

COMMUNICATION

L'adaptation du virus de la clavelée sur les cellules rénales du mouton

par MM. LANG (R.) et LEFTHERIOTIS (E.)

(Note présentée par M. GORET)

Les premières études sur le développement du virus de la variole ovine (BRIDRE (1)) ont été suivies d'autres travaux, tant sur la culture des cellules de tissu cutané, pulmonaire, testiculaire ou rénal provenant de fœtus ou de jeunes animaux de l'espèce ovine, caprine ou bovine (AYGÜN (2) BOUE et Coll. (3), CILLI et BALDELLI (4 et 5), PLOWRIGHT et FERRIS (6)) que sur celle des cellules provenant de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet (2).

Nous rapporterons ici les résultats obtenus dans ce domaine à l'I. F. F. A. où les recherches se poursuivent depuis 1958. Quelques précisions seront d'abord données sur le matériel et les techniques utilisées.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

VIRUS.

Une lymphe* claveleuse fraîchement récoltée sur un agneau infecté expérimentalement a servi de matériel virulent de départ, après détermination préalable de son titre sur mouton : $10^{5.1}$ DI50/ml.

MILIEUX et SOLUTIONS.

Les différents milieux utilisés ont été les suivants :

1. Solution P. B. S.
2. Solution de trypsine NBC à 0,25 p. 100 en P. B. S.

* Nous remercions le Docteur PAPAGEORGIOU de l'Institut Mérieux, qui a bien voulu nous remettre cette lymphe pour nos travaux.

3. Milieu de croissance : milieu Earle Lactalbumine (0,5 p. 100) additionné de 0,01 p. 100 d'extrait de levure avec 10 p. 100 de sérum de poulain.

4. Milieu d'ensemencement : milieu Earle Lactalbumine additionné de 5 p. 100 de sérum de poulain.

5. Milieu pour la culture MAITLAND : milieu 199 avec 3 p. 100 de sérum de poulain.

CULTURE de TISSU.

Deux types de cultures ont été utilisés :

— l'une selon MAITLAND, qui maintient en survie des fragments de tissus rénaux.

— l'autre selon DULBECCO et VOGT, modifiée par YOUNGNER, qui cultive les cellules rénales en couche monocellulaire.

Dans les deux cas, la préférence a été donnée aux tissus des reins d'agneaux de 3 à 4 mois, malgré quelques essais effectués avec la deuxième technique à partir de tissus cutanés ou rénaux de fœtus ovins, lesquels étaient positifs et ont dû être abandonnés devant les difficultés d'approvisionnement.

Dans le premier procédé, la corticale de rein est divisée en 4 parties égales. Chaque quart est ensuite découpé séparément en fragments de 3 à 4 mm et mis en suspension dans un flacon contenant 500 ml de milieu 199 avec 3 p. 100 de sérum de poulain. Les flacons sont alors mis à l'étuve à 35° et soumis à une agitation constante. Quatre jours plus tard, après renouvellement du milieu, ces cultures sont ensemencées.

Dans le deuxième procédé, les cellules sont trypsinées puis subissent des lavages et centrifugations successifs suivis d'une numération. La concentration finale des cellules dans le milieu de croissance a été de 4×10^5 ml pour les tubes et de $2,5 \times 10^5$ pour les flacons de Roux.

Cette technique, ainsi pratiquée au début, est maintenant simplifiée en faisant la lise en culture des cellules sans numération préalable et en mettant en suspension, à raison de 1 ml pour 500 ml de milieu de croissance, le culot de cellules obtenu à la dernière centrifugation.

Les cultures sont ensuite placées en position stationnaire à l'étuve à 36°5 ($\pm 0,5^\circ$).

Quatre ou cinq jours plus tard, dès l'apparition d'une couche uniforme de cellules épithéliales, la culture est prête pour l'ensemencement du virus.

CULTURE du VIRUS.

Dans la culture en couche monocellulaire, le premier passage a été ensemencé avec la lymphe diluée à 1 p. 10 de façon à avoir une dilution finale à 1 p. 100 dans les tubes et les flacons de Roux.

La récolte de cette première culture et des passages ultérieurs a été congelée et décongelée 3 fois, puis centrifugée 5 minutes à 230 g ; le surnageant servait à l'ensemencement suivant et la dilution finale du virus dans les tubes et les flacons était de 1 p. 10.

Dans les cultures sur fragments en survie, le même processus a été suivi excepté que, pour le premier passage, la dilution finale de la lymphe dans le milieu de culture a été de 1 p. 1000.

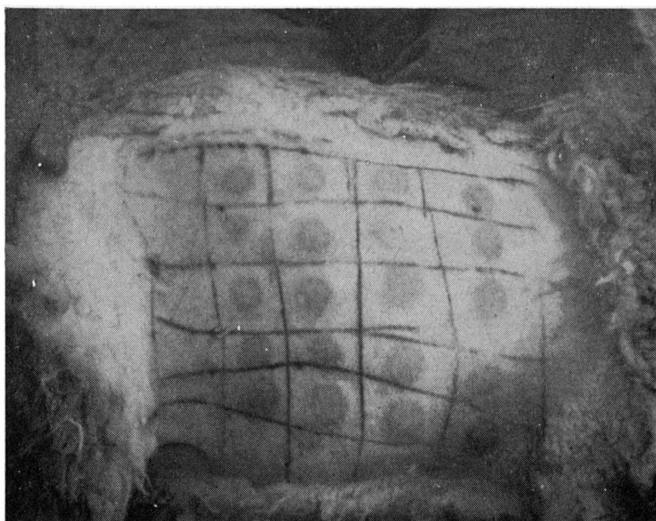
CONTROLES du VIRUS de CULTURE.

Ces contrôles ont été effectués parallèlement « in vivo » sur de jeunes moutons d'origine connue, qui ont été gardés en observation pendant 3 semaines avant leur utilisation, et « in vitro » sur des cultures en couche monocellulaire de cellules rénales d'agneau.

Contrôles in vivo.

Les contrôles ont été de deux sortes :

— les uns ont eu simplement pour but de mettre en évidence la



(FIG. 1). — Infection expérimentale du mouton avec le virus de la Clavelée.
Aspect des lésions 7 jours après l'inoculation.

presence du virus dans les cultures en inoculant un mouton, par voie intradermique, en 5 points, avec 0,2 ml de la culture à contrôler.

— Les autres ont permis d'apprécier le degré de multiplication du virus en le titrant sur mouton : les cultures étaient alors diluées de 10 en 10 dans du P. B. S. et chaque dilution était inoculée par voie intradermique, en 5 points sur le flanc épilé de l'animal, à raison de 0,2 ml par point. Seules les lésions locales apparues au point d'inoculation ont été considérées comme positives. Les résultats ont été basés sur la lecture au huitième jour après l'inoculation, mais les animaux ont été gardés en observation pendant 20 jours pour permettre de suivre l'évolution de la maladie et de noter toutes les réactions locales et générales. Le matériel virulent à contrôler était soumis au même traitement que le virus utilisé dans les passages sur cellules (congélations - décongélations).

Contrôles in vitro.

Le matériel virulent est également dilué de 10 en 10 dans la solution P. B. S. et 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé dans 5 tubes de culture.

Les résultats, comme ceux des titrages sur moutons, sont calculés d'après la méthode de REED et MUENCH (7).

RÉSULTATS

Les résultats les plus intéressants ont été principalement obtenus sur les cultures de cellules rénales d'agneau en multiplication. Dès le premier passage de lymphé claveuse, à partir du quatrième jour de culture, des modifications cellulaires ont pu être observées au microscope. La couche monocellulaire montrait par endroit des plages de cellules épithéliales grises dont le nombre et la surface augmentaient chaque jour, la structure des cellules devenant de moins en moins distincte. Vers le septième jour, ces cellules grisâtres devenaient ovales ou rondes, très réfringentes et bien individualisées (fig. n° 2).

En revanche, les cultures témoins, n'ayant pas reçu de lymphé claveuse, ne présentaient pas ces modifications (fig. n° 3). Une partie seulement des cultures ensemencées a été récoltée vers le 6^e ou 7^e jour et utilisée pour le passage suivant, l'autre a été conservée et observée jusqu'à la lyse complète des cellules survenant généralement entre le 9^e et le 10^e jour.

Les mêmes altérations ont été observées dans tous les passages ultérieurs avec, cependant, certaines nuances.

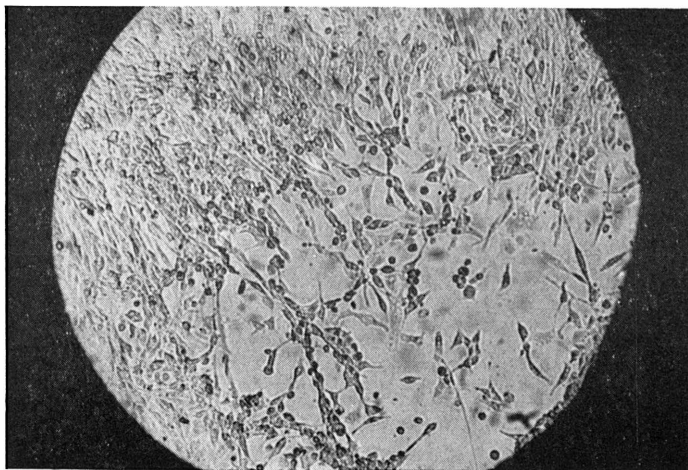


FIG. 2. — Effet cytopathogène du virus de la Clavelée sur les cellules épithéliales de rein d'agneau.

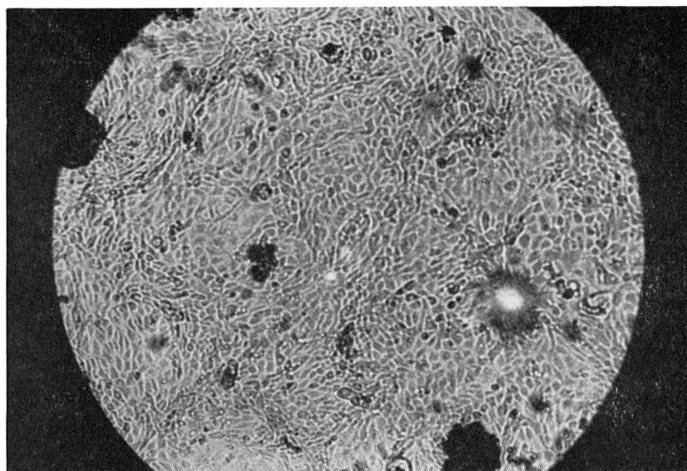


FIG. 3. — Culture normale de cellules épithéliales de rein d'agneau.

Lorsque le virus était ensemencé à 1 p. 10, l'effet cytopathogène apparaissait plus rapidement au fur et à mesure du nombre de passages, environ 2 à 3 jours après l'inoculation. Lorsque le virus était plus dilué, cet effet s'observait plus tardivement.

Nous avons fait actuellement 41 passages sur cellules rénales, au cours desquels chaque contrôle sur mouton a été positif avec formation de claveaux caractéristiques. Plusieurs séries de titrages ont été effectués dont les résultats sont réunis dans le tableau suivant.

n° passage virus	dilutions inoculées (0,2 ml en D. I. par point)							Titre	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	DI 50/0,2 ml	DI 50/1 ml
Lymphes n° 50			10/10	6/10	3/10	1/10	0/10	10 ^{4.4}	10 ^{5.1}
10 ^e passage	10/10	9/10	8/10	0/10	0/10			10 ^{3.3}	10 ^{4.0}
14 ^e passage	10/10	10/10	6/10	1/10	0/10			10 ^{4.2}	10 ^{4.9}
16 ^e passage			10/10	10/10	4/10	0/10	0/10	10 ^{4.9}	10 ^{5.6}
20 ^e passage			10/10	10/10	6/10	2/10	0/10	10 ^{5.3}	10 ^{6.0}
21 ^e passage			10/10	10/10	2/10	0/10	0/10	10 ^{4.6}	10 ^{5.3}

Il ressort de ce tableau que le titre du virus augmente en même temps que le nombre de passages pour atteindre, voire même dépasser, dès le 16^e passage, le titre de la lymphe initiale.

Quant aux résultats des titrages sur culture de tissu et leur parallélisme avec ceux des titrages sur mouton, nos travaux sont encore en cours et feront l'objet d'une prochaine communication.

Il est intéressant de signaler enfin que les cultures sur cellules fœtales ont donné des résultats analogues et que leurs contrôles sur mouton, comme ceux des cultures sur fragments de reins d'agneau en survie, ont tous été positifs.

CONCLUSION

En conclusion, il résulte de ces premiers résultats sur la culture du virus de la clavelée :

1. Que le virus de la clavelée se développe, soit sur les cultures en couche monocellulaire de cellules de rein d'agneau ou de cellules cutanées ou rénales de fœtus ovin, soit sur les fragments en survie de tissu de rein d'agneau.
2. Que la multiplication du virus sur les cultures cellulaires en couches monocellulaires s'accompagne d'un effet cytopathogène visible microscopiquement.
3. Qu'à partir du 16^e passage, le titre sur mouton du virus de culture dépasse celui de la lymphe d'origine.

Travail de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse - Lyon
Directeur : C. MACKOWIAK

BIBLIOGRAPHIE

1. BRIDRE (J.). — C. R. Soc. Biol. 1935, **119**, 502.
2. AYGUN (S. T.). — Archiv für Exper. Veterinärmed, 1956, **9**, 415.
3. BOUE (A.), BALTAZARD (M.), VIEUCHANGE (J.). — C. R. Ac. Sc. 1957, **244**, 1571.
4. CILLI (V.), BALDELLI (B.). — Proc. XVIth. Int. Vet. Congr. Madrid, 1959 **2**, 445.
5. CILLI (V.), BALDELLI (B.). — Lo Sperimentale, 1958, **108**, 91.
6. PLOWRIGHT (W.), FERRIS (R.D.). — Brit. J. Exp. Patho. 1958, **39**, 424.
7. REED (L.J.), MUENCH (H.). — Amer. J. Hyg. 1938, **27**, 493.