 fois par dialyse ; SDC : traitement par le désoxycholate de sodium ; TE : traitement par le Tween 80 puis l'éther éthylique.

chacune des préparations ; après 30 minutes à température ordinaire, l'agent oxydant est neutralisé en apportant du glucose 0,1 M (concentration finale dans la solution) puis on recherche l'activité hémagglutinante des préparations.

Elle est totalement abolie par ce traitement.

d. — Traitement à la trypsine. Aux différentes préparations on ajoute une solution de trypsine pour avoir une concentration finale de 0,5 mg/ml. Après séjour de 1 heure à 37 °C, la trypsine est inactivée en ajoutant 5 mg d'inhibiteur de la trypsine à chaque mélange. Ce traitement détruit toute activité hémagglutinante des préparations.

De ces expériences, il est aisé de tirer les conclusions que l'activité hémagglutinante est indépendante du pouvoir infectieux du virus, que l'hémagglutinine est relativement thermostable et que son activité est vraisemblablement sous la dépendance d'une protéine et d'un glucide (glycoprotéine ?).

4. — Mise en évidence d'un facteur non hémagglutinant.

On pouvait être surpris de ce que la souche RPKO/BK ne fournisse pas de préparations

hémagglutinantes. Toutefois, en postulant l'existence d'une hémagglutinine du virus pestique, hémagglutinine qui si elle existait, devait être du point de vue structural et antigénique très proche de l'hémagglutinine morbilleuse puisqu'un immunosérum antipestique inhibe cette dernière, on pouvait tenir le raisonnement suivant : en saturant les récepteurs globulaires, sites d'attache de l'hémagglutinine morbilleuse sur les hématies de patas, par les préparations citées plus haut, on doit empêcher l'attachement ultérieur de l'hémagglutinine morbilleuse et donc empêcher l'hémagglutination. C'est effectivement ce qui se produit.

Les préparations de la souche RPKO/BK en cellules rénales bovines (liquide de culture pur, dialysé ou traité par le tween-éther) sont chacune diluées en progression arithmétique de raison 2 sous le volume de 0,2 ml. On ajoute à chaque dilution 0,2 ml d'hématies de patas à 0,4 p. 100 et on laisse incuber 1 heure à 37 °C. Les hématies sédimentent, faisant la preuve de l'absence d'activité hémagglutinante directe de cette souche de virus bovipestique. On remet les hématies en suspension par agitation et on ajoute dans tous les tubes 2 unités hémagglutinantes d'hémagglutinine morbilleuse sous le volume de 0,2 ml. On inclut des témoins de l'activité de l'hémagglutinine morbilleuse et de la stabilité de la suspension globulaire. On lit après 45 minutes de séjour à 37 °C.

Il y a « empêchement » (terme utilisé pour ne pas se servir du mot inhibition qui pourrait prêter à confusion) de l'hémagglutination morbilleuse jusqu'à dilution 2^a avec les préparations pestiques concentrées 20 fois et celles traitées au tween-éther. Les témoins réalisés avec les milieux de culture non infectés n'entravent aucunement l'hémagglutination du virus morbilleux.

Le phénomène est spécifique car l'activité « empêchante » des préparations pestiques peut être abolie non seulement par un immunosérum antipestique mais aussi par un immunosérum antihémagglutinine pestique (voir Matériel et Méthodes) dont on a au préalable adsorbé les hétéro-hémagglutinines naturelles antipatas.

On a ainsi la preuve de l'existence dans les préparations pestiques d'un antigène qui bien que non hémagglutinant par lui-même peut occuper sur les hématies d'*E. patas* les sites d'attache

Figure n° 1

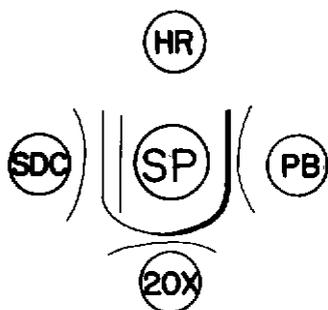


Figure n° 2

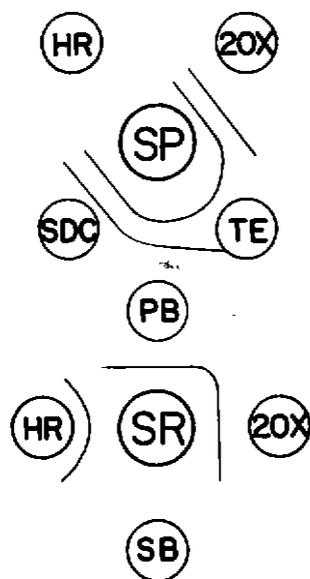


Figure n° 3

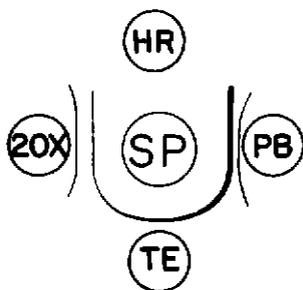


Figure n° 4

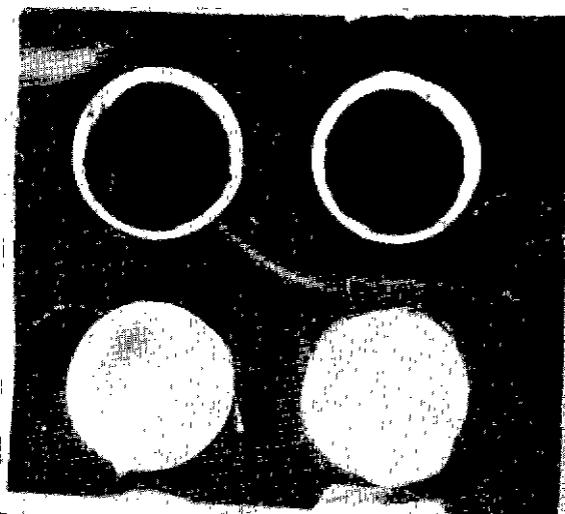


Fig. 4. — Ligne de précipitation commune au précipitogène bovipestique et à l'hémagglutinine bovipestique. Dans les deux réservoirs inférieurs, on a disposé un broyat de ganglion de bœuf pestique ; dans le réservoir supérieur droit, on introduit le sérum antipestique précipitant ; dans le réservoir supérieur gauche le sérum de lapin, antihémagglutinine tween-éther.

S. P. : sérum antibovipestique précipitant. — S. R. : sérum antihémagglutinine morbilleuse. — S. B. : sérum de bœuf. — P. B. : antigène bovipestique précipitant. — : ganglion de bœuf normal. — P. B. 56 : antigène bovipestique chauffé 30 minutes à 56°C. — 20 X : préparation concentrée 20 fois. — 20 X P. : préparation concentrée 20 fois puis traitée à 6 reprises par des hématies de patas. — S. D. C. : préparation au désoxycholate de sodium. — T. E. : préparation au tween-éther. — T. E. P. : préparation tween-éther traitée à 6 reprises par des hématies de patas. — H. R. : hémagglutinine morbilleuse commerciale.

Figure n° 5

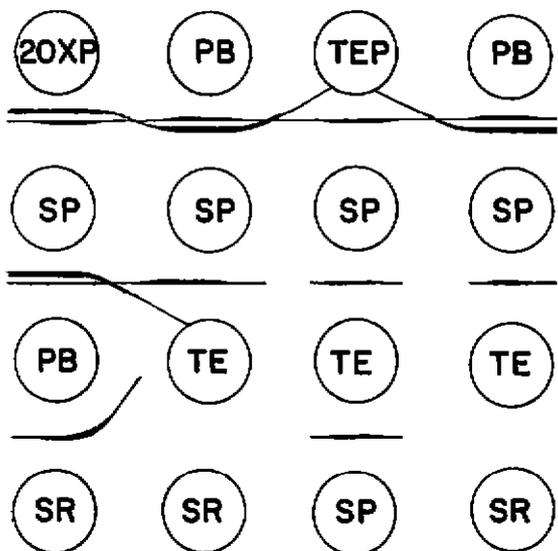


Figure n° 6

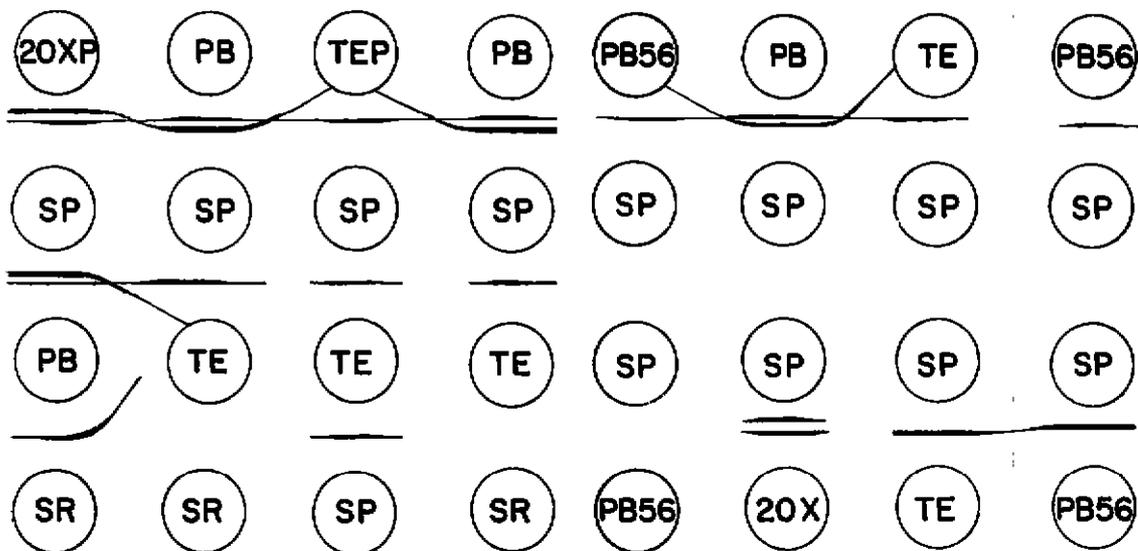


Figure n° 7

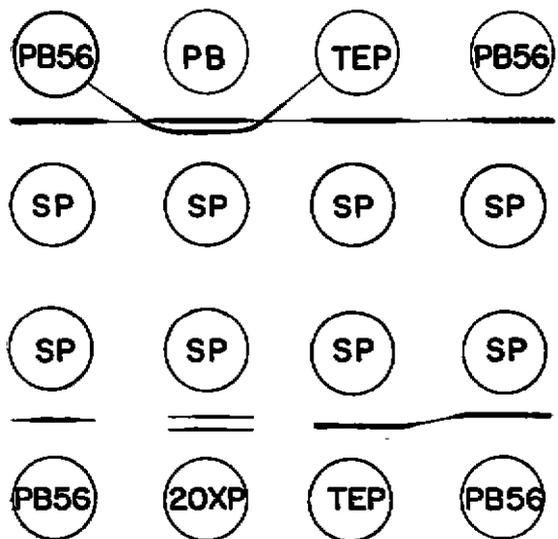
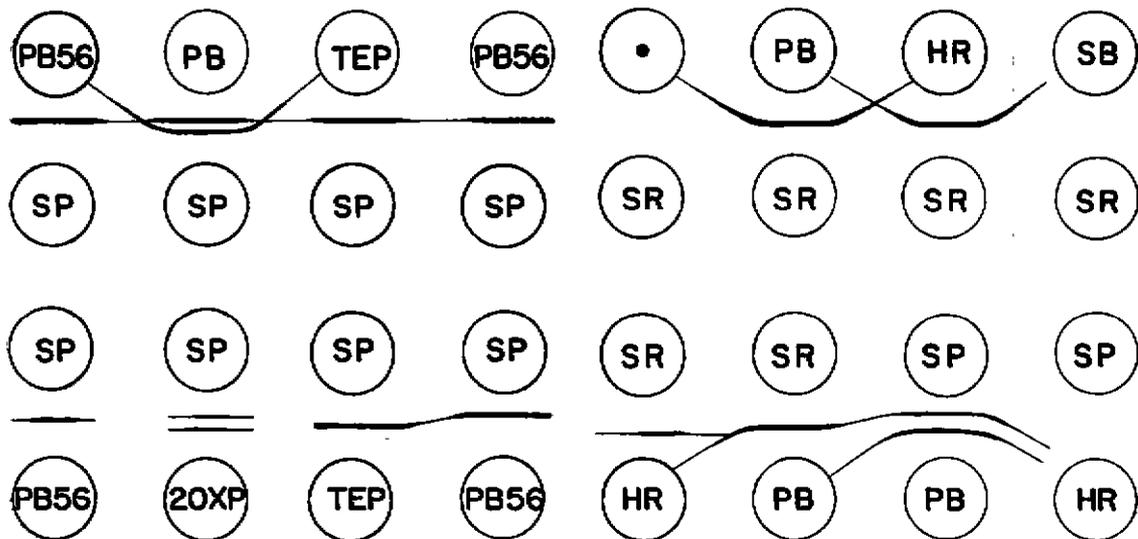


Figure n° 8



de l'hémagglutinine morbilleuse. On pourrait paradoxalement dénommer cet antigène bovipestique une « hémagglutinine non hémagglutinante ». Elle paraît être très proche de « l'hémagglutinine hémagglutinante » mise précédemment en évidence puisqu'elle est inhibée par son antisérum. Jusqu'à plus ample informé, il paraît s'agir d'un caractère de souche de virus pestique et non pas d'une faiblesse hémagglutinante intrinsèque aux préparations étant donné les titres « empêchants » (2⁹) atteints.

En l'absence de son image en microscopie électronique et pour néanmoins essayer de clarifier les idées, il est tentant de penser que les sites antigéniques compétents n'existent qu'à l'unité sur la particule non hémagglutinante (monovalence antigénique) alors qu'il y a pluralité sur les particules hémagglutinantes (plurivalence), qu'elles soient pestiques ou morbilleuses. Nous ignorons encore si l'hypothèse énoncée peut se rattacher à l'absence de phénomène d'hémasorption, qui en elle-même est extrêmement troublante.

Incidentement il est bon de faire remarquer que les sites d'attache globulaire de l'antigène non hémagglutinant sont spécifiques au groupe peste-rougeole car, expérience faite, les tentatives d'occupation de ces sites que l'on peut faire avec une hémagglutinine du virus de Newcastle n'empêchent pas l'hémagglutination ultérieure de ces hématies ainsi traitées par les hémagglutinines morbilleuses ou bovipestiques.

Enfin, comme on le verra plus loin ; il n'y a pas identité entre la particule non hémagglutinante et le précipitogène bovipestique.

5. — Activité hémolytique.

Lorsque l'on abandonne à température ordinaire certains titrages d'hémagglutinine bovipestique, on constate qu'au bout de quelques heures la couronne d'hématies précédemment hémagglutinées a disparu et que l'hémoglobine est dissoute dans le liquide.

Le phénomène est là encore spécifique car il est entravé par les immunsérums antipestiques, à un titre identique à celui de l'inhibition de l'hémagglutinine.

Là s'arrête la ressemblance entre virus pestique et morbilleux. En effet, alors que l'hémolysine morbilleuse est détruite par le traitement au

tween-éther, l'activité hémolytique de ces préparations du virus pestique est conservée. Il faut par ailleurs faire remarquer que toutes les préparations concentrées ne donnent pas lieu au phénomène d'hémolyse ; il nous a semblé que la dialyse à 4 °C permettait de la détecter plus régulièrement que la dialyse à température ordinaire.

6. — Précipitations-diffusions en gélose.

Les résultats sont donnés dans les figures 1 à 8. Elles appellent quelques commentaires :

— Il existe une ligne commune de précipitation à l'antigène précipitant (broyat de ganglion pestique) et aux différentes préparations hémagglutinantes vis-à-vis de l'immunsérum antipestique précipitant. En de nombreuses occasions, les préparations concentrées 20 fois et au désoxycholate de sodium ont fourni 2 lignes de précipitation se fondant avec les deux lignes du précipitogène ; la préparation au tween-éther n'a jamais donné qu'une seule ligne de précipitation (*).

— Fort de ce dernier résultat et de celui de la figure 4 où l'on voit un sérum de lapin anti-hémagglutinine bovipestique (hémagglutinine tween-éther) donner une ligne de précipitation avec le précipitogène pestique qui se fond dans celle que donne le sérum précipitant, on serait tenté d'assimiler l'hémagglutinine à l'un des composants du précipitogène. Cette proposition est fautive comme le montrent les figures 5 et 7 : le traitement des préparations 20 x et tween-éther à six reprises successives par un culot d'hématies de patas épuise totalement leur activité hémagglutinante sans modifier leurs qualités précipitantes ; la première préparation précipite toujours avec deux lignes, la seconde avec une seule.

On est donc tout au plus autorisé à dire que le précipitogène bovipestique accompagne l'hémagglutinine dans les préparations, sans qu'il lui soit assimilable. Incidentement, on remarquera que le

(*) Tout comme SCOTT et BROWN (38), on ne détecte le plus souvent qu'une seule ligne de précipitation avec des broyats de ganglions pestiques frais, mais, selon notre expérience, toujours très régulièrement deux lignes avec les mêmes broyats lyophilisés. L'une d'elles correspond à l'antigène thermostable à 56 °C, l'autre à un antigène thermolabile (figures 6 et 7), observation qui confirme celle de STONE (39).

traitement par le tween-éther fait disparaître l'un des composants du précipitogène qui est justement celui qui est thermolabile à 56° puisqu'est conservée la ligne commune à la préparation tween-éther et à l'antigène pestique chauffé (fig. 6 et 7).

— En aucune occasion l'hémagglutinine morbilleuse (préparée par le tween-éther) n'a donné de ligne de précipitation avec le sérum pestique précipitant. Inversement il existe une ligne commune entre les 2 systèmes précipitogène bovipestique-sérum antipestique et précipitogène bovipestique-sérum antimorbilleux (fig. 8) ; cette ligne commune correspond à celle de l'antigène pestique thermolabile et inactivé par l'éther. Le sérum précipitant antimorbilleux donne une ligne de précipitation avec son hémagglutinine et une autre ligne, non jointive mais croisée avec la précédente vis-à-vis du précipitogène pestique et de la préparation 20 × (fig. 2 et 8) ; par contre il n'y a pas de précipitation avec l'hémagglutinine bovipestique au tween-éther (qui, on l'a vu, ne contient plus d'antigène pestique thermolabile).

Il y a donc dissemblance entre les 2 systèmes précipitants et l'on peut en tirer une conclusion dogmatique extrêmement importante : ce n'est pas par leurs hémagglutinines que les virus de la rougeole et de la peste bovine entretiennent des caractères antigéniques croisés mais par l'un des composants du précipitogène bovipestique qui est détruit par l'éther et thermolabile à 56° (comparaison des fig. 2, 5 et 7). Par assimilation à la structure des virions de la famille des *Paramyxoviridae* et singulièrement celle du virion morbilleux, on est en droit de penser que ces antigènes communs se rencontrent au niveau des nucléocapsides.

7. — Applications pratiques (*).

a. Recherches des anticorps antipestiques.

La sérologie de la peste bovine se fonde jusqu'alors soit sur les techniques de séro-neutralisation (30), soit sur celle de l'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse (1, 2, 3). Cette dernière a l'immense avantage de posséder une

méthodologie simple. Toutefois, utilisée depuis 3 ans au Laboratoire de Farcha, on a pu constater dans le temps une divergence dans la cinétique des anticorps antipestiques neutralisant et ceux inhibant l'hémagglutinine morbilleuse (29) ; il est devenu évident qu'elle ne peut servir aux sondages d'immunité antipestique mais doit être réservée à la détection d'un contact récent avec le virus pestique.

Il ressort, des résultats ici exposés qu'un test d'inhibition de l'hémagglutination antipestique peut parfaitement être mis en œuvre. On le réalise de la manière suivante : inactivation des sérums sous test à 56 °C pendant 30 minutes ; saturation des hétéro-agglutinines anti *E. patas* par une suspension d'hématies de singes de cette espèce ; centrifugation ; dilution des sérums adsorbés et répartition des dilutions sous le volume de 0,2 ml ; addition d'un égal volume d'hémagglutinine pestique traitée par le tween-éther, diluée pour contenir 4 U. H/0,2 ml ; incubation d'une heure à 37 °C ; addition à tous les tubes de 0,2 ml d'une suspension d'hématies de singe à 0,4 p. 100 ; lecture après 45 minutes de séjour au bain-marie à 37°. On a bien sûr incorporé des témoins appropriés pour l'hémagglutinine et les sérums.

Les premiers résultats montrent un parfait accord entre anticorps neutralisant et inhibant l'hémagglutination. Nous ne possédons pas encore suffisamment de résultats pour établir de concordance statistique.

b. Immunogenèse antipestique.

Les deux préparations de vaccins inactivés décrites au chapitre Matériel et Méthodes engendrent une immunité clinique appréciée lors de l'épreuve virulente 1 mois 1/2 après la vaccination ; les bovins vaccinés n'extériorisent aucun symptôme de peste alors que meurent les témoins.

De cette expérience, il faut faire ressortir un point singulièrement remarquable et qui est *a priori* en contradiction avec la proposition ci-dessus énoncée concernant les communautés antigéniques des deux virus ; c'est l'aptitude de l'hémagglutinine morbilleuse à engendrer une immunité antipestique alors que les essais *in vitro* conduisent à penser que ce sont les nucléocapsides virales qui ont des motifs antigéniques communs. Nous discuterons plus loin ces résultats paradoxaux.

(*) Ces applications sont mentionnées ici sans détails expérimentaux qui doivent faire l'objet de publications séparées.

DISCUSSION

Les expériences rapportées laissent peu de doutes quant à l'existence de l'« être de raison » qu'était au départ l'hémagglutinine du virus bovipestique.

Cette hémagglutinine partage les propriétés physicochimiques de l'hémagglutinine de la rougeole. Il reste certes à explorer sa structure en microscopie électronique ; c'est une recherche à laquelle nous nous employons.

La présence d'une hémolysine du virus bovipestique avait été postulée (33) pour expliquer la formation des polycaryocytes accompagnant la synthèse et la libération des virions pestiques en cultures cellulaires ; elle reçoit ici la démonstration de son existence, encore qu'il soit patent que des travaux restent à faire à son sujet.

Plus troublante est l'existence de l'antigène non hémagglutinant. Le fait qu'il soit adsorbable sur hématies de patas le rapproche de l'hémagglutinine et le différencie nettement du précipitogène. L'explication sera peut-être apportée par la microscopie électronique ; il n'est pas interdit de penser que cet antigène puisse se rapprocher de l'antigène ZGHA étudié par ROTT (35) pour le virus de Newcastle et que cet auteur a assimilé aux viromicrosomes existant lors de la synthèse virale. Il est bon de rappeler que nous avons observé dans les cellules infectées par le virus pestique souche RPKO/BK l'existence de tels viromicrosomes (33).

Alors que cette étude était quasi terminée (elle a débuté en juin 1965), nous avons eu connaissance de la thèse de LIESS (15), auteur qui établit lui aussi l'existence de l'hémagglutinine bovipestique et vient ainsi confirmer nos résultats. Il détecte avec plus de régularité l'hémagglutinine dans les broyats ultrasonnés de cellules infectées que dans le surnageant, comme si la libération cellulaire de l'hémagglutinine était entravée ou qu'elle soit en partie inactivée dans le milieu. Nous souscrivons volontiers à cette observation, en faisant toutefois remarquer que les récoltes de LIESS sont effectuées quelques jours seulement après l'infection cellulaire alors que nous attendons la lyse du tapis pour pratiquer les nôtres. Nous confirmons également l'hémagglutination des hématies de lapin et de cobayes, mais les titres obtenus sont notablement inférieurs à ceux que donnent les hématies d'*E. patas*.

La négativité du phénomène d'hémadsorption, notée par LIESS et PLOWRIGHT (16), par LIESS (15) et dans la présente recherche, ne reçoit pas d'explication satisfaisante d'autant plus que la microscopie électronique montre l'existence de microvillosités à la surface des cellules infectées. Là encore des recherches s'imposent, en modifiant notamment les souches de virus et les conditions de culture.

Il en est d'autres encore plus pragmatiques à entreprendre qui consistent à améliorer le rendement des cultures en hémagglutinine. Le test d'inhibition proposé ne verra vraiment d'application pratique que lorsque l'on pourra produire l'hémagglutinine facilement sans être obligé de procéder à de fastidieuses opérations de dialyse. Tout n'est donc pas dit à son sujet. Il est possible, comme cela est connu pour la rougeole (6), que certaines souches de virus se montrent plus hémagglutinantes que d'autres ; il serait bon dans cette optique de sélectionner des souches bovipestiques à effet cytopathique rapide, ne formant que de petits polycaryocytes et une majorité de cellules étoilées et fuselées.

Les résultats exposés plus haut indiquent clairement la dissemblance de l'hémagglutinine et du précipitogène bovipestique. La nature purement protéique de l'antigène soluble précipitant avait déjà été établie par WHITE et COWAN (44) ; l'hémagglutinine, on l'a vu, contient un hydrate de carbone.

On pourrait être surpris du fait que l'hémagglutinine ne donne aucune ligne de précipitation en gélose avec les immunosérums antipestiques. Cette constatation ne reçoit pas encore d'explication mais rejoint ce que l'on sait dans la rougeole où les immunosérums antimorbilleux ordinaires ne précipitent pas l'hémagglutinine morbilleuse ; le sérum anti-hémagglutinine morbilleuse utilisé ici avait été préparé par hyperimmunisation de lapins avec une hémagglutinine mélangée à cet adjuvant de FREUND.

L'assimilation du précipitogène bovipestique thermolabile à des fragments de nucléocapside se trouve en accord à la fois avec les résultats de WHITE et COWAN (44) sur sa nature protéique dans laquelle se retrouve 0,1 p. 100 de l'infectiosité originelle du virus (à chaînes d'acide ribonucléique ?) et la proposition de WHITE (43) sur l'identité de l'antigène fixant le complément et du précipitogène. La structure des virions des

Paramyxoviridae (41) rend cette hypothèse fort plausible.

Etablies depuis plusieurs années (1, 10, 42), les relations antigéniques entre les virus pestiques et morbillieux reçoivent ici confirmation et explication. Il semble bien que les hémagglutinines des deux virus sont dissemblables. La relation paraît s'établir par les nucléocapsides, proposition qui vient renforcer des observations de WATERSON (41) et de WATERSON, ROTT et RUCKLE-ENDERS (42) dans lesquelles les titres des réactions de fixation du complément avec les sérums antipestiques ne sont pas modifiées par le traitement de l'antigène morbillieux au tween-éther et, surtout, où une partie de cette activité fixatrice du complément est conservée après épuisement de l'hémagglutinine morbillieuse au tween-éther par les hématies d'*E. patas* (41).

Il semblerait donc que le traitement au tween-éther des virions morbillieux (ainsi que des virions bovine pestiques), en faisant éclater les peplons viraux, libère des fragments de l'enveloppe (qui est l'hémagglutinine) (41, 42) auxquels restent attachés des chaînes nucléocapsidales. C'est la raison pour laquelle les préparations hémagglutinantes du virus de la rougeole sont inhibées par les sérums antipestiques et non pas par suite d'une communauté antigénique des deux hémagglutinines comme on pouvait le

supposer. C'est aussi vraisemblablement la raison pour laquelle différents lots d'hémagglutinine morbillieuse n'ont pas la même aptitude à être inhibés par les sérums antipestiques (29) : selon les tours de main de préparation de ces lots, il reste plus ou moins de fragments de nucléocapside accrochés à l'hémagglutinine. A tout prendre, la recherche des anticorps antipestiques avec les hémagglutinines morbillieuses ne détecte pas des anticorps inhibant l'hémagglutination (ou neutralisant, qui leur sont identiques) mais des anticorps homologues ou identiques à ceux fixant le complément. On sait, depuis longtemps, que dans le cas de la peste bovine ceux-ci ne sont présents que pendant quelques semaines dans les sérums bovins, tout comme le sont les anticorps inhibant l'hémagglutination morbillieuse (29).

C'est encore à ces fragments de nucléocapside entraînés par l'enveloppe que le vaccin antipestique préparé avec l'hémagglutinine morbillieuse doit de posséder des propriétés immunogènes contre l'infection pestique ; l'immunité, au reste, est imparfaite (une publication à venir exposera les faits en détail) car les bovins vaccinés puis éprouvés font une infection pestique abortive, ce qui ne devrait pas être si les deux hémagglutinines pestiques et morbillieuses (antigènes protecteurs, ce que l'on sait au moins pour la rougeole) (21, 22), étaient identiques.

SUMMARY

Some fundamental research on rinderpest virus.

2. — Rinderpest haemagglutinin ; Antigenic relationships of the rinderpest and measles virions

The existence of an haemagglutinin of the rinderpest virus has been evidenced. Some methods used to obtain it have been described, some of its physico-chemical properties have been studied and the erythrocytes of the monkey *Erythrocebus patas* have been shown to be the most convenient to evidence it. In addition to this haemagglutinin an other antigen, which can also be fixed on the red cells of monkey but which cannot induce haemagglutination, seemed to be present. The infected cells cultures did not show the haemadsorption phenomenon. The rinderpest haemagglutinin is not similar to the precipitogen components. One of the antigens of this latter (thermolabile antigen inactivated by ether) precipitated with a serum against measles ; the precipitation line was different from the one given by the measles haemagglutinin with the same serum.

Both viruses seemed to have antigenic relationship through their nucleocapsides and not through their haemagglutinins.

RESUMEN

Algunas investigaciones fundamentales sobre el virus bovipestico.

2. — La hemaglutinina bovipestica ;
Relaciones antigenicas de los viriones pestico y morbillosa

Los autores demostraron la existencia de una hemaglutinina del virus bovipestico. Precisan algunas condiciones de su logro, estudian algunas de sus propiedades físico-químicas e indican que los hematíes del mono *Erythrocebus patas* son los más susceptibles para con su acción. Con la hemaglutinina parece existir más antígeno, fijándose también sobre los glóbulos rojos del mono, pero no aglutinante. No se encuentra el fenómeno de hemadsorción en los cultivos celulares infectados.

No es asimilable la hemaglutinina pestica a los constituyentes del precipitogeno. Uno de los antígenos del dicho (antígeno termolábil e inactivado por el éter) precipita con un suero antimorbillosa ; la línea de precipitación es diferente de la que da la hemaglutinina morbillosa con el mismo suero. A lo que parece, los dos virus mantuvieran comunidades antigenicas mediante sus nucleopósidas y no sus hemaglutininas.

BIBLIOGRAPHIE

1. BÖGEL (K.), ENDERS-RUCKLE (G.) et PROVOST (A.). — Une réaction sérologique rapide de mesure des anticorps anti-bovipestiques. *C. R. Acad. Sc.*, 1964, **259** : 482-484.
2. BÖGEL (K.), PROVOST (A.) et ENDERS-RUCKLE (G.). — Hämagglutinations-Hemmungsreaktion mit Masernantigen bei Rinderpest. I. Anwendung in der Diagnostik. *Zbl. Bakt. (I), Org.*, 1966, **199** : 1-19.
3. BÖGEL (K.), PROVOST (A.) et ENDERS-RUCKLE (G.). — Hämagglutinations-Hemmungsreaktion mit Masernantigen bei Rinderpest. II. Antikörperproduktion nach Inokulation verschiedener Lebendimpfstoffe beim Rind. *Zbl. Bakt. (I), Org.*, 1966, **204** : 137-153.
4. BROTHERSTON (J. C.). — In : *East African Veterinary Research Organization Annual Report for 1950*. The government printer, Nairobi.
5. CUTCHINS (E. C.). — A comparison of the hemmagglutination-inhibition, neutralization and complement fixation tests in the assay of antibody to measles. *J. Imm.*, 1962, **88** : 788-795.
6. ENDERS-RUCKLE (G.). — The value of the hemagglutination-inhibition test using the twee-ether split HA-component of measles virus- in : *Symposium international sur la standardisation des vaccins contre la rougeole*, Lyon, 18-20 juin 1964, p. 192-200. Edition Institut Mérieux, Lyon, 1964.
7. FUNAHASHI (S.) et KITAWAKI (T.). — Studies on measles virus hemagglutination. *Biken J. (Japon)*, 1963, **6** : 73-96.
8. HUYGELEN (C.). — Failure to demonstrate agglutination of red blood cells by rinderpest virus. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1960, **8** : 121-125.
9. HUYGELEN (C.) et PEETERMANS (J.). — Studies on the growth of a vaccine strain (Komarov) of Newcastle disease virus in bovine kidney tissue culture and preparation of a vaccine. *Res. vet. Sc.*, 1963, **4** : 294-303.
10. IMAGAWA (D. T.), GORET (P.) et ADAMS (J. M.). — Immunological relationships of measles, distemper and rinderpest viruses. *Proc. Nat. Acad. Sc. (Washington)* ; 1960, **46** : 1119-1123.
11. ISHII (S.), TOKUDA (G.) et WATANABE (M.). — Analysis of rinderpest antigen. I. Results of the diffusion precipitation test in agar gel. *Nat. Inst. Anim. Health Qly.*, 1964, **4** : 205-213.
12. ISHII (S.) et TSUKUDA (K.). — Studies on the adaptation of bovine strain rinderpest

- virus in chick embryo. *Report Gov. Exp. Stat. An. Hyg.* (Tokyo), 1952, **25** : 29-36.
13. KOHN (A.). — Haemadsorption by measles syncytia. *Nature*, 1962, **193**, 1088-89.
 14. KUTTLER (K. L.). — Cité par SCOTT, G. R. A precis of the characteristics of rinderpest virus. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1959, **7** : 173-178.
 15. LIESS (B.). — Untersuchungen über das Virus der Rinderpest unter Verwendung von Zellkulturen. *Archiv exp. Vet. Med.*, 1966, **20** : 157-202 et 203-257.
 16. LIESS (B.) et PLOWRIGHT (W.). — The propagation and growth characteristics of rinderpest virus in Hela cells. *Arch. ges. Virusf.*, 1963, **14** : 27-38.
 17. Mac CLURKIN (A.), SHINA (S. K.) et HANSON (R. P.). — Rapid diagnosis of Newcastle disease using lung extract. *Am. J. Vet. Res.*, 1954, **15** : 314-315.
 18. NORRBY (E.). — Hemagglutination by measles virus. 4. A simple procedure for production of high potency antigen for hemagglutination-inhibition (HI) tests. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1962, **111**, 814-818.
 19. NORRBY (E.). — Hemagglutination by measles virus. III. Identification of two different hemagglutinins. *Virology*, 1963, **19** : 147-157.
 20. NORRBY (E.). — Effect of sodium deoxycholate on biological activities of measles virus. *Proc. soc. exp. Biol. Med.*, 1966, **121** : 948-954.
 21. NORRBY (E.), LAGERCRANTZ (R.), GARD (S.) et CARLSTRÖM (G.). — Measles vaccination. III. Serologic responses to immunization with purified hemagglutinin. *Acta pediat. scand.* 1965, **54** : 581-586.
 22. NORRBY (E.), LAGERCRANTZ (R.) et GARD (S.). — Measles vaccination. IV. Responses to two different types of preparations given as a fourth dose of vaccine. *Brit. Med. J.*, 1965, n° 5438, 813-817.
 23. PERIES (J. R.) et CHANY (C.). — Activité hémagglutinante du virus morbillieux. *C. R. Ac. Sc. (Paris)*, 1960, **251** : 820-21.
 24. PLOWRIGHT (W.). — Rinderpest virus. *Ann. New York Acad. Sc.*, 1962, **101** : 548-563.
 25. PLOWRIGHT (W.), CRUICKSHANK (J. G.) et WATERSON (A. P.). — The morphology of rinderpest virus. *Virology*, 1962, **17** : 118-122.
 26. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). — Cytopathogenicity of rinderpest virus in tissue culture. *Nature*, 1957, **179** : 316.
 27. PROVOST (A.). — In : Rapport annuel du Laboratoire de Farcha, année 1956, p. 51.
 28. PROVOST (A.). — Essais de transmission de la peste bovine par aérosols virulents. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1958, **6** : 79-85.
 29. PROVOST (A.). — In : Rapport annuel de la Région de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de l'Afrique centrale, Laboratoire de Farcha, année 1966, tome I : 87-89.
 30. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). — Différents aspects du diagnostic clinique et expérimental de la peste bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. pays trop.*, 1963, **16** : 445-526.
 31. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). — Possibilité d'immunisation anti-bovipestique avec un variant viral thermostable à 45° C. A paraître.
 32. PROVOST (A.), BORREDON (C.) et MAURICE (Y.). — Protection antibovipestique conférée au bœuf par un virus morbillieux adapté aux cellules bovines. *C. R. Acad. Sc.*, 1967, **25** : 2961.
 33. PROVOST (A.), QUEVAL (R.) et BORREDON (C.). — Quelques recherches fondamentales sur le virus bovipestique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1965, **18**, 371-384.
 34. PROVOST (A.), VALETTE (L.) et PAPA-GEORGIOU (C.). — Un nouveau vaccin injectable contre la maladie de Newcastle préparé en cultures de cellules bovines. *Bull. Acad. Vét.*, 1962, **35** : 399-402.
 35. ROTT (R.). — Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden, nichtinfektiösen, Viruspezifischen Einheiten. *Zent. Bl. Vet. Med.*, 1965, **12 B** : 74-96 et 97-116.
 36. SCHWARZ (A. J. F.) et ZIRBEL (L. W.). — Propagation of measles virus in non primate tissue culture. I. Propagation in bovine kidney tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1959, **102** : 711-714.
 37. SCOTT (G. R.). — Rinderpest. *Adv. Vet. Sc.*, 1964, **9** : 113-224.
 38. SCOTT (G. R.) et BROWN (R. D.). — Rinderpest diagnosis with special reference

- to the agar gel double diffusion test. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1961, **9** : 83-120.
39. STONE (S. S.). — Multiple components of rinderpest virus as determined by the precipitin reaction in agar gel. *Virology*, 1960, **11** : 638-640.
40. VOGEL (J.) et SHELOKOV (A.). — Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey tissue culture. *Science*, 1957, **126** : 358-359.
41. WATERSON (A. P.). — Measles virus. *Arch. ges. Virusf.*, 1965, **16** : 57-80.
42. WATERSON (A. P.), ROTT (R.) et RUCKLE-ENDERS (G.). — The components of measles virus and their relation to rinderpest and distemper. *Zeits. Naturf.*, 1963, **18 b** : 377-884.
43. WHITE (G.). — Gel diffusion in the diagnosis of rinderpest. *Vet. Rec.*, 1962, **74** : 1477-1478.
44. WHITE (G.) et COWAN (K. M.). — Separation of the soluble antigens and infectious particles of rinderpest and canine distemper. *Virology*, 1962, **16** : 209-210.
45. WOODHOUR (A. F.), METZGAR (D. P.), STIM (T. B.), TYTTEL (A. A.) et HILLEMANN (M. R.). — New metabolizable immunologic adjuvant for human use. I. Development and animal immune response. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1964, **116** : 516-523.