

Propriétés de la souche de virus LaSota infectant en permanence une lignée de cellules rénales bovines

par NGUYEN-BA-VY (*)

(avec la collaboration technique de Mlle Martine OREN)

RESUME

La souche de virus LaSota de la maladie de Newcastle infecte en permanence depuis 3 ans une lignée de cellules rénales bovines (MDBK). Son pouvoir cytopathogène est augmenté sur plusieurs lignées cellulaires (Vero, MS, BHK₂₁, PK₁₅) mais il y a une diminution du pouvoir hémagglutinogène sur œufs embryonnés et un abaissement de l'index de neurovirulence sur les poussins de 1 jour. Des poulets inoculés de cette souche modifiée, élaborent très peu d'anticorps inhibant l'hémagglutination (IHA = 1/2 - 1/16) et sont immunisés par des doses supérieures à $5 \times 10^{6,3}$ DICC₅₀. Lors de la vaccination des volailles par l'intermédiaire de l'eau de boisson, une trop forte dilution du vaccin peut provoquer une inactivation prématurée du virus.

La persistance de virus dans des lignées cellulaires a été maintes fois constatée. De nombreux virus sont capables en effet d'infecter en permanence des souches de cellules qui les conservent continuellement d'une génération à l'autre : virus de la fièvre aphteuse sur des cellules rénales bovines (3), virus de la peste porcine sur des cellules PK₁₅ (4), virus de la maladie de Newcastle sur des cellules L (6, 7, 9) et Hela (8) etc. Cette infection latente, ayant le même effet qu'une adaptation progressive, provoque des modifications des propriétés du virus. Nous relatons, dans cet article, les variations de celles de la souche LaSota du virus de la maladie de Newcastle infectant en permanence une lignée de cellules rénales bovines.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Milieux de culture

Les différentes lignées de cellules utilisées dans nos expériences, sauf la souche BHK₂₁,

ont été cultivées dans un milieu à base d'hydrolysate de lactalbumine (**), à 0,50 p. 100 dans la solution saline d'Earle, additionné de 0,01 p. 100 d'extrait de levure (**), 0,01 p. 100 de L-glutamine, 0,004 p. 100 de L-arginine chlorhydrate, 0,0001 p. 100 de biotine, 0,0001 p. 100 d'acide folique et de 10 p. 100 de sérum de veau. Le milieu d'entretien contient 3 p. 100 de sérum. Le milieu d'Eagle modifié (5) est utilisé pour les cellules BHK₂₁.

Titrage du virus

La suspension virale diluée avec de la solution saline de Hanks est distribuée à la dose de 0,2 ml par tube de cellules Vero, 5 tubes par dilution. La lecture se fait soit par l'observation directe des syncytia et des lésions cytopathiques, soit à l'aide du test d'hémadsorption. Les résultats sont calculés selon la méthode de Reed et Muench. Les titrages sur des œufs embryonnés de 9 jours sont effectués à la même dose.

(*) Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, laboratoire de Virologie, 10, rue Pierre Curie, (94) Maisons-Alfort.

(**) Difco.

Technique des plages

Les dilutions virales sont mises en contact avec une nappe de jeunes cellules pendant 1 heure à la température du laboratoire (23° C). Le milieu d'entretien à double concentration est mélangé juste avant la coulée avec un égal volume d'une solution de gélose à 2,7 p. 100 (Bacto-agar, Difco). La solution de rouge neutre à 0,1 p. 100 n'y est ajoutée qu'au jour de la lecture, soit directement soit par l'intermédiaire d'une seconde couche de milieu gélosé.

RESULTATS

1. Persistance du virus dans une lignée cellulaire

Une lignée de la souche MDBK de cellules rénales bovines fut infectée expérimentalement, il y a 3 ans, avec la souche LaSota du virus de la maladie de Newcastle à la dose de 10^6 DIO₅₀ (dose infectant 50 p. 100 des œufs embryonnés). Durant les 10 jours de culture, la nappe cellulaire ne fut pas détruite malgré l'existence de nombreuses cellules décollées. Rincée, trypticisée, elle permit une subculture d'aspect apparemment normal, mais au 5^e jour, de nouvelles cellules se décollèrent en abondance et la nappe restante fut soumise à une autre subculture. Les passages se succédèrent ainsi, à des intervalles de temps de plus en plus longs allant jusqu'à 2 à 4 semaines.

Les liquides de ces subcultures, éprouvés régulièrement au cours de ces 3 années sur des œufs embryonnés et sur des tubes de cellules Vero, recélaient constamment du virus; le titre viral, presque nul le 1^{er} jour, s'élevait à $5 \times 10^{3,5}$ DICC₅₀/ml (dose infectant 50 p. 100 des cultures cellulaires) au bout d'une semaine de subculture.

2. Effet de l'antisérum sur cette infection latente

Dans l'espoir de supprimer cette infection, un lot de ces cellules infectées fut traité pendant 3 mois, à travers 6 subcultures, par l'addition de 1 p. 100 de sérum anti-Newcastle dans le milieu de culture. Aucun virus n'y fut détecté, mais chaque fois que l'antisérum était supprimé, le virus réapparissait, en moins d'une semaine, dans le liquide avec un titre moyen de $5 \times 10^{2,5}$ DICC₅₀/ml. Toutefois, cet essai se poursuit actuellement avec un traitement beaucoup plus long.

3. Augmentation du pouvoir cytopathogène

Cette souche de virus, dénommée actuellement LaSota/RB pour la distinguer de la souche initiale, fut cultivée sur plusieurs lignées cellulaires.

Sur des cellules Vero ou MS ensemencées avec 1.000 DICC₅₀, il y avait formation de nombreux et vastes syncytia bien visibles à l'examen direct au microscope inversé. Après coloration, ces cellules géantes montrèrent des noyaux, au nombre de 10 à 50, disposés en couronne tout autour d'une masse cytoplasmique acidophile. Des inclusions de toute taille y étaient réparties irrégulièrement. Parfois on trouva des inclusions intranucléaires, des images de caryolyse et de margination de la chromatine. Le tapis cellulaire fut complètement disloqué au bout de 5 jours, avec un titre viral de $5 \times 10^{6,5}$ DICC₅₀/ml. La souche LaSota initiale produisit des syncytia plus petits, moins nets et ne détruisit pas rapidement la nappe cellulaire.

La souche LaSota/RB cultivée sur des cellules BHK₂₁ fit apparaître de nombreux syncytia mais les noyaux de ceux-ci n'eurent pas tendance à se mettre en couronne et demeurèrent groupés en un amas plus ou moins allongé selon la forme des fibroblastes. La nappe cellulaire se disloqua rapidement, libérant des virions complets dont le titre atteignit $5 \times 10^{6,3}$ DICC₅₀/ml.

Sur des lignées de cellules d'origine bovine MDBK ou porcine PK₁₅, la formation des syncytia et des inclusions intracytoplasmiques fut plus rare. On observa par endroits des images de pycnose et de margination de la chromatine. De nombreuses cellules se décollèrent dès le 3^e jour mais le tapis cellulaire ne fut détruit que vers le 10^e jour. Le titre obtenu d'une culture sur des cellules PK₁₅ fut de $5 \times 10^{2,9}$ DICC₅₀/ml et sur des cellules MDBK de $5 \times 10^{4,5}$ DICC₅₀/ml.

La technique directe d'immunofluorescence, utilisant un conjugué d'antisérum de coq, mit en évidence, dans le cytoplasme des cellules Vero infectées, de fines granulations et d'énormes foyers fluorescents entourant le noyau. Avec la souche LaSota initiale, une fluorescence plus ou moins nette fut observée soit dans la zone périnucléaire mal délimitée, soit dans tout le cytoplasme.



Fig. 1.
Culture du virus LaSota/RB sur des cellules Vero :
formation de syncytia et des inclusions.



Fig. 2.
Formation des inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires
sur des cellules Vero.



Fig. 3.
Immunofluorescence des cellules Vero infectées de LaSota/RB.



Fig. 4.
Plages formées par le virus LaSota/RB sur des cultures de cellules Vero.

L'application de la technique des plages sur des nappes de cellules Vero permit l'observation, entre le 2^e et 5^e jour, des plages très nettes de 1-2 mm de diamètre. Une prolongation du temps d'incubation jusqu'à 12 jours n'améliora pas leur taille. L'addition du sérum anti-Newcastle dans la proportion de 10 p. 100 à une suspension de virus LaSota/RB contenant 10^8 DICC₅₀/ml empêcha l'apparition des plages.

4. Modification du pouvoir hémagglutinogène

a) Sur des cellules

La souche LaSota/RB cultivée sur cellules Vero et BHK₂₁ produisit une plus grande quantité d'hémagglutinine que la souche initiale, avec un titre HA variant entre 1/8 et 1/64 contre 1/8 - 1/16 du LaSota. Le phénomène d'hémadsorption précoce et visible dès la 6^e heure, sous forme de petits foyers, gagna presque toute la nappe cellulaire au 3^e jour.

Les cultures du virus modifié sur des cellules PK₁₅ et MDBK ne produisirent que très peu d'hémagglutinine dans le milieu liquide (HA = 1/2 - 1/4) bien que la réaction d'hémadsorption fût toujours positive.

b) Sur des œufs embryonnés

Des lots de 10 œufs embryonnés de 9 jours ont été inoculés respectivement avec 10 et 100 DICC₅₀ dans la cavité allantoïdienne. Le titre viral obtenu au bout de 48 heures fut de $5 \times 10^{8.1}$ DICC₅₀/ml, mais le titre hémagglutinant ne monta qu'à 1/20 - 1/40 alors que celui de la souche LaSota initiale était de 1/1280 - 1/2560. Cinq passages successifs de la souche LaSota/RB sur des œufs embryonnés n'ont pas réussi à faire monter son titre hémagglutinant au-delà de 1/80 - 1/160.

c) Sur des poulets

Une quarantaine de poulets ont reçu par voie buccale et nasale des doses de virus cultivé sur cellules, allant de $5 \times 10^{4.5}$ à $5 \times 10^{6.5}$ DICC₅₀. Aucun symptôme morbide ne fut constaté chez eux. Le titre des anticorps inhibant l'hémagglutination examiné au bout de 3 semaines varia entre 1/2 et 1/32.

5. Abaissement de l'indice de neurovirulence

L'indice de neurovirulence sur des poussins de 1 jour était environ 0,19 - 0,2 pour la souche LaSota initiale. L'inoculation de la souche

LaSota/RB à 10 poussins, par la voie intracrânienne, n'en a tué aucun, durant les 2 semaines d'observation.

Son pouvoir léthal sur des embryons était aussi très atténué. On n'observa qu'irrégulièrement la mort de quelques embryons vers le 10^e jour après l'inoculation, alors que la souche LaSota initiale les tuait en 5 jours.

6. Modification du pouvoir immunogène

Dix poulets âgés d'un mois reçurent par la voie buccale 1 ml d'une culture de LaSota/RB sur cellules BHK₂₁ titrant 5×10 DICC₅₀/ml. Leur titre d'anticorps inhibant l'hémagglutination (IHA) négatif avant la vaccination, n'augmenta pas au-delà de 1/16, au bout de 3 semaines. Six d'entre eux succombèrent à l'épreuve avec une souche virulente, ainsi que les trois témoins.

La même suspension virale, diluée au 1/10 et au 1/100 dans 100 ml d'eau du robinet et administrée respectivement à 2 lots de 5 poulets chacun, qui l'absorbèrent dans un délai de 2 à 3 heures, ne conféra aucune immunité à ces sujets qui moururent tous à l'épreuve par une souche virulente.

Quinze poulets reçurent dans chaque narine 1 goutte d'une culture de ce virus sur cellules BHK₂₁ titrant $5 \times 10^{5.3}$ DICC₅₀/ml et ayant un titre HA : 1/8. Leur titre IHA, négatif avant la vaccination, s'éleva au bout de 3 semaines à 1/16 chez 10 d'entre eux, 1/32 chez 3 et resta négatif sur 2 sujets. A l'épreuve, succombèrent ces 2 derniers ainsi que les 3 témoins et l'un des poulets dont le titre IHA était de 1/16.

Une autre culture de LaSota/RB sur cellules Vero ($5 \times 10^{6.5}$ DICC₅₀/ml, titre HA : 1/32) fut administrée *per os* à la dose de 1 ml à 8 poulets âgés de 2 mois. Le titre IHA négatif avant la vaccination était inférieur ou égal à 1/8 au 22^e jour. Un seul des vaccinés fut tué par l'épreuve d'inoculation de 10^5 DIO₅₀ (dose infectant 50 p. 100 des œufs embryonnés) d'une souche virulente, ainsi que les 3 témoins.

Les résultats de ces vaccinations ont montré une relation entre les doses de virus administrées et le degré d'immunité obtenu. Les poulets étaient mal protégés par des doses égales ou inférieures à $5 \times 10^{6.5}$ DICC₅₀. Avec un vaccin LaSota dilué dans l'eau de boisson, ALLER et ALLAN (1) ont trouvé que la dose minimale

Tableau récapitulatif des résultats de vaccinations

N°	Vaccination			Après l'épreuve	
	DICC ₅₀	Voies	Vaccinés	Morts	Pourcentage de morts
1	$5 \times 10^{4,5}$	buccale	10	6	60
2	$5 \times 10^{4,5}$	eau de boisson	5	5	100
		à 1/10 1/100	5	5	100
3	$5 \times 10^{5,3}$	nasale	15	3	20
4	$5 \times 10^{6,5}$	buccale	8	1	12,5

protectrice pour chaque poulet était de $10^{5,5}$ - 10^7 DIO₅₀.

L'échec de l'expérience n° 2, au cours de laquelle la suspension virale a été diluée dans l'eau de boisson, peut être imputée non seulement à l'insuffisance de la dose vaccinnante mais aussi à la toxicité de l'eau de boisson vis-à-vis du virus. En effet une suspension du virus LaSota/RB contenant 5×10^3 DICC₅₀/ml a été diluée au 1/10 et au 1/100 avec de l'eau courante de ville, puis incubée à la température du laboratoire (23° C); des prélèvements furent effectués immédiatement et au bout de 30 minutes, 1, 2 et 3 heures pour être titrés sur des tubes de cellules Vero. Les résultats montrèrent que la dilution au 1/100 avec de l'eau de robinet abaissait le titre viral de $1 \log_{10}$ entre 1 et 2 heures et de $2 \log_{10}$ au bout de 3 heures d'incubation, tandis que la suspension au 1/10 gardait approximativement le même titre au bout de ce temps.

Afin d'examiner l'effet de la température, une autre suspension virale ayant 10^6 DICC₅₀/ml fut incubée au bain-marie à 48° C. Elle résista à ce traitement pendant 20 minutes et son titre viral ne s'abaissa qu'après 30 minutes en perdant $3 \log_{10}$ au bout de 60 minutes. A 56° C pendant 30 minutes, elle perdit tout pouvoir infectieux.

COMMENTAIRES

Nous avons maintenant à notre disposition une souche de virus de la maladie de Newcastle ayant un pouvoir cytopathogène très régulier et bien marqué, ce qui nous facilite la recherche des anticorps neutralisants et les titrages des

antisérums sur cultures cellulaires. De vastes syncytia bien visibles, au bout de 48 heures, par un simple examen des cultures, et la destruction massive de la nappe cellulaire, notamment sur des cellules Vero, vers le 5^e jour, nous évitent le plus souvent d'avoir recours au test d'hémadsorption. On a tout intérêt à utiliser de jeunes cellules qui sont les plus sensibles et peuvent être distribuées en même temps que les mélanges virus-sérum dans les tubes.

Les passages répétés et la persistance du virus de Newcastle sur des cellules hétérologues pourraient constituer l'un des moyens d'atténuation des souches virulentes. La diminution du pouvoir hémagglutinogène sur œufs embryonnés de la souche LaSota/RB et l'abaissement de son index de neurovirulence semblent être des modifications stables car le retour aux passages sur œufs embryonnés ne l'a pas fait revenir à son état initial. Il est intéressant d'obtenir une souche de virus immunogène mais non hémagglutinogène; ce qui permettra la distinction entre les volailles vaccinées et les contaminées lors des enquêtes sérologiques.

La vaccination anti-Newcastle par l'intermédiaire de l'eau de boisson était couramment utilisée. On a préconisé l'emploi de l'eau de pluie ou de l'eau de source pour éviter les antiseptiques mélangés dans l'eau courante des villes. YOSHIDA et collab. (10) ont proposé l'addition d'hyposulphite de sodium dans cette dernière eau pour neutraliser les effets néfastes du chlore. ALLER et ALLAN (2) ont trouvé que la perte du titre du virus LaSota dilué dans l'eau de boisson était insignifiante au bout de 4 heures à 25° - 27° C. Cependant des cas d'échec de vaccination nous ont été rapportés, même avec l'usage de l'eau de source et une absorption rapide de la dilution virale dans un

délai de quelques heures. Nous pensons en trouver l'explication dans la trop forte dilution du vaccin dans l'eau. Théoriquement un flacon de vaccin pourrait être mélangé indifféremment dans 1 volume ou dans 10 volumes d'eau à condition que toute cette eau soit absorbée par les volailles. En réalité, un poulet qui boit 10 volumes d'un mélange virus-eau au 1/100 n'acquiert pas forcément la même quantité de virus vivants que celui qui reçoit 1 volume d'un mélange au 1/10, parce que ces mélanges ne sont pas absorbés instantanément et qu'au bout d'un certain temps le titre viral du mélange au 1/100 s'abaisse beaucoup plus rapidement que celui du mélange au 1/10. Le fabricant doit donc déterminer pour chaque type de vaccin non seulement un titre suffisant de virus mais encore sa capacité de se conserver dans une proportion déterminée de l'eau de boisson

et cela dans un laps de temps bien défini. En négligeant cette précaution, on s'expose à des risques d'échec par inactivation prématurée du virus. Un vaccin fabriqué sur des cultures cellulaires ne pourrait être mélangé dans la même proportion d'eau que celui obtenu des cultures sur œufs embryonnés, même s'ils contiennent des titres équivalents de virus. En outre l'addition de stabilisateurs dans l'eau de boisson n'a de valeur que si on a indiqué clairement le volume d'eau maximal utilisable avec chaque flacon de vaccin.

REMERCIEMENTS

Mes plus vifs remerciements sont adressés à M. le Dr P. PERREAU pour les précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner dans la conduite de cette étude.

SUMMARY

Properties of LaSota virus strain persistently infecting a bovine kidney cell line

The LaSota strain of Newcastle disease virus persistently infected 3 years ago a bovine kidney cell line (MDBK). It shows an increase of cytopathic effect in several cell lines (Vero, MS, BHK₂₁, PK₁₅), a decrease of hemagglutinin titer in embryonated eggs and a fall of neurovirulence index in day-old chicks. Chickens inoculated with this modified strain, produce low titres of inhibition hemagglutination antibodies (IHA = 1/2 - 1/16) and are immunised with doses above $5 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀. When tap water is used for administering this vaccine, a viral inactivation can ultimately be produced with high dilution of vaccine in water.

RESUMEN

Propiedades de la cepa de virus LaSota infectando en función continua una línea de células renales de bovinos

La cepa de virus LaSota de la enfermedad de Newcastle sigue infectando una línea de células renales de bovinos (MDBK) desde hace tres años. Se aumenta su poder citopatógeno en varias líneas celulares (Vero, MS, BHK₂₁, PK₁₅) pero hay una disminución del poder hemaglutinogeno sobre huevos embrionados y un descenso del índice de neurovirulencia en los pollitos de un día de edad. Pollitos inoculados por dicha cepa modificada elaboran muy pocos anticuerpos inhibiendo la hemaglutinación (IHA = 1/2 - 1/16); dosis superiores a $5 \times 10^{6.5}$ DICC₅₀ los inmunizan. Durante la vacunación de las aves de corral mediante agua de bebida, una demasiado fuerte dilución de la vacuna puede provocar una inactivación prematura del virus.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLER (B.), ALLAN (W. H.), Vaccination against Newcastle disease with the LaSota strain. Results of administering different doses of virus in the drinking water, *Revta Patron. Biol. anim.*, 1969, **13**: 5-9.
2. ALLER (B.), ALLAN (W. H.), Stability of the LaSota strain of Newcastle disease virus in drinking water vaccines, *Supl. Cient. Cons. gen. Col. Vet. Esp.*, 1970, **188**: 3-6.
3. DINTER (Z.), PHILIPSON (L.), WESSLEN (T.), Persistent foot-and-mouth disease infections of cells in tissue culture, *Virology*, 1959, **8**: 542-544.
4. IZAWA (H.), SOEKAWA (M.), Attenuation of hog cholera virus in the carrier cell strains established from kidney of pigs experimentally infected with the virulent virus, *Am. J. vet. Res.*, 1967, **128**: 1661-1669.

5. MAC PHERSON (I.), STOKER (M.), Polyoma transformation of hamster cells clones; an investigation of genetic factors affecting cell competence, *Virology*, 1962, **16** : 147-151.
6. MASON (E. J.), KAUFMAN (N.), The persistent production of small quantities of infectious Newcastle disease virus in grossly unaltered L and U₁₂ strain cells, *J. Immunol.*, 1961, **86** : 413-420.
7. RODRIGUEZ (J. E.), HENLE (W.), Studies on persistent infections of tissue cultures. V. The initial stages of infection of L (MCN) cells by Newcastle disease virus, *J. exp. Med.*, 1964, **119** : 895-921.
8. SZANTO (J.) ALBRECHT (P.), VILCEK (J.), Investigations on latent infection in the Hela cell-Newcastle disease virus system, *Acta virol.*, 1963, **7** : 297-307.
9. THACORE (H.), YOUNGNER (J. S.), Cells persistently infected with Newcastle disease virus. I. Property of mutants isolated from persistently infected L cells, *J. Virol.*, 1969, **4** : 244-251.
10. YOSHIDA (I.), SHIMIZU (F.), YUASA (N.) et KOYANO (H.), Inactivating effect of residual chlorine on Newcastle disease virus and removal of the effect, *Bull. Natn. Inst. Anim. Hlth*, 1969 (59) : 1-5; analyse dans *Natn. Inst. Anim. Hlth Q.*, Tokyo, 1969, **9** : 241.