

55
142

ÉTUDE
DU COMPORTEMENT
DU VIRUS DE LA VARIOLE
EN CULTURES DE TISSUS

PAR

M. BALTAZARD, A. BOUÉ et H. SIADAT

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* »
N° d'ordre 2882. — (Extrait Mai 1958. — Tome 94, pp. 559-570.)

ÉTUDE DU COMPORTEMENT DU VIRUS DE LA VARIOLE EN CULTURES DE TISSUS

par M. BALTAZARD, A. BOUÉ et H. SIADAT (*).

(Institut Pasteur de l'Iran)

Si le virus de la variole peut être aisément cultivé sur la membrane chorio-allantoïdienne (M. C. A.) de l'œuf de poule incubé selon la technique décrite dès 1937 par Lazarus, Eddie et Meyer [1], il semble bien, par contre, que la culture de ce virus sur cultures de tissus n'ait encore jamais été obtenue. En effet, les quelques références données par les manuels spécialisés, tels que la récente *Bibliography of the Research in Tissue Culture* de Murray et Kopech [2], comme se rapportant au virus de la variole, ont en réalité trait au virus de la vaccine, par suite le plus souvent d'une confusion de termes, en particulier en allemand. Parmi les auteurs cités par Murray et Kopech, Minervin et Schmerling [3], qui auraient les premiers cultivé le virus de la variole sur tissus, ont en réalité travaillé avec le virus de la vaccine, ainsi que le montre la lecture de leur travail en langue allemande [4]. Nous n'avons pas pu consulter les publications de Haagen [5, 6], mais l'auteur lui-même en a donné une analyse [7, 8] dont la lecture est parfaitement explicite : il s'agit également du virus de la vaccine. Nauck et Pashen [9, 10], dont nous avons pu consulter les publications citées, ont cultivé une lymphé vaccinale humanisée, mais non le virus variolique. Lauche [11] est cité par Murray et Kopech d'après une analyse : or, la lecture de cette analyse même, comme celle des autres publications faites à la même époque par cet auteur, montre qu'il n'a travaillé que sur les cultures de tissus et non sur celles de virus. Les articles de Kimura et de ses collaborateurs [12, 13, 14], également cités par Gastinel dans son article « Virus variolique » dans *Les ultravirus des maladies humaines* (Levaditi et Lépine), et dont nous avons pu consulter l'original, portent uniquement sur un authentique virus de vaccine. Herzberg [15] a utilisé la même souche de vaccine humanisée que Nauck et Pashen. Bucher [16], comme le montre le titre même (« Les cultures embryonnaires du virus vaccinal et leur utilisation dans la

(*) Manuscrit reçu le 30 décembre 1957.

préparation du vaccin anti-variolique ») et la lecture de son travail, n'a pas cultivé le virus variolique. Enfin, Barg [17] a également cultivé le seul virus vaccinal, ainsi qu'il ressort du travail même cité par Murray et Kopech et d'autres publications du même auteur [18]. Seul, Reilly, cité par Gastinel, au cours de recherches restées inédites [19], a tenté en 1928 la culture du virus variolique sur tissus d'embryon de poulet, de rat et de chat.

Dans une première note [20], nous avons montré que cette culture pouvait être aisément obtenue ; nous rapportons ici les résultats de cette méthode en ce qui concerne la multiplication et le titrage du virus.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Virus. — Cinq souches de virus variolique ont été utilisées au cours de ce travail :

Quatre souches autochtones isolées de varioleux en évolution :
1° Souche Kachan (200 km au Sud de Téhéran) : épidémie de l'été 1955.

2° Souche Téhéran I : un cas sporadique en novembre 1955 (nourrisson de 6 mois non vacciné).

3° Souche Sabzevar (700 km à l'Est de Téhéran) : épidémie du printemps 1956.

4° Souche Téhéran II : décembre 1956.

5° Une souche étrangère : épidémie de Vannes (France) aimablement mise à notre disposition par P. Lépine, ayant subi trois passages sur l'œuf depuis son isolement.

Dans l'étude des souches autochtones, le diagnostic de variole a été confirmé au laboratoire par les méthodes classiques : inoculation à la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf incubé, passage sur la peau du lapin d'une suspension préparée avec la M. C. A. infectée. Dans la suite (souches Sabzevar, Téhéran II) nous avons également utilisé la culture sur tissus pour l'identification du virus. Le matériel virulent a été employé soit frais, soit après conservation à -25°C (dix mois pour la souche Kachan).

Différents types de suspensions virulentes ont été utilisés :

1° Suspensions préparées à partir de liquide de pustules varioliques prélevé dans des effilures. L'effilure et son contenu sont broyés dans un tube avec une baguette de verre, le broyat est mis en suspension dans 1 à 2 ml de solution tamponnée (solution de Hanks), puis centrifugé (2 000 tours, dix minutes). Le liquide surnageant constitue la suspension virulente.

2° Suspensions préparées à partir de croûtes varioliques, soit prélevées sur le malade, soit ramassées dans le lit ou même sur le sol de la chambre. La croûte est broyée au mortier (au besoin avec une poudre inerte), mise en suspension dans 1 ml de solution

tamponnée, puis centrifugée. On a intérêt à utiliser une solution tamponnée à laquelle on ajoute, par millilitre, en plus des antibiotiques habituels (pénicilline, 100 U, et streptomycine, 100 µg), de la tétracycline, 50 µg, et surtout de la nystatine; 50 U/ml. Malgré ces précautions, les croûtes prélevées sur la face, en particulier autour des orifices nasal et buccal, toujours très souillées, se prêtent mal à l'isolement du virus et on leur préférera les croûtes prélevées sur le tronc et les membres.

3° Suspensions préparées à partir de broyat de membranes chorio-allantoïdiennes.

Techniques. — Nous avons utilisé la technique de culture de tissus en tubes roulants décrite par Gey [21], telle que l'ont développée Robbins, Weller et Enders [22]. Nous employons un milieu nutritif à la lactalbumine dérivé de celui de Melnick [23]: solution de Hanks, 62 ml; solution d'hydrolysate de lactalbumine à 50 p. 100, 10 ml; liquide amniotique bovin, 23 ml; sérum de cheval, 5 ml; auquel sont ajoutés les antibiotiques.

Pour la préparation des explants, les différents tissus suivants ont été utilisés: tissus d'embryon humain (2 à 4 mois), peau et rein; tissu de lapin adulte, rein; tissus de lapin nouveau-né (1 jour), rein et cœur; tissus d'embryon bovin, peau et rein; tissus d'embryons ovin et caprin, peau et rein; tissu d'embryon de souris, cerveau.

Les tubes de culture reçoivent 2 ml de milieu nutritif, changé tous les quatre ou cinq jours. L'inoculation des suspensions virulentes est faite en général quatre jours après la mise en culture des explants, c'est-à-dire lors du premier changement de milieu nutritif; nous avons pratiqué des inoculations sur des cultures de 1, 2, 3, 8 et 12 jours sans modifications dans les résultats.

RÉSULTATS.

Effet cytopathogène. — La multiplication du virus de la variole sur cultures de tissus de mammifères s'accompagne d'un effet cytopathogène. Les cellules s'arrondissent, se séparent les unes des autres, deviennent très réfringentes, se nécrosent et disparaissent. Ce processus s'accompagne d'une augmentation de l'opacité des cellules donnant au tapis cellulaire entourant l'explant un aspect opalin bien visible à l'œil nu.

Cet effet cytopathogène, retrouvé avec tous les tissus que nous avons étudiés, atteint à la fois les fibroblastes et les cellules épithéliales. La date d'apparition des lésions dépend du taux de la suspension virulente inoculée. Sans qu'il soit possible de faire du délai d'apparition des lésions cytologiques une méthode de titrage, on peut établir une relation entre ce délai et le titre de

la suspension permettant d'orienter des titrages plus précis (tableau I).

TABLEAU I.

Taux de la suspension virulente en D. I. C. 50	Date d'apparition des lésions cytologiques
< 10 ¹	7 à 8 jours
10 ¹	6 à 7 jours
10 ²	4 à 5 jours
10 ³	3 à 4 jours
10 ⁴	2 à 3 jours
10 ⁵	2 à 3 jours

Pour les virus adaptés par de nombreux passages, ces chiffres doivent être modifiés et le délai raccourci, mais nous avons retrouvé des délais équivalents pour toutes les souches que nous avons étudiées au cours des premiers passages.

La propagation des lésions à l'intérieur de la culture se fait selon deux processus différents que l'on distingue aisément à l'examen microscopique des tubes:

Une propagation directe de cellule à cellule; ce processus est particulièrement net lorsqu'on examine des cultures inoculées avec un faible taux de virus (50 DIC50 ou moins). On voit alors apparaître, dans un tapis cellulaire très étendu (le délai d'apparition des lésions a permis à la culture de proliférer largement depuis l'inoculation) et à proximité de l'explant, quelques cellules arrondies et réfringentes groupées, tranchant sur la couche régulière des cellules encore normales. Ce début des lésions est particulièrement net dans les tapis de fibroblastes où il donne un aspect de petites zones de cellules arrondies rayonnant à partir de l'explant. L'examen régulier de la culture va montrer, au cours des jours suivants, une extension des lésions aux cellules avoisinantes. Trente-six à quarante-huit heures après l'apparition de ces premières cellules arrondies on peut, au même endroit, noter un aspect très caractéristique: dans un tapis de cellules normales, une zone ovale bordée de cellules rondes et granuleuses centrée par une lacune correspondant à l'emplacement des premières cellules atteintes, qui ont disparu. Cet aspect « mité » de la culture a été retrouvé avec toutes les souches (fig. 1 à 4). Il est toujours transitoire et cède la place aux images dues au deuxième processus de propagation du virus par diffusion dans le liquide, qui provoque des lésions sur l'ensemble de la culture, amenant rapidement une nécrose de la totalité des cellules. Ces lésions cytologiques disséminées sur toute la surface de la culture se voient d'emblée dans les tubes inoculés avec de fortes concentrations de virus.

Titration. — De même qu'il est possible de le faire pour de nombreux virus, l'effet cytopathogène permet le titrage des suspensions de virus variolique sur cultures de tissus.



FIG. 1.



FIG. 2.

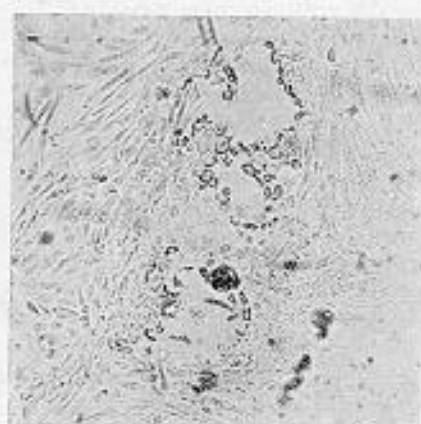


FIG. 3.

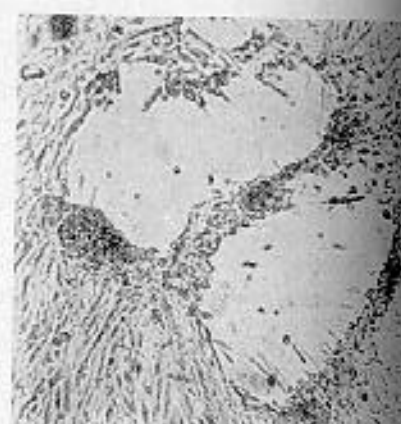


FIG. 4.

Tous nos titrages ont été faits sur cultures en tubes roulants de tissu rénal de lapin nouveau-né. Nous avons choisi ce tissu de préférence à d'autres tissus embryonnaires, parce qu'il était pour nous le plus aisément disponible et parce qu'il donne des cultures rapidement proliférantes et sans lyse de la couche plas-

matique. Les cultures ainsi obtenues sont le plus souvent des cultures mixtes de cellules épithéliales et de fibroblastes, ces derniers ayant tendance à recouvrir toute la culture. Les cultures d'un seul type cellulaire ou les cultures mixtes ne montrent d'ailleurs aucune différence de sensibilité au virus de la variole; les cellules sont toujours toutes détruites, les fibroblastes montrant seulement une plus grande résistance et disparaissant moins vite que les cellules épithéliales. Nous avons fixé à dix jours la durée d'observation des tubes après l'inoculation des suspensions à titrer, aucun effet cytopathogène n'apparaissant jamais après ce délai (voir tableau I). En outre, le liquide nutritif prélevé le dixième jour dans les tubes ne présentant pas de lésions n'est pas virulent, qu'il s'agisse de tubes appartenant à une série de tubes négatifs ou de tubes appartenant à une série partiellement positive.

Nous avons pu effectuer à plusieurs reprises avec nos différentes souches des titrages comparatifs d'une même suspension virulente sur tubes roulants et sur membrane chorio-allantoïdienne. Ces titrages montrent que la sensibilité des deux milieux est à peu près identique, que l'on lise la réaction de la M. C. A. par présence-absence de pustules ou par dénombrement des pustules. Le tableau II montre le titrage comparé de plusieurs liquides de virulence différente où le résultat sur M. C. A. est chiffré par présence ou absence de pustules.

TABLEAU II.

Liquides titrés	A	B	C	D	E
Titration sur cultures de tissus	$10^{4,6}$	10^2	$10^{1,25}$	$10^{1,75}$	10^2
Titration sur M.C.A.	$10^{5,2}$	10^2	$10^{0,75}$	$10^{1,5}$	10^2

Par dénombrement des pustules sur M. C. A., on arrive en moyenne à obtenir 1 à 3 pustules pour un liquide titrant sur tubes roulants $10^{5,2}$ DIC50 et 10 pustules pour un liquide titrant $10^{5,2}$ DIC50.

Nous avons également effectué des titrages sur des tubes immobiles (stationary tubes) de cultures en couche mono-cellulaire selon la technique de Dulbecco et Vogt [24] et de Youngner [25]. Les résultats des titrages comparatifs de mêmes suspensions virulentes, sur cultures en tubes roulants ou sur cultures en couche mono-cellulaire préparées à partir de rein de lapin nouveau-né, sont exactement superposables.

Il est évidemment impossible d'utiliser, comme pour le virus de la poliomyélite, des tests colorés pour la lecture des résultats. Les délais d'apparition de l'effet cytopathogène avec le virus de la variole sont trop longs, et la prolifération cellulaire qui précède l'apparition des lésions cytologiques entraîne toujours une variation de pH (en particulier dans le titrage des suspensions de taux faible).

Les lectures sont toujours faites au microscope : un seul examen des tubes au dixième jour est suffisant, l'intensité des lésions à ce moment permettant une lecture aisée et rapide.

Multiplication du virus. — La courbe de multiplication du virus variolique (fig. 5) en cultures de tissu rénal de lapin nouveau-né

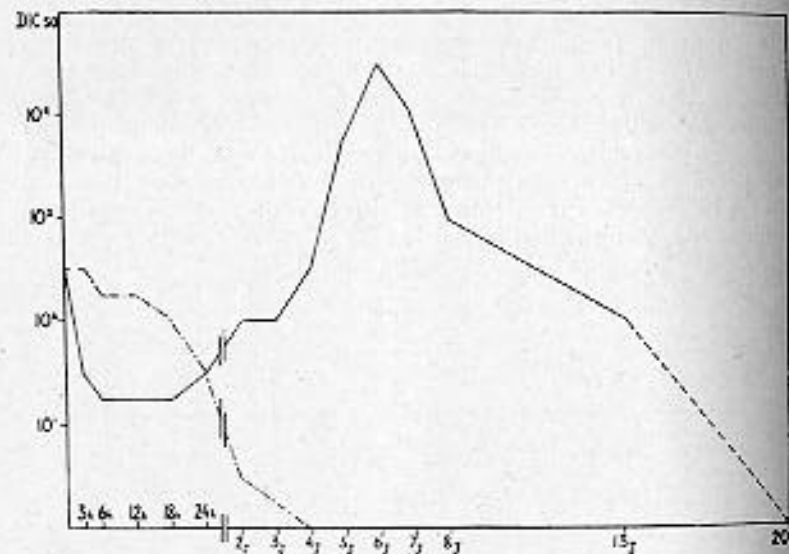


FIG. 5.

a été établie d'après les résultats de quatre expériences identiques : une série de tubes roulants est inoculée avec 2 ml, représentant 10⁸ D100, d'une suspension titrée de broyat de membrane chorio-allantoïdienne ; après trois, six et douze heures, puis toutes les vingt-quatre heures, trois tubes sont prélevés au hasard et les liquides mélangés pour titrage.

La lecture de cette courbe montre que :

a) Le taux du virus dans la phase liquide décroît rapidement pendant les six premières heures, période de fixation du virus.

b) A partir de la septième heure le taux du virus reste à peu près constant dans le liquide jusqu'à la dix-huitième heure.

L'expérience suivante montre que c'est bien à l'arrêt du phénomène de fixation qu'est due cette stabilisation du taux du virus dans le liquide, et non à un début de libération de virus par les cellules, qui viendrait masquer la décroissance due à une continuation du processus de fixation. Une série de tubes est inoculée avec 10⁸ D100 ; après douze heures la totalité du liquide de ces tubes est remplacée par du milieu nutritif neuf. Ce milieu est ensuite prélevé et changé toutes les deux heures. Le titrage sur tubes roulants montre l'absence complète de virus jusqu'à la vingtième heure.

La constance du taux du virus dans la phase liquide entre la septième et la dix-huitième heure est donc due à la survie dans le liquide du virus inoculé après la fin de la période de fixation. Cette survie à 37° C a pu par ailleurs être vérifiée dans des séries de tubes roulants sans explants, inoculés parallèlement aux précédents : le taux du virus reste à peu près constant jusqu'à la dix-huitième heure (courbe pointillée).

Ce phénomène de persistance du virus dans le liquide est constant : il existe donc toujours une non-fixation sur les cellules d'une partie du virus inoculé. Cette non-fixation se retrouve dans tous les cas, quelle que soit la quantité de virus présent dans l'inoculat : des séries de cinq tubes roulants sont inoculées avec des taux de 21, 210, 2 100 D100 ; à la sixième heure les liquides de chaque série sont prélevés et mélangés. Le titrage montre qu'il reste encore respectivement 3, 100, 237 D100 : la partie non fixée du virus semble donc proportionnelle à la richesse de l'inoculat.

Ce phénomène ne peut être expliqué par une qualité spéciale de certains éléments virulents, manquant par exemple de pouvoir d'agressivité vis-à-vis de la cellule : en effet, ce virus non fixé restant dans un liquide peut être fixé sur les cellules « neuves » d'autres tubes. C'est le cas de tous nos titrages positifs faits entre la sixième et la dix-huitième heure, et nous avons pu, dans un cas, opérer quatre « transferts » successifs d'un même liquide en récupérant à chaque transfert une quantité suffisante d'un virus capable d'infecter la série de tubes suivante.

Il ne peut s'agir non plus d'une « saturation » de toutes les cellules de la culture, puisque ce phénomène peut être observé même avec des inoculats très faibles, où le nombre des éléments virulents peut être considéré comme très inférieur à celui des cellules. De même on ne peut invoquer une inaptitude des cellules ou de certaines cellules de la culture à fixer le virus, puisqu'à la suite de la multiplication du virus toutes les cellules finissent par être infectées.

On doit donc invoquer la possibilité de l'existence d'un « équilibre » entre la quantité de virus fixé par les cellules et la quantité de virus libre dans le liquide.

c) C'est vers la vingt-quatrième heure que devient sensible l'augmentation du taux du virus dans le liquide par suite de la libération de virus par les cellules. La courbe, faiblement ascendante jusqu'au quatrième jour, commence à monter fortement alors qu'apparaissent les premières lésions cytologiques.

d) La courbe atteint son sommet les sixième et septième jours, au moment où les lésions ont atteint l'ensemble des cellules de la culture.

e) Le taux du virus décroît alors lentement jusqu'au vingtième jour, date à laquelle nous n'avons jamais pu le retrouver dans le liquide. Il s'agit donc d'une disparition lente : le taux du virus est encore de 10^6 DIC50 le treizième jour, bien que depuis le huitième jour on ne puisse voir aucune cellule vivante dans les tubes en dehors des explants, alors que dans les expériences parallèles de conservation du liquide à 37°C dans des tubes roulants sans cellules la disparition est totale en moins de trois jours. Melnick [26] a constaté avec le virus de la poliomyélite un phénomène semblable, qu'il attribue à une libération de virus par des cellules qui survivraient dans l'explant même.

Explants. — Dans les explants prélevés au cours de ces essais, nous n'avons pas étudié le taux du virus, mais seulement recherché si le virus était toujours décelable dans les cellules infectées. Pour cette recherche, après prélèvement du liquide dans les tubes, les explants sont lavés, décollés avec la couche cellulaire qui les entoure, congelés à -25°C , puis décongelés et broyés : le broyat mis en suspension dans 1 ml de solution de Hanks est centrifugé (1 500 tours, dix minutes), le liquide surnageant est inoculé à une série de tubes roulants.

Dans un premier essai le virus variolique n'a pas été retrouvé dans les explants prélevés une, trois, six, huit, dix, douze, quinze et dix-neuf heures après l'inoculation d'une suspension virulente titrant 10^8 DIC50 ; par contre, le virus est présent dans les explants prélevés à partir de la vingt-quatrième heure. Dans un deuxième essai semblable, portant sur une série de tubes inoculés avec une suspension titrant 10^{12} DIC50, les explants prélevés une, deux, trois, six et neuf heures après l'inoculation ne contenaient pas de virus décelable. Cette absence de virus dans des cellules sur lesquelles le virus est théoriquement déjà fixé permet d'affirmer qu'il existe, au cours de la multiplication du virus de la variole, une phase d'éclipse. Une phase d'éclipse semblable et de même durée avait déjà été observée par Crawford et San-

ders [27] au cours de leurs études sur la multiplication du virus vaccinal en culture de tissu cutané de lapin adulte.

Passages. — A partir de liquide de pustules varioliques (souche Kachan), nous avons effectué 16 passages sur cultures de rein de lapin nouveau-né. Au seizième passage l'inoculation du liquide par scarification eutanée au lapin ne provoque toujours aucune lésion et l'inoculation à la M. C. A. donne toujours les petites pustules caractéristiques de la variole. La seule modification est une adaptation du virus à la culture sur tissus caractérisée par un raccourcissement du délai d'apparition de l'effet cytopathogène : après quarante-huit heures pour des suspensions titrant 10^8 DIC50 on ne voit plus l'aspect « mité » des cultures mais des lésions diffusant d'emblée à l'ensemble de la culture. Le taux du virus dans le liquide prélevé le sixième jour atteint 10^6 DIC50. Cette constance des caractères du virus variolique après de nombreux passages sur cultures de tissus est à rapprocher du comportement du virus sur membrane chorio-allantoïdienne, ainsi qu'il ressort des travaux de Nelson [28] et de Downie et Dumbell [29].

RÉSUMÉ.

Des virus de variole d'origines diverses, étudiés en cultures de tissus, produisent un effet cytopathogène, caractérisé par sa lenteur (par comparaison au virus vaccinal, par exemple). L'étude du développement du virus en cultures de tissus montre également une phase de fixation relativement longue : six heures. La fixation est toujours incomplète, limitée à une partie du virus, proportionnelle à la quantité inoculée. Le virus montre une « phase d'éclipse » et ne peut être retrouvé qu'à partir de la vingtième heure dans les cellules, moment où celles-ci commencent à libérer le virus dans le liquide nutritif.

Le maximum de développement du virus correspond au maximum de l'effet cytopathogène (septième jour), après quoi le taux du virus baisse lentement jusqu'au vingtième jour.

Les passages répétés en cultures de tissus n'altèrent pas les caractères du virus.

SUMMARY

STUDY OF THE COMPORTMENT OF VARIOLA VIRUS IN TISSUE CULTURE.

Different strains of variola virus have been studied in tissue culture. They possess a cytopathogenic activity, which is characterized by its slowness (compared to vaccinia virus, for example). The development of the virus shows a relatively long fixation phase : six hours. The fixation is always incomplete and limited

to a quantity of virus proportional to the inoculated quantity. There is an « eclipse phase » and the virus cannot be demonstrated in the cultures before the twentieth hour, when the cells begin to release virus in the medium.

The maximum development of virus corresponds to the maximum cytopathogenic effect (seventh day), then the titer of virus slowly decreases until the twentieth day.

Transfers in series in tissue culture do not modify the properties of the virus.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] LAZARUS (A. S.), EDDIE (D.) et MEYER (K. F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1937, **36**, 7.
- [2] MURRAY (M. R.) et KOPPEL (G.). *A Bibliography of the Research in Tissue Culture*. Academic Press Inc., 1953, p. 1712.
- [3] MINERVIN (S.) et SCHMERLING (A.). *Zh. ekaper. Biol. Med.*, 1926, **2**, 78.
- [4] MINERVIN (S.) et SCHMERLING (A.). *Zbl. Bakt. Orig.*, 1926, **99**, 558.
- [5] HAAGEN (E.). *Arch. exp. Zellforsch.*, 1929, **8**, 499.
- [6] HAAGEN (E.). *Arch. exp. Zellforsch.*, 1931, **12**, 465.
- [7] HAAGEN (E.). *Zbl. Bakt. Ref.*, 1930, **97**, 531.
- [8] HAAGEN (E.). *Zbl. Bakt. Ref.*, 1932, **107**, 184.
- [9] NAUCK (E. G.) et PASSEN (E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1931, **121**, 312.
- [10] NAUCK (E. G.) et PASSEN (E.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1932, **124**, 91.
- [11] LAUCHE (A.). *Med. Welt*, 1931, **5**, 1377.
- [12] KIMURA (R.) et FUJISAWA (Y.). *Z. Immun. forsch.*, 1931, **71**, 556.
- [13] KIMURA (R.) et FUJISAWA (Y.). *Z. Immun. forsch.*, 1932, **74**, 384.
- [14] KIMURA (R.) et NISHI (S.). *Kyoto Imp. Univ. Coll. Med. Acta*, 1934, **17**, 159.
- [15] HERZBERG (K.). *Klin. Wschr.*, 1932, **11**, 2094.
- [16] HUCHER (P.). *Rev. Hyg.*, 1935, **57**, 529.
- [17] BARC (G. S.). *Mikrobiol.*, 1938, **5**, 27.
- [18] BARC (G. S.), NATOWITZCH (A. L.) et KOZINTZEWA (E. M.). *Mikrobiol.*, 1939, **6**, 95.
- [19] REILLY (J.). Communication personnelle.
- [20] BOUÉ (A.) et BALTAZARD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 1956, **243**, 1176.
- [21] GEY (G. O.). *Amer. J. Cancer*, 1933, **17**, 752.
- [22] ROBBINS (F. C.), WELLER (T. H.) et ENDERS (J. F.). *J. Immunol.*, 1952, **69**, 673.
- [23] MELNICK (J. L.). *Tissue culture methods in Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases*, 2nd ed., *Amer. Public Health Ass.*, 1956, 142.
- [24] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 167.
- [25] YOUNGNER (J. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 202.
- [26] MELNICK (J. L.). *Advances in Virus Research*, 1953, **4**, 229.
- [27] CRAWFORD (G. N. C.) et SANDERS (F. K.). *Quat. J. Microsc. Sc.*, 1952, **93**, 119.
- [28] NELSON (J. B.). *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 231.
- [29] DOWNIE (A. W.) et DUMBELL (K. R.). *J. Path. Bact.*, 1947, **59**, 189.