Exclu du Prêt

N° d'ordre
69

50.376
1966
18

50376
1966
18

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

(MENTION SCIENCES)

par Mlle Colette AERTS

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES INTERACTIONS VIRUS-LEUCOCYTES

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

ULTRASTRUCTURE DES VIRUS

Soutenues le 15 Juin 1966 devant la Commission d'examen

Président : M. E. VIVIER

Examinateurs : MM. M. DURCHON, E. SEGARD, Ch. GERNEZ-RIEUX

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires :

MM. PRUVOST, LEFEBVRE, PARREAU.

Professeurs Honoraires :

MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, GERMAIN, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY, KAMPE DE FERIET.

Doyen :

M.	TILLIEU	Professeur de Physique

Assesseurs :

MM.	DURCHON	Professeur de Zoologie
	HEUBEL	Professeur de Chimie Minérale

Professeurs :

MM.	BACCHUS	Astronomie Calcul Numérique
	BECART	Physique
	BERKER	Mécanique des Fluides
	BLOCH	Psychophysiologie
	BONNEMAN-BEMIA	Chimie et Physico-Chimie Industrielles
	BONTE	Géologie appliquée
	BOUGHON	Mathématiques
	BOUISSET	Physiologie animale
	BOURIQUET	Botanique
	CELET	Géologie

MM.	CORSIN	Paléobotanique
	DECUYPER	Mathématiques
	DEDEKER	Professeur associé de Mathématiques
	DEFRETIN	Biologie marine
	DEHORS	Physique Industrielle
	DELATTRE	Géologie
	DELEAU	Géologie
	DELHAYE	Chimie Minérale
	DESCOMBES	Calcul différentiel et intégral
	GABILLARD	Radioélectricité et Electronique
	GERMAIN	Chimie Générale et Chimie Organique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM de BALZAC	Zoologie
	HOCQUETTE	Botanique générale et Appliquée
	LEBEGUE	Botanique
Mme	LEBEGUE	Physique
	LEBRUN	Radioélectricité et Electronique
Melle	LENOBLE	Physique
MM.	LIEBART	Radioélectricité
	LINDER	Botanique
	LUCQUIN	Chimie Minérale
	MARION	Chimie
Melle	MARQUET	Mathématiques
MM.	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
	MAUREL	Chimie
	MENESSIER	Géologie
	MONTREUIL	Chimie Biologie
	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique Expérimentale
	PHAM MAU QUAN	Mécanique rationnelle et expérimentale
	POUZET	Calcul Numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie Générale
	SCHALLER	Zoologie
	SCHILTZ	Physique
Mme	SCHWARTZ	Analyse supérieure
	TRIDOT	Chimie
	VIVIER	Biologie animale
	WATERLOT	Géologie et Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

Maitres de Conférences

MM.	BEAUFILS	Chimie Appliquée
	BLANCHARD	Chimie Générale
	BOILLET	Physique

MM.BUI TRONG LIEU	Mathématiques
CHASTRETTE	Chimie Générale
COMBET	Mathématiques
CONSTANT	Physique
DERCOURY	Géologie et Minéralogie
DEVRAINNE	Chimie Minérale
MmeDRAN	Chimie Appliquée
FOATA	Mathématiques
FOURET	Physique
GAVORET	Physique
HERZ	Mathématiques
HUARD de la MARRE	Calcul Numérique
LACOMBE	Mathématiques
MAES	Physique
MONTARIOL	Chimie
MORIAMEZ	Physique
MOUVIER	Chimie
NGUYEN PHONG CHAU	Physique
PANET	Electromécanique
RAUZY	Mathématiques
SAADA	Physique
SEGARD	Chimie Biologique
TUDO	Chimie Minérale Appliquée
VAZART	Botanique
VAILLANT	Mathématiques
VIDAL	Physique Industrielle

Secrétaire Général, Attaché Principal : M. LEGROS

Attachés d'Administration : MM. COLLIGNON
FACON
JANS
LEROY

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES INTERACTIONS

VIRUS - LEUCOCYTES

Travail effectué à l'Institut Pasteur
de LILLE

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Ch. GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille qui m'a ouvert la porte de ses Laboratoires et n'a cessé de me prodiguer ses encouragements bienveillants. Je lui dois la réalisation de cette Thèse.

Ce travail a été inspiré et dirigé par Monsieur le Professeur C. VOISIN qui m'a guidée constamment au cours de ces dernières années. Son enthousiasme pour la Recherche et sa bonté m'ont été très précieux. Je tiens à le remercier vivement.

Ma gratitude s'adresse à Monsieur le Professeur J. MONTREUIL pour m'avoir conseillée dans l'élaboration de cette Thèse.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur M. DURCHON, à Monsieur le Professeur E. VIVIER, et à Monsieur le Professeur E. SEGARD pour la bienveillance qu'ils m'ont témoignée en acceptant de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur J. GUILLAUME, Monsieur le Professeur J. SAMAILLE, Monsieur le Professeur E. VIVIER pour l'aide précieuse reçue dans leur Laboratoire et les conseils qu'ils m'ont donnés.

Ma gratitude s'adresse également à tous ceux et celles qui m'ont aidée amicalement durant ces années, Monsieur le Professeur G. MARTIN, Monsieur le Docteur J. LEBLOIS, Monsieur le Docteur F. WATTEL, Madame MACKE-VAN MOORLEGHEM, Monsieur A. PETIT-PREZ.

Et tous mes Collaborateurs et Amis.

P L A N

Pages

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE :

EXPOSE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES INTERACTIONS VIRUS-LEUCOCYTES -

I. ARGUMENTS TEMOIGNANT D'INTERACTIONS VIRUS-LEUCOCYTES. 1

A - Faits d'observations en pathologie humaine ou vétérinaire au cours d'infections virales spontanées ou expérimentales 1

a) arguments indirects témoignant d'interactions virus-leucocytes 1

- modification de la formule sanguine 1
- éléments cellulaires anormaux 3
- présence d'inclusions 6

b) arguments directs démontrant l'existence d'interactions leucocytes-virus : mise en évidence du virus dans les leucocytes 7

- observations en immuno-fluorescence 8

- observations en microscopie électronique 11

- pouvoir infectieux des leucocytes 12
  isolement sur animaux 12
  isolement sur oeufs 13
  isolement en culture de tissus 14
  isolement sur l'homme 16

B - Expérimentation in vitro

a) Arguments indirects en faveur de la pénétration du virus dans les leucocytes 16

- difficulté d'élution 16

- inclusions intraleucocytaires 17

b) Arguments directs de la phagocytose in vitro du virus par les leucocytes 17

- observations en immuno-fluorescence 17

- observations en microscopie électronique 19

- pouvoir infectieux des leucocytes 21

II. DEVENIR DES VIRUS APRES PHAGOCYTOSE PAR LES LEUCOCYTES.

A - Expériences in vivo 22

B - Expériences in vitro 24

a) Expériences démontrant la multiplication virale dans les leucocytes 24

b) Expériences où la multiplication virale dans les leucocytes n'est pas mise en évidence 28

III. ETUDE DES PERTURBATIONS PHYSIOLOGIQUES ET METABOLIQUES DES LEUCOCYTES APRES PHAGOCYTOSE DES VIRUS 29

A. Modification de l'aptitude phagocytaire des leucocytes infectés en présence des bactéries 30

B. Modifications du métabolisme cellulaire 32

IV. HYPOTHESES EMISES SUR LE ROLE DES LEUCOCYTES DANS LA DEFENSE DE L'ORGANISME CONTRE L'INFECTION VIRALE 34

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES

ETUDE DE L'ACTION CYTOTOXIQUE DES PARTICULES VIRALES A L'EXCLUSION DE LEUR ACTION INFECTIEUSE -

I. ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE IN VIVO : OBSERVATIONS DES LEUCOCYTES DE L'EXSUDAT PROVOQUE CHEZ LE COBAYE PAR INJECTION INTRA-PERITONEALE DE DIFFERENTS VIRUS 41

Origine des exsudats inflammatoires 41

MATERIEL ET METHODE

A - TECHNIQUE GENERALE

a) Inoculation intrapéritonéale 41
b) Examen microcinématographique 42
c) Aptitude phagocytaire 43
d) Index de cytophagie 44
e) Isolement du virus 44

B - VIRUS UTILISES 44

C - REPARTITION DES ANIMAUX DANS LES DIFFERENTES EXPERIENCES 47

RESULTATS

A - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE LIQUIDE ALLANTOIQUE OU LE LIQUIDE DE HANKS 53

a) Caractéristiques de l'exsudat 53
b) Morphologie et cinétique 54

B - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR LES MYXOVIRUS INFLUENZAE 56

MYXOVIRUS INFLUENZAE A PR8, AI FM, B Lee 56

a) Caractéristique de l'exsudat 56
b) Morphologie et cinétique des leucocytes en microcinématographie 58

MYXOVIRUS INFLUENZAE INACTIVE PAR CHAUFFAGE A 56° 62

MYXOVIRUS INFLUENZAE CHEZ LES ANIMAUX IMMUNISES 62

C. COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR L'ADENOVIRUS TYPE V 63

1) Etude des leucocytes de l'exsudat 63

ADENOVIRUS V

a) Caractéristique de l'exsudat 63

b) Morphologie et cinétique des leucocytes en microcinématographie 64

ADENOVIRUS V CHAUFFE 1/2 H à 56° 70

ADENOVIRUS V CHAUFFE 5' à 100° 70

2) Etude de l'aptitude phagocytaire vis à vis des particules de quartz, des leucocytes, de l'exsudat obtenu par injection d'Adénovirus type V 70

D. COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE MYXOVIRUS PARA INFLUENZAE III 72

a) Caractéristiques morphologiques et cinétiques de l'exsudat péritonéal 72

b) Etude de l'aptitude phagocytaire vis à vis des particules de quartz, des leucocytes, de l'exsudat obtenu par injection de Myxovirus Para-influenzae III 75

E. COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE VIRUS VACCINAL 77

a) Caractéristique de l'exsudat 77

b) Morphologie et cinétique des leucocytes en microcinématographie 77

DISCUSSION 79

II - ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE IN VITRO DU MYXOVIRUS INFLUENZAE B LEE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES DE COBAYE 89

MATERIEL ET METHODE

VIRUS 89

MACROPHAGES ALVEOLAIRES 90

a) obtention des cellules 90
b) méthode d'étude en microcinématographie 90
c) méthode d'étude en microscope électronique 92
d) méthode d'étude en appareil de Warburg 92

RESULTATS

A) MORPHOLOGIE ET CINETIQUE DU MACROPHAGE ALVEOLAIRE STRUCTURE DU VIRUS GRIPPAL B LEE 95
- Macrophage alvéolaire 95
- Structure du virus grippal B Lee 96

B) ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE 101

- des particules virales 101
- des particules virales chauffées préalablement une 1/2H à 56° 101
- des particules virales chez les animaux vaccinés 102

C) CONSEQUENCES DE LA PHAGOCYTOSE DU VIRUS 107

1) Sur le comportement cinétique des macrophages alvéolaires 107

a) macrophages en contact in vitro avec le virus grippal 107

b) macrophages en contact in vitro avec le virus grippal chauffé 1/2 H à 56° 107

c) macrophages alvéolaires de cobayes vaccinés en contact in vitro avec le virus grippal 110

2) Sur les infrastructures cellulaires 110

3) Sur le métabolisme cellulaire 111

a) influence du virus grippal sur la consommation d'oxygène du macrophage alvéolaire 111

b) étude de la dégradation du glucose par le macrophage lors de la phagocytose du virus grippal 115

4) Etude d'une multiplication virale éventuelle 117

DISCUSSION 119

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

Il y a un siècle, les agents responsables des maladies infectieuses n'étaient pas encore découverts. La première culture pure d'un germe pathogène, le bacille charbonneux date de 1877 ; elle est due aux travaux de Pasteur et Joubert. Depuis, grâce aux perfectionnements des techniques de microscopie et de biochimie, nous connaissons non seulement la morphologie de ces différents agents, mais encore leur structure interne et leur composition chimique.

C'est ainsi que nous savons que certaines particules infectieuses se différenciant complètement des bactéries par leur très petite taille, leur parasitisme cellulaire obligatoire, leur structure, leur composition chimique, sont responsables de différents désordres organiques : nous les appelons "virus". Les premières cultures de virus datent de 1933. Ils ne sont visibles que depuis quelques années grâce au Microscope Electronique. Ces virus comprennent une partie centrale infectieuse faite soit d'acide ribonucléique, soit d'acide desoxyribonucléique, et d'une partie périphérique de nature protidique possédant une symétrie déterminée.

Actuellement, les connaissances en immunité bactérienne sont déjà bien avancées : on sait que parallélement à l'immunité humorale, il existe une immunité cellulaire, ayant entre elles des rapports étroits. A une attaque bactérienne, certaines cellules répondent en fabriquant des anticorps que l'on retrouve dans les humeurs ; il existe également dans l'organisme des cellules ayant le pouvoir d'englober les particules étrangères : on les appelle des phagocytes. Ces phagocytes comprennent les leucocytes du sang circulant et les macrophages. Ceux-ci peuvent se trouver à l'état libre dans les exsudats ou fixés dans les tissus constituant le système réticulo-endothélial. Les microbes phagocytés subissent des modifications plus ou moins poussées et rapides selon la nature des germes et les espèces animales envisagées. De plus, de nombreuses infections déterminent une irritation fonctionnelle des organes hématopoïetiques ayant pour conséquence l'élévation du nombre des globules blancs.

Peut-on assimiler "immunité bactérienne" à l'"immunité virale" ?

J. Bordet, en 1938, dans son Traité de l'immunité (1) dans les maladies infectieuses assimile l'une et l'autre :

- "l'observation des phénomènes", dit-il, qui président à la guérison des maladies à virus filtrants est difficile, mais les renseignements dont on dispose suffisent à démontrer que dans le cas des virus invisibles, les facteurs d'immunité sont identiques à ceux qui assurent la défense contre les bactéries" - .

L'approfondissement des connaissances dans le domaine viral, rend les immunologistes beaucoup moins catégoriques dans leurs affirmations. Raffel, en 1960, dans son Traité d'immunologie (2) reconnait le rôle très important des anticorps dans la défense de l'organisme contre les infections virales mais, certains faits, entre autres la guérison obtenue chez des sujets faisant une hypogammaglobinurie, montre que seuls, les anticorps n'y suffisent pas ; les leucocytes ont sans doute un rôle important, dit-il, mais qui reste très obscur.

Malgré leur caractère fragmentaire, les recherches effectuées depuis le début de ce siècle, ont établi la réalité de la participation des organes hématopoïétiques, des leucocytes circulants et des cellules du système réticulo-endothélial aux processus infectieux viraux : la leucopénie passagère, l'apparition d'éléments cellulaires morphologiquement anormaux, constatées au cours de nombreuses viroses humaines ou animales, la possibilité d'isoler l'agent pathogène des leucocytes sanguins et des macrophages de différents organes, suffisent à le démontrer. Mais de nombreuses inconnues persistent, à peine abordées au cours de ces dernières années : les conséquences sur le comportement leucocytaire de la présence intracytoplasmique des virus, le rôle respectif des polynucléaires, des lymphocytes et des monocytes dans le transport des particules infectieuses et dans la défense de l'organisme , l'intervention du système

réticulo-endothélial dans la sensibilité ou la résistance de l'organisme aux virus demeurent mal élucidés.

Nous ne prétendons pas, dans ce travail, apporter une solution à ces différentes questions fondamentales. Notre but, plus modeste, est double :

- dans la première partie de notre Thèse, nous nous proposerons de rassembler les documents actuellement publiés sur les intéractions virus-leucocytes et de dégager les grandes orientations des travaux actuels.

- dans la seconde partie, nous rapporterons les résultats de recherches personnelles : certaines constatations nous ont incité à étudier l'action cytotoxique des particules virales à l'exclusion de leur action infectieuse. Pour cela :

dans un premier temps, nous avons appliqué surtout la microcinématographie en contraste de phase, à l'observation des conséquences de la phagocytose de virus d'espèces différentes chez le cobaye en étudiant l'exsudat péritonéal de cet animal après phagocytose in vivo des différents virus.

Puis, nous avons approfondi la question en étudiant, in vitro, les intéractions myxovirus influenzae - macrophages alvéolaires de cobaye en microcinématographie, en microscopie électronique, et en appareil de Warburg.

PREMIERE PARTIE

EXPOSE DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LES INTERACTIONS VIRUS-LEUCOCYTES

Pour plus de clarté dans l'exposé des faits complexes que nous allons passer en revue, nous avons classé, sous diverses rubriques, les connaissances actuelles sur les interactions virus-leucocytes.

I - ARGUMENTS TEMOIGNANT D'INTERACTIONS VIRUS-LEUCOCYTES.

A - Faits d'observations en pathologie humaine ou vétérinaire au cours d'infections virales spontanées ou expérimentales.

a) Arguments indirects témoignant d'interactions virus-leucocytes.

Au cours de nombreuses infections virales humaines, on observe des modifications du nombre de leucocytes et de la formule leucocytaire accompagnées de modifications cytologiques : éléments cellulaires anormaux, présence d'inclusions.

- Modifications du nombre des leucocytes. Le chiffre moyen normal des globules blancs dans le sang périphérique est d'environ 8.000 par mm^3.

Les formules leucocytaires ont été étudiées au cours des infections virales par de nombreux hématologues dont nous ne pouvons citer ici tous les noms. Ils sont loin d'être d'accord sur les résultats. Nous passerons en revue les maladies virales les plus courantes.

La question de l'augmentation ou de la diminution des globules blancs chez les rougeoleux a été l'objet de contradictions assez grandes. Pour les uns, il y a leucocytose marquée ou légère, pour les autres cette hyperleucocytose n'existe que pendant la période d'incubation, elle est suivie d'une leucopénie en période d'état. J. RIEUX dans sont traité d'hématologie (3) pense, que si l'hyperleucocytose s'observe en période d'état ou de desquamation, c'est, selon toute vraisemblance, à cause de la concomitance d'infections secondaires qui se rencontrent d'une façon coutumière dans cette maladie.

Chez les sujets atteints de Rubéole, au lendemain de la généralisation de l'éruption rubéolique, les hématologistes relèvent un chiffre leucocytaire variant entre 2.000 et 4.000 leucocytes par mm^3. Aux environs du 8ème jour, le nombre des leucocytes est à peu près redevenu normal.

Chez les varioleux, on note une hyperleucocytose avec élévation du nombre des mononucléaires et des éosinophiles ainsi que la présence de myélocytes et de globules rouges nucléés. Cette formule est caractéristique de la variole mais peut se rencontrer, à un degré moindre, dans la varicelle et la vaccine.

Chez les malades atteints de grippe, en période d'épidémie, on observe au début de la maladie une leucocytose polynucléaire avec lymphopénie.(FRENTZEL-BEYME A.(4), CURLETTO R.et ses collaborateurs (5), JEANNERET C. et FARAHMAND F. (6)) .

Une lymphocytose s'observe au cours des oreillons.

Au cours de la pneumonie à virus chez l'enfant, JAKOVLSEV D.M. (7) constate une hyperleucocytose initiale modérée.

BOGDANOW I. L., ALEKSEEVA N. V. (8) étudient la formule leucocytaire de 404 malades atteints de poliomyélite. Ils trouvent une leucopénie modérée ou une monocytose ; mais, dans le cas de complications bactériennes, ils observent une leucocytose modérée ; par contre si le sujet atteint de poliomyélite a subi préalablement une autre infection virale, la leucopénie est accentuée.

- Eléments cellulaires anormaux. Les hématologistes observent dans le sang périphérique de malades atteints de diverses infections virales des leucocytes anormaux. Ils en font la description générale suivante : cellules de grande taille, à noyau excentrique avec une structure chromatinienne particulière ; la chromatine étant en réseau irrégulier ou en mottes à position excentrique. Leur protoplasme est hyperbasophile avec une zone pâle juxtanucléaire. Ce type cellulaire correspondrait à des éléments jeunes de transition de la lignée plasmocytaire.

Ces cellules ont reçu diverses appellations : SCHIER R.(9) les nomme "cellules mononucléées atypiques hyperbasophiles", LITWINS J. et LEIBOWITZ S. (10) les désignent sous le nom de "virocytes". Ce dernier terme a été vivement critiqué entre autre par J. BERNARD (11). En effet pour donner le nom de virocytes à ces cellules, il faudrait les rencontrer dans toutes les infections virales et uniquement au cours de ces infections.

Les formes anormales se rencontrent-elles dans toutes les maladies virales ? D'après BENAZET F., SCHIER R., FELIX M.(12) (1956) si les virocytes n'ont pas été observés dans toutes les infections virales, ils sont très fréquents au cours des viroses s'accompagnant d'une atteinte réticulo-endothéliale ou lymphoïde : rubéole, rougeole, hépatite à virus. On les rencontre plus rarement au cours de la varicelle, du zona, de l'herpès, des pneumopathies virales. En 1932, BENJAMIN B. et WARD S.M. (13) signalaient dans la rougeole des formes anormales de lymphocytes ressemblant à celles décrites par DOWNEY H.(14) dans la mononucléose infectieuse. Toutefois JOKOVLSEV D.M. (15) constate la présence de lymphocytes et monocytes atypiques dès le début de la pneumonie à virus chez l'enfant. Ils disparaissent après la guérison.

CURLETTO R. et ses collaborateurs (16) ont étudié la formule leucocytaire de 30 patients atteints de grippe pendant l'épidémie de 1957. Ils constatent un polymorphisme lymphocytaire allant jusqu'à

6 classes de lymphocytes. C'est la fréquence de ces formes anormales rencontrées au cours des maladies virales, qui a déterminé LITWINS J. et LEIBOWITZ S. (17) à les appeler "virocytes" bien que leur proportion par rapport aux autres leucocytes soit peu élevée, inférieure à 10%.

Mais des cellules étrangement semblables se rencontrent en dehors des infections virales. Dès 1907, TURCKW. (18) avait décrit de telles cellules chez un malade atteint d'angine associée à des symptômes septicémiques.

DOWNEY H. et ses collaborateurs (19) désignent sous le nom de leucocytoïdes des cellules semblables qui apparaissent dans le sang et que d'autres ont trouvées au cours d'infections et de parasitoses très diverses : rickettsiose, fièvre de Malte, toxoplasmose acquise, et surtout au cours de divers états allergiques. BENAZET F. (20) sur 8769 examens de sang a retrouvé 121 fois ces cellules.

112 fois dans les affections virales,
5 fois dans les maladies bactériennes,
4 fois au cours du paludisme.

Enfin, elles existent à l'état normal, dans les tissus lymphoïdes, au taux de 1 à 2 pour 1000 cellules. J. BERNARD (21) se basant sur le fait que ces cellules sont inconstantes au cours des viroses et présentes au cours de maladies incontestablement non

virales, appelle ces "virocytes" des "usurpateurs" et leur préfère le nom d' "immunocytes".

Les variations de la formule leucocytaire et l'apparition de formes anormales dans le sang, semblent à eux seuls des facteurs trop inconstants et trop généraux pour permettre de diagnostiquer une infection virale.

- Présence d'inclusions. Certains chercheurs, grâce au perfectionnement des techniques décrivent des inclusions intraleucocytaires au cours de quelques infections virales.

De simples colorations histologiques montrent des inclusions dans les leucocytes présents dans l'oeil de lapin infecté par scarification avec le virus vaccinal (MERLING, K., 1945 .(22)).

La coloration de Wright met en évidence au cours de certaines maladies virales : mononucléose infectieuse, herpès, poliomyélite et au cours de maladies dont les symptômes ne permettent pas un diagnostic absolu des granulations dans les lymphocytes. Ces granulations sont de teinte bleue durant la phase aigüe de la maladie, elles deviennent rouge au cours de la convalescence. Elles ne sont pas mises en évidence dans d'autres maladies. Ce qui est en faveur de leur association avec une condition spécifique (ISAAC S.R., 1953 (23)).

Des inclusions fluorescentes sont observées dans les polynucléaires neutrophiles du sang circulant de chiens atteints de la

maladie de Carré. Elles sont analogues aux inclusions obtenues par la coloration de schorr dans les neutrophiles du sang de chiens atteints de cette maladie (CELLO R., MOULTON J., Mac FARLAND S., 1958 (24)).

La coloration fluorescente à l'acridine-orange révèle dans l'épithélium trachéal et bronchique, dans les cellules alvéolaires du poumon, dans les leucocytes au cours d'infections grippales provoquées expérimentalement des inclusions de la couleur caractéristique de l'ARN. Par contre un traitement préalable avec la ribonucléose montre la disparition graduelle des inclusions. Elles seraient donc d'origine grippale (virus à ARN) (MAXIMOUICH N.A., PETROVSKA C.G., 1962) (25)).

Le Microscope Electronique met en évidence des inclusions dans les leucocytes de malades atteints de mononucléose infectieuse. Ces inclusions ne sont pas décelées dans les leucocytes de sujets sains (PAEGLE R., 1961 (26)).

Si l'origine des inclusions est reconnue virale, et, en ce sens est une preuve indirecte d'une interaction virus-leucocytes, l'identification de ces particules avec le virus reste discutable.

b) Les arguments directs démontrant l'existence d'intéractions leucocytes-virus : mise en évidence du virus dans les leucocytes.

Depuis plusieurs années des moyens d'observation directe tels que l'immunofluorescence et la Microscopie Electronique permettent de mettre en évidence la présence du virus dans les leucocytes

et complètent les techniques plus courantes d'isolement du virus à partir de ces cellules sur animaux, sur oeufs ou en culture de tissus.

- Observations en IMMUNOFLUORESCENCE.

La technique d'immunofluorescence a été décrite par COONS A.H. et KAPLAN M.H. en 1950 (27). Elle permet par coloration des anticorps avec une substance fluorescente de détecter les complexes anticorps-virus dans les frottis et les tissus. C'est par cette technique quelquefois modifiée que l'on a pu mettre en évidence la présence du virus dans les leucocytes d'animaux infectés. Le virus grippal A, souche PR_8 a été décelé dans les cellules mononucléées présentes dans les déjections nasales du furet infecté par ce virus. Ces macrophages montrent à l'intérieur une fluorescence jaune-verte à la fois dans le cytoplasme et le noyau alors qu'aucune fluorescence n'est observée dans les tissus non infectés, traités de la même manière, ni dans les tissus infectés, traités avec un sérum homologue non marqué (LIU C. 1957 (28)).

De même HERS J.F. Ph. en 1963 (29) a étudié en immunofluorescence, en vue d'une méthode de diagnostic rapide, les déjections du tractus respiratoire des malades atteints de grippe, de pneumonie primaire atypique et d'ornithose : il trouve une fluorescence dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire et également dans des cellules rondes indifférenciées probablement, dit-il, des macrophages alvéolaires.

Ces expériences sont recoupées avec d'autres tests : isolement du virus, tests sérologiques. Les résultats obtenus montrent la valeur de cette méthode.

Le virus grippal A, PR_8 a été révélé sur les leucocytes de l'exsudat péritonéal de souris normales et immunisées, provoqué par ce virus purifié. Les auteurs observent sur les leucocytes, normalement présents dans la cavité péritonéale de la souris, un halo de fluorescence qui est interprété comme la preuve de l'adsorption virale. Les lymphocytes sont agglutinés. Au bout d'une heure d'infiltration leucocytaire, des neutrophiles apparaissent. Le virus libre est adsorbé sur ces cellules et les agglutine. La phagocytose apparaît au bout de 16 heures mais le virus est présent dans la cavité péritonéale pendant 28 heures. Chez la souris immunisée, la phagocytose du virus apparaît 8 heures après l'injection de ce virus. Celui-ci est présent dans la cavité péritonéale pendant 12 heures (HANSON R.J., KEMPF J.E. et BOAND A.V., 1957 (30)).

Le virus de la maladie de Carré se rencontre dans les monocytes du sang périphérique de la souris inoculée par voie nasale, le 3ème et le 4ème jour de la maladie. Ce stade virémique précède de peu la mort de l'animal (LIU C. et COFFIN D.L., 1957, (31)).

De même, le virus poliomyélitique type III est décelé par cette technique dans les leucocytes du sang périphérique de singes à qui on a inoculé le virus par voie intracérébrale . Le sang est

recueilli de 5 à 20 jours après le début de la paralysie. La fluorescence n'existe qu'en utilisant l'antisérum homologue. Les préparations témoins faites avec des leucocytes de singes normaux ou de singes infectés mis en présence de l'antisérum poliomyélitique type I et type II ne montrent aucune fluorescence ; Preuve de plus à l'appui : le virus est isolé de ce même lot de leucocytes sur culture de rein de singe (KOVACS E., BARATAWIDJAJA R.K., WALMSLEY-NEWSON A. et LABZOFFSKY N.A., 1963 (32)).

MINS C.A. (33), dans un récent article (Mars 1964) faisant suite à des travaux antérieurs (1959-1960), souligne l'importance des macrophages dans les infections virales. Ceux-ci se trouvent disséminés un peu partout dans l'organisme. Ils bordent le foie, la rate, les sinus, les capillaires, les cavités pleurales et péritonéales, le tractus respiratoire, Les particules virales tendent à être captées par les macrophages comme le sont les autres particules étrangères. Du résultat de cette rencontre, dit-il, dépend la course à l'infection. En employant la technique des anticorps fluorescents, il montre en particulier, que le virus inoculé par voie intraveineuse est retiré de la circulation sanguine par les macrophages du système réticulo-endothélial en particulier ceux du foie

BRUNNER K.T. et son équipe (34) ont montré en 1960 que le virus de la stomatite vésiculaire et le virus Newcastle marqués avec P 32 et purifiés, inoculés par voie intraveineuse à des souris sont

enlevés de la circulation sanguine par les cellules réticulo-endothéliales du foie.

- Observations en Microscopie Electronique.

Il ne semble pas qu'il y ait jusqu'à présent beaucoup d'observations rapportées en microscopie électronique de virus à l'intérieur de leucocytes, résultant d'une phagocytose in-vivo.

En 1963 et 1964 NELSON E., HAGER H., KOVACS E. (35) observent des particules virales dans le cytoplasme des polynuclaires de souris encéphalitiques inoculées avec le virus poliomyélitique souche Columbia SK. Les particules virales sont associées aux granulations osmiophiles, elles sont bien circonscrites et quelquefois entourées d'une membrane. Beaucoup de ces leucocytes montrent des altérations ultrastructurales telles que formation de pseudopodes, de vacuoles intracytoplasmiques, accumulations lipidiques. Les leucocytes dégénérés ou pycnotiques montrent une perte des membranes nucléaires avec soit une concentration centrale soit une diminution générale des granulations caractéristiques.

Le virus de la mosaïque du tabac radioactif injecté par voie intraveineuse à la souris se retrouve dans les cellules de Kupffer (cellules réticulo-endothéliales de foie). Ceci a été confirmé par la Microscopie Electronique (ERICKSON J.O., HENSLEY T.J., FIELDS M. et LIBRY R.L. 1957 (36)).

- Pouvoir infectieux des leucocytes.

FENNER F. en 1948 (37) d'après les résultats d'une vaste expérience chez la souris infectée avec le virus ectromélia montre le rôle des macrophages et en particulier de ceux du foie et de la rate dans le déroulement de l'infection. Sa méthode consiste à titrer des suspensions d'organes et de tissus à différents temps après l'infection.

- Isolement sur animaux.

Un certain nombre d'isolements de virus ont été faits à partir de sang total, décelant ainsi la période virémique de la maladie. Les auteurs constatent peu à peu que seuls,dans le sang les leucocytes sont virulents. En 1902 NICOLLE F. et ADIL-BEY (38) avaient déjà émis l'hypothèse du siège intraleucocytaire du virus de la peste bovine. Cette hypothèse s'appuyait d'une part, sur l'expérience de KOLLE W. qui, en 1899, centrifugeant du sang défibriné d'un animal atteint de peste bovine avait constaté que le sérum demeurait inoffensif tandis que le culot tuait les animaux, d'autre part, sur la constatation du fait qu'il n'y a jamais de lésions au point d'inoculation, et que les humeurs pauvres en éléments figurés (comme le liquide céphalo-rachidien ou la sérosité oculaire) se montrent moins riches en virus que les humeurs où abondent les cellules du sang.

Le virus poliomyélitique a été isolé, dès 1910, du sang de singes infectés expérimentalement (FLEXNER S. et LEVIS P.A.(39)), et en 1947, du sang total humain par inoculation à la souris (KOPROVSKI H. et son équipe (40)).

Si l'on centrifuge le sang total d'une volaille atteinte de peste aviaire, le virus fowl-plague se cantonne surtout dans la couenne leucocytaire qui se montre 10 fois plus virulente que le plasma ou les globules rouges lavés (TODD C., 1928 (41)).

De même le pouvoir infectieux de leucocytes d'animaux infectés avec le virus vaccinal a souvent été démontré (SMITH, W., 1929 (42)), (DOUGLAS S.R. et SMITH W., 1930 (43)) (LONG P.H. et OLITSKY P.K., 1930 (44)), (SABIN A.B., 1935 (45)).

Le comportement du virus vaccinal a été étudié chez le primo-vacciné (GILDEMEISTER E. et HILGERS P., 1930 (46)). Il est décelé 6 fois sur 15 dans le sang entre le 3ème et le 9ème jour, par inoculation intratesticulaire. Des recherches plus approfondies ont montré que le virus vaccinal se fixe surtout sur les leucocytes.

La faible quantité trouvée dans le plasma correspondrait aux virus échappés aux phagocytes (GILDEMEISTER E. et HILGERS P., 1930 (47)).

De même le virus myxomateux est isolé de la couenne leucocytaire du sang de lapin inoculé 5 jours plus tôt avec ce virus. (FENNER F. et WOODROFE G.M., 1953 (48)).

- Isolement sur oeuf.

Les essais d'isolements du virus grippal dans le sang soit des animaux infectés expérimentalement, soit au cours de différentes épidémies n'ont pas toujours donné des résultats concluants.

Dans l'expérience de HERZBERG K. et ses collaborateurs en 1960 (49), le virus grippal est isolé dans 17 % des cas du sang de souris 24 heures à 96 heures après inoculation par voie nasale des souches A/2/Asian ou A/PR_8.

Ces mêmes auteurs n'ont pas réussi, au cours de l'épidémie de grippe A 2 en 1960, à mettre en évidence le virus dans le sang prélevé 24 heures après le début de la fièvre alors que ce virus était décelé dans le liquide de lavage de gorge. Les tentatives d'isolement de ce virus, à partir du sang, faites par MINUSE E. (50) au cours d'épidémies en 1960, n'ont également donné aucun résultat. Ceci est en faveur de la conception suivante : Dans les grippes sans complications, l'infection grippale se propage dans l'épithélium des voies respiratoires et non par voie sanguine.

D'après LIPPELT H. et MULLER F. (51) en 1954 l'échec de l'isolement du virus dans le sang circulant au cours de certaines maladies virales, entre autres les oreillons, est dû à une insuffisance technique. Ils soulignent l'importance d'un détail confirmée par l'isolement du virus grippal sur oeuf : il est nécessaire de réfrigérer le sang à - 70°, immédiatement après le prélèvement.

- Isolement sur culture de tissus.

L'isolement sur culture de tissus a d'abord été tenté à partir du sang total : quelques virus isolés du sang humain : le virus

de la rougeole (ENDERS J.F. et PEEBLES T.C. 1954, (52)), le virus ECHO 9 (YOSHICKA I.W. HORSTMANN D.M., 1960,(53)) le virus poliomyélitique (pour la première fois en 1946 chez une fillette de 9 ans au début de la maladie lors de la rhino-pharyngite (WARD R., HORSTMANN D.M. MELNICK J.L., 1946 (54)).

Une vaste expérimentation est entreprise en 1954 par HORSTMANN D.M. (55) à partir des prélèvements rectaux, pharyngés et sanguins de personnes en contact avec des cas graves de poliomyélite. Le type poliomyélitique I est isolé du sang de 6 individus sur 33 dont les prélèvements pharyngés et rectaux sont positifs. Dans les échantillons de sang, le virus est présent à la fois et au même titre dans le plasma et dans le mélange leucocytes-hématies partiellement hémolysées contenant un peu de plasma tandis qu'aucun virus n'est associé aux hématies lavées. L'expérience n'a pas été tentée avec les leucocytes lavés. Les auteurs attribuent la difficulté d'isolement du virus au fait que la virémie chez les humains est suivie d'une réponse prompte d'anticorps.

- l'isolement des virus est effectué maintenant à partir des <u>leucocytes seuls lavés</u>.

Le virus poliomyélitique est isolé des leucocytes sanguins 6 fois / 6 chez des sujets atteints de paralysie infantile entre le 5ème et le 20ème jour après le début de la paralysie, sur culture de rein de singe de 5 jours (KOEHLER H., 1960 (56)).

Parallèlement aux expériences d'immunofluorescence citées plus haut KOVACS E. (57) et son équipe ont isolé le virus poliomyélitique type III sur rein de singe à partir des leucocytes du sang périphérique 5 à 20 jours après le début de la paralysie chez des singes inoculés par voie intracérébrale (1963). Mais KOEHLER H. et SPRINGER D. en 1962 (58) signalent plus particulièrement l'isolement du virus poliomyélitique à partir des lymphocytes du sang périphérique de singes infectés. Ils isolent en même temps le virus Simien

L'isolement du virus de la rougeole des leucocytes de malades n'est possible que si le prélèvement de sang est fait au plus tard 2 jours après l'éruption. (GRESSER I. et CHANY C., 1963 (59)).

- Isolement sur l'homme.

En 1937, PAPP K. (60) transmettait la rougeole à trois humains volontaires en inoculant des leucocytes obtenus dans la période d'incubation de cette maladie.

B - Expérimentation in vitro.

a) Arguments indirects en faveur de la pénétration du virus dans les leucocytes.

- Difficulté d'élution du virus grippal adsorbé sur les leucocytes.

Certains virus, comme le virus grippal, possèdent la propriété d'agglutiner les hématies et les leucocytes de certaines espèces animales ; on les appelle pour cette raison : virus hémagglutinants.

Tandis que les erythrocytes placés dans certaines conditions de température 37° éluent spontanément et presque complètement le virus grippal adsorbé, les leucocytes éluent peu ou pas du tout ce virus. Il s'agirait donc d'un lien plus intime qu'une simple adsorption. (GINSBERG H.S. et BLACKMON J.R., 1956 (61)) (LA PLACA M., 1958 (62)), INGLOT D.A. et DAVENPORT F.M., 1962 (63)).

- Inclusions intraleucocytaires.

Des inclusions spécifiques du virus vaccinal (corps de guarnieri)ont été décrites dans les leucocytes d'exsudat péritonéal du lapin mis en présence in vitro avec le virus. Mais rien ne permet d'affirmer encore l'identification inclusions, virus. (BARSKI G., MESSORE G., LEPINE P., 1955 (64)).

b) Arguments directs de la phagocytose in vitro du virus par les leucocytes.

- Immuno-fluorescence.

BOAND A.V., KEMPT J.E. et HANSON R.J., 1957 (65) ont également étudié in vitro l'action du Myxovirus influenzae A PR_8 sur les leucocytes du sang circulant de lapin. Ils observent le complexe virus globuline fluorescente en taches de tailles variables, disséminées irrégulièrement à l'intérieur des leucocytes. Lorsque la phagocytose est inhibée par l'alcool, le virus apparaît seulement à la périphérie, il n'y en a aucune trace à l'intérieur de la cellule. En fractionnant les leucocytes contenant le virus par broyage et centrifugation différentielle,

ils isolent différents composants qu'ils identifient ensuite par colorations spéciales. Ils montrent ainsi que le virus est associé aux granulations cytoplasmiques.

Cette méthode d'immuno-fluorescence, montre les différences qui existent entre la phagocytose in vitro du Myxovirus influenzae A PR_8 par les leucocytes et celle des cellules de cultures de tissus (Hela, reins de poulet) (INGLOT D.A. et DAVENPORT F.M., 1962 (66)).

Avec les leucocytes, on peut distinguer les complexes présents à la surface de la cellule, et les complexes localisés à l'intérieur de la cellule, la majorité d'entre eux semblent être intra-cellulaires, indifféremment distribués mais uniquement dans le cytoplasme à l'exclusion du noyau. Par contre, les cellules de culture de tissus ont une couche complète de fluorescence sur leur surface ; ce qui rend impossible l'identification d'unités infectantes à l'intérieur de la cellule.

MINS C. en 1964 (67) suit en Microscopie à fluorescence des polynucléaires obtenus à partir de la cavité péritonéale de la souris par inoculation de bouillon stérile et mis en présence du virus ectromélia.

Après deux heures de contact cellules-virus la phagocytose est intense chez certains polynucléaires tandis qu'elle n'est pas décelable dans d'autres. Il n'y a aucune réduction significative dans la fluorescence entre 4 et 8 heures. A 18 heures la plupart des polynucléaires

sont dégénérés. La phagocytose du virus ectromélia est réelle mais la dégénérescence des cellules n'est probablement pas attribuable, pense-t-il, à l'action du virus car les polynucléaires sont difficilement gardés en survie in vitro.

- Observations en Microscopie Electronique.

Peu d'observations ont été faites jusqu'à présent au Microscopie Electronique sur ce sujet :

Une culture de leucocytes du sang circulant de poulet est infectée avec du virus Newcastle en grande quantité (10.000 particules par cellule). Durant les 4 premières heures aucun changement dans la structure cellulaire n'est constaté, mais une heure après l'addition du virus, les vacuoles contiennent un matériel analogue au virus tel qu'il apparaît en coupe de liquide allantoïque concentré. 5 heures après l'inoculation, l'aspect des macrophages change ; la structure finement détaillée du cytoplasme disparaît, de grandes inclusions amorphes et rondes apparaissent. A l'intérieur de ces inclusions, on retrouve des particules ressemblant au virus.

Les auteurs de cette expérience font de ces inclusions des mitochondries détruites (HOTZ G. et BANG F.B., 1957 (68)).

Des particules ressemblant au virus Coxsackie type A 4, sont observées en coupes ultra-fines de leucocytes de cobaye, incubés in-vitro avec ce virus (KANTOCH M., ZAPF K., 1959 (69)).

Ces particules

1) se différencient des autres éléments structuraux de la cellule par leur forme globulaire.

2) ressemblent aux éléments vus dans une goutte de suspension de virus coxsackie seul.

3) ne sont pas vus dans les coupes de leucocytes normaux en absence de virus.

Ces auteurs en déduisent que ces éléments sont des particules virales.

Des leucocytes humains ont également été mis en présence du Myxovirus influenzae absorbé sur les érythrocytes in vitro (DANON D., JERUSHALMY Z., KOHN A. et DE VRIES A., 1961 (70))

En 1957 JERUSHALMY et ses collaborateurs (71) montraient que les hématies humaines traitées au périodate et sur lesquelles le Myxovirus influenzae est adsorbé en présence du sérum humain débarrasser des agglutinines par le périodate sont phagocytées par les leucocytes. Par contre les hématies sur lesquelles le virus est adsorbé sans traitement préalable au périodate ne sont pas phagocytées par ces mêmes leucocytes. Ces auteurs postulaient que les leucocytes phagocytent le virus absorbé sur la surface des erythrocytes ; mais lorsque ces derniers sont traités au périodate, le virus est fortement attaché à l'hématie, les leucocytes ne pouvant détacher le virus de l'hématie, phagocytent le tout.

DANON D. et ses collaborateurs (72) vont donner l'explication de ce phénomène grâce aux observations combinées du Microscope Electronique et de la microcinématographie.

1'5 après l'incubation leucocytes, erythrocytes-virus en présence de sérum, l'observation en microcinématographie montre les leucocytes englobant les erythrocytes. Ceux-ci restent à l'intérieur des leucocytes quelques instants et sont ensuite rejetés : quelquefois l'érythrocyte reste simplement en contact pendant un temps très court et se détache. L'observation au Microscope Electronique quelques minutes plus tard, 10' à 30', ne montre aucune phagocytose d'érythrocytes. On observe des particules virales adsorbées sur les erythrocytes, d'autres à la surface des leucocytes, d'autres dans les vacuoles des leucocytes. Les particules virales en suspension dans le milieu sont rares. Les auteurs concluent que les particules virales sont phagocytées par les leucocytes à partir de la surface des érythrocytes.

Le Microscope Electronique a permis d'identifier des particules virales dans le pus de diverses formes d'acné hormonal, maladie due à un virus de grande taille appartenant à la famille de la psittacose (MELCZER N., HAMAR M., KISS S., ROKA E., 1962 (73)).

- Pouvoir infectieux des leucocytes.

Une expérience faite en 1955 par GARABEDJAN G.A. et SYVERTON J.T. (74) montre que les macrophages et les microphages péritonéaux de lapins, mis en évidence in vitro avec le virus herpétique,

restent infectieux pour la souris après 10 lavages successifs, alors que l'inoculation du dernier liquide de lavage n'amène aucune mortalité. Le virus est donc soit adsorbé, soit phagocyté par les leucocytes.

II - DEVENIR DES VIRUS PHAGOCYTES PAR LES LEUCOCYTES.

Que deviennent les virus phagocytés par les leucocytes ? Des expériences, in vivo et in vitro, montrent que le comportement du virus dans les leucocytes varie avec l'espèce animale et le virus étudié. Certains animaux sont sensibles à tel virus et réfractaires à tel autre.

A - Expériencesin vivo.

- Diversité des résultats :

Les cellules de l'exsudat péritonéal de la souris permettent la multiplication du Myxovirus influenzae A (AGKERMANN W.W. et KURTZ N., 1952 (75)) ainsi que celle du virus de la vaccine (ALTENBERG L.S., 1955 (76)).

Dans ces deux expériences les auteurs notent que la multiplication virale aboutit à la mort cellulaire.

BORDET P. et QUERSIN-THIRY L., en 1951-1953 (77) étudient l'action du virus grippal sur le cobaye, en inoculant ce virus par voie intra-péritonéale ; ils constatent l'apparition d'un exsudat abondant avec des lésions leucocytaires (images de pycnose dans les polynucléaires) mais ne mettent pas en évidence de multiplication virale dans ces leucocytes.

Les expériences de HANSON R.J., KEMPF J.E. et BOAND A.V. (78) citées à propos de l'immuno-fluorescence démontrent la phago-

cytose in vivo du virus grippal par les leucocytes péritonéaux de souris normales et immunisées, mais ces auteurs ne constatent aucune multiplication virale dans ces leucocytes.

Les expériences de GINSBERG H.S. et BLACKMON J.R.(79) concernant l'adsorption du virus grippal A PR_8 sur les leucocytes de cobaye montrent que très peu de virus s'élue spontanément des leucocytes. Moins de 1 % du virus qui n'a pas été élué peut être détecté par titrage d'infectivité ou d'hémagglutination quand les cellules sont complètement rompues. Ceci n'est pas en faveur d'une multiplication virale.

MINC C. (80) montre la diversité d'action du virus sur les macrophages du foie :

a) certains virus ne sont pas phagocytés par les macrophages : exemple : le virus poliomyélitique I, à la différence des virus poliomyélitiques II et III. La chute du titre du virus dans le sang circulant est due à l'inactivation par la chaleur.

b) certains virus sont phagocytés et digérés : le virus vaccinal est retrouvé dans les macrophages du foie quelques minutes après l'injection intraveineuse ; dans l'heure qui suit l'antigène diminue et disparaît. Le Myxovirus influenzae (dose subtoxique), le virus du myxome chez la souris, le virus ectromélia chez le rat suivent le même chemin.

c) D'autres sont englobés et transférés passivement à travers les macrophages jusqu'aux cellules hépatiques : Le Myxovirus influenzae et le virus Rift Valley fever chez la souris passent à travers les macrophages bordant les sinusoides pour atteindre les cellules hépatiques sans un cycle préliminaire de multiplication dans les macrophages.

d) D'autres enfin sont englobés et se multiplient dans les macrophages ce qui conduit à l'infection des cellules hépatiques : exemple le virus distemper du chien, le virus de la fièvre jaune du singe, le virus ectromélia de la souris.

MINS C. conclut que l'une des fonctions naturelles des macrophages du foie est de sélectionner le matériel pouvant passer du sang aux cellules hépatiques.

B - Expériences in vitro.

a) expériences démontrant la multiplication intraleucocytaire des virus.

En 1908, M.E. MARCHOUX (81), dans une note présentée à l'Académie des Sciences par M. E. ROUX indique qu'un certain nombre de microbes invisibles se multiplient surement dans le sang et décrit la technique employée pour cultiver le virus de la peste aviaire sur sang de poule défibriné ; depuis les cultures cellulaires se sont développées et de nombreuses expériences démontrent la multiplication intraleucocytaire des virus en culture in vitro de leucocytes du sang circulant et de cellules réticulo-endothéliales.

C'est CARREL A., en 1926 (82), qui réussit la première de ces expériences avec le virus du sarcome de Rous mis en culture sur des cellules mononucléées provenant du sang circulant de poulet, emballées dans un film de plasma. Il constate une multiplication virale et observe une certaine modification des cellules causée, dit-il, probablement par le virus à la surface ou à l'intérieur de ces cellules. Le développement viral est fonction du nombre de leucocytes, il est nul lorsque ceux-ci sont préalablement congelés.

Le virus vaccinal se multiplie dans les cellules de Kupffer (BEARD J.W. et ROUSS P., 1938 (83)), dans les cellules mononucléées du sang circulant de lapin (FLORMAN A.L. et ENDERS J.F., 1942 (84)) et dans les cellules de l'exsudat péritonéal de lapin (BARSKI G., MESSORE G., LEPINE P., 1955 (85)).

Sur ces dernières cellules le titre du virus vaccinal s'accroît de 2 log en 5 jours tandis que parallèlement se développent et s'accroissent dans les leucocytes des lésions spécifiques de la vaccine type Guarnieri. Ces mêmes auteurs cultivent également sur ces cellules le virus herpétique. Celui-ci centuple en 5 jours. Les leucocytes s'arrondissent, il se forme des lésions nucléaires typiques : disparition des nucléoles, margination de la chromatine, inclusions acidophiles, Ce même virus se multiplie également en culture de leucocytes humains en présence de phyto-hémagglutinine (NAHMIAS A.J., KIBRICK. S., ROBERT C.R. (86)).

Le virus Hog Cholera se multiplie dans les leucocytes du sang périphérique de porc pendant une période de plus de 10 semaines avec 20 changements de milieu avant que les cellules ne se détériorent : aucun effet cytopathogène n'est observé pendant cette période (DUNNE H.W. et ses coll., 1957 (87)). Ce virus se développe également en sub-culture de leucocytes de porc (GUSTAPSON D.P. et ses coll., 1963 (88)). En 1959, une culture primaire de leucocytes de porc est inoculée avec le virus Hog Cholera. Dans les subcultures les cellules continuent de libérer une grande concentration de virus. Ce virus est testé par inoculation au porc. On note une réduction graduelle de la virulence. On peut l'utiliser après 3 années de culture pour immuniser des porcs par voie intramusculaire ou par aérosol. Les derniers ne montrent aucun signe clinique particulier sauf une leucopénie transitoire et modérée. Les animaux sensibles, en contact avec de tels animaux, deviennent souvent immuns.

Ces mêmes leucocytes multiplient également le virus de la fièvre du porc d'Afrique (MALINQUIST W. et HAY D. 1960 (89)). Mais des faits qui distinguent ce dernier, du virus Hog Cholera sont la mise en évidence dans une telle culture :

1) l'hémadsorption d'érythrocytes à la périphérie et à la surface des cellules qui le contiennent.

2) la cytolyse des cellules infectées. L'hémadsorption dépend de la concentration virale et est observée dès la 18ème heure, pendant 10 jours.

Le virus Newcastle se multiplie dans les cultures de leucocytes de sang périphérique aviaire, multiplication qui s'accompagne d'une dégénérescence leucocytaire (DUNNE H.W. et ses coll., 1958 (90)).

Le virus ECHO 9 se multiplie dans les suspensions de leucocytes humains. Mais de nombreuses préparations colorées avec l'anticorps fluorescent ou l'acridine orange n'ont pas permis d'indiquer les cellules qui, parmi les leucocytes, supportaient la multiplication virale (BERG R.B., 1961 (91)).

Le virus poliomyélitique type I se multiplie dans les cellules d'exsudat de singe (BARSKI G.(92)), BARSKI G. et ROBBE-FOSSAT F., 1957 (93)) et dans les leucocytes du sang circulant humain (GRESSER I., CHANY C., 1964 (94)). Dans ces deux expériences, la multiplication n'est accompagnée d'aucun effet cytopathogène dans les limites d'observation de l'expérience.

Les suspensions de leucocytes humains du sang circulant permettent également la multiplication du virus de la rougeole (BERG R.B. et ROSENTHAL M.S., 1961 (95)). Les titres infectants sont comparables à ceux trouvés en culture de tissus. La multiplication virale a lieu spécialement dans les cellules mononucléées, mais la possibilité d'une prolifération virale au sein des polynucléaires ne peut être éliminée.

ROBERTS J.A., en 1964 (96) étudie le virus ectromélia virulant et atténué sur les macrophages péritonéaux de souris normales et immuns : ils ne constatent aucune différence d'infectivité chez des

souris différemment sensibles à la souche virale. Les macrophages péritonéaux de souris immunes sont plus rapidement infectés que les macrophages de souris normales.

Le virus de la myxomatose se multiplie dans les cellules de l'exsudat péritonéal de lapin. Les cellules infectées ne montrent pas de signes de dégénérescence mais des altérations-inclusions cytoplasmiques, cellules plasmodiques multinucléées. (MARAL (96a)).

Le virus fowl-plaguese multiplie en culture de macrophages de poulet. Les études montrent que l'antigène soluble S se multiplie dans le noyau et peut s'étendre à travers la cellule d'un noyau à un autre. L'antigène hémagglutinant est trouvé seulement dans le cytoplasme et est détecté plus tard que l'antigène S (FRANKLIN, 1958 (97)).

Le virus meningo-pneumotique se multiplie dans les monocytes de cobayes normaux ; aucun effet cytopathogène n'est observé pendant 5 jours. Par contre dans les monocytes de cobayes immuns, il n'y a pas de multiplication virale (BENEDICT A., 1958 (98)).

b) Expériences où la multiplication du virus dans les leucocytes n'a pu être mise en évidence.

Même in vitro, toutes les expériences n'aboutissent pas à une multiplication virale dans les leucocytes. NISHMI M. et BERNKOPF H., en 1958 (99) ne constatent aucune multiplication du virus vaccinal dans les leucocytes de souris soit en suspension dans le milieu, soit en culture sur verre. Mais ils observent des effets cytopathiques certains.

En 1961, BERG R.B. et ROSENTHAL M.S. (100) ayant réussi comme nous l'avons signalé plus haut, à cultiver le virus de la rougeole sur leucocytes du sang circulant humain et de singe, essayent de multiplier ce virus en culture de leucocytes du chien, du lapin, du cobaye, de la souris, et du poulet. Leurs expériences échouèrent avec ces animaux.

BORECKY L., LACKOVIC V., 1964 (101) ne constatent aucune multiplication du Myxovirus influenzae souche A 1 (adaptée aux oeufs et à la souris) dans les cultures de cellules péritonéales de souris après 48 heures. Ce qui démontre, pensent-ils, que ces virus ne se multiplient pas dans ces macrophages.

Les expériences in vitro montrent que la multiplication virale n'est pas obligatoirement suivie de la dégénérescence cellulaire.

III - ETUDE DES PERTURBATIONS PHYSIOLOGIQUES ET METABOLIQUES DES LEUCOCYTES APRES PHAGOCYTOSE DES VIRUS.

Comme nous venons de le voir, la phagocytose du virus avec multiplication virale ou non, entraîne des modifications morphologiques importantes pouvant même aller jusqu'à la mort cellulaire.

Divers auteurs ont étudié in vitro les perturbations consécutives à la phagocytose du virus. Les leucocytes étant avant tout phagocytaires, ils ont observé les modifications de leur aptitude phagocytaire vis à vis des bactéries après contact plus ou moins prolongé avec le virus et ils se sont attachés à l'étude du métabolisme cellulaire.

a) Modification de l'aptitude phagocytaire des leucocytes.

Les virus ourlien et Myxovirus influenzae A PR_8 inhibent le pouvoir phagocytaire des leucocytes de cobayes vis à vis des bactéries in vitro. L'antisérum ourlien neutralise l'effet inhibiteur du virus ourlien mais n'a aucune action sur celui du Myxovirus influenzae A PR_8 (Travaux de MERCHANT D.J. et MORGAN H.R., 1950, (102)).

Les leucocytes mis en présence in vitro de bactériophages T2 ont leur aptitude phagocytaire inhibée vis à vis des bactéries hétérologues. Cette action inhibitrice dépend du temps de contact phages leucocytes ainsi que de la concentration de la suspension de virus. Le degré d'inhibition serait plus grand avec les bactériophages inactivés par le sérum antiphage qu'avec les bactériophages vivants ou inactivés par la chaleur. L'inhibition serait alors due au complexe phage-anticorps formé durant l'inactivation (KANTOCH M., SKURSKI A. et WIECZOREX Z., 1958 (103)).

Des expériences analogues ont été faites avec les virus Coxsackie type A4 et B3 et des leucocytes de cobayes et de chevaux (KANTOCH M. et ENGLOT D.A., 1960 (104)).

Ces auteurs déduisent de leurs expériences les faits suivants :

1) l'inhibition est indépendante de la nature des leucocytes et des bactéries employées, mais varie avec la concentration virale, la température ambiante et le temps de contact leucocytes-virus.

2) l'inhibition de l'activité phagocytaire ne dépend pas de la présence du virus libre dans la suspension mais est bien due à l'action du virus associé aux cellules car, lorsque les leucocytes sont lavés 3 fois, après 5 heures de contact avec le virus, on constate la même inhibition qu'avec les leucocytes non lavés.

3) Le virus Coxsackie inactivé par un antisérum inhibe l'activité phagocytaire des leucocytes au même titre que le virus actif.

4) Dans les expériences où la phagocytose des bactéries est nulle, le diamètre des leucocytes a diminué de moitié, la structure du noyau devient plus dense et celui-ci se colore davantage. Par contre les transformations morphologiques sont moins marquées lorsque le virus Coxsackie est préalablement inactivé par un antisérum homologue.

Les auteurs concluent que l'inhibition de la phagocytose des bactéries par les leucocytes dépend préalablement de celle du virus par ces cellules.

KANTOCH M. (105) va confirmer cette conclusion à la suite d'une série d'expériences avec les Myxovirus influenzae A PR_8, Coxsackie A4 et les leucocytes de cobaye, en 1962. Il démontre que le sérum a pour effet d'augmenter le phagocytose du virus par les leucocytes en exerçant une action opsonisante.

En présence de sérum, l'inhibition de l'activité phagocytaire des leucocytes vis à vis des bactéries est plus importante qu'en absence de sérum ou qu'en présence de sérum et de tanin en proportion

dosée pour ne pas altérer le pouvoir infectieux du virus, car le tanin se combine à la protéine du sérum qui perd alors son activité opsonisante.

b) Modifications du métabolisme cellulaire.

Cette question a surtout fait l'objet des travaux de FISHER T.N. et GINSBERG H.S., 1956 (106). Ils étudient d'abord le métabolisme leucocytaire lors de la phagocytose de bactéries et de levures et établissent le fait suivant : la phagocytose des leucocytes requiert une source active d'énergie : telle une source d'hydrate de carbone. En milieu d'eau physiologique tamponnée, la phagocytose des levures par les leucocytes de cobaye est faible ; son degré augmente en fonction du glucose ou des hexoses monophosphatés ajoutés au milieu. L'utilisation de O_2 par les leucocytes de cobaye en présence de glucose est minime.

En employant la technique de Warburg avec le glucose comme substrat, une quantité importante de CO_2 est libérée du bicarbonate tamponné, par les leucocytes, il se forme 2 molécules d'acide lactique (CH_3 CHOH COOH pour une molécule de glucose ($C_6 H_{12} C_6$) métabolisée). La glycolyse est donc une source importante d'énergie.

Ils étudient ensuite les leucocytes en contact préalable avec Myxovirus influenzae A PR_8 et constatent que le glucose et le glucose 6 phosphate perdent leur action favorisante ; ce virus inhibe donc la fonction de glycolyse dans les leucocytes. En présence de fructose 6 phosphate, la phagocytose des levures par les leucocytes ou par une suspension de

leucocytes mis en présence préalablement avec le Myxovirus influenzae diffère très peu. Le blocage du métabolisme induit par le virus est probablement une réduction de l'activité du phosphohéxoisomérase, car la glycolyse est inhibée par le virus quand le glucose et le glucose 6 phosphate sont utilisés comme substrat mais pas quand la fructose 6 phosphate est employée. Le virus inactivé par la chaleur dont l'activité enzymatique a été détruite est incapable d'inhiber la glycolyse des leucocytes.

Parallèlement le Receptor Destroying Enzyme (RDE) du vibrion cholérique en présence de calcium réduit la formation de CO_2 et d'acide lactique; le RDE inactivé par la chaleur à 100° pendant 30' n'inhibe pas la glycolyse ceci montre que le Myxovirus influenzae et le RDE inhibent la glycolyse par un mécanisme similaire.

De même que le Receptor Destroying Enzyme détruit les récepteurs viraux mucoprotéiniques des hématies, de même il altère les récepteurs mucoprotéiniques des leucocytes. Le virus aurait un rôle analogue et le réduction de la glycolyse résulterait de la réaction du virus sur des substances localisées à la surface de leucocytes.

Le virus influerait donc le métabolisme cellulaire des leucocytes, notablement au cours de la glycolyse anaérobie.

Ceci provoquerait une perturbation de l'aptitude phagocytaire de ces cellules vis à vis des bactéries et des levures.

IV - HYPOTHESES EMISES SUR LE ROLE DES LEUCOCYTES DANS LA DEFENSE DE L'ORGANISME CONTRE L'INFECTION VIRALE.

Le rôle attribué aux leucocytes dans la défense de l'organisme contre l'infection virale fait l'objet d'hypothèses assez contradictoires : pour certains le leucocyte aide à disséminer la maladie, pour d'autres, il joue un rôle actif dans la défense de l'organisme.

A - Rôle des leucocytes dans la dissémination virale.

Les partisans de cette théorie attribuent aux anticorps neutralisants le rôle essentiel dans la défense de l'organisme vis-à-vis de l'infection virale. INGLOT D.A. et DAVENPORT F.M. dans le Journal of Immunology de 1962 (107) pensent que les leucocytes interviennent dans le transport des virus, en protégeant ceux-ci de l'action des anticorps naturels ou acquis.

Pour SMORODINTSEV A.A. et son Ecole, (1957 (108)), quand le virus est bloqué par un anticorps, il n'est pas capable de se fixer et de pénétrer à l'intérieur des cellules réceptives ; il reste extracellulaire et ne peut se multiplier. Or le virus extracellulaire est détruit à la température de 37-38°C, par la présence d'inhibiteurs thermolabiles dans le sérum normal des animaux réfractaires au virus. A l'intérieur des leucocytes, le virus n'est pas détruit aussi bien chez les animaux réfractaires que chez les animaux immunisés, et se multiplie.

B - Rôle de défense des leucocytes vis à vis de l'agression virale.

a) du fait de la phagocytose

FAIRBROTHER, en 1930 (109) avec le virus vaccinal, JAMUNI A. et HOLDEN M., en 1934 (110) avec le virus herpétique démontrent que les leucocytes augmentent apparemment l'effet neutralisant des anti-sérums spécifiques. Ces auteurs inoculent intra-cérébralement aux lapins soit du virus seul, soit du virus en présence d'immunsérum, soit du virus et de l'immunsérum mis en présence de leucocytes normaux ou immunisés, et édudient les effets léthaux de ces différents inoculats sur ces animaux. Ils en déduisent que le sérum sensibilise le virus et le rend susceptible d'être détruit par le phagocyte.

KOEHLER H., en 1960 (111), dans un article intitulé "le rôle des leucocytes en tant que porteur de virus", attribue aux leucocytes un rôle primordial de défense. Le virus serait phagocyté par les leucocytes mais ne s'y multiplierait pas.

L'apparition de la maladie dépendrait du rapport particules virales/leucocytes.

Si les leucocytes ne viennent pas à bout des particules virales, celles-ci se multiplient librement et il se produit une virémie au cours de laquelle on peut mettre en évidence le virus dans le sang total. Suivant la virulence et le pouvoir pathogène du virus pendant et après la virémie, il se produit directement ou indirectement une affection clinique Mais KOEHLER H. (112) n'a pas élucidé le problème du devenir du virus

dans le leucocyte. Combien de temps le virus reste-t-il infectieux dans le leucocyte ? Après l'infection expérimentale d'animaux chez lesquels une maladie ne s'est pas déclarée, KOEHLER H. a pu, quelques jours après l'infection, retiré du virus encore infectieux des leucocytes.

b) par production d'interféron.

L'interféron a été découvert par ISAACS A. et LINDENMANN J., en 1957. Cette substance antivirale est produite par les cellules de l'embryon de poulet qui a été inoculé avec du Myxovirus influenzae inactivé par les rayons ultra-violets (BARON S. et ISAACS A., 1960 (113)).

Des expériences plus récentes montrent que beaucoup d'espèces animales , y compris l'homme, produisent l'interféron en réponse à l'infection de divers virus. Son mécanisme d'action a été étudié en particulier par ISAACS A. et son équipe, 1961 (114), de SOMIER P. et son équipe, 1962 (115), WAGNER R., 1963 (116).

L'interféron est une protéine non globuline, produite par les cellules infectées elles-mêmes. Il apparaît tôt au cours de l'infection, avant les anticorps. Il n'est pas spécifique, il n'a pas d'action sur le virus extracellulaire ou sur le virus absorbé mais il inhibe la multiplication virale à l'intérieur des cellules infectées. L'interféron inhibe la synthèse du virus à condition qu'un certain délai existe entre l'apparition de l'interféron dans le milieu et l'infection ultérieure par le virus ou l'acide nucléique viral infectieux. ISAACS A. et HITCHCOCK G., 1960 (117)

en étudiant le taux de virus , d'anticorps et d'interféron dans les poumons et le sérum de souris inoculées par voie nasale avec différentes doses de virus grippal souche A PR_8, observent que le titre du virus dans les poumons commence à diminuer quelques jours avant que l'anticorps soit décelable dans le sérum ou dans les poumons et au moment où l'interféron est présent au maximum dans ceux-ci ; la multiplication virale est limitée avant la formation des anticorps. L'interféron joue donc un rôleimportant dans l'arrêt de l'infection grippale. GRESSER I., en 1961 (118) démontre la production d'interféron par les leucocytes humains en culture inoculés avec du virus Sendaï à haute concentration.

GLASGOW L.A., HABEL K. montrent, en 1963 (119) que les leucocytes des souris exposés aussi bien in vivo (dans la cavité péritonéale) qu'in vitro, au virus vaccinal protégent la souris contre le virus de la stomatite vésiculaire. Ces auteurs émettent l'hypothèse suivante : "l'intéraction virus-leucocytes aurait pour résultat la production de l'interféron. Celui-ci serait alors capable de prévenir l'extension du virus à de nouvelles cellules sensibles et contribuerait de cette façon à éliminer le virus. La persistance des particules virales observées dans les leucocytes contribuerait à la guérison en effectuant une stimulation continuelle de production d'interferon." BARON S., en 1963 (120) montre que l'interféron est décelable dans le sérum de souris 1 h après l'injection intraveineuse de différents types de virus ; le taux d'interféron est maximum 4 h après l'injection. Les leucocytes sont probablement les premiers responsables de la production de cette substance.

GRESSER I. et CHANY J.F., en 1964 (121) ont démontré qu'une petite population de cellules sensibles, peut modifier la courbe de l'infection virale dans cette culture. Ceci appuie l'hypothèse émise par GLASSON L.A. et HABEL K. (122).

HENON M., DELAUNAY A. (123) à la suite de ces expériences concluent en 1966 que les cellules qui participent à la défense de l'organisme contre les affections bactériennes, polynucléaires, mononucléaires, cellules du système réticulo-endothélial peuvent participer également à la défense de l'organisme contre une affection virale . Leur mode d'action seul différe. Ces cellules freinent le développement de l'agresseur par l'élaboration d'une substance particulière : interféron ou substance étroitement apparentée".

Une autre façon d'aborder le problème serait d'étudier à quels facteurs on peut attribuer la sensibilité ou la résistance au virus.

DURAND D.P., BARRETT J.T., en 1963 (124) attribuent la sensibilité naturelle ou la résistance au virus à l'absence de types cellulaires particuliers ; de simples différences dans les complexes enzymatiques hôtes peuvent changer la réplique complète en réplique incomplète, mais ils ajoutent que dans une population hôte de même potentiel génétique, le milieu, l'âge, la température du corps à l'état normal, la présence d'inhibiteurs viraux dans le sérum normal peuvent influer sur la réplique virale. Le rôle de l'activité phagocytaire peut conduire soit à éliminer le virus, soit à le séparer des cellules sensibles, soit à transporter le virus vers ces cellules sensibles.

MINS C., 1964 (125) dans son article sur la pathogénèse des maladies virales intitule un de ses paragraphes : macrophages et sensibilité aux infections virales :

Les macrophages sont, dit-il, dans une position clé quant à la sensibilité des animaux aux infections virales. Ils contrôlent l'entrée des virus dans les organes comme le foie, la rate. Or nous avons vu à propos de la multiplication virale que la réaction virus-macrophages du foie est très variable d'un virus à l'autre.

BANG F.B. et WARWICK A., 1960 (126) montrent que la différence génétique dans la sensibilité de deux souches de souris à l'hépatite de la souris se trouve au niveau des macrophages : les macrophages du foie de souris sensibles dégénèrent quand ils sont infectés in vitro, tandis que les macrophages de souris résistantes survivent. THEIS G. et KOPROWSKI H., 1961 (127) montrent que la sensibilité des souris au virus West-Nile de la souris dépend de la réponse des macrophages : peu ou pas de virus sont produits par les macrophages péritonéaux et spléniques de souris de souche résistante après infection in vitro tandis qu'un taux élevé de virus est produit par les macrophages de souris sensibles.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

ETUDE DE L'ACTION CYTOTOXIQUE DES PARTICULES VIRALES A L'EXCLUSION DE LEUR ACTION INFECTIEUSE

Cette étude comportera deux parties :

I) Etude en Microcinématographie à contraste de phase de l'activité cytotoxique in vivo de différents virus sur les cellules de l'exsudat péritonéal provoqué chez le cobaye. (Myxovirus influenzae A et B, para-influenzae III, Adenovirus V, virus vaccinal.).

II) Etude en Microcinématographie à contraste de phase, de l'activité cytotoxique in vitro du Myxovirus influenzae B (Lee) sur les macrophages alvéolaires de cobaye. Cette étude a été couplée d'observations en Microscopie Electronique et de l'étude biochimique de la consommation d'oxygène et de la dégradation du glucose en appareil de Warburg.

Nous avons choisi comme animal d'expérimentation le cobaye. Celui-ci présente une résistance naturelle à certaines infections en particulier à celles dues aux Myxovirus influenzae et para-influenzae, aux adenovirus, au virus vaccinal, virus pathogènes pour l'homme. Cette particularité nous permet d'étudier l'action cytotoxique de ces virus sur la cellule à l'exclusion de leur action infectieuse.

I - ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE IN VIVO : OBSERVATIONS DES LEUCOCYTES DE L'EXSUDAT PROVOQUE CHEZ LE COBAYE PAR INJECTION INTRA-PERITONEALE DE DIFFERENTS VIRUS.

- Origine des exsudats inflammatoires.

Chez les mamnifères adultes à l'état normal, on trouve dans les grandes cavités, une certaine quantité de liquide séreux.

Chez le cobaye, on observe quelques rares polynucléaires des lymphocytes et des cellules mononucléées.

Lorsqu'on inocule un liquide quelconque : eau physiologique, liquide allantoïque, liquide de Hanks dans la cavité péritonéale, on provoque une réaction inflammatoire qui est constituée par deux phénomènes :

- un afflux de leucocytes sanguins sortis des vaisseaux par diapèdèse et qui sont en grande majorité des polynucléaires.

- et une réaction de toutes les cellules fixes et particulièrement des cellules endothéliales qui se mobilisent et dans lesquelles l'irritation développe de nouvelles propriétés et en particulier un pouvoir phagocytaire considérable.

- MATERIEL ET METHODE

A - TECHNIQUE GENERALE

a) Inoculation intra-péritonéale du virus suspendu dans du Hanks ou du liquide allantoïque. Les animaux sont d'un poids moyen de 500 g.

L'injection intrapéritonéale est effectuée au moyen d'une aiguille à biseau court 30 x 12 sous un volume variable de 3 à 10 ml suivant le virus employé et le laps de temps désiré entre l'inoculation et la récolte. L'animal est ensuite laissé à jeun et l'exsudat est récolté de 2 à 48 heures après l'inoculation. Après sacrifice de l'animal par anesthésie à l'éther, l'abdomen est immédiatement ouvert, et le liquide péritonéal est récolté à la pipette sous contrôle de la vue. Une goutte de l'exsudat est utilisée pour un frottis coloré au May Grunwald ou à l'hémalun éosine. D'autres gouttes sont disposées sur des lamelles rigoureusement propres et préalablement chauffées sur lesquelles on applique des lames de façon à obtenir un film liquidien très mince propre à l'étalement leucocytaire. La lamelle est ensuite fixée à la paraffine et la préparation placée immédiatement à 37°C.

b) Examen microcinématographique

L'examen microcinématographique commence après 10 ' de séjour à 37°C. Durant toute l'observation la préparation est maintenue à cette température. Nous utilisons la chambre microcinématographique C. Zeiss avec prises de vue sur film 16 mm inversible KODAK PANATOMIC et PLUS X ; l'intervalle entre deux prises de vue est de 1 sec. et le temps de pose de 1/2 sec. De cette façon nous pouvons étudier les leucocytes après action du virus non seulement au point de vue morphologique, mais surtout au point de vue dynamique et c'est là toute l'originalité de la méthode d'observation.

Conjointement à cette observation purement qualitative, nous avons étudié d'une part, l'aptitude phagocytaire de ces cellules vis-à-vis de particules minérales, d'autre part, leur index de cytophagie, méthodes plus mathématiques.

c) Aptitude phagocytaire

L'aptitude phagocytaire a été appréciée vis-à-vis des particules de quartz. 0,25 ml d'exsudat sont mis en tubes siliconés à 37°C en présence de 1 mg de quartz. Le quartz utilisé présente les caractéristiques granulométriques suivantes :

particules inférieures à 1 µ	91,06 %
particules de 1 à 2 µ	7,88 %
particules de 2 à 3,5 µ	0,97 %
particules de 3,5 à 5 µ	0,09 %

Après 45' de contact, les frottis sont réalisés sur lame, fixés à l'alcool absolu à basse température. Les préparations sont ensuite montées entre lame et lamelle en présence de glycérine (1 part de glycérine pour 9 parts d'eau physiologique tamponnée à pH 7).

La lecture est effectuée en contraste de phase et l'aptitude phagocytaire des polynucléaires et des macrophages appréciée par numération des cellules contenant des particules de quartz.

Le compte est effectué sur 200 cellules. L'expérience est faite avec des cellules récoltées à des laps de temps différents entre l'inoculation et la récolte afin de déterminer le temps de contact

nécessaire pour que le virus agisse sur les leucocytes.

d) Index de cytophagie :

Celui que nous avons adopté peut être défini comme suit : le % des histiocytes ayant phagocyté un ou plusieurs polynucléaires ; il est établi sur l'observation de 200 cellules.

c) Isolement du virus

Afin de vérifier si les lésions sont bien secondaires à la phagocytose des particules virales, nous avons cherché à démontrer cette phagocytose en réisolant le virus des corps cellulaires. Nous avons utilisé la technique suivante : la cavité péritonéale est lavée avec 10 ml de liquide de Hanks inoculé au moyen d'une seringue rincée à l'héparine. Les cellules obtenues sont lavées deux fois dans du Hanks, remises en suspension, congelées et décongelées pour libérer les virus des cellules et mises en culture soit sur oeufs de poule embryonnés pour le virus grippal, soit sur cellules KB ou Hela pour le virus vaccinal.

B - VIRUS UTILISES.

Myxovirus influenzae A, souche PR_8

Myxovirus influenzae A 1, souche FM

Myxovirus influenzae B, souche lee

En milieu allantoïque.

Le virus grippal est cultivé sur oeufs de poule embryonnés incubés depuis 10 jours (inoculum 0,25 ml d'une dilution 10^{-5} d'une suspension de virus titrant 1/640 à 1/1280 en hémagglutination). Le virus est

récolté après une incubation de 48 heures à 36°C. Il est stocké à 4°C. et utilisé dans un délai inférieur à une semaine. Avant l'injection à l'animal il est à nouveau titré en présence d'hématies de poule et son titre est ramené au 1/160 par dilution dans du liquide allantoïque non infecté. Nous en inoculons 3 ml au 1/160 par voie intrapéritonéale, soit 1920 U.H.

En milieu de Hanks.

Pour certains animaux nous avons étudié ce virus en liquide de Hanks. La suspension de virus grippal en milieu de Hanks est préparée de la façon suivante inspirée de la technique de BORDET P. et QUERSIN-THIRY L. (128) : des hématies de poule lavées à 3 reprises en eau physiologique stérile sont ajoutées à du liquide allantoïque infecté de façon à obtenir une concentration en hématies de l'ordre de 2 %. Après un séjour de 2 heures à 4°C., on agite doucement de façon à remettre en suspension les hématies agglutinées. Une centrifugation courte de 4.000 t/m. est alors réalisée. Le surnageant prélevé est remplacé par du liquide de Hanks à volume égal. La suspension globulaire est ensuite placée au bain-marie à 37°. Les globules sont éliminés par une courte centrifugation. Le surnageant qui contient le virus élué est titré et son titre d'hémagglutination ramené au 1/160 par addition de milieu de Hanks.

Virus inactivés.

Un certain nombre d'animaux ont été inoculés avec du virus inactivé par chauffage 1/2 heure à 56°.

Animaux immunisés

Nous avons immunisé des animaux vis à vis de la souche B lee par 3 injections sous-cutanées à huit jours d'intervalle de 3 ml de virus en milieu de Hanks titrant 1/640 en hémagglutination, additionné d'adjuvant de Freund. Nous avons obtenu une immunisation variable : le taux d'inhibition de l'hémagglutination variant entre 1/160 à 1/1280.

Les expériences témoins ont été faites avec des animaux injectés avec du liquide de Hanks.

Adénovirus type V.

Le virus est cultivé sur cellules Hela et KB. Nous obtenons un titre infectieux de 10^5 DE 50/ml, titre déterminé par la méthode de REED L.S. et MUENCH H. (129). Pour disposer de suspension d'un titre plus élevé (10^7 DE 50 par ml), nous extrayons le virus des cellules en présence de fluorocarbone (Fréon 113) (technique de GESSLER A.E.(130)) Des expériences témoins sont également faites avec des cellules de cultures non infectées traitées par le fluorocarbone.

Virus inactivé.

L'Adénovirus V chauffé 1/2 h à 56°

Le chauffage 1/2 heure à 56° C. de l'Adénovirus V supprime le pouvoir infectant du virus mais garde en partie son pouvoir toxique.

L'Adénovirus V chauffé 5' à 100° perd son pouvoir infectant et son pouvoir toxique.

Myxovirus parainfluenzae III

Le virus a été isolé par CHANY C. et ses collaborateurs, en 1958 (131), au cours d'affections respiratoires aigües du nourrisson (souche EA 102). Ce virus est cultivé sur cellules Hela et utilisé au titre de 10^4 DE 50 par ml. Il est injecté par voie péritonéale sous un volume de 5 ml.

Virus vaccinal

La souche de virus vaccinal est une souche entretenue initialement par Calmette sur génisses et lapins, utilisée à l'Institut Pasteur de Lille pour préparation du vaccin antivariolique. Cette souche a été adaptée à la culture sur cellules Hela et KB sans passage préalable sur la membrane chorio-allantoïque de l'oeuf embryonné. Le virus a été utilisé au titre de 10^4 DE 50 / ml titre mesuré par la méthode de REED L.J. et MUENCH H. (132). Il a été injecté par voie péritonéale sous un volume de 5 ml.

C - REPARTITION DES ANIMAUX DANS LES DIFFERENTES EXPERIENCES.

L'expérience a été faite sur 275 cobayes. Les tableaux ci-joints montrent la répartition des animaux pour chaque expérimentation.

Laps de temps entre inoculation et récolte	Nature de l'inoculum	Nombre d'animaux
16 à 20 heures	Liquide allantoïque non infecté (Témoins)	20
16 à 20 heures	Myxovirus influenzae A PR_8 en liquide allantoïque	13
	Myxovirus influenzae A_1 FM en liquide allantoïque	17
	Myxovirus influenzae B lee en liquide allantoïque	17
16 à 20 heures	Myxovirus influenzae A PR_8 inactivé 1/2 h à 56° en liquide allantoïque	3
	Myxovirus influenzae B lee inactivé 1/2 h à 56° en liquide allantoïque	11

MYXOVIRUS INFLUENZAE

Animaux non immunisés

TABLEAU I

Laps de temps entre inoculation et récolte	Nature de l'inoculum		Nombre d'animaux
16 à 20 heures	Témoins animaux neufs	Liquide de Hanks	3
		Myxovirus influenzae B lee dans liquide de Hanks	2
16 à 20 heures	Animaux immunisés	Myxovirus influenzae B lee dans liquide de Hanks	7

MYXOVIRUS INFLUENZAE B lee

Animaux immunisés

TABLEAU II

Laps de temps entre inoculation et récolte	Nature de l'inoculum	Nombre d'animaux
	Témoins	
16 à 24 heures	Liquide de Hanks	6
40 à 48 heures	Liquide de Hanks	6
7 à 24 heures	Surnageant cellules non infectées	12
16 à 24 heures	Cellules non infectées traitées au Fréon	3
40 à 48 heures	Cellules non infectées traitées au Fréon	3
7 à 24 heures	Adénovirus type V 10^{-7} à 10^{-3}	42
40 à 48 heures	Adénovirus type V 10^{-7} à 10^{-3}	8
16 à 48 heures	Adénovirus type V inactivé 1/2 h à 56°	12
7 à 48 heures	Adénovirus type V inactivé 5' à 100°	22

ADENOVIRUS TYPE V

TABLEAU III

Laps de temps entre inoculation et récolte	Nature de l'inoculum	Nombre d'animaux
	Témoins	
7 à 24 heures	Liquide surnageant cellules	12
7 à 24 heures	Liquide de Hanks	12
16 à 48 heures	Myxovirus parainfluenzae III souche EA 102	28
48 à 72 heures	Myxovirus parainfluenzae III souche E A 102	4

MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE III - SOUCHE E A 102

TABLEAU IV

Laps de temps entre inoculation et récolte	Nature de l'inoculum	Nombre d'animaux
40 à 48 heures	Témoins Liquide de Hanks	6
	Cellules non infectées traitées au Fréon	3
40 à 48 heures	Virus Vaccinal	12

VIRUS VACCINAL

TABLEAU V

RESULTATS

A - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PERITONEAL PROVOQUE PAR LE LIQUIDE ALLANTOIQUE OU LE LIQUIDE DE HANKS.

a) Caractéristiques de l'exsudat.

L'injection intra-péritonéale de ces solutions provoque un exsudat peu abondant mais riche en cellules.

La formule leucocytaire varie suivant le laps de temps entre l'inoculation et le prélèvement. Ainsi que l'on pouvait logiquement s'y attendre, les polynucléaires prédominent au cours des premières heures, mais leur pourcentage décroit sensiblement à partir de la 20 ième heure, alors que celui des histiocytes augmente sensiblement. Les lymphocytes n'apparaissent que tardivement et demeurent toujours en petit nombre.

Bien que l'on note des différences appréciables d'un animal à l'autre, il est possible de dresser un graphique du pourcentage relatif des différents types cellulaires suivant l'heure du prélèvement en établissant une moyenne de 5 cobayes. (Voir tableau VI)

	2h	8h	14h	20h	38h	44h	48h
Polynucléaires	95	76	53	52	28	14	10
Histiocytes	5	22	42	43	62	72	73
Lymphocytes	2	2	2	3	10	14	17

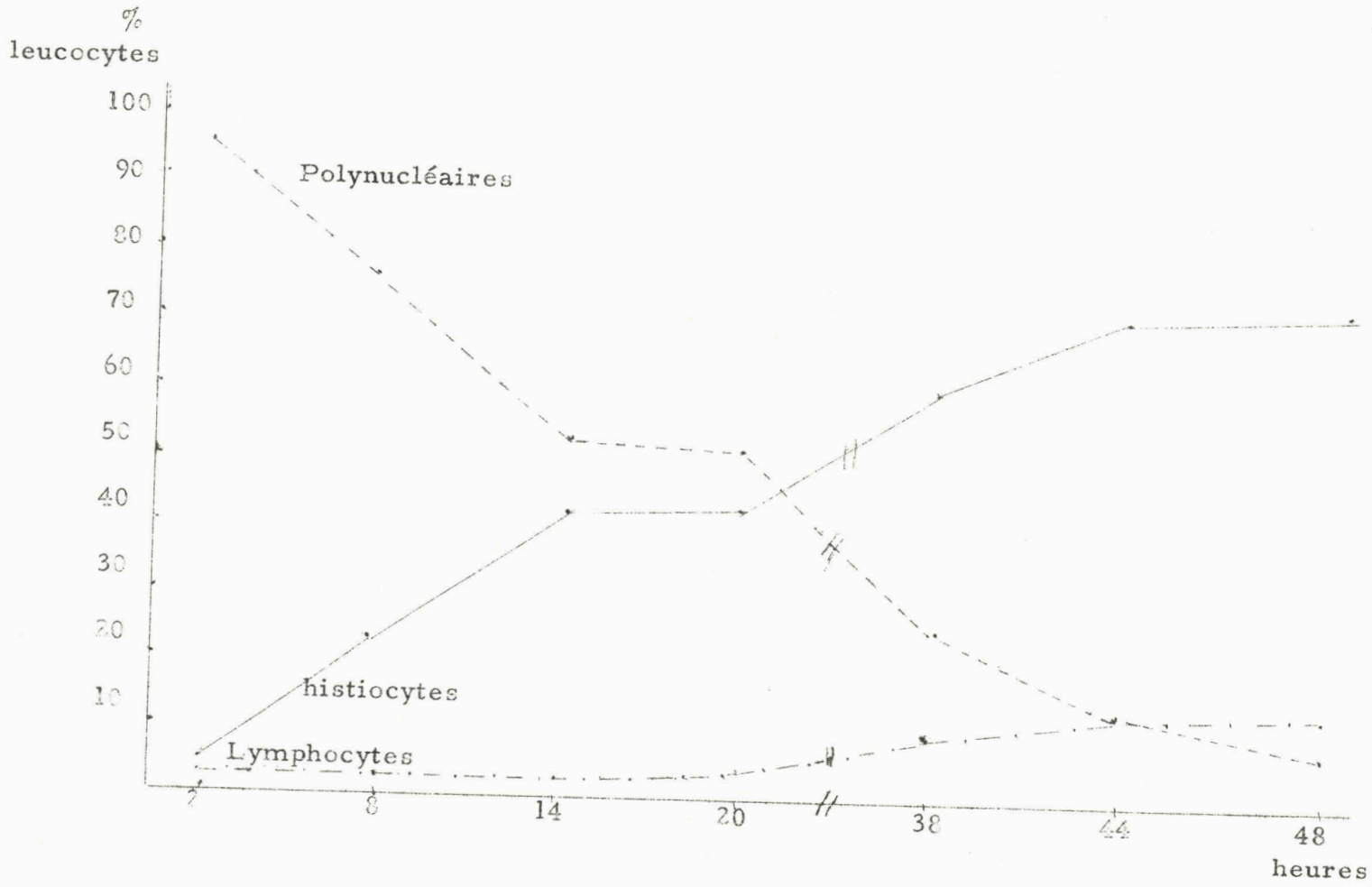

%
leucocytes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
Polynucléaires
histiocytes
Lymphocytes
2
8
14
20
38
44
48
heures

TABLEAU VI

b) Morphologie et cinétique.

Le comportement général des cellules de l'exsudat péritonéal provoqué par le liquide allantoique ou le liquide de Hanks correspond au comportement physiologique habituel des leucocytes tel que l'ontdécrit POLICARD A. et BESSIS M. (133) POLICARD A. et COLLET A. (134) ROBINEAUX R. (135).

1 - Les polynucléaires neutrophiles. (Planche I fig. a)

Douées d'une mobilité et d'une plasticité remarquables, ces cellules présentent dans l'ensemble des mouvements vifs et rapides, s'étirant avec souplesse et élégance et se déplaçant.

La morphologie générale des polynucléaires neutrophiles est aujourd'hui bien connue. La partie antérieure supporte le voile hyaloplasmique, aux replis disposés de façon grossièrement radiaire, dépourvu de granulations et animé d'un bouillonnement caractéristique. En bordure de ce voile se distinguent de nombreuses granulations animées d'un mouvement rapide qui suggère une grande fluidité du milieu cellulaire à ce niveau. le noyau plurilobé, dépourvu de mouvements propres, est d'une plasticité très marquée. Les isthmes des lobes sont très fins et quelquefois à peine visibles. A l'intérieur du noyau l'on voit des masses relativement sombres en contraste de phase qui paraissent correspondre aux masses chromatiques de la cellule fixée et colorée. Le noyau est entouré d'innombrables granulations animées d'un mouvement incessant et rapide. Dans les conditions d'observation où nous nous sommes placés, le centre cellulaire est

souvent difficile à situer. Les vacuoles sont rares dans ces cellules normales. La région caudale est très variable dans sa morphologie : tantôt très courte, elle est susceptible de s'allonger démesurément, sa partie distale adhérant au support par l'intermédiaire d'un petit renflement terminal.

Le déplacement de ces cellules est lié à deux processus cellulaires décrits par MM. A. POLICARD et A. COLLET (136) : d'abord une émission rapide sur la lame d'un pseudopode en voile d'hyaloplasme généralement large, sans granulations, suivie d'un écoulement dans ce voile du granulo-plasma entrainant souvent le noyau. Cet écoulement amène le déplacement de la cellule. Après un temps d'arrêt, un nouveau pseudopode se forme à un autre endroit de la cellule, changeant la direction du déplacement; la cause et la signification de ces brusques changements de direction nous échappent complètement.

2 - Les polynucléaires éosinophiles.

Leur nombre varie d'un animal à l'autre, la cause en est encore inconnue. En général peu nombreux, les polynucléaires éosinophiles sont facilement identifiés grâce à leurs volumineuses granulations. D'aspect général plus massif que les polynucléaires neutrophiles, leur déplacement est un peu moins rapide et s'effectue le plus souvent grâce à l'émission de pseudopodes de petite taille qui surgissent à la périphérie, puis se réunissent pour être envahis par le cytoplasme cellulaire et les granulations.

3 - Les cellules mononucléées de type histiocytaire.

Dans les 20 premières heures les histiocytes ont un comportement différent des polynucléaires en ce sens qu'ils se déplacent lentement et se déforment peu au cours de leur déplacement. (Planche 1 fig. b).

A leur pôle antérieur, la membrane ondulante, dépourvue de granulations, animée de mouvements amples est facilement visible. Immédiatement en arrière du voile, le noyau est sphérique ou réniforme avec des masses chromatiniennes qui apparaissent plus sombres en contraste de phase. Le cytoplasme contient des granulations denses de petite taille et parfois de petites vacuoles. Après 20h, apparaissent de grandes cellules macrophagiques sans voile apparant avec un noyau presque central. Leurs déplacements sont nuls.

4 - Cellules d'allure lymphocytaire

Beaucoup plus petites que les précédentes, elles sont en petit nombre. Elles ont un noyau arrondi avec une ou deux encoches et quelques masses chromatiniennes mal limitées. Le cytoplasme est peu abondant et homogène.

B - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PERITONEAL PROVOQUE PAR LES MYXOVIRUS INFLUENZAE.

MYXOVIRUS INFLUENZAE A PR_8, A 1 FM, B Lee.

a) Caractéristiques de l'exsudat.

L'exsudat récolté 16 à 20 heures après l'injection intrapéritonéale de virus grippal en suspension dans le liquide allantoïque est très

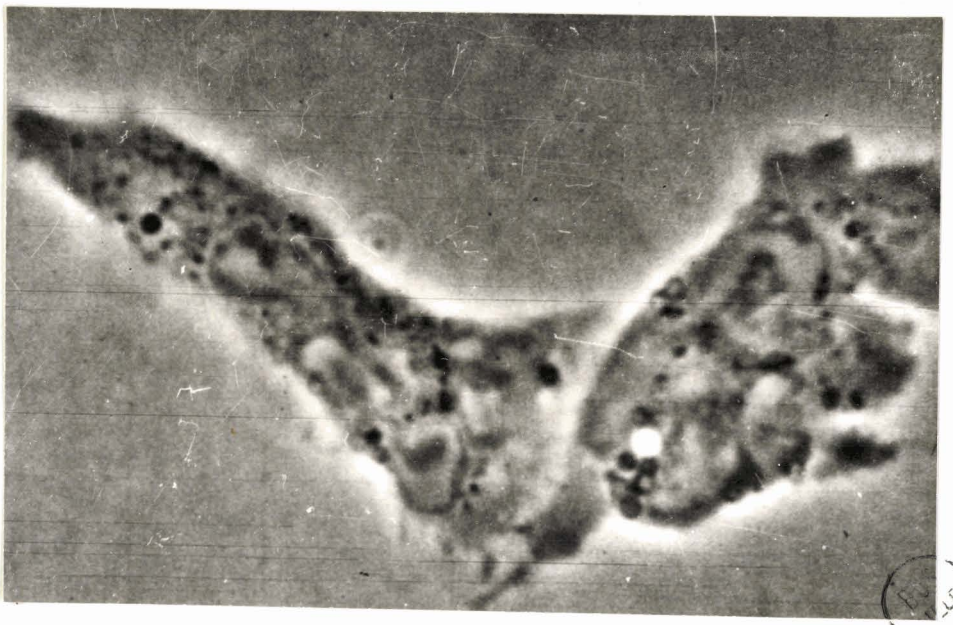


Fig a : Polynucléaires neutrophiles

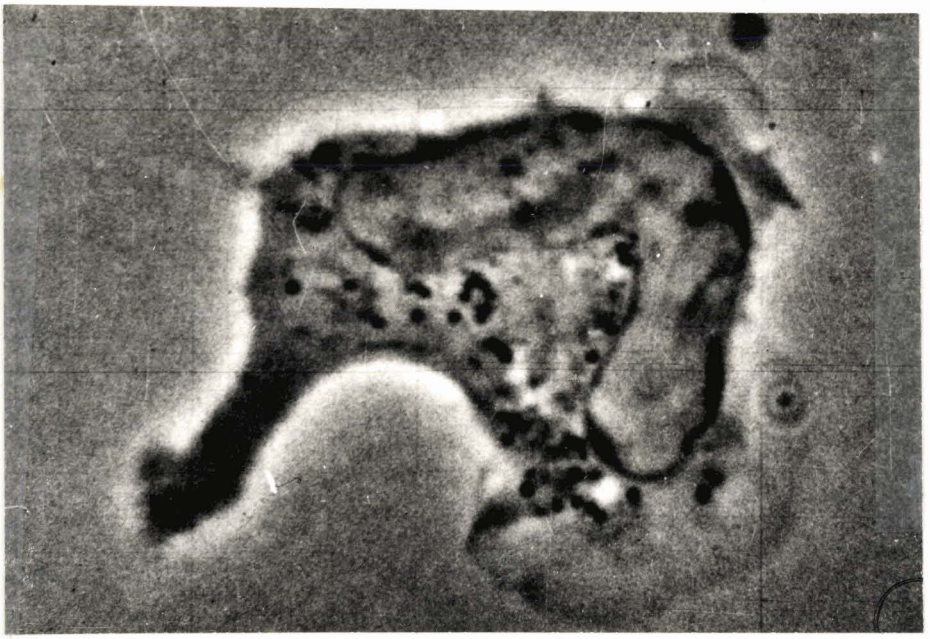


Fig. b : Cellule mononucléée

CELLULES D'EXSUDAT PROVOQUE PAR LIQUIDE DE HANKS

PLANCHE I

abondant, fluide et contraste avec celui obtenu après injection de liquide allantoïque non infecté. Nous avons constaté ce fait, déjà signalé par BORDET P. et QUERSIN-THIRY L. (137), avec une quantité de virus relativement faible (1920 unités hémagglutinantes) comparée à celle qu'ont utilisée cer derniers auteurs (20.480 unités hémagglutinantes ou davantage).

L'examen des frottis ne nous a pas montré de particularités notables de la formule de l'exsudat. Nous n'avons pas noté, lors de l'examen des frottis colorés au Giemsa, de lésions cellulaires caractéristiques, et cela confirme les constatations de BORDET P. et QUERSIN-THIRY L. (138) qui n'ont observé que 24 heures après l'injection du virus des aspects de pycnose.

b) Morphologie et cinétique des leucocytes en microcinématographie en contraste de phase.

La microscopie en contraste de phase révèle de très importantes lésions cellulaires, qui se rencontrent quel que soit le type de virus grippal utilisé. Toutefois ces lésions sont plus fréquentes et plus marquées avec la souche B lee qu'avec les souches A 1 FM et A PR_8.

1 - Les polynucléaires neutrophiles.

Les altérations sont de deux ordres, morphologiques et cinétiques.

Les polynucléaires neutrophiles ont un aspect massif, sont ramassés sur eux-mêmes. Ils ont perdu leur souplesse et leur plasticité

habituelles ; leurs contours se déforment peu. La partie caudale est souvent impossible à distinguer (Planche II, fig. a). Il s'y ajoute d'importantes perturbations de la mobilité cellulaire. L'émission de voiles hyaloplasmiques est très ralentie, d'une ampleur moindre qu'au niveau des cellules normales. Ils sont réduits à une mince frange qui se déplace le long du bord cellulaire. Les déplacements de la cellules sont peu marqués, souvent limités à un mouvement de rotation sur place.

La structure interne est également modifiée : les granulations spécifiques sont diminuées en nombre, fait que ROBINEAUX R. et FREDERIC J. (139), et plus récemment POLICARD A., COLLET A. et PREGERMAIN S. (140) ont observé après phagocytose de bactéries charbonneuses ou dans les foyers inflammatoires aseptiques. On distingue parmi elles des formations arrondies denses, plus volumineuses, dont nous ignorons la signification exacte. Le noyau n'apparaît altéré que dans les cellules les plus atteintes : disparition des mottes chromatiniennes et accentuation des limites nucléaires. Enfin, des vacuoles de petite taille, aux limites nettes et à contenu clair apparaissent dans le cytoplasme, refoulant et déformant le noyau lorsqu'elles sont particulièrement nombreuses. Certaines d'entre elles apparaissent en cours d'observation, conséquence d'une pinocytose exagérée.

Ces altérations précèdent de peu la mort cellulaire. Celle-ci se produit parfois en cours d'observation, caractérisée par l'arrêt brutal de tout mouvement interne.

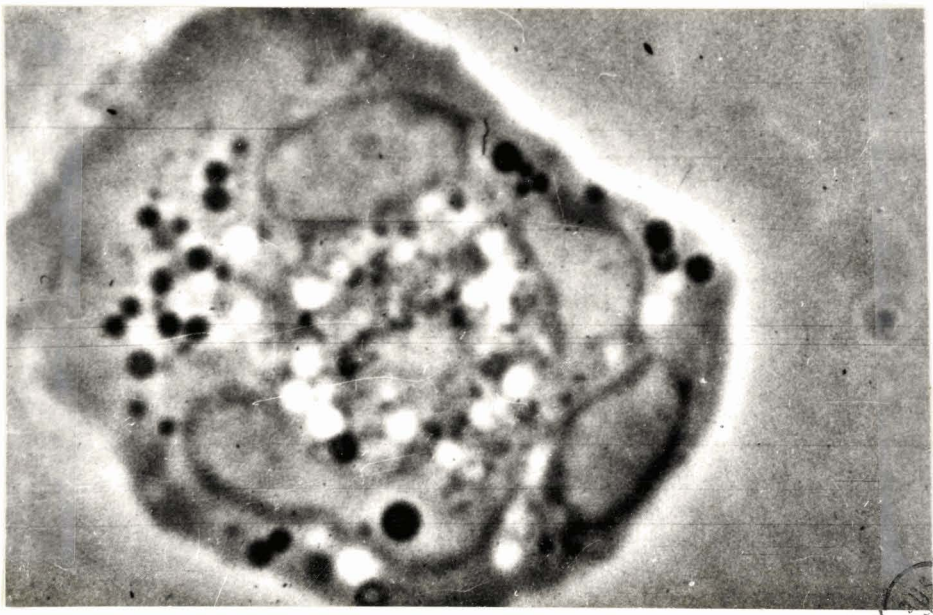
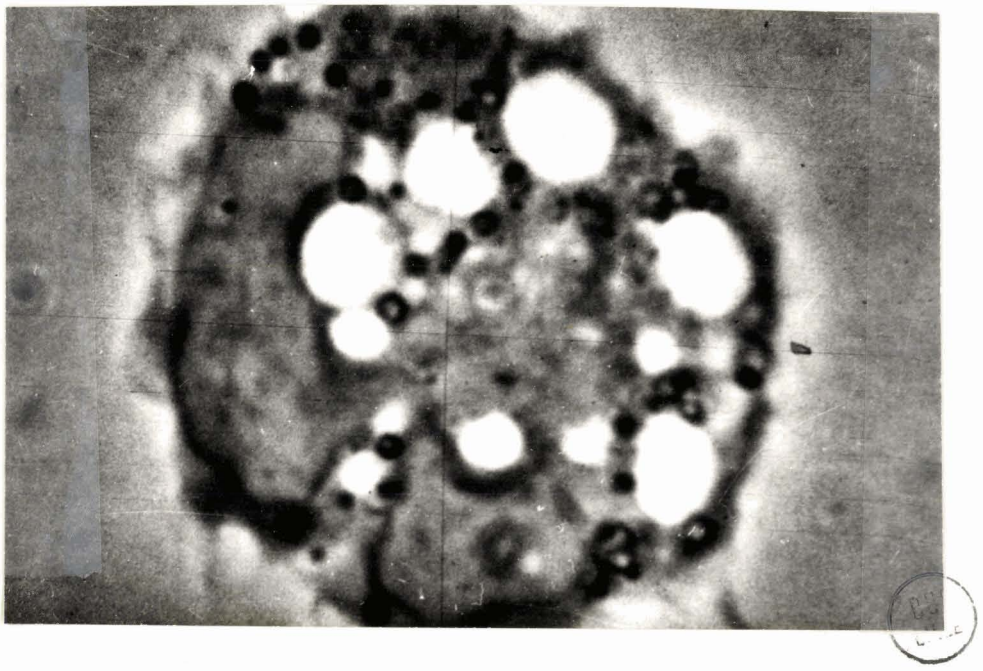


Fig. a : Polynucléaire neutrophile



; Fig. b : Cellule mononucléée

CELLULES D'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE VIRUS GRIPPAL B (lee)

PLANCHE II

2 - Les polynucléaires éosinophiles.

Au contraire des polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles que nous avons pu observer ne montrent pas de modifications morphologiques sensibles et leur activité cinétique nous est apparue normale.

3 - Les cellules mononucléées.

Les mouvements sont relentis, limités à une simple oscillation ou à une rotation sur place pour les cellules plus atteintes. Par contre l'activité interne est peu modifié.

Ces cellules présentent, en outre, de très graves altérations morphologiques, ainsi qu'en témoignent les reproduction photographiques de la planche II, fig. b : l'aspect massif, la tendance marquée à la vacuolisation, les lésions nucléaires terminales caractérisées par une homogénéisation avec disparition des mottes chromatiniennes rappellent beaucoup, par leur aspect, les lésions des polynucléaires neutrophiles. Ces modifications morphologiques sont surtout marquées avec le virus grippal B lee.

De nombreux cadavres sont visibles : ils ont un aspect figé, la membrane ondulante immobilisée, tout mouvement interne ayant cessé.

4 - Les cellules lymphocytoïdes sont trop peu nombreuses, dans les préparations que nous avons examinées, pour que nous puissions en analyser de façon valable leur altérations éventuelles sous l'influence du virus grippal.

MYXOVIRUS INFLUENZAE INACTIVE PAR CHAUFFAGE A 56°.

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action du virus grippal, nous avons procédé à l'inoculation intra-péritonéale de virus grippal inactivé préalablement par chauffage 1/2 heure à 56°.

L'examen microcinématographique montre que les altérations des polynucléaires neutrophiles et des cellules mononucléées caractéristiques de l'action du virus vivant, ne se produisent pas avec le virus chauffé. La vitesse de déplacement est semblable à celle de cellules normales. La souplesse et la plasticité cellulaires sont conservées, le nombre des granulations spécifiques identique à celui noté sur les préparations témoins, et il n'existe pas de vacuolisation.

LE MYXOVIRUS INFLUENZAE CHES LES ANIMAUX IMMUNISES.

Chez les animaux immunisés, le virus grippal est inoculé par voie intra-péritonéale, en suspension dans du milieu de Hanks, de façon à éviter les effets d'une éventuelle sensibilisation de l'animal aux protéines du liquide allantoïque . Nous avons préalablement vérifié que le milieu de Hanks non infecté provoque l'apparition d'un exsudat en tous points comparables à celui observé après infection intrapéritonéale de liquide allantoïque.

La vaccination protège les cellules phagocytaires contre les effets toxiques des particules virales.

Cette protection s'est avérée totale chez deux animaux dont la réaction de Hirst était positive au 1/640 et 1/1280 : la mobilité et la morphologie des polynucléaires neutrophiles et des macrophages sont normales.

Chez 5 autres animaux, cette protection n'est que partielle : on note en effet la présence de cellules vacuolaires, aux mouvements ralentis, dont l'aspect rappelle, à un moindre degré, les observations effectuées chez l'animal non immunisé. Chez ces animaux, la réaction de Hirst était positive respectivement à 1/1280 dans 2 cas, à 1/640, 1/320 et 1/160 dans les 3 autres cas.

C - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PERITONEAL PROVOQUE PAR L'ADENOVIRUS TYPE V.

I - Etude des leucocytes de l'exsudat.

ADENOVIRUS V

a) Caractéristique de l'exsudat.

L'exsudat provoqué par l'adénovirus V en suspension dans le liquide de Hanks est moins abondant que l'exsudat obtenu avec le virus grippal. Il est toutefois plus important que celui obtenu avec le Hanks seul. Par contre il est plus visqueux que dans les deux autres cas. La formule leucocytaire est sensiblement la même que dans les exsudats témoins.

b) Morphologie et cinétique des leucocytes.

- Exsudats obtenus 16 à 22 heures après l'inoculation.

Nous avons observé pour les cobayes ayant reçu les doses les plus fortes d'adénovirus type V (10^7 - 10^6 DE 50/ml sous un volume de 3 ml pour les exsudats de 24 heures et 5 ml pour les exsudats de 48 heures), une perte de la mobilité cellulaire.

1) Les polynucléaires ont un aspect massif, avec quelques mouvements sur place. Certains sont vacuolaires. Les mottes chromatiniennes sont remaniées et les contours nucléaires plus marqués (planche III, Fig. a).

2) Les cellules mononucléées sont vacuolaires et leur mouvement à peu près nul, mais un certain nombre d'entre elles ont englobé des polynucléaires. Cette cytophagie intense et précoce des polynucléaires par ces cellules, constatée à la 20ème heure confère un aspect très particulier aux préparations obtenues après infection péritonéale d'adénovirus. Certains polynucléaires phagocytés sont directement inclus dans le cytoplasme de l'histiocyte, immobiles et déjà nettement réduits en volume et quelquefois fragmentés. D'autres sont contenus dans de vastes vacuoles où ils subissent un brassage continu (planche III, Fig. b). D'autres enfin sont encore animés de mouvements de rotation sur eux-mêmes à l'intérieur de la cellule macrophagique et leurs granulations cytoplasmiques conservent une activité normale.

3) Les éosinophiles et les lymphocytes ne présentent pas d'altérations morphologiques et cinétiques notables.

- Exsudats entre 40 et 48 heures après l'inoculation.

La formule leucocytaire est alors changée. Les histiocytes sont en majorité : ce sont de grandes cellules macrophagiques à mouvement réduit sans membrane ondulante apparente. Ils sont vacuolaires. La cytophagie augmente. Certains histiocytes contiennent plusieurs polynucléaires à des stades différents de digestion.

c) Index de cytophagie.

L'index de cytophagie a été évalué de la façon suivante : le % d'histiocytes ayant phagocyté un ou plusieurs polynucléaires (Tableau VII).

Nous avons ainsi montré que le pourcentage de cellules phagocytées est d'autant plus important que le titre du virus inoculé est plus élevé (TableauxVIII et IX).

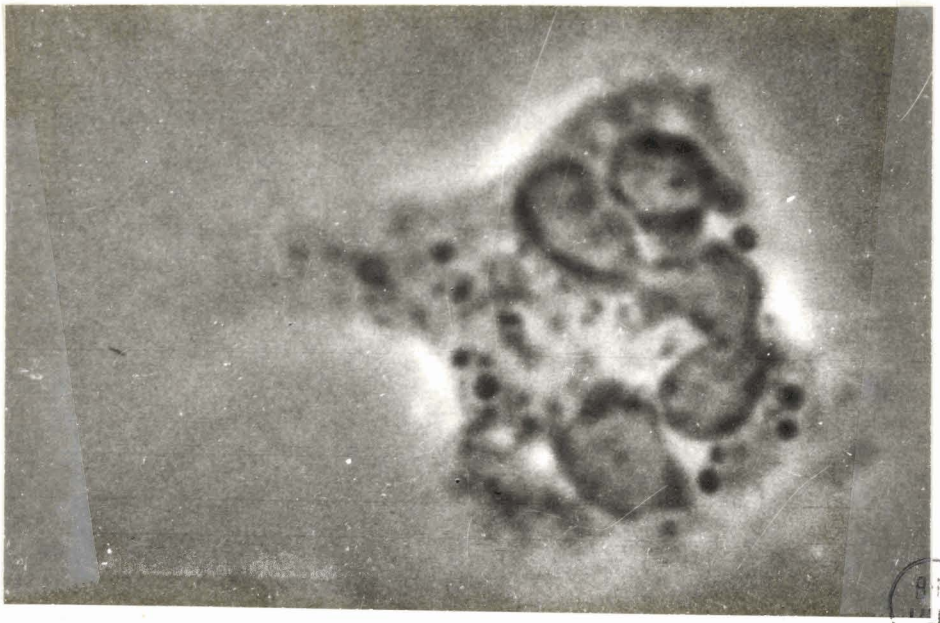


Fig. a : Polynucléaire neutrophile

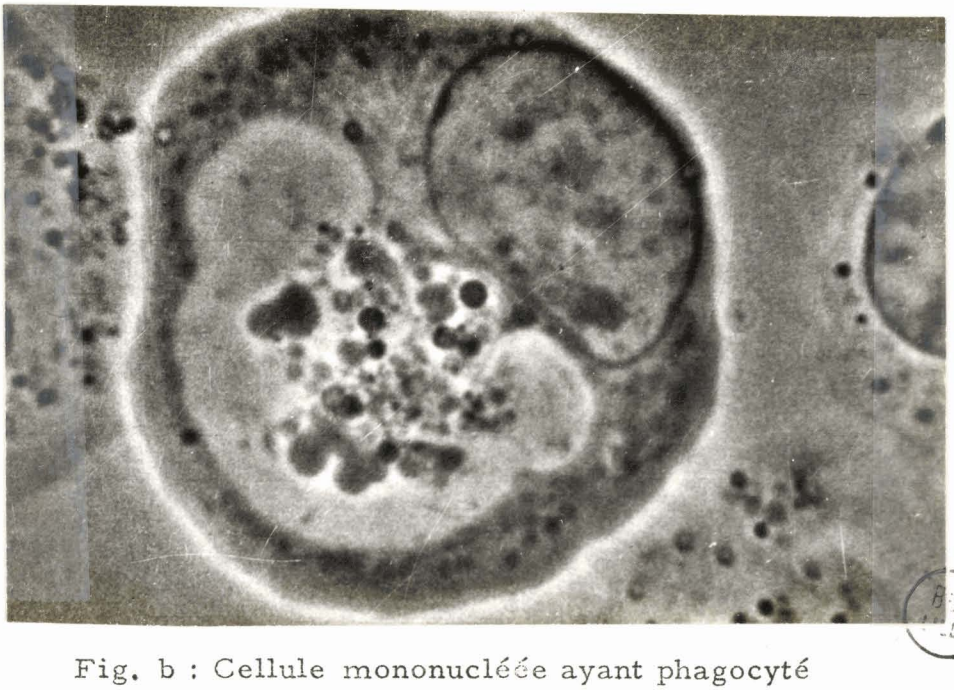


Fig. b : Cellule mononucléée ayant phagocyté
un polynucléaire neutrophile.

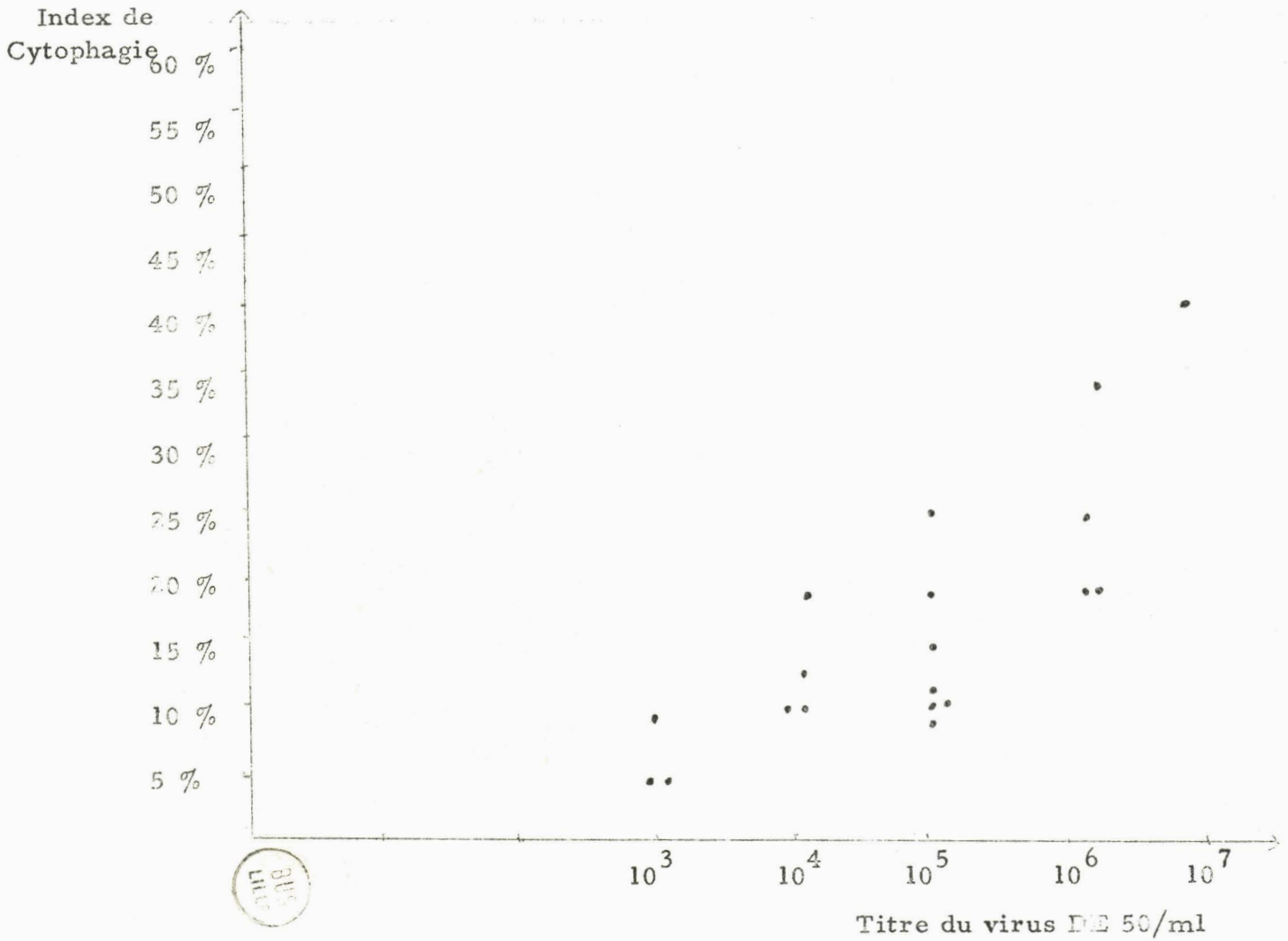
CELLULES D'EXSUDAT PROVOQUE PAR L'ADENOVIRUS V

PLANCHE III

		% des histiocytes ayant phagocyté des polynucléaires	Nombre de polynucléaires phagocytés pour 100 histiocytes	Laps de temps entre l'inoculation et la récolte de l'exsudat
Témoins		4 %	4	18 h
		4 %	4	18 h
		3 %	3	20 h
		4 %	5	20 h
		6 %	7	20 h
		1,5 %	2	44 h
		3 %	3	44 h
		6 %	6	44 h
Adénovirus type V	10^7	38 %	57	22 h
		53 %	96	48 h
	10^6	21 %	27	20 h
		26 %	32	20 h
		21 %	23	22 h
		35 %	37	22 h
		31 %	34	48 h
	10^5	19 %	21	18 h
		15 %	16	18 h
		10 %	12	18 h
		9 %	12	18 h
		26 %	30	18 h
		12 %	12	20 h
		10 %	13	21 h
		25 %	25	48 h
	10^4	11 %	14	18 h
		13 %	15	18 h
		11 %	15	21 h
		19 %	23	22 h
		12 %	15	48 h
	10^3	5 %	5	18 h
		9 %	12	18 h
		5 %	5	20 h
		7 %	7	48 h

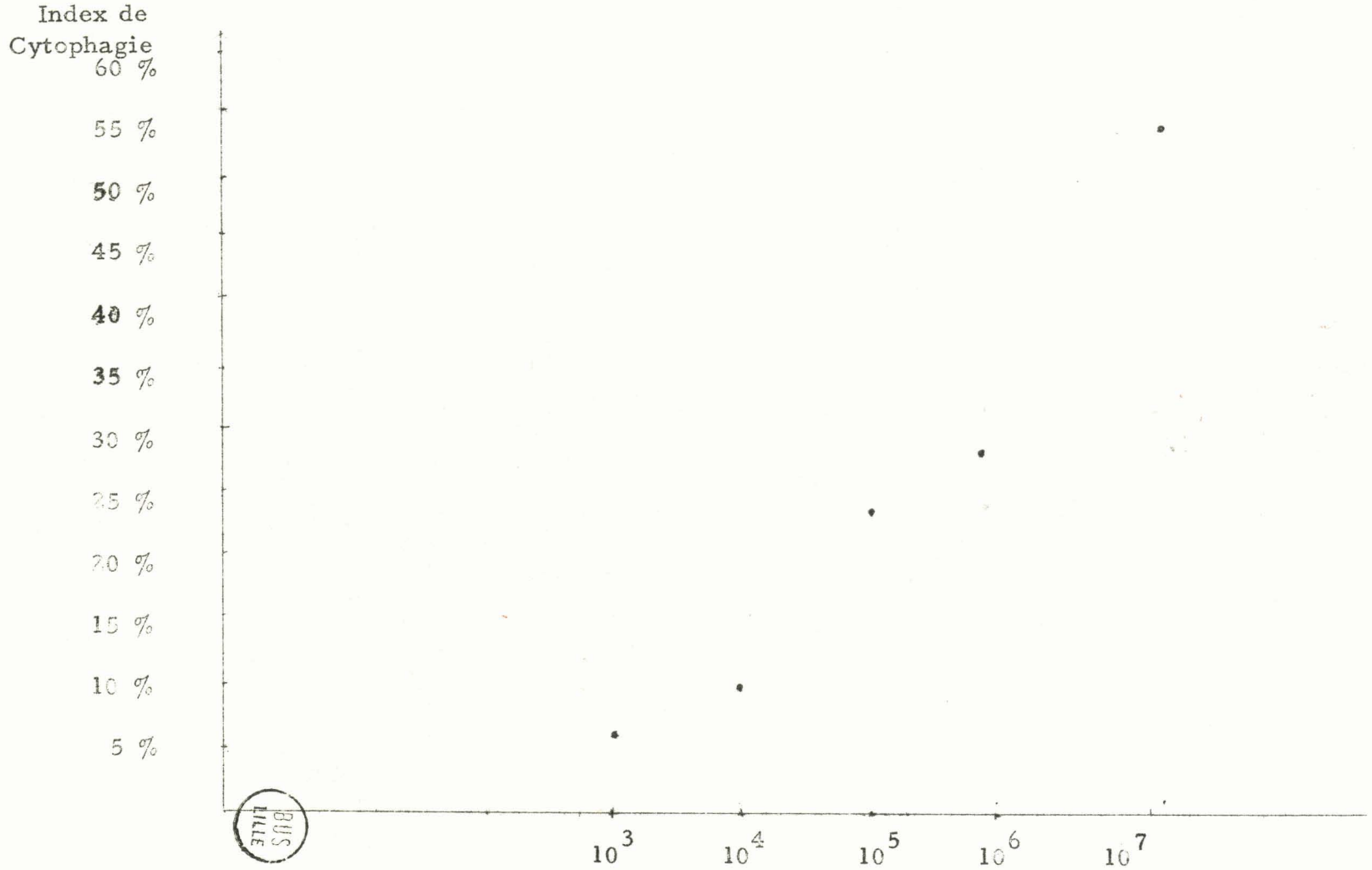
TABLEAU VII

INDEX DE CYTOPHAGIE



Exsudat de 18 à 22 heures

TABLEAU VIII



Exsudat de 48 h

TABLEAU IX

ADENOVIRUS CHAUFFE 1/2 heure A 56°.

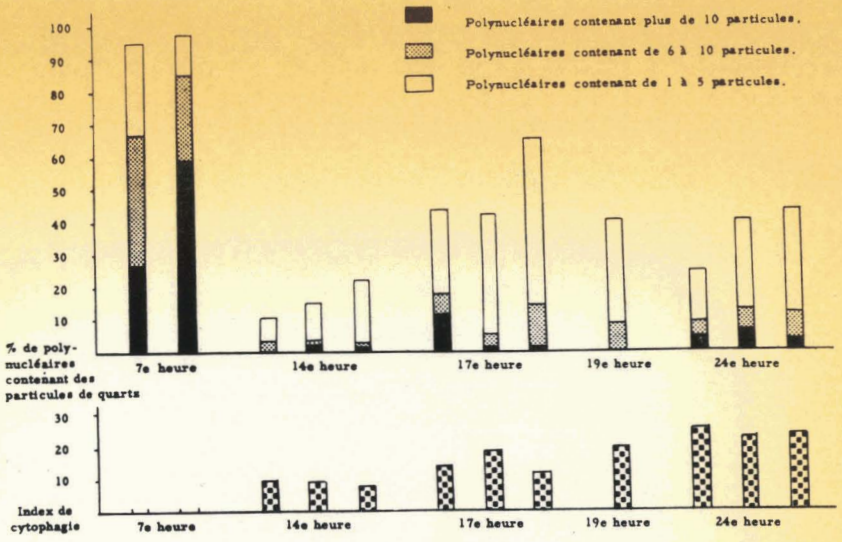
Un chauffage préalable de la suspension virale pendant 1/2 heure à 56° diminue les altérations morphologiques et le pourcentage des polynucléaires phagocytés. Celui-ci demeure cependant significatif alors que le pouvoir infectieux du virus est supprimé à cette température.

ADENOVIRUS CHAUFFE 5' A 100°

Un chauffage préalable à 100° pendant 5' fait disparaître la cytophagie et supprime également les perturbations cinétiques et les altérations morphologiques cellulaires constatées chez les animaux qui reçoivent le virus non chauffé.

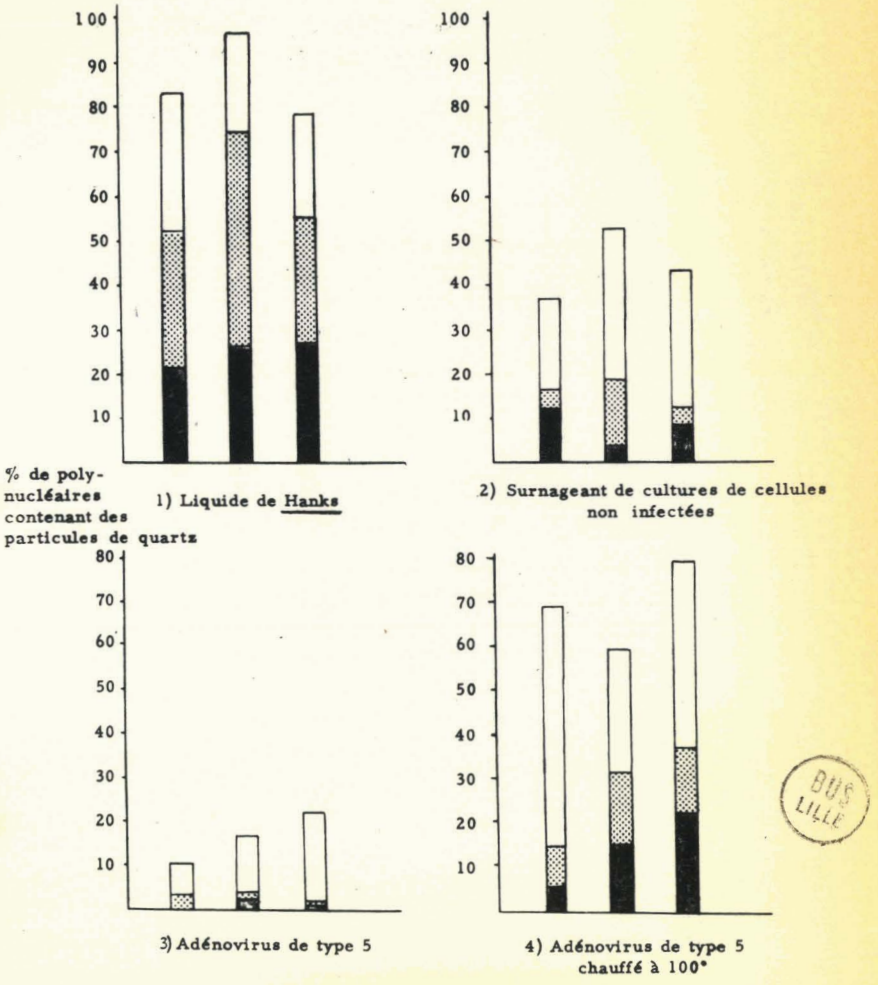
II - Etude de l'aptitude phagocytaire vis-à-vis des particules de quartz des leucocytes de l'exsudat obtenu par injection d'adénovirus type V.

L'aptitude phagocytaire de ces leucocytes appréciée "in vitro" montre une diminution très nette d'activité notamment pour les neutrophiles. Cette diminution d'activité ne se manifeste qu'après un temps de latence de plusieurs heures : les polynucléaires de l'exsudat récolté à la 7ème heure après l'injection intra-péritonéale présentent une aptitude phagocytaire intense alors que les cellules récoltées à la 14ème heure sont beaucoup moins actives : 10 à 20 % de polynucléaires seulement contiennent des particules de quartz.



APTITUDE PHAGOCYTAIRE VIS-A-VIS DES PARTICULES DE QUARTZ DES POLYNUCLEAIRES DE L'EXSUDAT DU COBAYE OBTENU PAR INJECTION INTRA-PERITONEALE D'ADENOVIRUS TYPE 5 (Etude in vitro)

Fig 1



ETUDE COMPARATIVE DE L'APTITUDE PHAGOCYTAIRE DES POLYNUCLEAIRES DE L'EXSUDAT OBTENU PAR INJECTION INTRA-PERITONEALE CHEZ LE COBAYE DE :
1) Liquide de Hanks ; 2) Surnageant de culture de cellules non infectées ;
3) Adénovirus de type 5 ; 4) Adénovirus de type 5 chauffé à 100°
(Exsudat récolté entre la 14e et la 16e heure)

Fig: 2

TABLEAU X

Dans les heures qui suivent, la phagocytose est plus marquée mais il faut noter que parallèlement l'index de cytophagie augmente,traduisant la disparition progressive des polynucléaires altérés par l'action des adénovirus (Tableau X , Fig.1).

La courbe d'aptitude phagocytaire des histiocytes suit celle des polynucléaires neutrophiles mais les variations apparaissent moins nettes.

Ces faits semblent bien dus à la particule virale. En effet lorsque l'on compare entre la 14ème et la 16ème heure l'activité des polynucléaires obtenus par injection 1) de liquide de Hanks, 2) de surnageant de cultures de cellules non infectées, 3) d'adénovirus viables, 4) d'adénovirus chauffés à 100°, pendant 5', on constate une nette diminution de la phagocytose du quartz sous l'influence des adénovirus vivants : (Tableau X, fig. 2) ce qui recoupe parfaitement les résultats de l'examen cinétique et morphologique des polynucléaires neutrophiles en microcinématographie en contraste de phase.

D - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PERITONEAL PROVOQUE PAR LE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE III.

a) Caractéristiques morphologiques et cinétiques de l'exsudat péritonéal.

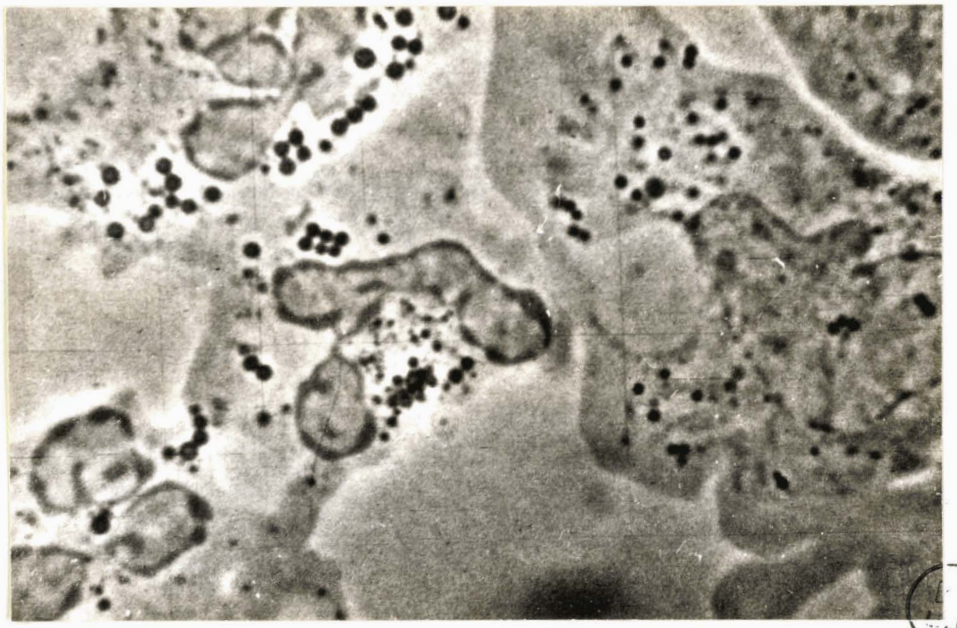
L'exsudat est de moyenne importance mais riche en cellules.

L'examen microcinématographique en contraste de phase révèle divers types d'altérations cellulaires surtout nettes dans les exsudats récoltés entre la 16ème et la 24ème heure.

Les polynucléaires neutrophiles apparaissent sensiblement normaux dans les 3 à 5 premières minutes qui suivent leur prélèvement de la cavité péritonéale. Leur morphologie interne, leur déplacement sont ceux que l'on observe lors des examens d'exsudats obtenus avec les cellules du surnageant de cultures non infectées. Mais passé ce court délai, les polynucléaires neutrophiles s'étalent brusquement sur le verre, les cellules voisines s'accolent parfois en formations d'allure syncytiale : les noyaux sont nettement visibles et déployés au sein du cytoplasme étalé, alors que les granulations en nombre normal sont animés de mouvements très vifs.

Par contre les cellules, ainsi étalées, sont immobilisées, incapables de se séparer les unes des autres lorsqu'elles sont accolées en formations pseudo-syncytiales. (planche IV)

Les macrophages présentent également des altérations morphologiques nettes : ces cellules ont un aspect arrondi, massif et sont fréquemment le siège d'une vacuolisation nette. Elles présentent une certaine tendance à l'accolement mais moins marquée que pour les polynucléaires neutrophiles. Leurs déplacements sont presque nuls. L'index de cytophagie s'accroît régulièrement à partir de la 16ème heure mais ne dépasse pas 10 à 15 % . L'index de cytophagie des exsudats entre 40 et 48 heures est en moyenne de 8 %.



FORMATION PSEUDO-SYNCYTIALE

OBSERVEE DANS L'EXSUDAT PERITONEAL PROVOQUE

PAR LE MYXOVIRUS PARAINFOUENZAE III Souche EA 102

PLANCHE IV

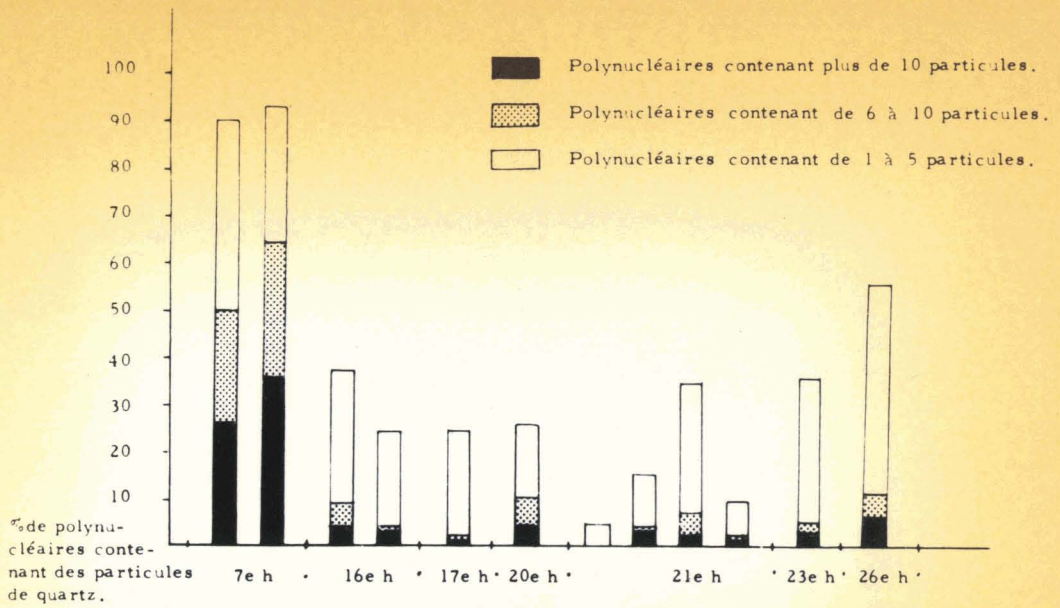
Les lymphocytes et les polynucléaires éosinophiles ne présentent pas d'altérations morphologiques ou cinétiques notables mais se trouvent parfois englobés dans une plage de cellules polynucléaires ou histiocytaires ce qui rend plus difficile leur étude.

b) Aptitude phagocytaire des polynucléaires et des macrophages vis à vis des particules de quartz.

Les polynucléaires neutrophiles, récoltés à partir de la 16ème heure et surtout vers la 21ème heure présentent une aptitude phagocytaire nettement inférieure à celle des polynucléaires récoltés à la 7ème heure et toujours inférieure à celle constatée chez les animaux témoins (Tableau XI, Fig. 1).

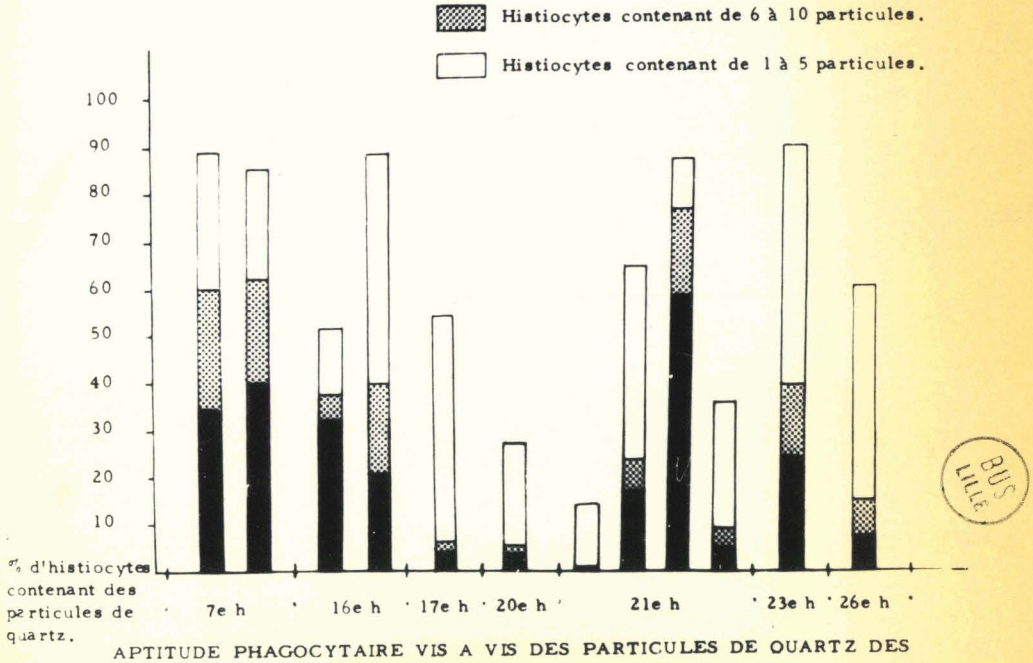
A partir de la 23 ème heure la phagocytose des particules de quartz est à nouveau plus intense mais il faut noter que parallèlement l'index de cytophagie des polynucléaires par les macrophages augmente, traduisant la disparition progressive des cellules les plus altérées. L'apport d'éléments cellulaires nouveaux au niveau de la cavité péritonéale, qui n'ont pas été soumis à l'action des Myxovirus parainfluenzae III de façon durable, contribue également à expliquer cette reprise d'activité phagocytaire.

Les variations de la courbe phagocytaire des histiocytes sont ici beaucoup moins nettes, fait que nous avions déjà noté dans le chapitre précédent avec les adénovirus (Tableau XI, Fig. 2).



APTITUDE PHAGOCYTAIRE VIS A VIS DE PARTICULES DE QUARTZ DE POLYNUCLEAIRES DE L'EXSUDAT RECOLTE 7 à 26 HEURES APRES INJECTION INTRA-PERITONEALE DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE TYPE III CHEZ LE COBAYE.

Fig 1



BUS LILLE

APTITUDE PHAGOCYTAIRE VIS A VIS DES PARTICULES DE QUARTZ DES HISTIOCYTES DE L'EXSUDAT RECOLTE 7 à 26 HEURES APRES INJECTION INTRA-PERITONEALE DE MYXOVIRUS PARAINFLUENZAE TYPE III CHEZ LE COBAYE.

Fig 2

TABLEAU XI

E - COMPORTEMENT DES CELLULES DE L'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE VIRUS VACCINAL.

a) Caractéristique de l'exsudat de 40 à 48 heures.

L'inoculation du virus vaccinal provoque dans la cavité péritonéale du cobaye un exsudat peu abondant mais très épais.

b) Morphologie et cinétique.

Les polynucléaires ont un aspect passif avec quelques mouvements sur place, ils sont analogues aux polynucléaires décrits avec l'adénovirus type V. On observe un certain nombre de noyaux pycnotiques.

Les histiocytes sont sidérés, souvent vacuolaires.

L'index de cytophagie est élevé et on observe quelquefois de nombreux polynucléaires par histiocytes. On note également un remaniement de la chromatine assez important.

Les lymphocytes et les éosinophiles ne semblent pas atteints. Nous avons essayé de mettre ces cellules en survie en flacons à lamelle dans un milieu de culture (liquide de Earle à l'hydrolysat de Lactalbumine) identique à celui utilisé pour la culture du virus sur cellules KB et Hela. De même que les cellules de l'exsudat péritonéal provoqué par le liquide de Hanks, elles se fixent sur le verre au départ, mais contrairement aux cellules témoins, elles se décollent et dégénèrent rapidement. Nous avons pu isoler le virus vaccinal sur cellules Hela ou KB à partir des leucocytes d'exsudats de 48 heures ou même d'exsudats de 48 heures mis quelques jours en survie . Mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de multiplication virale. La coloration à

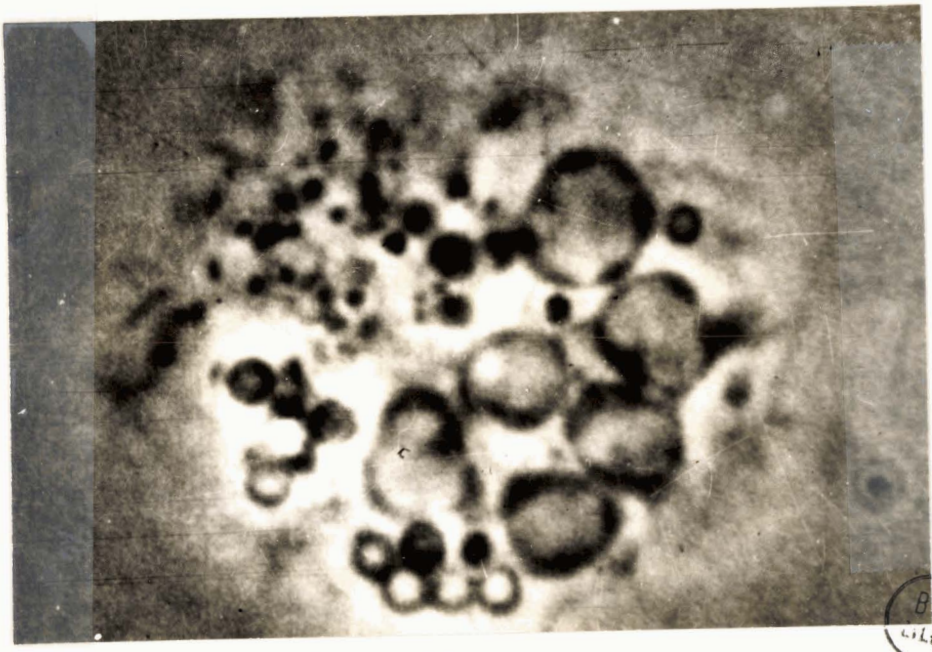


Fig a : Polynucléaire neutrophile

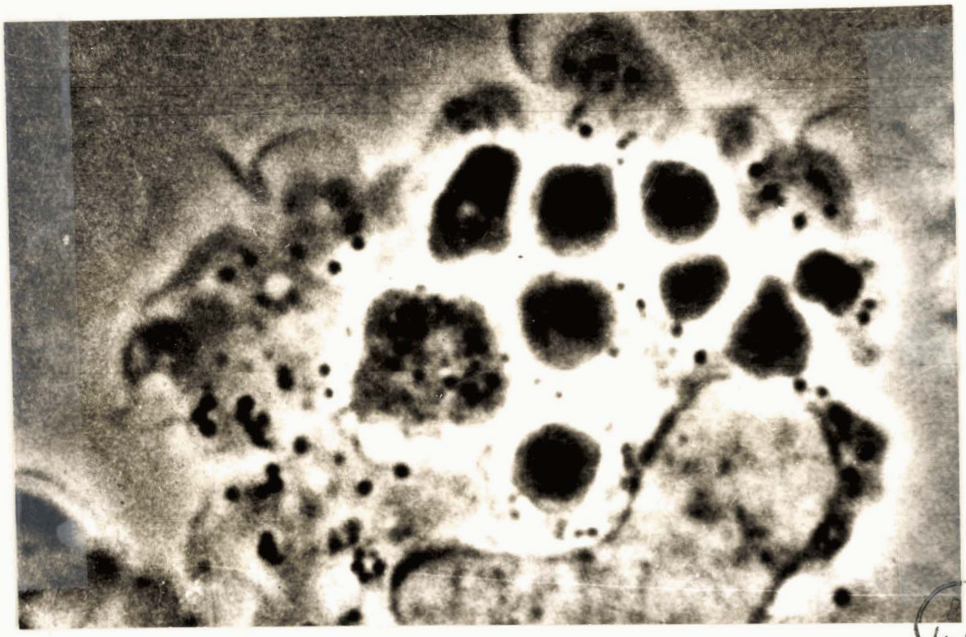


Fig. b : Cellule mononucléée ayant phagocyté de nombreuses cellules

CELLULES D'EXSUDAT PROVOQUE PAR LE VIRUS VACCINAL

PLANCHE V

l'hémalin éosine de cellules mises en survie montre chez certains cobayes autour du noyau des masses allongées foncées qui peuvent être interprétées comme des masses chromatiniennes provenant du noyau et remaniées ou comme des inclusions type guarnieri analogues aux inclusions observées dans les cellules de cultures de tissus : HeLa, KB, Amniotiques, RS avec ce même virus (LEBLOIS J. (141)).

DISCUSSION

D'une manière générale, on peut noter que l'injection de particules virulentes amène l'apparition d'un exsudat plus riche que chez les animaux témoins.

Les éosinophiles et les lymphocytes en petit nombre dans l'exsudat ne semblent présenter aucune modification caractéristique. Seuls les polynucléaires neutrophiles et les histiocytes montrent des altérations morphologiques et cinétiques importantes.

a) Altérations diverses

Certaines altérations morphologiques se rencontrent avec chaque virus étudié et sont le signe d'une souffrance cellulaire banale : cellules arrondies, massives avec déplacement nul ou limité à des mouvements de rotation sur place. D'autres altérations bien que non spécifiques comme nous le verrons plus loin, peuvent

caractériser de préférence telle ou telle atteinte virale : vacuolisation intense pour le virus grippal, tendance à l'étalement cytoplasmique avec accollements cellulaires pour le myxovirus parainfluenzae III, cytophagie importante et précoce pour l'adénovirus type V et le virus vaccinal.

Les accollements cellulaires ont retenu particulièrement notre attention, le virus EA 102 provoquant l'apparition de syncytiums en culture de cellules HeLa. En fait, les aspects que nous avons rencontrés ne correspondent pas à de véritables syncytiums : les granulations ne passent jamais d'une cellule à l'autre au cours de leurs deplacements et l'observation prolongée entre lame et lamelle montre qu'après 24 heures le cytoplasme cellulaire se rétracte, laissant réapparaître des cloisons intra-cellulaires nettement individualisées. Il est toutefois possible que les accollements observés soient liés à une altération de la membrane cellulaire dont le mécanisme reste à préciser.

Cette tendance à l'accollement et à l'étalement cellulaire ne saurait cependant être considérée comme spécifique ; de tels aspects sont parfois observés à l'examen d'exsudats provoqués par le virus de la grippe ou à la suite d'injection de tuberculine dans le péritoine d'animaux allergiques par exemple. Dans ces cas, seules quelques cellules présentent des altérations alors que celles-ci intéressent la quasi totalité des polynucléaires de l'exsudat provoqué par les myxovirus parainfluenzae III.

La cytophagie intense des polynucléaires par les histiocytes ne peut également être considérée comme spécifique d'une atteinte virale car elle a été signalée en outre par STEWART F.W., LONG P.H. et BRADLAY J.I. dès 1926 (142) lorsqu'ils étudiaient l'exsudat pleural provoqué par l'injection de tuberculine chez l'animal allergique. BORDET J. (143) la signale également lorsqu'il étudie l'exsudat péritonéal provoqué par du bouillon.

Il est vraisemblable que la cytophagie des polynucléaires représente un témoin indirect de l'altération de ces cellules sous l'action de facteurs divers, et soit, à ce titre, un élément intéressant pour l'étude de l'atteinte virale.

En effet, l'activité phagocytaire vis à vis du quartz, étudiéeavec l'adénovirus type V et le Myxovirus parainfluenzae III, montre qu'à un certain moment : vers la 14ème heure pour l'adénovirus type V, vers la 20ème heure pour les myxovirus, alors que la cytophagie n'est pas encore importante, il y a dans la cavité péritonéale du cobaye une réduction très nette de l'activité de ces polynucléaires qui sont alors une proie toute trouvée pour les histiocytes qui commencent à affluer dans la cavité péritonéale.

b) Les modifications morphologiques et cinétiques sont-elles dues aux virus phagocytés ?

Pour montrer que les modifications morphologiques et cinétiques sont bien dues à la présence du virus dans ces cellules péritonéales, nous avons tenté de réisoler le virus des exsudats.

Unités hémagglutinantes inoculées	Laps de temps entre l'inoculation et la récolte	Titres hémagglutinants			
		Liquide lavage péritonéal (5 ml)	Liquide 2e lavage cellulaire (2 ml)	cellules congelées et décongelées 2 fois (2 ml)	L.A. oeuf inoculé avec cellules
1920	22 h	0	0	1/5	0
3840	22 h	1/5	0	1/10	1/40
3840	22 h	1/5	0	1/5	1/160
3840	22 h	0	0	1/5	1/160
1920	44 h	0	0	0	0
1920	44 h	0	0	pur	0
1920	44 h	0	0	pur	0

TABLEAU XII

Isolement du virus à partir des exsudats péritonéaux provoqués par le virus grippal B. Lee.

Le tableau XII montre que : 22h après l'inoculation du virus dans la cavité péritonéale :

- on peut facilement réisoler le virus des leucocytes sur oeufs de poule embryonnés. Le premier liquide de Hanks ayant servi à laver les leucocytes de l'exsudat est quelquefois positif en hémagglutination (hémagglutination des hématies de poule). Le liquide du deuxième lavage est toujours négatif par la même méthode. Par contre, les cellules lavées, congelées et décongelées sont positives en hémagglutination et les titres après inoculation dans la cavité allantoïque d'oeufs de poule embryonnés peuvent atteindre 1/160 ; ce qui montre que le virus associé aux leucocytes possède toujours son pouvoir infectant en même temps que son pouvoir hémagglutinant.

: 44h après l'inoculation du virus dans la cavité péritonéale :

- on ne retrouve plus de virus en dehors des leucocytes et il semble avoir perdu son pouvoir infectant.

Isolement de virus des exsudats péritonéaux provoqués par le virus vaccinal.

Le virus vaccinal a pu être isolé sur cellules HeLa et KB 6 fois sur 12 à partir des leucocytes soit d'exsudats de 48h, soit d'exsudats de 48h mis quelques jours en survie. Mais nous n'avons

pu noter de montée du titre du virus pouvant apporter une preuve de multiplication virale à l'intérieur des leucocytes. Le virus a été retrouvé 3 fois sur 10 du premier liquide de lavage.

Chez le cobaye, animal réfractaire à beaucoup d'infections virales (entre autres, aux myxovirus influenzae et parainfluenzae, aux adenovirus, au virus vaccinal), l'atteinte cellulaire ne peut être mise sur le compte de la multiplication virale. Il semble plus logique d'incriminer une toxicité propre des particules virales s'exerçant à l'échelon cellulaire. Les altérations cellulaires morphologiques et cinétiques variant suivant l'agent pathogène étudié, laisseraient entrevoir l'existence de modalités d'action toxique différentes.

Cette action toxique est thermolabile et un chauffage préalable la supprime. Le chauffage de la suspension grippale 1/2h, à 56° suffit à détruire le pouvoir toxique de ce virus et parallélement abolit les altérations des leucocytes de cobaye.

Un chauffage à 100°, pendant 5' supprime complètement les altérations cellulaires dues à l'adénovirus V tandis qu'un simple chauffage à 56° pendant 1/2h supprime le pouvoir infectieux de ce virus mais l'effet toxique est encore significatif.

L'immunisation préalable de l'animal contre le myxovirus influenzae B prévient de même les effets du pouvoir toxique de ce virus tout au moins partiellement.

Le pouvoir toxique des virus a déjà été étudié par différents auteurs. En 1951-1953, BORDET P. et QUERSIN-THIRY L. (144) étudient l'action du virus grippal sur le cobaye. L'inoculation

intrapéritonéale du virus grippal provoque un exsudat abondant, des images de pycnose des polynucléaires et un accroissement considérable de la réceptivité à diverses infections bactériennes. Cette influence est abolie par chauffage préalable du virus à 60° pendant 30'. Cette influence favorisante qu'exerce le virus grippal sur certaines infections associées relève, disent-ils, également, d'une action toxique du virus grippal. Elle se manifeste sans délai après l'injection d'une dose massive de virus au cobaye non réceptif à l'infection grippale. Cette augmentation de réceptivité est nulle vis à vis du pneumocoque, considérable à l'égard du streptocoque hémolytique et surtout vis à vis du bacille de Pfeiffer. Cette action pro-infectieuse du virus grippal est bien connue en pathologie humaine. Une suite de travaux expérimentaux ont été publiés à ce sujet : le streptocoque (CARLISLE H.N., HUDSON P. (145)) (WILSON H.E. et son équipe (146)), le staphylocoque (DACHY A. (147), GALEAZZI F. VISCO (148) , le pneumocoque (HARFORD C.G. et son équipe (149)), le bacille tuberculeux (VOLKERT M. et son équipe (150)), et surtout hémophilus influenzae (BUDDINGH G.J. (151), FRANCIS T., TORREGROSA M.V. (152a)) ont un pouvoir exalté lorsqu'ils sont associés aux virus.

En 1946, HENLE G. et HENLE W. (152) constatent que, injecté à forte dose par voie intraveineuse ou intra-abdominale, le virus grippal A PR8 sans se multiplier de façon apparente tue la souris avec lésions au bout de 9 à 96h, alors que l'infection grippale

n'a pas eu le temps de se développer. Cet effet est neutralisé par l'antisérum PR8 et non par l'antisérum B.

De même ZAKAY-RONESS et son équipe (153) montrent que l'inoculation intraveineuse à haute concentration du virus vaccinal chez la souris cause la mort des animaux en 12 à 24h sans qu'aucune multiplication virale soit décelable. Les faibles concentrations de virus sont sans effet.

Le virus purifié au fluorocarbone donne les mêmes effets que le virus brut.

Parmi les changements pathologiques observés, on note surtout des hémorragies sévères dans le foie, dues aux lésions des capillaires endothéliaux. Ceci serait en accord avec les travaux de BRUNNER K.T. et ses collaborateurs (154) qui, en inoculant à la souris les virus de la Stomatite Vésiculaire et le virus Newcastle purifiés et marqués avec du P 32, par voie intraveineuse, observent que ces virus sont enlevés de la circulation sanguine par les cellules réticulo-endothéliales du foie. Ces auteurs concluent qu'il s'agirait d'un effet toxique.

En 1961, KATO N. et HARA H. (155) montrent que l'injection intraveineuse d'une suspension concentrée de virus grippal A PR8 cause également la mort des lapins, animaux non récepteurs à ce virus, par action toxique au bout de 8 à 16h. De plus, la mort survient également après injection de virus ultrasonné 1h (virus qui a perdu beaucoup de son pouvoir infectieux chez les embryons de

poulet) avec lésions identiques à celles du lapin infecté avec le virus intact. Les suspensions de virus inactivés par la chaleur et les UV perdent leur effet lethal sur les lapins, c'est à dire leur pouvoir toxique et leur pouvoir infectieux chez les embryons de poulet, tandis que leurs titres hémagglutinants sont maintenus.

NISHMI M. et BERNHOPF H., en 1958, (156) devant l'absence de multiplication du virus vaccinal en culture de leucocytes de souris et les lésions cytoplasmiques observées, font une série d'expériences en traitant ce virus soit par la chaleur soit par les UV. Le chauffage à 56° pendant 40' diminue les effets cytoplasmiques sur les cultures de leucocytes de souris mais le pouvoir infectant demeure en culture de cellules amniotiques. Le chauffage à 60° inhibe complètement les deux effets.

L'exposition aux UV pendant 5' abolit complètement les modifications morphologiques dans ces mêmes cultures mais le pouvoir infectieux demeure en cellules amniotiques.

Ces auteurs aboutissent aux mêmes conclusions : les propriétés toxiques du virus grippal accusent une résistance au chauffage intermédiaire entre celle du pouvoir infectant et du pouvoir hémagglutinant et sont spécifiquement neutralisées par les immuns-sérums correspondants. Les éléments responsables des effets toxiques sont indépendants à la fois du pouvoir infectant et du pouvoir hemagglutinant que possède le virus.

Le pouvoir infectant et le pouvoir toxique des virus dépendent de constituants différents à l'intérieur de la particule virale.

Le "facteur toxique" des adénovirus a pu être séparé de la particule infectieuse par centrifugation. C'est un facteur soluble de nature protéique. Il est détruit par l'action de la trypsine mais résiste au chauffage à 56°. En cultures de cellules épithéliales, on note deux effets cytopathogènes distincts du virus : le premier, dû à la multiplication du virus, est caractérisé par le développement d'inclusions intranucléaires et une destruction cellulaire tardive. Le second, plus précoce, se traduit par un arrondissement et une agglutination des cellules sans perturbations de leur métabolisme. C'est ce second effet qu'on qualifie de toxique. Nous ne pouvons cependant pas conclure de nos expériences, que l'effet des adénovirus sur les cellules de l'exsudat péritonéal provoqué chez le cobaye est lié à la particule virale elle-même ou à la "protéine toxique" étudié par PEREIRA (157).

II - ETUDE DE LA CYTOTOXICITE IN VITRO DU MYXOVIRUS INFLUENZAE B LEE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES DE COBAYE.

1 - Etude en microcinématographie en contraste de phase.

2 - Etude en Microscopie Electronique

3 - Répercussion sur leur métabolisme en appareil de Warburg.

- MATERIEL ET METHODE

- VIRUS

Le virus grippal est le Myxovirus influenzae B, souche Lee, inoculé dans la cavité allantoïdienne d'oeufs de poule embryonnés de 10 jours. Le liquide allantoïdien est récolté 48h plus tard. Il est fixé sur des hématies de poule puis élué soit dans du liquide de Hanks, soit dans le milieu nutritif utilisé pour l'expérience. On obtient ainsi des suspensions à 1280 - 2560 - 5120 unités hémagglutinantes par ml.

Une partie des virus est mise en ampoule scellée et chauffée 1/2 heure à 56°. Un liquide témoin est préparé de la même façon à partir d'un liquide allantoïdien non infecté.

- MACROPHAGES ALVEOLAIRES

a) Obtention des cellules

Des cobayes d'un poids moyen de 500 grs sont sacrifiés à l'éther et le bloc cardio-pulmonaire prélevé après occlusion préalable de la trachée. 5 ml de liquide Hanks chauffé à 37° sont ensuite injectés par voie trachéale et le tissu pulmonaire est massé doucement avant réaspiration du liquide. Cette opération est répétée 4 fois (technique de Myrwick modifiée (158)). Le liquide de lavage pulmonaire est centrifugé, le culot cellulaire remis en suspension dans le liquide de Earle à l'hydrolysat de Lactalbumine additionné de sérum de veau 10% et d'antibiotiques à raison de 1 million de cellules par ml. Les cellules sont mises en flacons de 250 ml (50 ml par flacon) ou en petits flacons à lamelles de 25 ml (2 ml par flacon), suivant leur emploi.

Le nombre des cellules récoltées varie de 20 à 40 millions par animal. L'examen microscopique révèle un mélange en proportions variables d'un animal à l'autre de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, de cellules bronchiques et de cellules mononucléées, ces dernières sont d'origine alvéolaire, seules, elles se fixent sur le verre et constituent notre matériel d'étude. Elles représentent 40 à 60% des cellules récoltées, les autres sont éliminées au premier changement de milieu.

b) Méthode d'étude en microcinématographie.

La suspension de macrophages alvéolaires

obtenus par lavage des poumons de cobaye, est placée dans un flacon de 250 ml à fond plat. Après 3h de sédimentation, le milieu est changé et remplacé par le milieu de survie.

Les macrophages alvéolaires fixés au verre sont placés dans ces conditions pendant 24h à 37°. Les cellules sont alors détachées de leur support par une solution de versène dont la composition est la suivante :

EDTA (sel sodique de l'acide éthylène diamine tetra acétique)... 1,25 g
NaCl..... 8g
KCl..... 0,20 g
$Na_2H\ PO_4$..... 1,15 g
KH_2PO_4..... 0,20 g
H_2O q.s.p..... 1 litre

Les cellules sont numérées et remises en suspension dans le milieu de survie à raison de 1.000.000 de cellules par ml en tubes siliconés. On ajoute alors, soit le virus grippal à raison de 50, 200, 320, 400 unités hémagglutinantes par ml soit le virus chauffé, soit le liquide témoin.

Après 2 heures de contact, les cellules en suspension sont placées dans de petits flacons sur le fond plat desquels est disposée une lamelle, sur laquelle les cellules se fixent après sédimentation.

Cette lamelle est prélevée à des intervalles de temps réguliers, montée en cellule de Barski, et le comportement cellulaire est filmé en microscopie en contraste de phase, en chambre C. Zeiss maintenue à 37° centigrades. Les prises de vue sont

effectuées à raison d'une image toutes les 4 secondes, et le film obtenu projeté à 16 images seconde (accélération d'observation : 64).

c) Méthode d'étude en microscopie électronique.

Les macrophages alvéolaires sont mis en présence du virus grippal dans les mêmes conditions que préalablement mais demeurant en tubes siliconés : les cellules sont prélevées à des intervalles de temps réguliers après l'introduction du virus, et immédiatement fixées à l'acide osmique à 2% en tampon Dalton (au bichromate de potassium), à 0° pendant 1 heure.

Après déshydratation suivant la méthode classique, l'inclusion est faite dans l'Epon (Epikote 812).

Les coupes sont effectuées à l'ultra microtome Porter Blum sur couteaux de verre et montées sur grilles nues. Elles sont ensuite colorées à l'hydroxyde de plomb pendant 10'. L'examen est effectué au microscope électronique Hitachi H.U. 11 A.

d) Méthode d'étude du métabolisme cellulaire en appareil de Warburg.

Les macrophages alvéolaires sont obtenus dans les mêmes conditions que précédemment.

Après 24 heures de culture, les cellules sont versinisées. Le virus grippal souche B Lee, soit non traité, soit traité par chauffage à 56°, pendant 30', est utilisé à raison de 200 unités hémagglutinantes pour 10^6 macrophages.

- Les mesures de consommation d'oxygène sont effectuées en appareil de Warburg. Les fioles, munies d'un intermédiaire contenant un filtre de coton stérile, sont autoclavées au préalable. Les cellules sont mises en suspension dans 1ml de milieu nutritif dont la composition est donnée ci-dessous (pour 1 ml) :

Cl_2 Ca anhydre $1,75 \times 10^3$M ; $SO_4Mg, 7 H_2O$ $5,9 \times 10^4$M ; ClNa $8,5 \times 10^3$ M ; CIK $3,9 \times 10^4$; glucose $1,1 \times 10^3$M ; NaoH 5×10^4 M ; Hydrolysat de lactalbumine 3660 g ; levure 732 g ; vitamines 6,6 µlitres (Biotine 1g., acide folique 1 g., acide nicotinique 1 g., acide panthotenique 1 g., thiamine 1 g., riboflavine 0,1 g, MesoInositol 2 g., choline 1 g., eau bidistillée 1000 ml) ; sérum de veau 66 µlitres; Antibiotiques 2,6 µlitres (Pénicilline 500 U; Streptomycine 50 µg, Néomycine 50 µg, eau bidistillée 1 ml).

La composition d'une fiole est la suivante :

- 1 ml de milieu contenant $4\ 10^6$ cellules auquel on ajoute 0,2 ml d'une solution de glucose marqué soit uniformément (glucose U^{14} C, CEA), soit sur le carbone 1 (glucose $1^{14}C$, Amertsham), soit sur le carbone 6 (glucose $6^{14}C$, Amertsham) (0,2 microcuries/0,2 ml H_2O bidistillée).
- 0,2 ml de KOH décarbonatée dans le godet central,
- 0,2 ml d'une solution de TCA 10% dans une anse latérale,
- 0,4 ml de suspension virale (milieu ci-dessus) dans l'autre anse.

Au temps zéro, la suspension virale est versée dans le milieu contenant les macrophages. Les mesures manométriques sont effectuées toutes les 30 minutes, puis toutes les heures. Les résultats sont exprimés en micromoles d'oxygène consommées en 24 heures par 4 10^6 cellules.

Mesure du CO_2 marqué.

En fin d'expérience, on verse le T.C.A. dans la suspension cellulaire pour libérer le CO_2 total dissout. L'appareil est laissé en mouvement pendant 30 minutes, puis on recueille le carbonate de potassium contenu dans le godet central de la fiole. Ce godet est rincé 6 fois de suite à l'eau tridistillée décarbonatée. Le CO_2 est précipité sous forme de CO_3Ba par addition de 1 ml de Cl_2 Ba à saturation en présence de $ClNH_4$. La suspension est passée sur filtre (millipore, 0,45 μ), lavée à l'eau. Les filtres sont séchés sous lampe infra-rouge, fixés sur plaques métalliques et la radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur Geiger à faible bruit de fond.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de ^{14}C. du CO_2 dégagé par rapport au ^{14}C. total du glucose utilisé. Compte tenu de la quantité de glucose marqué mis en jeu en début d'expérience et de la quantité de glucose froid présent dans le milieu réactionnel, il est facile de calculer la quantité de glucose utilisée par les cellules d'une fiole durant l'expérience.

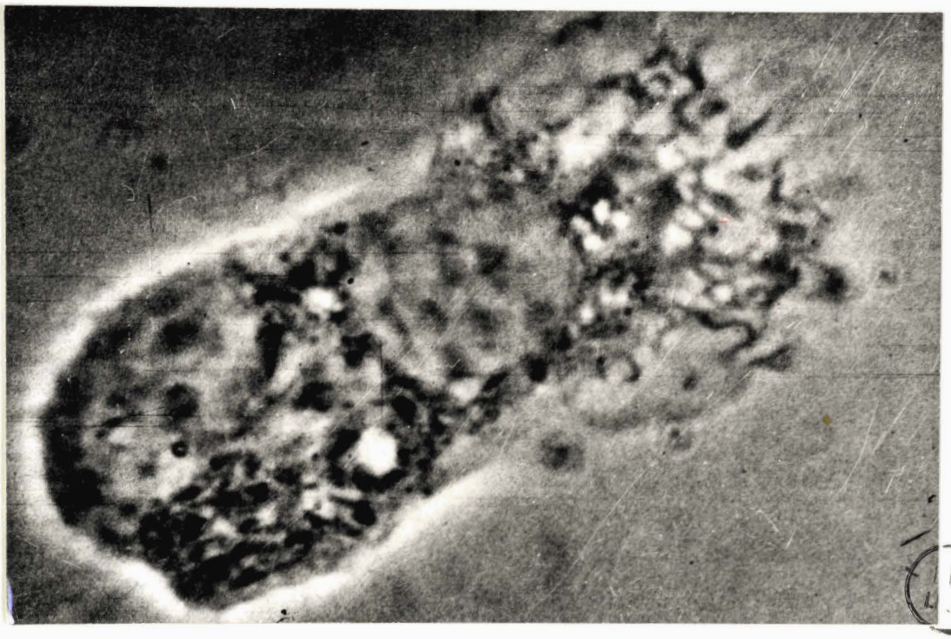
RESULTATS

A - MORPHOLOGIE ET CINETIQUE DU MACROPHAGE ALVEOLAIRE - STRUCTURE DU VIRUS GRIPPAL B. LEE

- Macrophage alvéolaire

Un grand nombre d'expériences sur les macrophages alvéolaires de cobaye ont été réalisées par nous (350 animaux) et ont servi à d'autres buts. Cette technique permet, en effet, l'étude non seulement de la toxicité des virus mais celle de bien d'autres substances entre autres des poussières de charbon et de silice.

Le jour de la récolte, les macrophages ont un aspect massif et ne présentent qu'une faible activité cinétique interne. Les inclusions sont nombreuses et de taille variable et l'on note l'existence fréquente de larges vacuoles cytoplasmiques. Les cellules possèdent habituellement un noyau arrondi, parfois polylobé, rarement 2 ou plusieurs noyaux (planche VI - fig a). A partir du 2ème jour de culture d'importantes modifications morphologiques et cinétiques surviennent. Les cellules émettent des prolongements adhérents au verre, les inclusions cytoplasmiques deviennent moins nombreuses, les vacuoles disparaissent. La microcinématographie révèle un voile périphérique dépourvu de granulations, doués de mouvements amples et d'une intense activité pinocytaire (planche VI - fig b). Le nombre des cellules décroit chaque jour. On ne note pas de multiplication



? Fig. a - Macrophage alvéolaire le jour de la récolte.

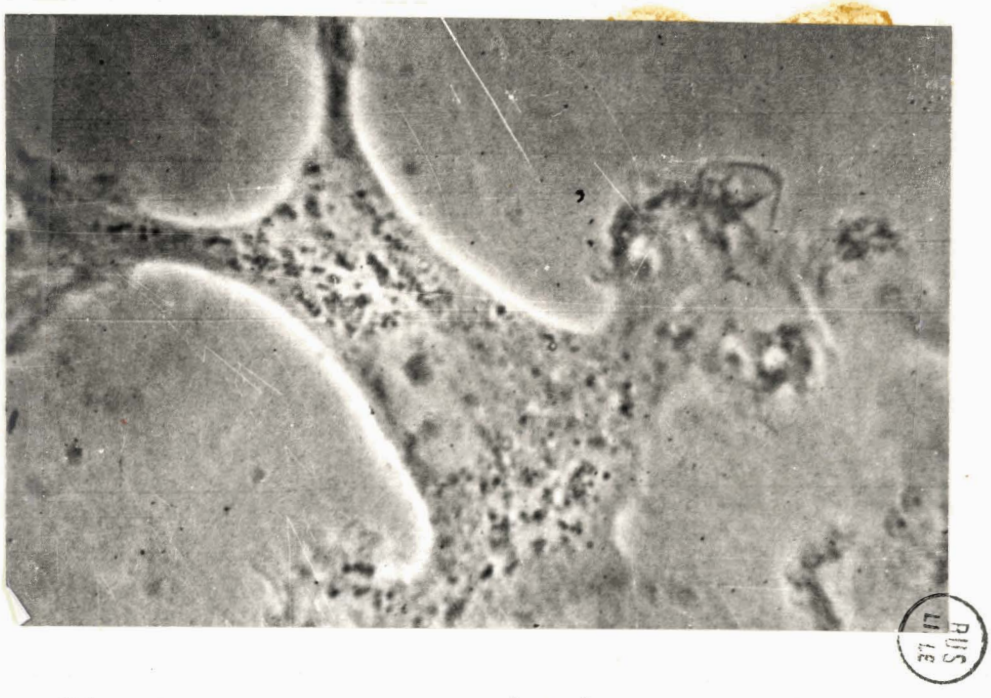


Fig. b - Macrophage alvéolaire en survie de 4 jours.

PLANCHE VI

Macrophage Témoin en survie depuis 24 h :
aucun signe d'altération nucléaire ou cytoplasmique
Grossissement : X 21.000

PLANCHE VII

cellulaire. Nos expériences ont été réalisées avec des cellules de 24 heures de survie. Ces cellules après versinisation et séjour en tubes siliconnés de 2 heures se recollent dans une large proportion. Observées quelques heures plus tard elles sont légèrement vacuolaires mais ne présentent pas de signes de souffrance.

L'étude au Microscope Electronique des coupes minces de ces macrophages montre un noyau limité par une double membrane avec un nucléole, des mitochondries avec crêtes bien visibles, l'ergastoplasme, de nombreuses inclusions. Des prolongements entourent la cellule correspondent à la membrane ondulante formant des replis (Planche VII).

Structure du virus grippal B Lee

La méthode de coloration négative de Brenner et Horne, 1957 a permis l'étude détaillée de ce virus au Microscope Electronique (HOYLE L., HORNE R.W., WATERSON A.P., 1961 (159)). Nous avons examiné par ce moyen notre suspension virale : Les particules ont une forme sphérique exceptionnellement allongée. On observe une membrane bien définie recouverte de projections régulièrement disposées autour de la particule. (planche VIII). Nous n'avons pas observé de structure hélicoïdale à l'intérieur du virion mais nous nous sommes bornés qu'à l'observation du virus complet. Certaines particules ont un centre opaque aux électrons, montrant la pénétration de l'acide phosphotungstique à l'intérieur par une fissure probable de la membrane. Nous allons retrouver ce même virus en

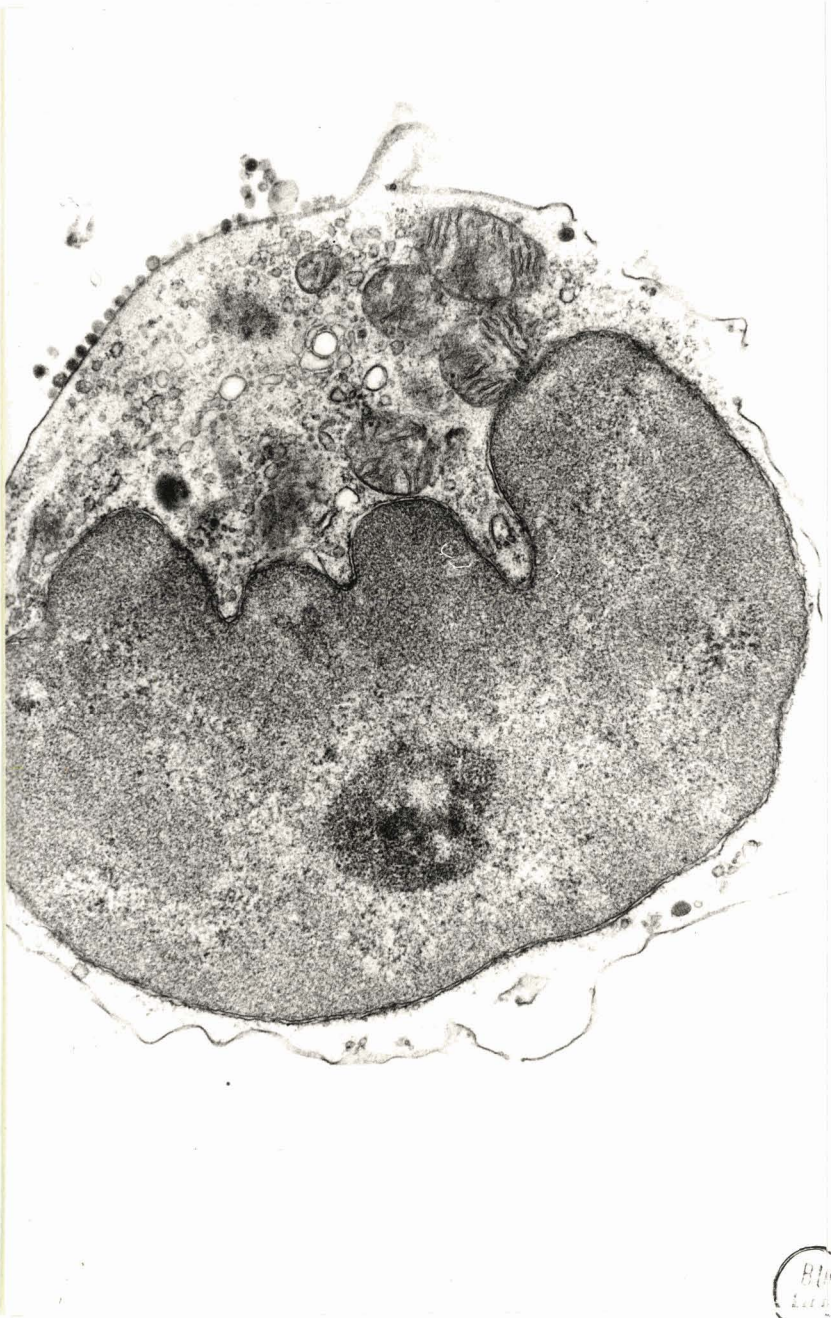
contact des macrophages en coupe ultra-fines. Certaines particules montrent nettement la membrane et les projections périodiques.

BIU LILLE

Myxovirus influenzae B Lee. (Coloration en contraste négatif).

Grossissement : X 105.000

PLANCHE VIII



Macrophage fixé après I h de contact
avec le virus. Les particules virales sont agglutinées
à la membrane cellulaire. Grossissement : X I5.000

PLANCHE IX

B - ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE.

- des particules virales.

La Microscopie Electronique permet seule de suivre les différentes étapes de la pénétration des particules virales dans la cellule alvéolaire. Dans un premier temps, et dès la première heure de la mise en contact des macrophages et du virus grippal, on note la fixation sur la membrane cellulaire, de nombreuses particules (planche IX).

D'autre part, des amas de virus sont visibles dans les replis de la membrane ondulante (planche X).

Dès la première heure, on note également, dans le cytoplasme cellulaire, la présence de virus rassemblés dans de petites vacuoles (planche XI).

A ce stade, aucune altération morphologique des infrastructures cytoplasmiques, ni du noyau cellulaire n'est visible .

Pendant les heures qui suivent, la phagocytose va se poursuivre , et l'on trouve encore à la 7ème heure et même plus tardivement, des particules virales facilement identifiables fixées à la membrane cellulaire (planche XII). A ce stade cependant apparaissent les premiers signes de souffrance du macrophage alvéolaire.

- des particules virales chauffées préalablement 1/2 heure à 56°.

Lorsque le virus grippal a été préalablement chauffé 1/2 heure à 56°, on observe au Microscope Electronique qu'un petit nombre de particules se fixent en périphérie de la cellule. La phagocytose se produit cependant mais n'entraîne aucune altération morphologique des

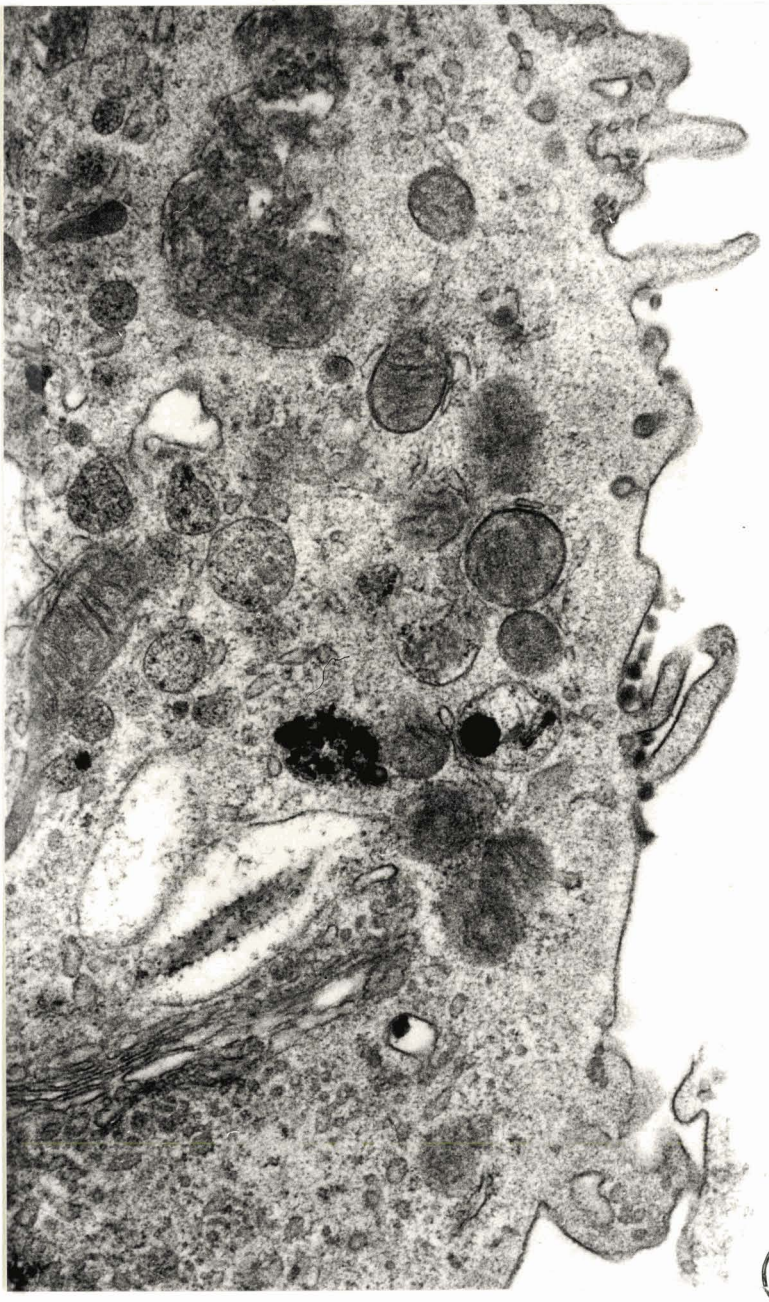
cellules (planche XIII) qui apparaissent en tous points semblables aux cellules témoins (planche VI).

- des particules virales chez les animaux vaccinés.

L'observation a été faite en Microscopie Electronique après 24 heures de contact virus-cellules. On observe des débris cellulaires contenant de nombreuses particules virales mais aussi des cellules intactes avec des particules virales en périphérie.
En Microcinématographie les macrophages de cobayes vaccinés mis en présence de virus B Lee montrent également d'importantes lésions, comme le montrent les résultats suivants.

Titre d'inhibition de l'hémagglutination sérum de cobaye	UH/Million de cellules	Observations Microcinématographiques
1/40	100 UH	Lésions importantes en 24 heures
1/80	100 UH	Vacuoles - Lésions de quelques cellules
1/160	100 UH	Lésions importantes en 24 heures
1/160	100 UH	Lésions importantes en 48 heures
1/160	100 UH	quelques lésions cellulaires
1/320	100 UH	destruction cellulaire en 24 heures
1/320	100 UH	Lésions importantes en 24 heures

Si le virus est mis en contact préalablement 1/4 h avec du sérum immun décomplémenté 1/2 h à 56°, on ne constate aucune

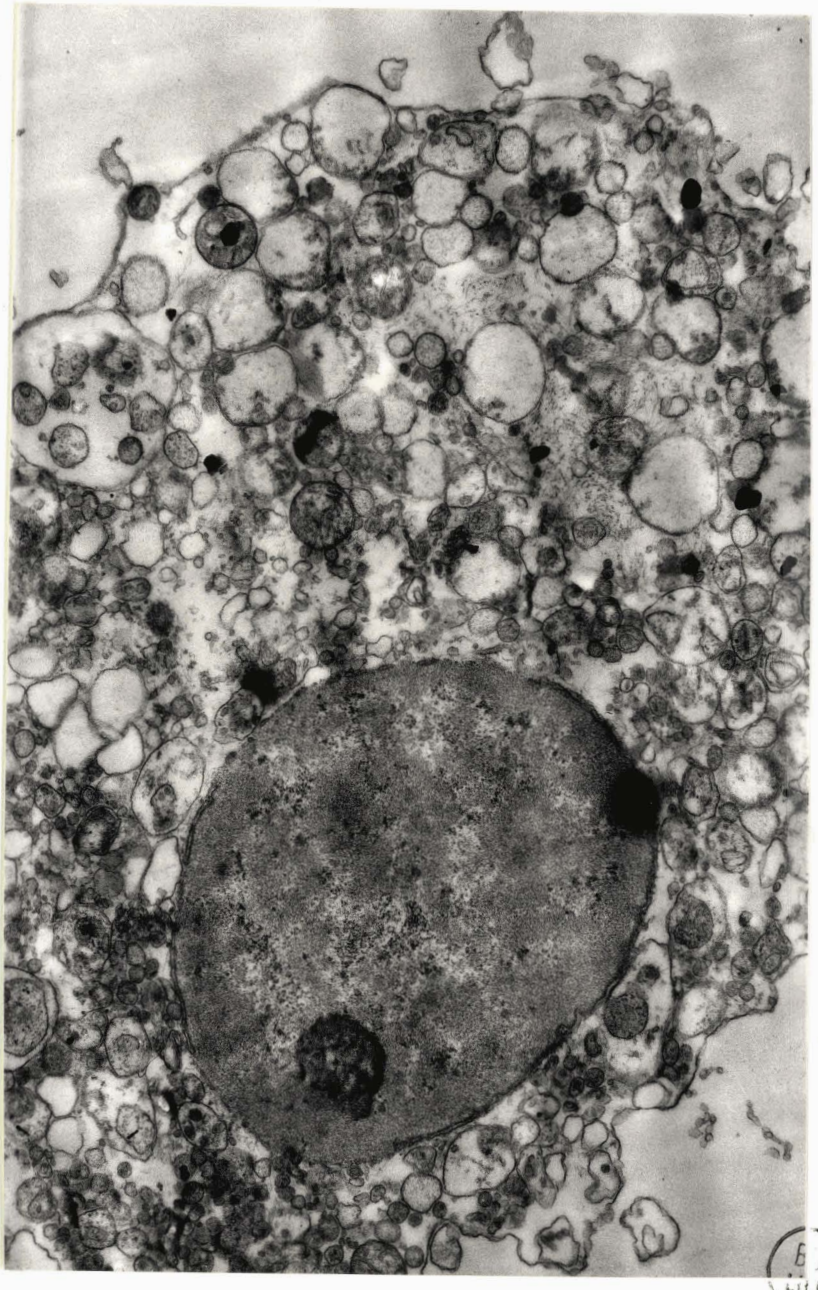


Macrophage fixé I h après la mise en contact avec le virus. Début de la phagocytose : les particules virales sont entonnées par les pseudopodes. Grossissement : X 27.000

PLANCHE X

Particules virales dans une vacuole du macrophage (macrophage fixé après I h de contact avec le virus). Grossissement : X 75.000

PLANCHE XI



BIS LILLE

Macrophage fixé 7 h après mise en contact avec le virus. Début de dégénérescence cytoplasmique : gonflement des espaces intraergastoplasmiques. Le noyau paraît encore intact. Grossissement : X I2.000

PLANCHE XII

Macrophage alvéolaire fixé 2 h après la mise en contact avec des particules virales chauffées I/2 h à 56°. On trouve des particules dans une vacuole
Grossissement X : 27.000

PLANCHE XIII

lésion (4 cobayes). Si le virus est préalablement chauffé 1/2 h à 56°, les cellules ressemblent en tous points aux cellules témoins (5 cobayes).

C - CONSEQUENCES DE LA PHAGOCYTOSE DE VIRUS.

1) Sur le comportement cinétique des macrophages alvéolaires.

a) Macrophages en contact in vitro avec le virus grippal.

Lorsque les cellules sont mises en contact avec le virus B Lee, on observe des signes nets de souffrance vers la 12ème heure intéressant d'autant plus de cellules dans la préparation que la quantité de virus introduite dans les tubes siliconés a été plus importante. Les macrophages ont un aspect massif, arrondi sans prolongements cytoplasmiques visibles, le voile disparaît, au fur et à mesure que le temps de contact virus-macrophage s'allonge, les modifications morphologiques et les perturbations cinétiques s'accentuent. On assiste un peu à la fois à la mort cellulaire, le cytoplasme ne concentre dans la cellule, le noyau subit des modifications importantes (planche XIV, Fig. a), enfin il y a ballonisation et mort cellulaire.

b) Macrophages en contact in vitro avec le virus grippal chauffé 1/2 h à 56°.

Le virus chauffé à 56° pendant 1/2 h perd son pouvoir infectieux et son pouvoir toxique mais il garde en partie son pouvoir hémagglutinant. Les cellules en contact avec le virus B Lee chauffé ne montrent aucun signe de souffrance et ressemblent en tous points aux cellules témoins (planche XIV, fig. b).

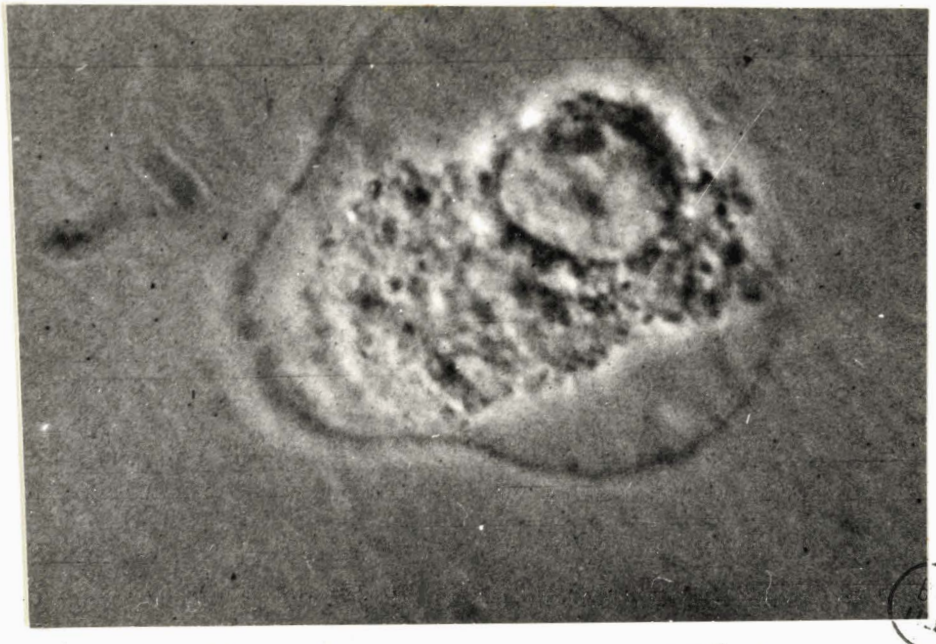


Fig. a - Macrophage ayant phagocyté des particules virales 24h avant.

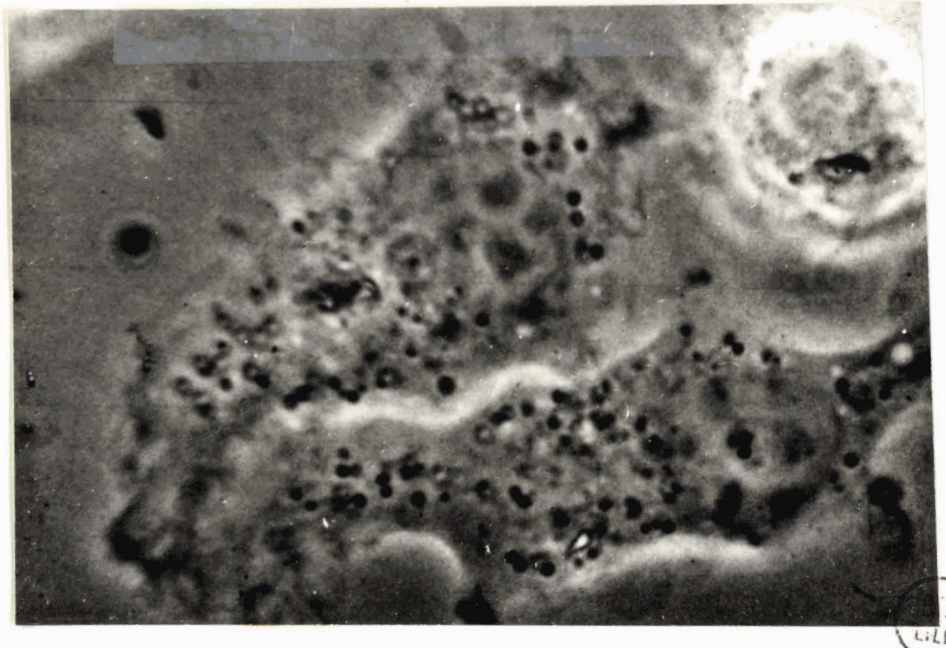
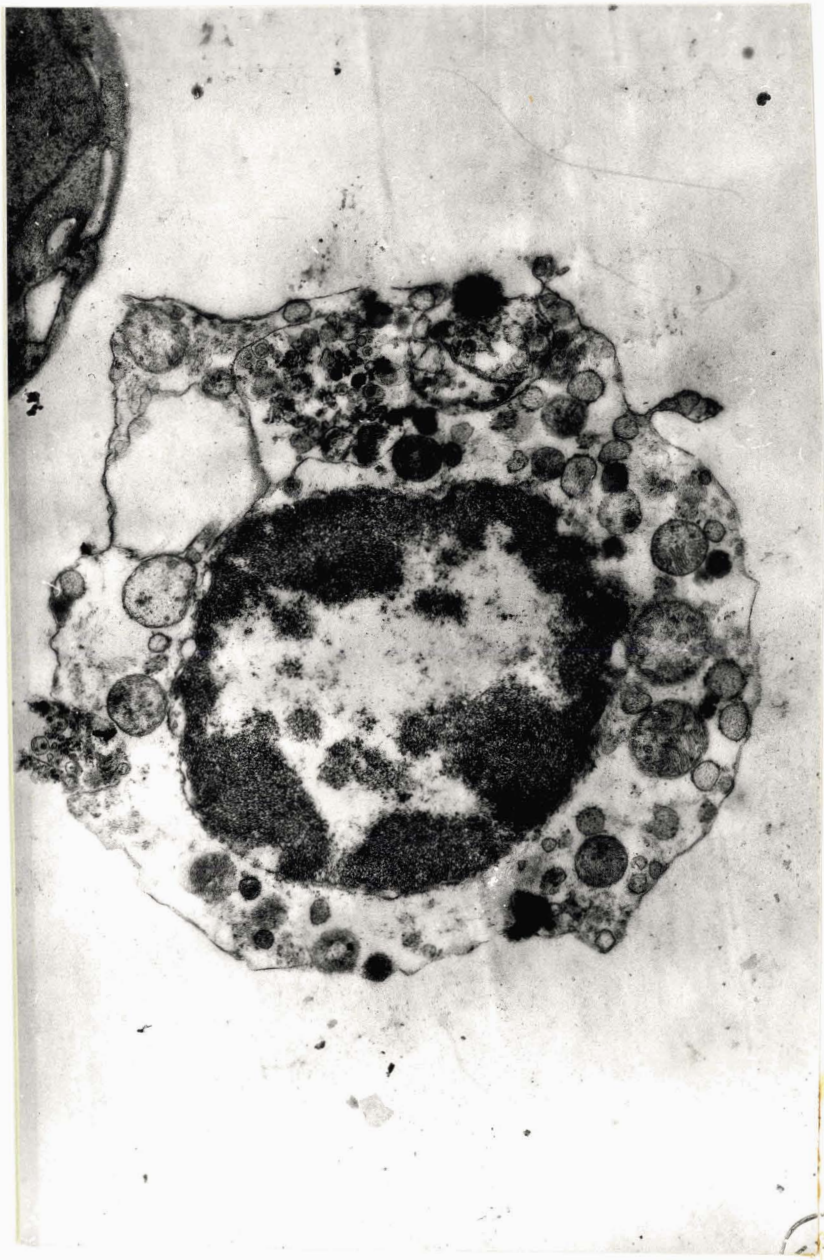


Fig. b - Macrophage ayant phagocyté des particules virales chauffées I/2h à 56°
24h avant.

PLANCHE XIV



Macrophage fixé I4 h après la mise en contact avec le virus. La chromatine forme des mottes plaquées contre la membrane nucléaire. Grossissement X I2.500

PLANCHE XV

c) Macrophages alvéolaires de cobayes vaccinés en contact in vitro avec le virus grippal.

Les cobayes ont été vaccinés par inoculation intra-musculaire de virus grippal B souche lee purifiée (128 UH) avec adjuvant de Freund. Voir tableau p 102

2) Sur les infrastructures cellulaires

L'examen en microscopie électronique complète ces données : les premières altérations morphologiques interprétables apparaissent dès la 7ème heure, et s'accentuent au cours des heures suivantes jusqu'à aboutir à la destruction cellulaire complète. Il semble que l'on puisse établir la succession suivante, dans l'apparition des lésions :

- gonflement des cisternes orgastoplasmiques, avec vacuolisation cytoplasmique progressive (planche XII).

- gonflement des mitochrondries, avec diminution des crêtes aux dépens de la matrice (planche XV).

- vacuolisation extrême du cytoplasme et lyse cellulaire par éclatement de la membrane cellule.

- le noyau résiste plus longtemps : alors que le cytoplasme présente déjà des altérations majeures, la chromatine, la substance inter-chromatinienne et le nucléole ont encore un aspect normal. Mais finalement, la chromatine devient opâque, forme des mottes plaquées contre la membrane nucléaire (planche XV), alors que la substance interchromatinienne s'éclaircit, le nucléoplasme apparaissant optiquement vide.

Pendant que les lésions cellulaires se développent, l'identification des particules est très difficile au sein des structures altérées. Cependant, lorsque la destruction du macrophage est achevée, on retrouve des particules nettement visibles dans les débris de la cellule.

Lorsque le virus grippal a été préalablement chauffé 1/2 heure à 56°, on n'observe en Microscopie Electronique qu'un petit nombre de particules se fixent en périphérie de la cellule. La phagocytose se produit cependant (planche XIII), mais n'entraîne aucune altération morphologique des cellules, qui apparaissent en tous points semblables aux cellules témoins.

L'examen en microcinématographie en contraste de phase confirme cette notion, ne révélant aucune altération de la cinétique cellulaire.

3) Sur le métabolisme cellulaire.

a) Influence du virus grippal sur la consommation d'oxygène du macrophage alvéolaire.

Les études de consommation d'oxygène sont réalisées en appareil de Warburg. La durée de l'expérience est de 24 heures.

Au cours de travaux antérieurs faits au laboratoire de Biochimie à l'Institut Pasteur, il a été montré que la quantité d'oxygène consommée est proportionnelle au temps d'agitation en fiole de Warburg et au nombre de cellules introduites dans ces fioles.

Dans le tableau XIII sont rapportés comparativement les nombres de consommation d'oxygène en micromoles par $4\text{-}10^6$ cellules, en 24 heures, de 3 séries de cellules.

1° - macrophages témoins

2° - macrophages en présence de virus grippal

3° - macrophages en présence de virus grippal traité par chauffage à 56°, pendant 30 minutes.

Les nombres sont donnés pour la moyenne de 3 expériences, réalisées à la fois en micro et en macrofioles. On constate une consommation d'oxygène plus grande en macrofiole, provoquée par l'agitation plus importante des cellules dans les fioles.

Au bout de 24 heures, on note une augmentation de la consommation d'oxygène des cellules mises en présence de particules virales traitées par chauffage. Cette augmentation est liée à la phagocytose et correspond à des faits analogues qui ont été observés lors de la phagocytose des Mycobactéries par le macrophage. D'ailleurs des observations du même ordre avaient déjà été signalées par BALBRIDGE C. W. et GERARD R. W. (160) à propos des leucocytes. Par contre, en présence de particules virales non traitées, les macrophages présentent une diminution de la respiration globale de l'ordre de 50 % par rapport aux cellules témoins. La cinétique de la consommation d'oxygène (Tableau XIV) montre que cette baisse survient à la 7ème heure et atteint son maximum à la 12ème heure. Ensuite la consommation d'O_2 reste stable jusqu'à la 24ème heure.

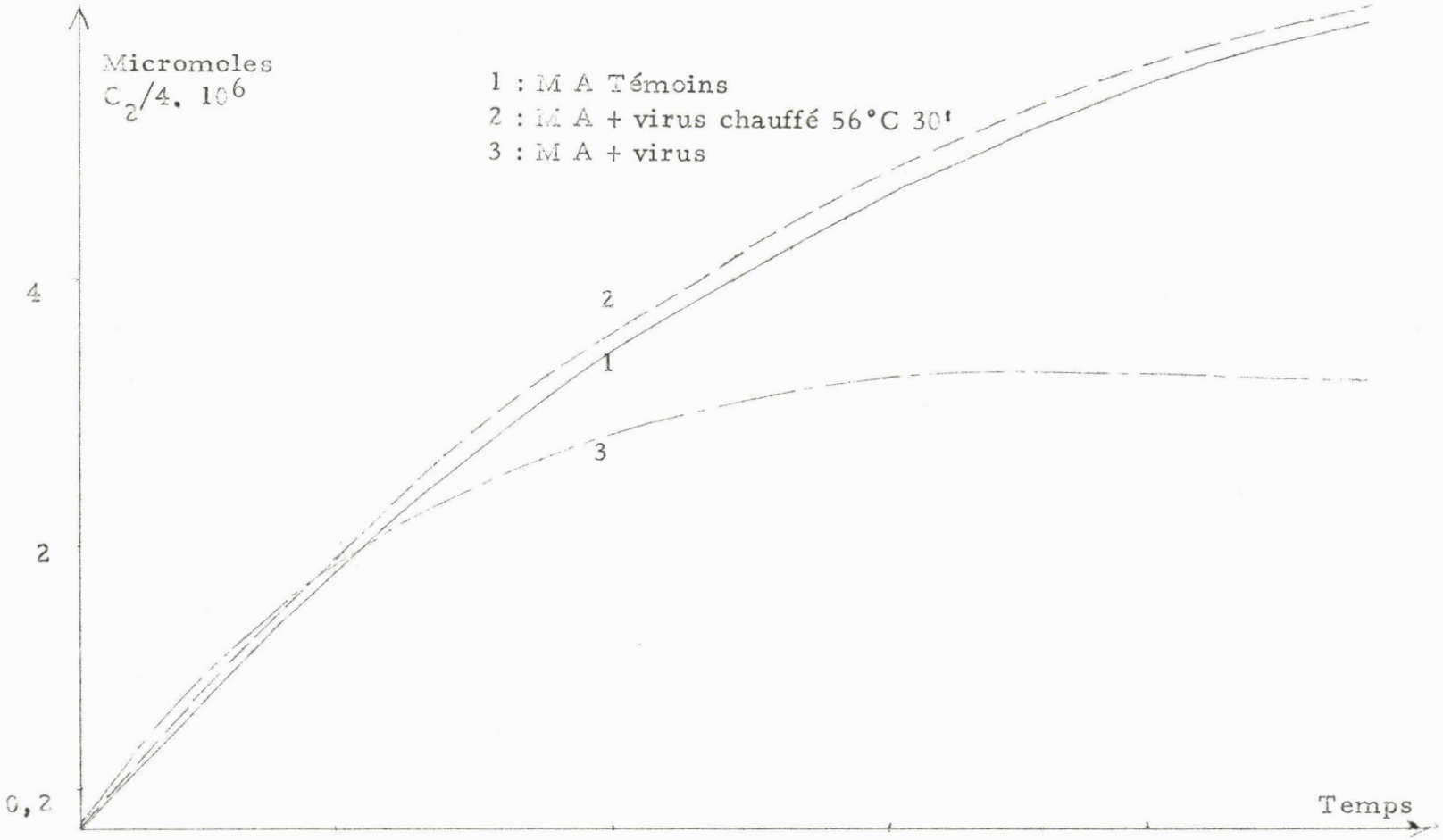
	Macrophages	Macrophages et virus grippal	Macrophages et virus grippal traité par chauffage à 56°C pendant 30'
Microfioles	5,63	2,27	5,73
Macrofioles	7,30	4,81	7,59

INFLUENCE DU VIRUS GRIPPAL SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DU MACROPHAGE ALVEOLAIRE

Micromoles d'oxygène consommées en 24 heures par 4.10^6 cellules.

(les nombres sont donnés par la moyenne de 3 expériences)

TABLEAU XIII



Cinétique de la consommation d'O_2 par le macrophage alvéolaire en présence du Myxovirus influenzae B lee

TABLEAU XIV

b) Etude de la dégradation du glucose par le macrophage lors de la phagocytose du virus grippal.

Dans le tableau XV sont rapportés les chiffres de consommation d'oxygène exprimés en micromoles, par $4\text{-}10^6$ cellules, en 24 heures et le pourcentage de $^{14}CO_2$ dégagé par rapport au ^{14}C total du glucose.

- en présence de virus grippal inactivé par la chaleur on note une consommation accrue du glucose : le pourcentage de $^{14}CO_2$ dégagé par rapport au ^{14}C total provenant du glucose est plus élevé.

De plus on constate une augmentation très significative de la quantité de CO_2 provenant du glucose $1\,^{14}C$, suggérant une utilisation préférentielle par la voie de la phosphorylation oxydative.

- en présence de virus grippal non traité, la dégradation du glucose par le macrophage est beaucoup moins importante et comparable à la diminution de la respiration des cellules observées en appareil de Warburg, dans les mêmes conditions. Si l'on compare les pourcentages de CO_2 dégagé, provenant du glucose $6\,^{14}C$ par rapport à celui provenant du glucose $1\,^{14}C$, on constate également une augmentation, encore plus significative, du passage par la voie des pentoses.

Ainsi, il n'y a pas de modifications qualitative dans le métabolisme du macrophage alvéolaire lors de la phagocytose du virus grippal suivant que ce dernier soit non traité ou inactivé par la chaleur. Lors de la phagocytose du virus grippal non traité la diminution de la respiration du macrophage est liée à la diminution quantitative du métabolisme cellulaire sous l'action directe du virus. Elle traduit une

	Macrophages témoins		Macrophages et virus grippal		Macrophages et virus grippal traité par chauffage à 56°C pendant 30'	
	0_2 consommé	% 14 $C0_2$ dégagé	0_2 consommé	% 14 $C0_2$ dégagé	0_2 consommé	% 14 $C0_2$ dégagé
Glucose $U^{14}C$	5,55	2,31	2,57	1,08	6,2	2,68
Glucose $1^{14}C$	5,78	3,66	2,03	2,50	5,31	3,91
Glucose $6^{14}C$	5,57	0,53	2,22	0,49	5,68	0,94

ETUDE DE LA DEGRADATION DU GLUCOSE PAR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE LORS DE LA PHAGOCYTOSE DU VIRUS GRIPPAL

(Micromoles d'oxygène consommées en 24 heures par 4 10^6 cellules, % de $^{14}C0_2$ dégagé par rapport au ^{14}C total du glucose - expérience réalisée en présence de 1,55 micromoles de glucose)

TABLEAU XV

véritable altération des structures métaboliques de la cellule.

4) Etude de la multiplication virale à l'intérieur du macrophage alvéolaire in vitro.

La réapparition de particules virales nombreuses et bien individualisées après 24 heures de contact peut laisser supposer qu'il y ait multiplication virale in vitro. Cette multiplication serait faible et cantonnée dans un laps de temps très court.

Nous nous sommes bornés dans un premier temps au titrage de l'hémagglutinine.

1) Expérience où le surnageant contenant les particules virales n'est pas enlevé après 2 heures de contact.

Temps de contact virus-cellules	Nombre d'unités hémagglutinantes au départ	Nombre de cellules	Nombre d'unités hémagglutinantes après congélation et décongélation
10 heures	768 UH	1 million	1040 UH
22 heures	3200 UH	10 millions	1600 UH
24 heures	480 UH	2 millions	190 UH
24 heures	480 UH	2 millions	480 UH

2) Expériences où le surnageant contenant au départ la totalité du virus est retiré du flacon après 2 h. de contact.

Temps de contact virus-cellules	Nombre d'unités hémagglutinantes au départ	Nombre de cellules	surnageant 2 heures	Titrage après congélation et décongélation
4 heures	512 UH	4 millions	48 UH	60 UH
6 heures	512 UH	4 millions	48 UH	12 UH
8 heures	512 UH	4 millions	24 UH	30 UH
24 heures	512 UH	4 millions	24 UH	60 UH
6 heures	400 UH	2 millions	320 UH	24 UH
8 heures	400 UH	2 millions	320 UH	24 UH
10 heures	400 UH	2 millions	320 UH	50 UH
15 heures	400 UH	2 millions	320 UH	14 UH
18 heures	400 UH	2 millions	320 UH	30 UH
21 heures	400 UH	2 millions	320 UH	30 UH
22 heures	50 UH	2 millions	8 UH	0
22 heures	100 UH	2 millions	16 UH	0
22 heures	200 UH	2 millions	42 UH	8 UH
30 heures	50 UH	2 millions	0	0
30 heures	100 UH	2 millions	20 UH	0
30 heures	200 UH	2 millions	42 UH	0
48 heures	50 UH	2 millions	8 UH	0
48 heures	100 UH	2 millions	16 UH	0
48 heures	200 UH	2 millions	42 UH	18 UH

L'inoculation à des oeufs embryonnés de 10 jours de surnageant de cellules congelées et décongelées de 48 h n'a pas permis de réisoler de virus . Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence de multiplication virale dans ces cellules.

- DISCUSSION -

Les travaux de NUNGEITER W.J., GORDON J.D. et COLLINS K.E.(161), de GINSBERG H.S. et BLACKMON J.R.(162), de BOAND A.V., KEMPF J.E. et HANSON R.J.(163), de La PLACA M. (164) ont montré que le virus grippal peut se fixer à la surface des leucocytes de cobaye. Ce stade précède la pénétration du virus dans la cellule, qui a été depuis plusieurs années démontrée, pour les polynucléaires neutrophiles par BOAND A.V. et ses collaborateurs (165), puis plus récemment par INGLOT D.A. et DAVENPORT F.M.(166).

La Microscopie Electronique nous a permis de suivre avec précision cette pénétration, en deux phases, en ce qui concerne le macrophage alvéolaire, complètant le travail de DANON D. et ses collaborateurs (167) qui avaient étudié, avec la même méthode, la phagocytose par les leucocytes des particules virales fixées sur les hématies.

L'examen répété de la morphologie et de la cinétique cellulaire, dans les heures qui suivent la phagocytose, nous a en outre confirmé les effets cytotoxiques des particules virales, qui inhibent l'activité normale du macrophage, et finissent par entraîner la mort cellulaire, comme nous l'avions déjà constaté à l'examen des cellules de l'exsudat péritonéal provoqué par injection du virus grippal chez le cobaye.

Cette action cytotoxique est thermolabile, et le chauffage préalable du virus 1/2 heure à 56° la supprime totalement.

Les expériences sur le métabolisme cellulaire démontrent enfin que, chez le macrophage alvéolaire, la phagocytose requiert l'utilisation des processus d'oxydation aérobie, alors que de nombreux travaux montrent que les autres phagocytes tirent leur énergie de la glycolyse anaérobie (STAHELJN H., SUTER E. et KARNOVSKY M.L. (168)); SBARRA A.J. et KARNOVSKY M.L. (169), BAZIN S. et AVICE G. (170), COHN Z.A. et MORSE S.I. (171) ; KARNOVSKY M.L. (172). Cette particularité de la phagocytose chez le macrophage alvéolaire peut être à rattacher à la situation de cette cellule au sein des structures alvéolaires pulmonaires, en un lieu éminemment favorable aux échanges gazeux.

La phagocytose du virus grippal par les macrophages alvéolaires de cobayes en survie in-vitro, entraîne une diminution de la consommation d'oxygène nette à partir de la 7ème heure, et un arrêt de cette consommation à partir de la 15ème heure. La dégradation du glucose est diminuée parallèlement. Ces faits ne se produisent pas lorsque le virus a été préalablement traité par chauffage à 56°, mais on note des modifications dans les voies de catabolisme du glucose.

CONCLUSIONS

Nos travaux montrent les faits suivants :

I - La réalité de la phagocytose des particules virales par les leucocytes, spécialement par les macrophages : nous voyons dans les deux heures qui suivent la mise en présence du virus et des macrophages, des particules virales dans les vacuoles.

II - L'absence de multiplication virale dans ces cellules aussi bien in vivo qu'in vitro : le virus grippal B Lee n'a pu être isolé, sur oeufs de poule embryonnés, ni des cellules de l'exsudat péritonéal 44 h après l'inoculation, ni des macrophages alvéolaires en survie après 48h de contact avec le virus. Le surnageant de ces dernières cellules congelées et décongelées, ne montre aucune élévation du titre hémagglutinant dans les laps de temps allant de 4h à 48h après la mise en présence du virus.

III - L'action cytotoxique des particules virales sur les cellules leucocytaires aussi bien in vivo qu'in vitro : les cellules phagocytaires, polynucléaires neutrophiles et macrophages, présentent des altérations morphologiques et cinétiques importantes variant avec chaque type de virus étudiés. Ces altérations ne sont pas spécifiques, mais cependant peuvent caractériser de préférence tel ou

tel virus, par exemple la tendance à l'accollement cellulaire observé avec le Myxovirus parainfluenzae III et la vacuolisation intense provoquée par le Myxovirus influenzae B Lee.

IV - La traduction de cette toxicité sur le métabolisme cellulaire (Etude de la consommation d'oxygène).

L'appareil de Warburg montre que les macrophages alvéolaires utilisent l'oxydation aerobie. La phagocytose du virus entraine une diminution de la consommation d'oxygène nette à partir de la 7ème heure et un arrêt de celle-ci à partir de la 15ème. La dégradation du glucose est diminuée parallélement.

V - Les altérations morphologiques et les perturbations métaboliques enregistrées sont dues à l'action toxique du virus.

Le chauffage à 56° pendant 1/2 heure pour le virus grippal, à 100° pendant 5' pour l'adenovirus, détruit ce pouvoir toxique des particules et prévient l'apparition des altérations cellulaires.

• • o

Nos recherches mettent donc en évidence à l'échelon cellulaire, une toxicité virale indépendante du pouvoir infectieux, dont la réalité avait été démontrée antérieurement à l'échelon de l'organisme, par injection massive de particules virales à des animaux réfractaires à l'action infectieuse de ce même virus.

B I B L I O G R A P H I E

AGKERMANN WW., KURTZ N. (75)

A new host-virus system.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1952, 81, 421-423

ALTENBERG L.S. (76)

Growth of vaccinia virus on mouse ascitic tumor cells in vivo.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1955, 88, 313-315.

BALBRIDGE C.W., GERARD R.W. (160)

The extra respiration of phagocytosis
Amer. J. Physiol. 1933, 103, 235.

BANG F.B., WARWICK A. (126)

Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis virus and the genetic basis of their susceptibility.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1960, 46, 1065-1075.

BARON S., BUCKLER C.E. (120)

Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus.
Science, 1963, 141,1061-1063

BARON S., ISAACS A. (113)

Interferon and natural recovery from virus diseases.
New Scientest 1961, 11, 81.

BARSKI G. (92)

Multiplication of poliovirus in reticulo-endothelial cells without generalized cytopathogenic effect.
Science 1957, 125, 448.

BARSKI G., MESSORE G., LEPINE P. (64) (85)

L'exsudat peritonéal artificiel source de cellules pour la culture des virus in vitro.
Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 366-371.

BARSKI G., ROBBE-FOSSAT F. (93)

Multiplication du virus poliomyélitique dans les cultures in vitro de cellules exsudatives de singe sans effet cytopathogen • généralisé.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, 301-309

BAZIN S., AVICE C. (170)

Le métabolisme glycogénique des polynucléaires au cours de la phagocytose in vitro.
C.R. Soc. Biol. 1953, 147, 1025-1027

BEARD J.W., ROUSS P. (83)

The fate of vaccinia virus on cultivation in vitro with Kupffer cells (reticulo-endothelial cells).
J. Exp. Med. 1938, 67, 883-910

BENAZET F., SOHIER R., FELIX M. (12) (20)

Le sang dans les infections à virus et le problème des virocytes.
Sem. Hôp. Paris (Arch. Biol). 1956, 32,247-258

BENEDICT A. (98)

Growth of meningo-pneumonitis virus in normal and immune guinea pig monocytes.
Nature 1958, 181, 1742-1743

BENJAMIN B., WARD S.M. (13)

Leukocytic response to measles.
Amer. J. Dis. Child, 1932, 44, 921-963.

BERG R.B. (91)

Multiplication of ECHO 9 virus in suspensions of human leucocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1961, 108, 742-744.

BERG. R.B., ROSENTHAL M.S. (95) (100)

Propagation of measles virus in suspensions of human and monkey leucocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1961, 106, 581-585.

BERNARD J., MATHE G. (11) (21)

Un usurpateur : le virocyte.
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 1957, 11, 115-117.

BOAND A.Y, KEMPF J.E., HANSON R.J. (65) (163) 165)

Phogocytosis of influenza virus.
I. In vitro observations.
J. Immun. 1957, 79, 416-421.

BOGDANOV I.L., ALEKSEEVA N.V. (8)

The picture of the white blood cells in poliomyelitis and its diagnostic signifiance.
Pediatriya 1961, 40, 51-54.

BORDET J. (1) (143)

Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses.
Ed. MASSON Paris 1939, 879 pages.

BORDET P., QUERSIN-THIRY (77) (128) (137) (138) (144)

Influence favorisante du virus grippal sur les infections associées.
Premier Mémoire. Ann. Inst. Pasteur 1951, 81, 394-406.

BORDET P., QUERSIN-THIRY (128) (144).

Influence favorisante du virus grippal sur les infections associées.
Deuxième Mémoire. Ann. Inst. Pasteur 1953, 84, 695-702.

BORECKY L., LACKOVIC V. (101)

The reticulo-endothelial system and virus infection. The reaction of mouse peritoneal mononucleate cells to infection with the mouse and egg line of influenza virus - persistance and dissemination of the virus in the mouse organism.
Acta. Virol. 1964, 8, 208-216.

BRUNNER K.T., HUREZ D., Mc CLUSKEY R.T., BENACERRAF B. (34) (154)

Blood clearance of P 32 labeled vesicular stomatis and Newcastle disease viruses by the reticulo-endothelial system in mice.
J. of Immun. 1960, 85, 99-105.

BUDDINGH G.J. (151)

Experimental combined viral and bacterial infection (influenza C and hemophilus influenzae type B) in embryonnated eggs.
J. Exp. Med. 1956, 104, 947-958.

CARLISLE H.N., HUDSON P. (145)

Streptococcal content of lungs of mice infected with streptococcus hemolyticus after influenza virus.
J. Bact. 1947, 54, 56.

CARREL A. (82)

Some conditions of the reproduction in vitro of Rous virus.
J. Exp. Med. 1926, 43, 647-668.

CHANY C., DANIEL P., ROBBE-FOSSAT F., VIALATTE J., LEPINE P. et LELONG M. (131).

Isolement et étude d'un virus syncytial non identifié associé à des infections respiratoires aiguës des nourissons.
Ann. Inst. Pasteur 1958, 95, 721-731

CELLO R., MOULTON J., Mc FARLAAND S. (24)

The occurrence of inclusion bodies in the circulating neutrophils of dogs with canine distemper.
Cornell. Vet. 1959, 49, 127-146.

COHN Z.A., et MORSE S.I. (171)

Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes ; observations on the requirements and consequences of particle ingestion.
J. Exp. Med. 1960, 111, 667-686.

COONS A.H., KAPLAN M.H. (27).

Localization of antigen in tissue cells.
II. Improvements in method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exp. Med. 1950, 91, 1-13.

CURLETTO R., CICONALI M., PELLO F., FERRARIO G. (5) (16)

Studio morfologico e citochimico dei leucociti Del Sangue perriferico in paziente affetti da influenza.
Haematologica 1960, 45 (7), 613-656).

DACHY A. (147)

Virus grippal et infection staphylococcique.
Rev. Belg. Patho. 1958, 26, 426-432.

DANON D., JERUSHALMY Z., KOHN A., DE VRIES A. (70) (72) (167)

In vitro phagocytosis by leucocytes of influenza virus adsorbed onto erythrocytes. Electron microscopic and cinematographic observations. Virology 1961, 15, 258-262.

DOUGLAS S., SMITH W. (43)

A study of vacinal immunity in rabbits by means of vitro methods.
Brit. J. Exp. Path. 1930, 96, 11.

DOWNEY H., Mc KINLAY C.A. (14) (19)

Acute lymphodenosis compared with acute lymphatic leukemia.
Arch. Int. Med. 1923, 32, 81-112.

DUNNE H.W., LUEDKE A., HOKANSON J.F. (90)

The growth of animal leukocytes and then use in the cultivations of animal viruses.
Amer. J. Vet. Res. 1958, 19, 706-711.

DUNNE H.W., LUEDKE A.J., REICH C.V., HOKANSON J.F. (87)

The in vitro growth of hog cholera virus in cells of peripheral blood.
Amer. J. Vet. Res. 1957, 18, 502-507.

DURAND D.P., BARRETT J.T. (124)

Immunity and virus diseases.
Missouri Med. 1963, 60, 35-38.

ENDERS J.F., PEEBLES T.C. (52)

Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1954, 86, 277-286.

ERICKSON J.O., HENSLEY T.J., FIELDS M., LIBRY R.L. (36)

Intracellular localization of tobacco mosaic virus mouse liver.
J. of Immun. 1957, 78, 94-103

FAIRBROTHER R.W. (109)

The production of immunity to vaccinia virus by mixtures of immune serum and virus and the importance of phagocytosis in antivaccinal immunity.
J. Path. Bact. 1933, 36, 55-64.

FENNER F. (37)

The pathogenesis of the acute exathems ; an inter pretation based on experimental investigations with mouse pox (infections ectromelia of mice).
Lancet 1948, 2, 915-920.

FENNER F., WOODROOFE G.M. (48)

Thepathogenesis of infectious myxomatosis. The mecanism of infection and the immunological response in the European rabbit (oryctolagus cuniculus).
Brit. J. Exp. Path. 1953, 34, 400-411.

FISCHER T.N., GINSBERG H.S. (106)

The reaction of influenza viruses with guinea pig polymorphonuclear leucocytes.
III. Studies on the mechanism by which influenza viruses inhibit phagocytosis.
Virology 1956, 2, 656-664.

FISCHER T.N., GINSBERG H.S. (106)

The reaction on influenza viruses with guinea pig polymorphonuclear leucocytes.
II. The reduction of white blood cell glycolysis by influenza viruses and Receptor-Destroying-Enzyme (R.D.E.)
Virology 1956, 2, 637-655.

FLEXNER S., LEVIS P.A. (39)

Experimental epidemic poliomyelitis in monkeys.
J. Exp. Med. 1910, 12, 227-255.

FLORMAN A.L., ENDERS J.F. (84)

The effet of homologous antiserum and complement on the multiplication of vaccinia virus in roll-tube cultures of blood mononuclear cells.
J. Immun. 1942, 43, 159.

FRANCIS T., TORREGROSA M.V. (152a)

Combined infection of mice with H influenzae and influenza virus by the intranasal route.
J. Infect. Dis. 1945, 76, 70-77.

FRANCKLIN M.R. (97)

The growth of fowl plague virus in tissue cultures of chicken macrophages and geant cells.
Virology 1958, 6, 81-95.

FRENTZEL- BEYME A. (4)

Problem of the typical blood picture in influenza.
Ztschr. Ges. im. Med. 1950, 5, 427-431.

GALEAZZI T., VISCO G. (148)

Studi sul sinergismo tra virus influenzale e germi
Nota II. L'organotropismo dello staphylacocco aureo del topino inoculato con virus influenzale.
Riv. Ist. Sicroter Ital. 1958, 33, 47-58.

GARABEDIAN G.A., SYVERTON J.T. (74)

Studies on herpes simplex virus.
II. An affinity in vitro of herpes virus for rabbit macrophages and microphages.
J. Inf. Dis. 1955, 96, 5.

GESSLER A.E., BENDER C.E., PARKISON M.C. (130)

A new rapid method for isolating viruses bu selective fluorocarbon deproteinization.
TRANS NY Acad. Sci. 1956, 18, 701-703.

GLASGOW L.A., HABEL K. (119) (122)

Interferon production by mouse leukocytes in vitro and in vivo.
J. Exp. Med. 1963, 117, 149-160.

GILDEMEISTER E., HILGERS P. (46) (47)

On welchen blutbestandteilers haftet das nach kitaner impfung dis kaninchers in den blutkreis lang gelen-gengle vakzinevirus.
Centralbl. f. Bakt CXVII, 1930, 258.

GILDEMEISTER E., HILGERS P. (46) (47)

Ueber das Verhalten dis Valkzinevirus bein Erstimp fling mit normalem Impgverlang.
Centralbl f Bakt I CXVII 1930, 321.

GINSBERG H.S., BLACKMON J.R. (61) (79) (162)

Réactions of influenza viruses with guinea-pig polymorphonuclear leucocytes.
I. Virus-cell interactions.
Virology 1956, 2, 618-636.

GRESSER I. (118)

Production of interferon by suspension of human leucocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1961, 108, 799-803.

GRESSER I., CHANY C. (59)

Isolation of measles virus from the washed leucocytic fraction of blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1963, 113, 695-697.

GRESSER I., CHANY C. (94) (121).

Multiplication of poliovirus type I in preparations of human leucocytes and its inhibition by interferon
J. Immun. 1964, 92, 889-895.

GUSTAFSON D.P., MEKISSICK G.E. (88)

Hog cholera virus in subculturable leukocyte cells cultures.
Fed. Proc. 1963, 22, 675.

HANSON R.J., KEMPF J.E., BOAND A.V. (30) (78) (163) (165)

Phagocytosis of influenza virus. II. Its occurence in normal and immune mice.
J. Immun 1957, 79, 422-427.

HARFORD C.G., LEIDLER V., HARA M. (149)

Effect of the lesion due to influenza virus on the resistance of mice to inhaled pneumococci.
J. Exp. Med. 1949, 79, 53-67.

HENLE W., HENLE G. (152)

Studies on the toxicity on influenzae viruses.
II. The effect of intraabdominal and intravenous injection on influenzae viruses.
J. Exp. Med. 1946, 84, 639-660.

HENON M., DELAUNAYA (123)

L'interferon leucocytaire.
Med. Hyg. 1966, 24, 177-178.

HERS J.F. Ph (29)

Fluorescent antibody technique in respiratory viral diseases.
Amer. Rev. Resp. Dis. 1963, 88, 316-333.

HERZBERG K., VANEK E. (49)

Recherches sur la question de la virémie dans la grippe.
I. Mise en évidence du virus dans le sang de la souris.
Z. Hyg. Infekt. 1961, 147, 369-381.

HERZBERG K., VANEK E., REUSS J. coll.tech. HARBRECHT I (49)

Recherches sur la question de la virémie dans la grippe.
II. Mise en évidence du virus dans le sang de l'homme atteint de la grippe.
Z. Hyg. Infekt. 1961, 147, 382-390.

HORSTMANN D.M., Mc COLLUM R.W., MASCOLA A.D., RIORDAN J.T. (55)

Viremia in human and experimental poliomyelitis.
A.M.A. Arch. Int. Med. 1954, 94, 859-862.

HOTZ G., BANG F.B. (68)

An electron-microscope study of chicken macrophages infected with virus of Newcastle disease. (myxovirus multiforme)
J. Path. Bact. 1957, 73, 331.

HOYLE L., HORNE R.W., WATERSON A.P. (159)

The structure and composition of the myxovirus
II. Components realeased from the influenza virus particule by ether.
Virology 1961, 13, 448-459.

INGLOT A., DAVENPORT F.M., (63) (107) (166)

Studies on the role of leucocytes in infection with influenza virus.
J. Immun. 1962, 88, 55-65.

INGLOT D.A., DAVENPORT F.M. (66) (166)

Studies on the role of leucocytes in infection with influenza virus.
J. Hyg. Epidem. 1962, 6, 71-72.

ISAACS R. (23)

Granules in lymphocytes (splenocytes) in virus infections.
Fed. Proc. 1953, 12, 593.

Isolierung von phagozytiertem virus aus leukozyten infizierter tiere.

ISAACS A., HITCHCOCK G. (117)

Role of interferon in recovery from virus infections
Lancet 1960, 2, 69.

ISAACS A., KLEMPERER H.G., HITCHCOCK G. (114)

Studies on the mecanism of action of interferon.
Virology 1961, 13, 191-199.

JAKOVLSEV D.M. (7) (15)

Formule leucocytaire au cours de la pneumonie à virus chez l'enfant.
Bibl. Paediat. Basel 1961, 77, sup 138-140.

JAMUNI A., BOLDEN M. (110)

The role of leucocytes in immunity to herpes.
J. Immun. 1934, 26, 395-400.

JEANNERET O., FARAHMAND F. (6)

La formule leucocytaire au cours de l'épidémie de grippe asiatique. (1957-1958)
Bibl. Paediat. Basel 1961, 77, sup 141-146.

JERUSHALMY Z., DE VRIES A., KOHN A., KOCHWA S. (71)

Phagocytosis of periodate treated and virus coated red blood cells by white blood cells in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1957, 95, 368-371.

KANTOCH M. (105)

Phagocytosis of viruses.
J. Hyg. Epidem. 1962, 6, 183-185.

KANTOCH M., INGLOT A. (104)

Inhibition of the phagocytic activity of leucocytes by coxsackie viruses.
I. The influence of viral concentration and temperature on the inhibition of phagocytosis.
Schweiz. Z. allg. Path. 1960, 23, 83-94.

KANTOCH M., INGLOT A. (104)

Inhibition of the phagocytic activity of leucocytes by coxsackie viruses.
II. Serological studies.
Schweiz. Z. allg. Path. 1960, 23, 327-343.

KANTOCH M., SKURSKI A., WIECZOREK Z. (103)

In vitro blockade to bacterial phagocytosis of leucocytes by means of bacterial viruses.
SChweiz. Z. Allg. Path. 1958, 21, 1106-1119.

KANTOCH M., ZAPF K. (69)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Lokalisation von Coxsackie-Viren in Leukocyten.
Acta. Biol. et Medica Ger. 1959, 3, 351-359.

KARNOVSKY M.L. (172)

Aspects comparatifs des modifications métaboliques au au cours de la phagocytose.
C.R. Soc. Biol. 1962, 156, 1008-1012.

KATO N., HARA H. (155)

The toxic effect on rabbits of influenza virus given intravenously.
Brit. J. Exp. Path. 1961, 42, 145-152.

KOEHLER H. (111) (112)

Die rolle der leukozyten als virusträger.
Zbl. Bakt. 1960, 180, 140-144.

KOEHLER H. (56)

New method for the isolation of the poliomyelitis virus from the blood of humans affected by infantile paralysis.
Zbl. Bakt. (orig). 1960, 180, 145-146.

KOEHLER H., SPRINGER D. (58)

Isolement du virus phagocyté à partir des leucocytes des animaux infectés.
Zbl. Bakt 1962, 186, 287-291.

KOPROWSKI H., NORTON T.W., Mc. DERNOTT W. (40)

Isolement of poliomyelitis virus from human serum by direct inoculation into a laboratory mouse.
Pub. Health Rep. 1947, 62, 1467-1476.

KOVACS, BARATAWIDJAJA R.K., WALMSLEY-HEWSON A. and LABZOFFSKY N.A. (32) (57).

Demonstration of poliovirus in isolated leucocytes blood and C.S.F. smears of infected monkey by immunofluorescence and biological means.
Arch. Ges. Virusforsch. 1963, 14, 143-146.

LA PLACA M. (62) (164)

Osservazioni sull'azione del virus influenzale A-PR_8 nei confronti dei leucociti di cavia. I. Adsorbimento ed eluzione del virus in varie condizioni di temperatura.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1958, 34, 314-317.

LEBLOIS J., SAMAILLE J., AERTS C. (141)

Effet cytopathogène du virus vaccinal sur les différents types de cultures cellulaires.
C.R. Soc. Biol. 1961, 155, 93.

LIPPELT H., MULLER F. (51).

Model studies on the problem of viremia in mumps infection.
Zschz. Hyg. 1954, 140, 180-186.

LITWINS J., LEIBOWITZ S. (10) (17)

Abnormal lymphocytes (virocytes) in virus diseases other than infections mononucleosis.
Acta Haemat. 1951, 5, 223-231.

LIU C. (28)

Studies of influenza infection in ferrets by means of fluorescein-labelled antibody. I. The pathogenesis and diagnostis of the disease.
J. Exp. Med. 1955, 101, 665-676.

LIU C. (28).

Rapid diagnosis of human influenza infection from nasal smears by means of fluorescein-labelled antibody.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1956, 92, 883-887.

LIU C., COFFIN D.L. (31)

Studies of canine distemper infection by means of fluorescein-labelled antibody.
I. The pathogenesis, pathology and diagnostis of the disease in experimentally infected ferrets.
Virology 1957, 3, 115-131.

LONG P.H., OLITSKY P.K. (44)

The recovery of vaccinia virus after neutralization with immune serum.
J. Exp. Med. 1930, 51, 209-217.

MALINQUIST W., HAY D. (89)

Hemadsorption and cytophathic effect produced by African Swine bone marrow and Buffy coat cultures.
Amer. J. Vet. Res. 1960, 21, 104.

MARAL R.(96a)

Etude du développement du virus de la myxomatose en cultures de tissus.
Ann. Inst. Pasteur 1957, 92, 742-751

MARCHOUX E. (81)

Culture in vitro du virus de la peste aviaire.
Note de M.E. MARCHOUX présentée par M.E. ROUX
C.R. Acad. Sci. 1908, 147, 357.

MAXIMOUICH N.A., PETROVSKA O.G. (25)

Nouvelles études sur les inclusions virales dans la grippe expérimentale au moyen du microscope à fluorescence.
Acta Virol. 1962, 6, 2, 127-131.

MELCZER N., HAMAR M., KISS S., ROKA E. (73)

La présence et la signification pathogénique du virus de l'acné humaine dans la maladie acnéique hormonale.
Arch. Klin. Exper. Dermatal. Dtsch. 1962, 214, 274-288.

MERCHANT D.J., MORGAN H.R. (102)

Inhibition of the phagocytic action of leucocytes by mumps and influenza viruses.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1950, 74, 651-653.

MERLING K. (22)

La phagocytose du virus vaccinal in vitro.
J. Path. Bact. 1945, 57, 21.

MINS C.A. (33) (67) (80) (125)

Aspects of the pathogenesis of virus diseases.
Bact. Rev. 1964, 28, 30-71.

MINS C.A. (33)

The response of mice to large intravenous injections of ectromelia virus.
I. The fate of infected mice.
Brit. J. Exp. Path. 1959, 40, 533-542.

MINS C.A. (33)

An analysis of the toxicity for mice of influenza virus.
I. Intracerebral toxicity
Brit. J. Exp. Med. 1960, 41, 586-593

An analysis of the toxicity for mice of influenza virus.
II. Intravenous toxicity.
Brit. J. Exp. Med. 1960, 41, 593-598.

MINUSE E., WILLIS C., DAVENPORT F., FRANCIS T. (50)

An attempt to demonstrate viremia in cases of Asian influenza.
J. Lab. Clin. Med. 1962, 59, 1016-1019.

MYRVIK Q., LEAKE E.S., FARRISS S. (158)

Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit : a technique to procure them in high state of purety.
J. Immun. 1961, 86, 128-132.

NAHMIAS A.J., KIBRICK S., ROBERT C.R. (86)

Viral leukocytes interrelationships
I. Multiplication of a D N A virus herpes simplex in human leukocyte cultures.
J. Immun. 1964, 60, 73.

NELSON E., HAGER H., KOVACS E. (35)

Virus containing leucocytes in polioencephalitis.
Science 1963, 139, 499-501.

NELSON E., HAGER H., KOVACS E. (35)

Intracytoplasmic virus crystal formation and other alterations in polymorphonuclear leucocytes in mouse polioencephalitis.
Amer. J. Path. 1964, 44, 29-49.

NICOLLE M., ADIL-BEY (38)

Etudes sur la peste bovine. Expériences sur la filtration du virus.
Ann. Inst. Pasteur 1902, 16, 56-64.

NISHMI M., BERNKOPF H. (99) (156)

The toxic effect of vaccinia virus on leucocytes in vitro.
J. Immun. 1958, 81, 460-466.

NUNGEITER W., GORDON D., COLLINS K. (161)

Comparison of the erythrocyte and leucocytes cells surfaces of guinea pig by ruse agglutination technique.
J. Infect. Dis. 1950, 87, 71-77.

PAEGLE R. (26)

Electron microscopic study of leucocytes in infectious mononucleosis.
Blood 1961, 17, 687-700.

PAPP K. (60)

Fixation du virus morbilleux aux leucocytes du sang dès la période d'inoculation de la maladie.
Bull. Acad. Nat. Med. 1937, 117, 46-51.

PEREIRA H., GIRSBERGHS (157)

A protein factor responsible for the carly cytopathic effect of adenoviruses.
Virology 1958, 6, 601-611.

POLICARD A., BESSIS M. (133)

Etude sur l'élément vivant en pathologie cellulaire. L'emploi de la microcinématographie en contraste de phase.
Rev. Hémat. 1953, 8, 57-70.

POLICARD A., BESSIS M. (133)

Essai de classification des expansions cytoplasmiques observées sur les cellules vivantes.
Rev. Hémat. 1952, 7, 543-550.

POLICARD A., COLLET A. (134)

Recherches par microcinématographie en contraste de phase sur la phagocytose des particules minérales.
Rev. Hémat. 1953, 8, 132-155.

POLICARD A., COLLET A. (134) (136)

Sur certains caractères physiologiques des leucocytes polynucléaires révélés par la microcinématographie en contraste de phase.
C.R. Acad. Sci. 1953, 237, 861-863.

POLICARD A., COLLET A., PREGERMAIN S. (140)

Etude au microscope électronique des modifications infrastructurales présentées par les polynucléaires neutrophiles dans les foyers inflammatoires aseptiques.
Rev. Hémat. 1959, 14, 97-117.

RAFFEL S. (2)

Immunity.
Appleton New-York 1961, 646 pages.

REED L.J., MUENCH H. (129) (132)

A simple method of estimating fifty per cent and points.
Amer. J. Hyg. 1938, 27, 493-497.

RIEUX J. (3)

Traité d'hématologie clinique.
Ed. DOIN Paris 1924, 761 pages.

ROBERTS J.A. (96)

Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultures macrophages from normal and ectromelia immune mice.
J. Immun. 1964, 92, 837-842.

ROBINEAUX R., FREDERIC J. (135) (139)

Contribution à l'étude des granulations neutrophiles des polynucléaires par la microcinématographie en contraste de phase.
C.R. Soc. Biol. 1955, 149, 486-489.

SABIN A.B. (45)

The mecanism of immunity to filterable viruses.
III. Role of leukocytes in immunity to vaccinia.
Brit. J. Exp. Patho. 1935, 16, 158-166.

SBARRA A.J. et KARNOVSKY M.L. (169)

The biochemical basis of phagocytosis : metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leucocytes.
J. Biol. Chem. 1959, 234, 1355-1361.

SMITH W. (42)

The distribution of virus and neutralizing antibodies in the blood and pathological exsudats of rabbit infected with vaccinia.
Brit. J. Exp. Path. 1929, 10, 93.

SMORODINTSEV A.A. (108)

Factors of natural resistance and specific immunity to viruses.
Virology 1957, 3, 299-321.

SOHIER R (9)

Mononucléose infectieuse.
Enc. Med. Clin. Tome Mal. Infectieuses n° 8070K10 1962.

SOMIER P de, PRINZIE A., DENYS P., SCHONNE E. (115)

Mécanisme d'action de l'interferon. I. Rapports avec l'acide ribonucléique viral.
Virology 1962, 16, 63-70.

STAHELIN H., SUTER E., KARNOVSKY M.L. (168)

Studies on the interaction between phagocytes and tubercle bacilli : observations on the metabolism of guinea pig leucocytes and the influence of phagocytosis.
J. Exp. Med. 1956, 104, 121-135.

STEWART F.W., LONG P.H., BRADLEY J.I. (142)

The fate of reacting leucocytes in the tuberculin and reinfection reactions.
Amer. J. Path. 1926, 2, 47-55.

THEIS G., KOPROWSKI H. (127)

A cellular basis for virus resistance.
Fed. Proc. 1961, 20, 265.

TODD C., WHITE R. (41)

Experiments on the virus of fowl-plague.
Brit. J. Exp. Path. 1928, 9, 19-27.

TURCK W (18)

Septische Erkrankungen bei verkümmerung dis granulozyten systems.
Wien. Klin. Woch. 1907, 20, 157.

VISCO G., GALEAZZI F. (148)

Studi sul sinergismo tra virus influenzale e germi
Nota I. Sull' impostanza dellefattore tossico virale
Riv. Ist. Sicroter Ital. 1957, 32, 469-488.

VOLKERT M., PIERCE C., HORSFALL F., DUBOS R.J. (150)

The enhancing effect of concurrent infection with pneumotropic viruses on pulmonary tuberculosis in mice.
J. Exp. Med. 1947, 86, 203-213.

WAGNER R. (116)

Cellular resistance to viral infection with particular reference to endogenous interferon.
Bact. Rev. 1963, 27, 72-86.

WARD R., HORSTMANN D., MELNICK J.L. (54)

Isolation of poliomyelitis virus from human extraneural sources, scarch for virus in blood of patients.
J. Clin. Inv. 1946, 25, 284-286.

WILSON H.E., SASLAW S., DOAN C.A., WOOLPERT O.C., SHWAB J.L. (146)

Reactions of monkeys to experimental mixed influenza and streptococcus infections.
J. Exp. Med. 1947, 85, 199-215.

YOSHIOKA I.W., HORSTMAN D.M. (53)

Viremie in infection due to echo virus type 9
New Engl. J. Med. 1960, 262, 224-228.

ZAKAY-RONESS Z., ROSIN A., BERNKOPF H. (153)

A study on toxic effect to vaccinia virus in mice with special reference to hematological changes.
J. Immun. 1962, 88, 184-190.

*

* *