

**Préparation d'antigène aphteux concentré
sur culture cellulaire
pour l'étude de 3 variantes de type "O"
O Flandres - O Sicile 58 - O Espagne 64 (*)**

par

M. AMIGHI C. DUBOUCARD, M. ROUMIANTZEFF, J. FONTAINE
et R. LANG

Le virus aphteux, utilisé comme antigène dans la réaction de fixation du complément, peut avoir diverses origines:

- - aphtes de bovins infectés, épithélium infecté ou liquide obtenu par culture d'un virus adapté à l'épithélium bovin maintenu en survie (méthode Frenkel), complexe vaccino-aphteux obtenu sur la génisse préalablement inoculée avec le virus de la vaccine (méthode Belin), virus multiplié sur des cellules cultivées *in vitro* selon la méthode de DULBECCO et VOGT (1-2).

La technique exposée permet d'obtenir des antigènes concentrés utilisés en particulier pour la fixation du complément à 100 p. 100 ou à 50 p. 100 d'hémolyse (6), ceci pour l'étude des variantes du virus aphteux. Ce travail consiste à adapter des variantes du virus O sur cellules primaires de rein de porc, puis sur cellules BHK 21 de MACPHERSON et STOKER (3-4). Cette technique, applicable à tous les virus de la Fièvre aphteuse, présente de multiples avantages:

a) Le virus est moins coûteux que celui produit sur bovin.

b) Le risque de contamination par le virus est très minime étant donné que tout le matériel ayant servi à ce travail peut être autoclavé et que les locaux réservés aux variantes peuvent être désinfectés facilement. Par contre, la production du virus sur bovin et même sur cobaye nécessite des installations coûteuses pour la destruction des cadavres et présente une moins grande sécurité car la désinfection de plus grands boxes est délicate.

I. - MATÉRIEL.

1. *Cellules.* --- Les cellules primaires de rein de porc sont mises en culture en milieu de Earle à raison de 200 000 cellules par millilitre et sont utilisées lorsque le tapis cellulaire est à peu près complet soit environ après 5 jours de culture. En effet, il est préférable d'employer des cellules jeunes, en bon état, plutôt que des cellules âgées de 7, 8 ou 9 jours: cela s'explique par le fait que les cellules en multiplication et assez jeunes conviennent particulièrement pour le virus aphteux (virus à A.R.N.)

(*) Revue d'Immunologie, Paris, tome 30, 1966 No 3, pp. 131 à 140.

— Les passages de la lignée cellulaire BHK 21 se font par multiplication dans le rapport de 1 à 6. Les cellules sont employées après 4-5 jours.

2. *Milieux de culture et d'entretien.* Le milieu pour les cellules rénales de porc est constitué par la solution saline de Earle (*) contenant par litre:

- 5 grammes d'hydrolysate de lactalbumine;
- 50 millilitres de sérum de veau;
- des antibiotiques: pénicilline, streptomycine.

—

Le milieu pour les cellules BHK 21 est constitué par la solution saline de Hanks (**) contenant par litre:

- 5 grammes d'hydrolysate de lactalbumine;
- 1 gramme d'extrait de levure de bière;
- 30 à 40 millilitres de sérum de veau;
- les mêmes antibiotiques.

—

Le sérum de veau utilisé est inactivé à 56° pendant 30 minutes et ne doit pas contenir d'anticorps anti-aphteux.

3. *Multiplication des cellules.* — La couche cellulaire est traitée par un mélange de trypsine à la dose de 1,5 g par litre et de versène à la dose de 1,2 g par litre, dans une solution de PBS sans calcium ni magnésium. Puis les cellules sont mises en suspension dans un nouveau milieu et cultivées dans de nouveaux flacons.

4. *Milieu de culture du virus.* — Pour la culture du virus aphteux, le milieu contient la solution saline de Earle (***) à laquelle on ajoute de la lactalbumine et de l'extrait de levure de bière dans les mêmes proportions que pour le milieu Hanks. Ce milieu ne contient pas de sérum ni de rouge de phénol, ceci pour éviter la coloration des antigènes.

5. *Virus d'inoculation.* — Ce sont des virus bovins: O Flandres, O Sicile 58, O Espagne 64, souches de l'Institut Français de la Fièvre aphteuse.

(*) Milieu de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse.

(**) Milieu de l'Institut Razi.

(***) Milieu de l'Institut Razi.

II. — MÉTHODES

I. ADAPTATION DU VIRUS BOVIN SUR CELLULES RÉNALES PRIMAIRES DE PORC

A. — *Premier passage.*

Les difficultés d'adaptation des virus bovins sur cellules rénales de porc⁽⁷⁾ nous ont amenés à rechercher l'adaptation la plus rapide d'une part, et le virus le plus concentré possible d'autre part. L'expérience réalisée a été la suivante :

Le virus bovin a été dilué de 10^{-1} à $10^{-6,4}$, dilutions d'écart logarithmique de 0,6 soit : 10^{-1} , $10^{-1,6}$, $10^{-2,2}$... $10^{-6,4}$. Deux flacons de Roux de cellules rénales de porc ont été infectés avec 15 millilitres de chaque dilution.

Après 2 heures de contact à l'étuve à 37 °C « en agitant tous les 1/4 d'heure », une série reçoit immédiatement 35 millilitres de milieu Earle (*) tandis que l'autre série reçoit 50 millilitres du même milieu après élimination du virus d'ensemencement et lavage de la couche cellulaire avec du milieu de Earle. Le virus cultive donc en présence de 50 millilitres de milieu par flacon de Roux.

L'expérience est tout d'abord faite avec le virus O Sicile 58 (**).

Comme les cellules lavées montrent des effets cytopathogènes plus nets, le virus de départ est éliminé et les cellules lavées avec le milieu d'Earle pour la culture des virus O Flandres et O Espagne.

Après 24 heures de culture, nous avons observé l'effet cytopathogène, titré les échantillons par la réaction de fixation du complément et sur cellules rénales primaires de porc.

Ces 3 méthodes ont donné des résultats parallèles.

a) *Effect cytopathogène.* — Le tableau I nous montre les effets cytopathogènes observés avec les 3 virus, 24 heures après inoculation, en fonction de la dilution de l'inoculum.

Les courbes suivantes (fig. I) résument les résultats obtenus.

b) *Fixation du complément.* — Les tableaux II, III, IV montrent les résultats de fixation du complément des échantillons prélevés après 24 heures. Ceux-ci confirment les 3 courbes de la figure I.

c) *Titrages du pouvoir infectieux.* — Les différents échantillons de virus O Flandres ont été titrés sur cellules primaires de rein de porc. Le tableau V montre les résultats obtenus.

Ces résultats confirment à nouveau les courbes de la figure I. En conséquence, pour adapter un virus bovin sur cellules de reins de porc (en général sur cellules primaires), il faut :

(*) Milieu de l'Institut Razi.

(**) Souche initiale remise par le Pr Nobili (Palerme).

TABIEAU I

EFFET CYTOPATHOGENE SUR CELLULES RENALES PRIMAIRES DE PORC 24 HEURES APRES ENSEMENCEMENT
 AVEC DES DILUTIONS VARIABLES DE VIRUS
 + 25 % de cellules lésées
 ++ 50 % de cellules lésées
 +++ ± 75 % de cellules lésées
 ++++ 100 % de cellules lésées

132

| DILUTIONS DE VIRUS D'ENSEMENCEMENT (log.) | O SICILE 58 | | O FLANDRES | O ESPAGNE 64 |
|---|-----------------------|---------------------------------------|--|--|
| | Virus d'ensemencement | | Virus d'ensemencement éliminé couche cellulaire lavée | Virus d'ensemencement éliminé couche cellulaire lavée |
| | non éliminé | éliminé couche cellulaire lavée | | |
| 10 ⁻¹ | ± | + | | |
| 10 ^{-1,5} | + ± | ++ | + | + ± |
| 10 ^{-2,2} | + | ++ ± | ++ | ++ |
| 10 ^{-2,8} | +++ ± | ++++ | +++ | +++ ± |
| 10 ^{-3,4} | ++++ ± | +++++ | ++++ ± | ++++ ± |
| 10 ⁻⁴ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ |
| 10 ^{-4,5} | +++ ± | +++ | +++ | +++ |
| 10 ^{-5,2} | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 10 ^{-5,8} | + | + | + | + ± |
| 10 ^{-6,4} | ± | + | ++ | + |

TABLEAU II

FIXATION DU COMPLÈMENT DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS 24 HEURES APRÈS ENSEMENCEMENT EN FONCTION DE LA DILUTION DE L'INOCULUM

++++ signifie fixation totale du complément
 +++ signifie fixation de 75 % du complément
 ++ signifie fixation de 50 % du complément
 + signifie fixation de 25 % du complément
 T traces de fixation du complément
 o pas de fixation du complément

VIRUS O SICILE 58

| DILUTIONS DU VIRUS DE DÉPART (log.) | VIRUS NON ÉLIMINÉ APRÈS 2 HEURES DE CONTACT | | | | | | |
|--|--|------|-----|-----|------|-----------------|-----|
| | Dilutions d'antigène | | | | | Témoin antigène | |
| | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | Pur | 1/2 |
| | | | | | | | |
| 10 ^{-1,8} | +++ | + | o | o | o | T | o |
| 10 ^{-2,2} | +++ | ± | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,8} | ++++ | ++ | T | o | o | o | o |
| 10 ^{-3,4} | ++++ | +++ | + | T | o | o | o |
| 10 ⁻⁴ | ++++ | +++ | ± | o | o | o | o |
| 10 ^{-4,8} | ++++ | ++ | ± | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,2} | +++± | ± | ± | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,8} | ± | o | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-6,4} | ± | o | o | o | o | o | o |
| | Virus éliminé après 2 heures de contact couche cellulaire lavée | | | | | | |
| 10 ⁻¹ + I ₁ | +++ | ± | o | o | o | T | o |
| 10 ^{-1,8} + I ₁ | +++ | ± | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,2} | +++± | ++ | T | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,8} | ++++ | +++± | ± | T | o | o | o |
| 10 ^{-3,4} | ++++ | +++ | T | o | o | o | o |
| 10 ⁻⁴ | ++++ | +++± | + | + | o | o | o |
| 10 ^{-4,8} | ++++ | ++± | ± | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,2} | +++± | ± | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,8} | +++± | + | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-6,4} | + | o | o | o | o | o | o |

TABLEAU III

FIXATION DU COMPLÈMENT DES LIQUIDES PRÉLEVÉS 24 HEURES APRÈS ENSEMENCEMENT EN FONCTION DE LA DILUTION DE L'INOCULUM
VIRUS O FLANDRES

| DILUTIONS DU VIRUS DE DÉPART (log.) | DILUTIONS D'ANTIGÈNE | | | | TÉMOINS ANTIGÈNE | |
|---|----------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|
| | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | Pur | 1/2 |
| 10 ^{-1,6} | T | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,2} | + | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,8} | +++ | ++ | o | o | o | o |
| 10 ^{-3,4} | ++++ | ++ | T | o | o | o |
| 10 ⁻⁴ | +++++ | +++ | + | o | o | o |
| 10 ^{-4,6} | +++++ | +++ | + | o | o | o |
| 10 ^{-5,2} | +++ | ++ | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,8} | +++ | ++ | o | o | o | o |

134

TABLEAU IV

FIXATION DU COMPLÈMENT DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS 24 HEURES APRÈS ENSEMENCEMENT EN FONCTION DE LA DILUTION DE L'INOCULUM
VIRUS O ESPAGNE 64

| DILUTIONS DE VIRUS DE DÉPART (log.) | DILUTIONS D'ANTIGÈNE | | | | TÉMOINS ANTIGÈNE | |
|---|----------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|
| | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | Pur | 1/2 |
| 10 ^{-1,6} | T | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,2} | ++ | T | o | o | o | o |
| 10 ^{-2,8} | +++ | ++ | o | o | o | o |
| 10 ^{-3,4} | ++++ | + | T | o | o | o |
| 10 ⁻⁴ | ++++ | T | T | o | o | o |
| 10 ^{-4,6} | +++ | + | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,2} | T | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-5,8} | T | o | o | o | o | o |
| 10 ^{-6,4} | + | o | o | o | o | o |

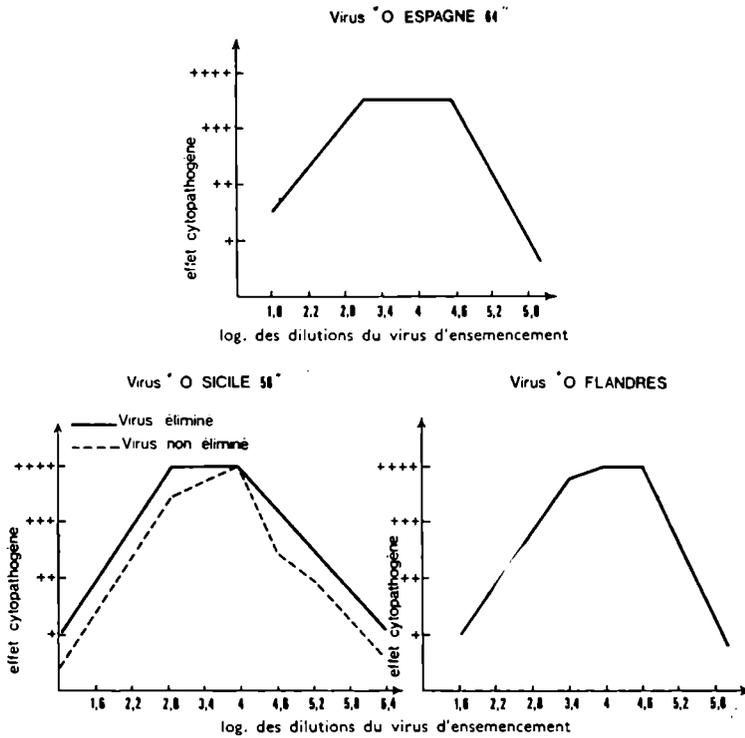


FIGURE I.

Effet cytopathogène, après 24 heures, en fonction de la dilution du virus d'ensemencement.

TABLEAU V

TITRES INFECTIEUX (D.E.C.P. 50/ml) DES ÉCHANTILLONS PRÉLEVÉS 24 HEURES APRÈS ENSEMENCEMENT, EN FONCTION DE LA DILUTION DE L'INOCULUM.

| DILUTIONS DU VIRUS D'ENSEMENCEMENT | D.E.C.P. 50/ml |
|------------------------------------|----------------|
| $10^{-1,0}$ | $10^{3,9}$ |
| $10^{-2,0}$ | 10^6 |
| $10^{-3,4}$ | $10^{6,7}$ |
| 10^{-4} | $10^{6,7}$ |
| $10^{-4,6}$ | $10^{6,9}$ |
| $10^{-5,2}$ | $10^{6,1}$ |
| $10^{-6,0}$ | $10^{5,8}$ |

— diluer le virus de départ, les dilutions optima étant situées entre $10^{-2,8}$ et $10^{-4,6}$, voire $10^{-5,2}$ suivant le virus employé;

— après 2 heures de contact, éliminer le virus de départ et laver la couche cellulaire I ou 2 fois dans un milieu sans sérum.

B. — Deuxième passage.

Le second passage du virus a été fait parallèlement sur cellules rénales de porc en couche monocellulaire et en suspension: les résultats ont été meilleurs avec ces dernières d'autant plus que le but était d'obtenir des virus concentrés pour la réaction de fixation du complément.

Pour adapter le virus à la culture en suspension, les cellules sont trypsinées avec le mélange trypsine-versène: puis elles sont mises en suspension homogène dans le milieu Earle contenant 2 p. 100 de sérum de veau, ou 2 p. 100 de sérum de poulain. Ensuite, ces cellules sont centrifugées pendant 10 à 15 minutes à raison de 900 à 1 000 tours par minute. Le surnageant est éliminé et les cellules mises en suspension dans le milieu Earle sans sérum, ni rouge de phénol, à raison de 2 millions de cellules par millilitre. On ajoute le virus du 1er passage sur cellules de reins de porc dans les proportions de 1/10 à 1/12 du volume total. Le flacon contenant la suspension de cellules, est porté au bain-marie à 37 °C sous agitation discontinuée. Après 20 à 22 heures, le virus peut être récolté et congelé à -20° ou -70°. Les résultats de ce 2e passage sont résumés dans le tableau VI.

2. ADAPTATION DU VIRUS 2e PASSAGE R.P. SUR CELLULES BHK 21

Les cellules en couche monocellulaire nous donnent des virus titrant entre $10^{7.2}$ et $10^{8.2}$ par millilitre, mais fixant le complément au maximum +++ à la dilution 1/4 et + à la dilution 1/8. Aussi avons-nous produit les virus sur les cellules BHK 21 en suspension selon la même méthode que la précédente: mais nous pouvons utiliser des suspensions de 2 à 4 millions de cellules par millilitre.

Les titres infectieux des antigènes obtenus sont compris entre $10^{8.0}$ et $10^{8.9}$. Les résultats obtenus après 2 à 3 passages sur BHK 21 en suspension sont reportés sur le tableau VII.

III. — DISCUSSION - CONCLUSION

Les essais décrits ici nous donnent les résultats fort satisfaisants.

La qualité antigénique élevée des virus obtenus nous permet de faire des réactions de fixation du complément croisées 100 p. 100 et 50 p. 100 d'hémolyse, pour étudier des variantes du virus type «O» (5).

Les titres infectieux DECP 50 et surtout les pouvoirs fixant le complément élevés que nous avons constatés avec les virus obtenus par cette méthode, nous paraissent dus:

1° à la quantité évidemment plus grande par unité de volume, des cellules rénales de porc et BHK 21 en suspension, par rapport aux cellules en couche monocellulaire:

2° à la méthode d'adaptation des virus bovins sur cellules rénales de porc qui consiste à inoculer avec la dilution du virus d'ensemencement provoquant l'effet cytopathogène le plus net et les virus les plus déviants:

3° à la stabilité du pH (de 7,4 à 7,5) obtenue en utilisant du milieu Earle sans sérum, ce qui maintient un équilibre favorable à la multiplication et à la conservation du virus aphteux.

TABIEAU VI

FIXATION DU COMPLÉMENT DU 2^e PASSAGE SUR RP DES 3 VIRUS

| VIRUS | DILUTIONS D'ANTIGÈNE | | | | | TÉMOINS ANTIGÈNE | |
|---------------------------------|----------------------|------|-------|-----|------|------------------|-----|
| | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | Pur | 1/2 |
| <i>O Sicile 58</i> | | | | | | | |
| Suspension | ++++ | ++++ | ++++ | + | o | T | o |
| Couche monocellulaire | +++ | ± | T | o | o | T | o |
| <i>O Espagne 64</i> | | | | | | | |
| Suspension | ++++ | ++++ | ++++± | + | o | o | o |
| Couche monocellulaire | ++++ | ++ | T | o | o | o | o |
| <i>O Flandres</i> | | | | | | | |
| Suspension | ++++ | +++ | ± | o | o | o | o |
| Couche monocellulaire | +++ | ++ | o | o | o | o | o |

TABIEAU VII

FIXATION DU COMPLÉMENT A 100 P. 100 D'HÉMOLYSE AVEC LES VIRUS OBTENUS PAR CULTURE SUR CELLULES BHK EN SUSPENSION (1^{er}, 2^e, 3^e passages)

| VIRUS | DILUTIONS D'ANTIGÈNE | | | | | | | TÉMOINS ANTIGÈNE | |
|---------------------------------------|----------------------|------|------|-------|------|-------|------|------------------|-----|
| | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | Pur | 1/2 |
| <i>O Sicile 58</i> | | | | | | | | | |
| 1 ^{er} passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | | | T | o |
| 2 ^e passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | T | o |
| <i>O Espagne 64</i> | | | | | | | | | |
| 1 ^{er} passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | T | T | o |
| 2 ^e passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++± | ± | o | o |
| 3 ^e passage BHK | +++± | +++± | ++++ | ++++ | ++++ | ++++± | T | o | o |
| <i>O Flandres</i> | | | | | | | | | |
| 1 ^{er} passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++± | ± | o | o | o | o |
| 2 ^e passage BHK | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | o | T | o |

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DULBECCO (R.) et VOGT (M.). — *J. Exp. Med.*, 1954, **99**, 167-82.
- (2) MOWAT (G. N.) et CHAPMAN (W. G.). — *Nature Lond.*, 1962, **194**, 253-255.
- (3) MACPHERSON (I. A.) et STOKER (M. G. P.) — *Virology*, 1962, **16**, 147.
- (4) AMIGHI (M.), HESSAMI (M.), MASTAN (M.) et CHAFYI (A.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1964, **61** (9-10), 935-949. XI^e Conférence de la Commission permanente de la Fièvre Aphteuse de l'O.I.E., Paris, 27-31 octobre 1964.
- (5) FONTAINE (J.), ROUMIANT ZEFF (M.), TERRE (J.), DUBOUCLARD (C.), GILBERT (H.), DHENNIN (L.) et MACKOWIAK (C.). — Etude immunologique et sérologique de types et variantes du virus aphteux. I. Etude comparative de 2 souches de virus aphteux de type O: virus "O Flandres" et virus "O Sicilia 58". *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1964, **61** (9-10), 1143-1156. XI^e Conférence de la Commission permanente de la Fièvre Aphteuse de l'O.I.E., Paris, 27-31 octobre 1964.
- (6) ROUMIANT ZEFF (M.), STELLMANN (C.) et DUBOUCLARD (C.). — Technique de fixation quantitative du complément appliquée à l'étude du virus de la Fièvre Aphteuse. *Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon*, 1965, **67** (3), 243-269.
- (7) PETERMANN (H. G.) — Une méthode d'adaptation rapide du virus de la fièvre aphteuse à la culture selon la méthode Frenkel. *Zbl. Bakt. I Orig.*, **153**, 1959, 63-66.