

Hémagglutinines des arbovirus en cultures de tissus et cerveaux de rats nouveau-nés

PAR

S. R. PATTYN et L. DE VLEESCHAUWER

Institut de Médecine Tropicale, Prince Léopold, Anvers.

Résumé. — Des hémagglutinines peuvent être obtenues avec les virus WEE et Sindbis en cultures de cellules d'embryon de poulet. De faibles taux peuvent être obtenus avec certains virus du groupe B tels que FJ et RSSE en cultures de cellules HeLa. Les cerveaux de rats nouveau-nés peuvent également servir d'antigènes pour les réactions d'hémagglutination.

Depuis longtemps de nombreux auteurs ont cherché à appliquer les techniques de cultures de tissus à l'étude des arbovirus. Toutes les recherches ont montré que ces virus, tout en se multipliant plus ou moins dans certaines cultures cellulaires, produisent un effet cytopathogène (ECP) d'une façon trop irrégulière pour que la technique trouve une application générale dans ce domaine.

Une autre voie d'exploration est l'utilisation des cultures cellulaires comme source éventuelle d'hémagglutinines.

Diercks *et al.* (1961) ont montré qu'il y avait moyen de préparer des antigènes hémagglutinants (AHA) pour de nombreux arbovirus dans des cultures de reins de hamster. Salminen (1962) a décrit la préparation de ces antigènes dans des cultures d'une lignée cellulaire continue (cellules U).

Récemment, au cours de nos travaux, Likar *et al.* (1962) ont publié quelques résultats de leurs recherches de AHA en cultures de cellules HeLa. Nous avons recherché l'apparition de AHA des arbovirus en cultures de cellules HeLa ainsi que dans des cultures de cellules d'embryon de poulet. Parallèlement nous avons investigué la possibilité d'utilisation de cerveaux de rats nouveau-nés comme source d'antigènes hémagglutinants.

Matériel et Techniques.

Les cellules HeLa et d'embryon de poulet (CTEP) ont été cultivées selon les techniques habituelles dans un milieu dont la composition est la suivante : solution de Hanks à 0,5 p. cent d'hydrolysate de lactalbumine additionnée de 5 p. cent de sérum de veau. La surface des cultures était de 35 cm².

TABLEAU I

Apparition de HA, ECPE, et présence d'arbovirus en cultures de tissus.

Virus		HeLa					CTEP			
		1	2	3	5	7	1	2	4	6
WEE	HA CPE Titre		0		0	0 0 0	512	512	512 ++ > 10 ⁵	
Sindbis	HA CPE Titre			0	2	0 + +	256	64 ++		
Chick	HA CPE Titre	0		0	0 0	0 0	0	0	0 + +	0
SF	HA CPE Titre	0	4	8 ++ 3.10 ⁵				64	64 ++ > 10 ⁶	
FJ	HA CPE Titre		3.10 ⁵	0	32 3.10 ^{4.5}	8 3.10 ³	0	0	0 3.10 ³	0 0
RSSE	HA CPE Titre	4		8	16	32 0 3.10 ⁶	0	4	32 3.10 ⁴	32 0 3.10 ³
WN	HA CPE Titre	0		0 > 3.10 ⁴	8	4 0 3.10 ⁴		0		0 0 3.10 ⁴
Dengue	HA CPE Titre	0		0	0 0 3.10 ⁴	0		0	2	0
Jap. B.	HA CPE Titre	0		0	0	4		0	0	
Buny.	HA CPE Titre	0		0	0	0 0 0	0	0	0	0 3.10 ⁴

Avant l'infection avec les diverses souches virales le milieu de croissance fut remplacé par un milieu de conservation (MC) composé de Hanks à 0,5 p. cent de lactalbumine : 80; albumine bovine (fraction V à 10 p. cent) 2; Tris 0.05 M. 20.

Souches virales.

Groupe A : WEE L. Thiry, Institut Pasteur de Bruxelles.

Sindbis : E. De Maeyer, Institut Rega Louvain.

Chickunguya et Semliki Forest : J. Porterfield, Londres.

Groupe B : RSSE souche Graz J. D. Verlinde, Leiden.

West Nile, Dengue 2, FJ souche neurotrope) Japonaise B : J. Porterfield, Londres.

Bunyamwera : Bunyamwera J. Porterfield, Londres.

Ces virus furent passés sur souriceaux ou souris, et ajoutés aux cultures cellulaires à la dilution de 10^{-2} .

Récolte des hémagglutinines (HA). A divers moments après l'infection 4 ml du milieu surnageant furent récoltés et additionnés de tampon borate pH 9. Ce mélange fut éventuellement conservé à -70° jusqu'au moment des tests de HA. La quantité du milieu ainsi prélevée fut remplacée par la même quantité de MC. Dans le cas où un ECP apparut, le liquide fut, d'abord centrifugé afin de le débarrasser des débris cellulaires.

Réaction d'hémagglutination. Elle fut exécutée selon les techniques décrites par Clarke et Casals (1958). Les suspensions de cerveaux de souriceaux et de rats nouveau-nés furent traitées à la protamine immédiatement avant la réaction. Toutes les réactions furent faites en plaques en plastique en utilisant des hématies de canard, les incubations eurent lieu à la température du laboratoire.

Résultats.

Virus du groupe A. Comme le montre le tableau 1, les CTEP constituent un milieu favorable pour la production de AHA pour certains virus du groupe A : les virus WEE et Sindbis nous ayant fourni les titres les plus élevés. Les hémagglutinines apparaissent déjà après 24 heures. Il ne s'agit pas du résidu de AHA se trouvant dans l'inoculum car celui-ci mélangé dans les mêmes proportions au tampon borate pH9 n'agglutine pas les hématies de canard, pas plus qu'une récolte faite quelques minutes après l'infection des cultures cellulaires. En cultures de cellules HeLa les virus du groupe A ne trouvent pas de milieu aussi favorable pour la production de AHA; même le virus SF qui se multiplie pourtant bien dans ces cultures.

Virus du groupe B et Bunyamwera (voir tableau 1). Ici les cellules HeLa fournissent un milieu plus approprié à la production d'AHA que les CTEP. Des taux de 1/16 et 1/32 peuvent être obtenus pour la FJ et le RSSE. Le virus WN et JapB produisent moins de AHA; les essais furent négatifs pour Dengue 2 et Bunyamwera.

En CTEP seul le virus RSSE fournit des AHA.

L'effet de la quantité de cellules mises en œuvre fut également testé. En augmentant la surface des cultures, par l'emploi par exemple des flacons de Roux à surface et nombre de cellules quadruple,

nous avons dans certains cas observé une augmentation des anti-gènes de deux à quatre fois. La production de AHA semble donc être proportionnelle au nombre de cellules mises en œuvre.

Effet du sérum dans le liquide surnageant des cultures. Salminen a fortement insisté sur l'effet inhibiteur du sérum, contenu dans le MC, sur la production de AHA. Aussi avons-nous fait toutes nos recherches avec le milieu MC dépourvu de sérum. Nous avons vérifié l'effet du sérum dans les deux cas des virus WEE et SF en CTEP. Les résultats figurent au tableau 2.

TABLEAU II
Effet du sérum contenu dans le milieu
sur la production d'antigènes hémagglutinants. Titre au deuxième jour.

WEE		Semliki Forest	
MC	MC + 5 p. cent sérum de veau	MC	MC + 5 p. cent sérum de veau
512	512	64	4

On voit que l'effet du sérum est différent selon le virus : alors que le titre des AHA n'est pas changé chez WEE en présence de sérum, ceci est le cas pourtant pour SF.

Résultats avec cerveaux de rats nouveau-nés.

Voici les titres obtenus comparativement avec des suspensions de cerveaux de souris et de rats nouveau-nés :

WEE	> 2048	1024
Sindbis	256	128
Chick	2048	128
SF	2048	256
Bunyamwera	1024	0
FJ	256	128
WN	2048	512
RSSE	512	64
Dengue	2128	256
Japb	PF	256

Discussion.

Ces taux appréciables de AHA peuvent donc être obtenus pour certains arbovirus du groupe A en CTEP et des quantités importantes pour les virus FJ et RSSE sur cellules HeLa. Nos résultats montrent

également que tout virus qui se multiplie en cultures de tissu ne fournit pas nécessairement des HA par exemple, Dengue et JapB en cellules HeLa. Si nous comparons nos résultats avec ceux d'autres auteurs nous constatons que les titres obtenus sont du même ordre que ceux signalés par Diercks *et al.* (1961) sur reins de hamster. Salminen (1962) signale en général des titres plus élevés. Likar *et al.* (1962) ont obtenu des titres plus élevés sur cellules HeLa mais en travaillant à des températures inférieures à 37°C et en prolongeant le temps d'incubation, ce qui leur était rendu possible, grâce à l'incorporation de sérum de bovidé fœtal dans leur milieu.

En l'absence de sérum en effet il n'y a pas moyen de garder des cellules HeLa en de bonnes conditions au delà de cinq à sept jours.

Comme nous le montrent les résultats avec les virus WEE l'emploi des cultures cellulaires peut dans certains cas constituer une source commode de AHA.

Si les suspensions de cerveaux de rats nouveau-nés fournissent également des AHA, les titres sont toujours plus bas que ceux obtenus avec des souriceaux et ne compensent pas la différence de poids en matière récoltée.

BIBLIOGRAPHIE,

- Clarke, D. H. et Casals, J., Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses. *Am. J. Trop. med. hyg.*, 1958, **7**, 561-573.
- Diercks, F. H., Kunin, D. et Porter, T. J., Arthropod borne virus hemagglutinin production in infected hamster kidney cell cultures. *Am. J. hyg.*, 1961, **73**, 164-172.
- Likar, M., Buckley, S. M. et Clarke, D. H., Improved conditions for the production of arbor viral hemagglutinins in infected HeLa cell culture *Virol.*, 1962, **18**, 647-649.
- Salminen, A., A method for the production of arthropod borne viral hemagglutinins in tissue culture. *Ann. Med. Exper. Fenn.*, 1962, **40**, 174-184.
-