

50  
137

VIROLOGIE. — *Culture du virus de la variole sur cultures de tissus*. Note de MM. **ANDRÉ BOUÉ** et **MARCEL BALTAZARD**, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Les techniques d'étude expérimentale de la variole se limitent actuellement à l'inoculation à l'œuf incubé et au singe. La technique devenue courante de la culture sur tissus en tubes roulants, telle que nous avons pu la pratiquer au laboratoire de J. Vieuchange, à l'Institut Pasteur de Paris, nous a permis de tenter la culture du virus variolique.

L'appareil, les tubes, le bouchage et la préparation des explants sont ceux décrits par Enders. Comme liquide nutritif nous employons le milieu à la lactalbumine de Melnick : solution d'hydrolysate de lactalbumine (1) à 5 % dans la solution de Hanks, 10 ml; solution de Hanks, 67 ml; liquide amniotique bovin, 23 ml; milieu auquel nous ajoutons : pénicilline, 100 U et streptomycine, 250 µg/ml. Pour éviter les contaminations par des éléments mycéliens, lorsque la suspension virulente est préparée à partir de croûtes, nous ajoutons aux antibiotiques précédents : tétracycline, 50 µg et nystatine, 50 U. Le liquide nutritif est changé tous les quatre à cinq jours en tenant compte du virage du milieu.

Le matériel virulent provient de varioleux en évolution [Kachan, 200 km au Sud de Téhéran, épidémie de l'été 1955; Téhéran, novembre 1955 (cas isolé); Sabzevar, 700 km à l'Est de Téhéran, épidémie du printemps 1956 (2)]. Le matériel a été utilisé soit frais, soit conservé au congélateur à -25° C.

Le diagnostic de variole a été confirmé au laboratoire par les méthodes classiques : inoculation de liquide de vésicules ou de pustules à la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs de poule au 11<sup>e</sup> jour de l'incubation; examen des membranes après trois jours; inoculation de liquide de pustules ou de broyat de membranes chorio-allantoïdiennes infectées à la peau du lapin pour éliminer la vaccine. Dans la suite nous avons utilisé la méthode d'identification des virus par la neutralisation par les immunoserums, décrite plus loin.

Les suspensions virulentes utilisées sont préparées soit à partir d'effilures contenant du liquide de vésicules ou de pustules, soit de croûtes varioliques, soit de membranes chorio-allantoïdiennes infectées. Enfin le plus souvent, la

suspension virulente est constituée par le liquide nutritif prélevé dans un tube de culture en évolution. Les tubes sont infectés avec 0,2 ml de suspension virulente; 2 ml de liquide nutritif sont ajoutés après 30 mn d'incubation dans l'appareil rotatif. L'inoculation du matériel virulent est faite en général quatre jours après la mise en culture des explants, mais a été pratiquée également sur des cultures âgées de 1, 2, 3, 8 et 12 jours.

Nous avons pu ainsi cultiver le virus de la variole sur des cultures de cellules de différents tissus :

- a. tissus d'embryons humains (2 à 4 mois) : peau et rein;
- b. tissus de lapins adultes : rein;
- c. tissus de lapins nouveau-nés (1 jour) : cœur et rein.

C'est sur le rein de lapin nouveau-né que la plupart de nos essais ont été effectués. Les explants de ce tissu donnent une prolifération rapide et abondante de fibroblastes.

Le virus de la variole provoque un effet cytopathogène. Sur les fibroblastes provenant d'explants de rein et de cœur de lapin nouveau-né et de tissu cutané d'embryon humain les lésions apparaissent trois à cinq jours après l'inoculation de la suspension virulente; elles sont localisées au début aux fibroblastes proches de l'explant : les fibroblastes s'arrondissent, se séparent les uns des autres, deviennent très réfringents, se nécrosent et sont détruits. Cet effet cytopathogène a une extension centrifuge. La nécrose des fibroblastes est souvent totale le huitième jour : le liquide nutritif ne vire plus. La date d'apparition, l'intensité et la rapidité d'extension de ces lésions sont liées au taux de virus présent dans la suspension inoculée. Sur les cellules épithéliales obtenues à partir d'explants de rein de lapin adulte et de rein d'embryon humain nous avons observé également un effet cytopathogène; son extension à l'intérieur de la culture est beaucoup plus rapide (parfois moins de 24 h).

Dans les premiers essais le contrôle de la virulence des liquides nutritifs prélevés a été fait sur l'œuf; ultérieurement l'effet cytopathogène nous a permis d'effectuer les titrages en cultures de tissus. Le taux de virulence quatre à cinq jours après l'inoculation atteint  $10^{-4}$ . Nous avons pu faire des passages successifs (quatre passages) d'un tube (souvent après un ou deux changements de milieu nutritif) à un autre tube sans observer de diminution de la virulence.

L'effet cytopathogène a rendu possible également l'étude du pouvoir neutralisant des immunosérums sur cultures de tissus. Le sérum de sujets convalescents ou le sérum de sujets porteurs de cicatrices de variole neutralise le virus variolique : des suspensions virulentes incubées durant 1 h avec un volume égal d'immunosérum, inocuées à des cultures de fibroblastes ne produisent aucun effet cytopathogène et le liquide nutritif n'est pas virulent. La même suspen-

sion virulente incubée seule ou avec un volume égal de sérum animal (sérum de cheval) ou de sérum humain normal (sujet n'ayant pas subi la vaccination jennérienne) provoque l'apparition des lésions cytologiques habituelles. D'autre part le sérum de lapin guéri de la vaccine ou le sérum humain provenant de sujets immunisés par la vaccination jennérienne, utilisé dans les mêmes conditions, montre une action retardante sur l'effet cytopathogène (trois jours au moins); l'extension des lésions est également ralentie.

Nous reviendrons sur ces premiers résultats fournis par les épreuves de neutralisation, ainsi que sur le pouvoir hémagglutinant des liquides de cultures.

(1) Provenant de *Nutritional Biochemical Corp.*, Cleveland (Ohio), et mise à notre disposition par J. E. Smadel.

(2) Le Docteur Hamed Siadat nous a procuré le matériel virulent et les immunosérums.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, t. 243, p. 1176-1178, séance du 15 octobre 1956.)