**Zeitschrift:** Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

**Herausgeber:** Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

**Band:** 99 (1957)

**Heft:** 12

**Artikel:** Les cultures de tissus

**Autor:** Martin, L.A.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-593179

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

**Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

**Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 04.02.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch**

is possible by the operation combined with antibiotics even with mediastinitis and pleuresy. The esophagus must be closed by rubber ligatures cranial and caudal of the foreign body before it is opened. Sometimes partial resection is necessary. Further indications are dilatations of the esophagus, which as a rule are immediately before the cardia. The incision is made in the 10th left intercostal room. Only the muscle coat of the esophagus is cut, not the mucosa. No suture. Dilatation of the cranial portion of the esophagus before the basis of the heart is yare. Two such cases, caused by persistency of the ductus Botalli, are described.

---

# Les cultures de tissus[1]

*Leur utilisation pour le diagnostic des viroses vétérinaires*

Par L. A. Martin,
Chef de Service à l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca

## Introduction

Pour poser un diagnostic étiologique de maladie à virus, rappelons qu'il existe trois méthodes principales.

Première méthode: Mise en évidence du virus vivant.

Deuxième méthode: Recherche dans le sérum des anticorps soit déviants, soit neutralisants.

Troisième méthode: Recherche du virus antigène.

La première méthode: Mise en évidence du virus à partir de prélèvements pratiqués soit sur le vivant, soit sur le cadavre, comprend 3 temps.

1er temps: Isolement du virus.

2me temps: Identification du virus.

3me temps: Rapports entre le virus isolé et la maladie en cause.

Le 1er temps, l'isolement du virus se fera soit par inoculation du produit suspect à l'animal de laboratoire supposé sensible, soit par culture du virus sur un substratum vivant, puisqu'un virus ne pousse pas sur un milieu inerte. Ce substratum vivant sera soit l'œuf embryonné, soit les tissus en culture «in vitro».

Voici donc la place réservée aux cultures de tissu dans l'ensemble des méthodes qui concourent à l'établissement du diagnostic étiologique des maladies à virus.

Nous allons examiner:

1. les cultures de tissu;
2. la culture des virus en cultures de tissu. Pour certains virus, presque

[1] Exposé fait le 10 juillet 1957 devant la Société des vétérinaires genevois.

tous humains, leur mise en culture sur tissus cultivés «in vitro» est déjà un procédé diagnostique courant. Pour d'autres, l'utilisation de ce procédé n'est encore qu'au stade de la recherche. Un grand nombre de virus enfin n'ont pas encore été transférés sur cellules en culture «in vitro».

## I. Les cultures de tissu

Avant d'en arriver aux techniques modernes utilisées en virologie, rappelons rapidement le nom des précurseurs.

C'est en 1906 et en 1907 qu'un biologiste américain, le docteur Ross Harrison [1], eut l'idée d'appliquer à la culture cellulaire le procédé de la goutte pendante, utilisé par des bactériologistes comme Roux dès 1885 et comme Born en 1896 pour cultiver des lignées microbiennes issues d'un seul germe. Harrison observa la croissance de fibres nerveuses à partir de fragments de tissu nerveux de grenouille déposé dans une goutte de lymphe.

Pendant 50 ans les techniques aux perfectionnement desquelles sont liés les noms de Burrows, Carrel, Lewis, Fischer, Parker, Earle, Barsky, Lépine, Frenkel et de tant d'autres devaient conduire aux procédés actuels d'exécution relativement facile pour les laboratoires spécialisés surtout depuis que antibiotiques, antifongiques et stérilisation de l'air ambiant neutralisent les petites infections surajoutées, mais c'est seulement depuis quelques années que les cultures de tissu entrèrent dans le domaine de la virologie pratique.

Jusqu'à une époque récente, les cultures de tissu étaient surtout utilisées comme moyen d'étude de la physiologie cellulaire. La recherche systématique des différents constituants obligatoires des liquides de culture (sels, acides aminés, vitamines, conditions de pH et de rH) fit faire de grands progrès non seulement à la physiologie mais aussi à la chirurgie. Les célèbres études sur la cicatrisation des plaies de Carrel, plus tard toutes les greffes de tissu et d'organes, ont profité des connaissances acquises en cultivant des cellules «in vitro». Mais si, depuis plus de 20 ans, de nombreux virus avaient été mis en présence de cellules soit en survie, soit même multipliées in vitro, la preuve de la multiplication des virus dans ces conditions n'était apportée que par retour à l'animal sensible, ce qui enlevait à la méthode une grande part de son intérêt diagnostique.

Une ère nouvelle s'ouvrit avec les travaux de Enders, Weller et Robbins [2] qui montrèrent que certains virus pouvaient traduire leur présence et leur multiplication «in vitro» par des effets cytopathogènes spécifiques d'une observation relativement aisée.

Pour cultiver un tissu «in vitro», il faut:

1. Prélever des fragments de tissu vivant soit par biopsie, soit sur le cadavre dans les toutes premières heures après la mort.

2. Transférer ces fragments convenablement traités dans le récipient où les cellules qui en dériveront se multiplieront.

3. Adjoindre un milieu nutritif que l'on renouvelera au fur et à mesure des besoins pour permettre non seulement la survie mais aussi la multiplication «in vitro» des cellules explantées.

Il ne faut pas considérer comme culture de tissu, le procédé qui consiste à adjoindre à un milieu liquide une masse de cellules explantées qui jouent le rôle d'aliment vivant. Dans un tel milieu s'il y a bien culture du virus, il n'y a pas culture de tissu.

L'exemple le mieux connu et le plus exploité est celui de la méthode de Frenkel [3, 4] pour la culture du virus aphteux sur le plan industriel. La couche profonde de la muqueuse linguale de bovins non infectés est incorporée en quantité suffisante à un liquide nutritif spécial (350 cc pour un épithélium lingual) et le tout ensemencé de virus et maintenu à 37°. Cette technique permet la multiplication intense du virus en 20 heures. Le procédé moderne utilise des cuves de 600 litres où l'on peut traiter à la fois 300 à 500 épithéliums. Une autre variante qui allie culture de tissu et culture de virus est la méthode de J. André-Thomas et de ses collaborateurs [5] qui créant un embryome spécifique géant chez la vache y cultivent le virus aphteux. Il s'agit là d'une culture de tissu in vivo et non plus in vitro. Rappelons aussi le procédé de Borrel [6] de culture de virus claveleux: on crée sous la peau du mouton une énorme pustule aseptique à l'aide d'un virus adapté à la vie sous-cutanée, et l'on récolte en quelques jours de grandes quantités de virus.

La multiplication «in vitro» de tissus explantés répondra à deux modes totalement différents:

A. les techniques utilisant les explants primaires de tissus renouvelés à chaque expérience;

B. les techniques utilisant les souches de cellules-stock, repiquées au laboratoire et maintenues en culture continue.

A. *Méthode des explants primaires:*

Trois facteurs conditionnent cette méthode:

a) l'explant,
b) le support sur lequel se développent les cellules,
c) le milieu nutritif.

a) *L'explant: Origine.* Il est impossible de dresser la liste de tous les tissus qui ont été essayés par un nombre toujours plus grand de chercheurs.

Le but utilitaire lointain étant un emploi de la culture obtenue en virologie; il est évident que les chercheurs se sont adressés de préférence à l'espèce animale qui hébergeait naturellement le virus qu'ils se proposaient d'étudier.

Quel que soit le tissu choisi, embryonnaire ou adulte, animal ou humain, normal ou néoplasique, il sera prélevé aussi aseptiquement que possible. Ce n'est pas très difficile s'il s'agit d'une pièce opératoire humaine; fragment de tumeur ou fœtus dans ses enveloppes lors d'avortement chirurgical provoqué. Le placenta humain normal, plus spécialement l'amnios, récolté suivant une technique précise sera une source abondante de cellules épithéliales.

Les tissus animaux seront prélevés soit au laboratoire, soit à l'abattoir sur des animaux saignés au préalable. Sur un organe volumineux, rein, cœur, foie, il est facile au laboratoire d'éliminer les couches superficielles qui ont pu être contaminées.

Le tissu choisi, soigneusement lavé, sera réduit avec des ciseaux ou des lames de rasoir en fragments de 1 à 2 mm² à bords bien nets.

b) *Le support:* Les fragments sont déposés sur la génératrice d'un tube (ou réparti dans une boîte) qui aura préalablement été enduit d'une couche de plasma. Les fragments sont fixés par adjonction de quelques gouttes d'extrait embryonnaire qui coagule le plasma et englobe les fragments.

Dans d'autres méthodes il suffira souvent de déposer les fragments sur le verre bien sec (Pyrex obligatoire suffisamment propre, ou autre verre traité par le Rhovinal, substance synthétique permettant l'adhérence des cellules au verre).

c) *Le milieu:* Il y en a de très nombreux. Ils seront soit naturels, soit synthétiques, soit le plus souvent mixte.

Ils comprendront en général 4 groupes de substance:

1. des sels minéraux;
2. des corps organiques simples: glucose, acides aminés;
3. des vitamines et des facteurs de croissance;
4. des produits naturels de composition mal définie: extraits embryonnaires et sérum.

La qualité de l'eau employée a une énorme importance et sera en principe toujours bi-distillée sur verre.

Les composants du milieu choisi varieront suivant son utilisation. Au départ d'une culture le milieu sera plus riche en albumines pour assurer une nutrition abondante des cellules. Plus tard on diminuera le sérum pour ralentir la vitesse de croissance cellulaire et éviter les dégénérescences.

L'observation quotidienne des fragments explantés montre très rapidement, d'abord une foule de petites cellules rondes, mobiles, qui s'échappent du fragment et ne se multiplient pas. Puis on voit apparaître des cellules pointues aux 2 bouts, claires qui se ramifient peu à peu et dessinent entre elles l'image stylisée d'un tissu conjonctif plus ou moins discontinu.

Ce sont des fibroblastes ou cellules conjonctives qui apparaîtront toujours et souvent exclusivement dans beaucoup de cultures de tissus embryonnaires et aussi de tissus adultes.

Pour obtenir régulièrement des cellules de type épithélial à partir de tissus embryonnaires ou adultes sains il fallut attendre que fussent introduites dans la technique les méthodes de la trypsination.

Cette méthode a pour but la dissociation d'un tissu pour en libérer les éléments cellulaires. Ce ne sont plus des fragments de l'organe donneur ayant conservé leur intégrité anatomique que l'on explante, mais c'est une

suspension de cellules libérées à l'unité ou par groupe de quelques cellules que l'on met en culture.

Le tissu réduit aux ciseaux en petits fragments est introduit dans un Erlenmeyer avec un volume suffisant de solution de Trypsine à 0,25% environ. On opère de préférence à 30°. Le liquide est constamment agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Le premier liquide est rejeté au bout d'environ 30 minutes et remplacé par de la solution fraîche de trypsine. Après 10–15 minutes, le liquide qui contient de nombreuses cellules en suspension est vidé dans une fiole refroidie pour arrêter l'action de la trypsine. On renouvelle l'opération jusqu'à épuisement de l'organe en cellules récupérables. Tous les liquides de digestion sont réunis et centrifugés, les cellules lavées plusieurs fois et enfin mises en suspension dans le liquide nutritif choisi en proportion déterminée après numération à l'hématimètre. Des volumes adéquats de suspension cellulaire titrée sont introduits dans les tubes ou flacons de culture (Boîte de Roux par exemple) qui sont abandonnés à plat.

Les cellules sédimentent, se collent au verre et commenceront plus ou moins rapidement à se diviser et à recouvrir peu à peu la surface du verre d'une couche monocellulaire.

Suivant la nature de l'organe d'où proviennent les cellules origines et la composition du milieu de culture, on obtiendra soit des fibroblastes, soit des cellules de type épithélial, plus difficiles à obtenir mais beaucoup plus intéressantes pour l'utilisation en virologie.

En résumé, la méthode des explants primaires, qu'il s'agisse de fragments de tissu ou de cellules isolées, donne facilement et rapidement des fibroblastes, moins facilement et moins rapidement des cellules épithéliales. Mais elle comporte de graves inconvénients:

1. La nécessité d'avoir recours chaque fois que l'on veut une nouvelle culture à des donneurs: biopsie, fœtus, organes adultes, ne sont pas toujours faciles à se procurer au jour voulu et régulièrement.

2. En admettant toutes les conditions égales d'une expérience à l'autre, ce qui n'est pas toujours vrai, le fait de partir d'organes d'individus différents amène un élément variable dans la qualité des cellules obtenues, ce qui nuira aux expériences ultérieures menées à l'aide de ces cellules.

3. On sait enfin qu'il existe, au moins dans les cellules issues de la corticale des reins de singes *cynomolgus* et *rhesus*, des agents transmissibles de culture en culture provoquant des lésions caractérisées par d'énormes masses syncitiales avec vacuolisation intense du cytoplasme. Ce «virus spumeux» isolé en culture de tissu en 1955 par Rustigian, Johnston et Reinhardt [7] fut retrouvé (huit souches différentes) en 1956 par Hull et ses collaborateurs [8].

Ces virus pathogènes pour la cellule-singe sont totalement inoffensifs pour le singe adulte ou pour d'autres animaux.

De tels virus posent de sérieux problèmes pour le contrôle des vaccins antipoliomyélitiques dont l'innocuité est vérifiée en autres procédés par l'absence de toute action cytopathogène sur des cultures de cellules de rein de singe.

Il est évident que l'obtention de lignées cellulaires continues, toujours disponibles pour l'expérimentateur et au moins dans certaines limites semblables à elles-mêmes, devait pallier aux inconvénients des explants primaires. C'est ainsi que naquit la seconde méthode qui utilise les souches de cellules-stock.

B. *Les souches de cellules en culture continue:*

Si la chose paraît simple en principe, elle n'est pas toujours facile à réaliser. Les fibroblastes qui s'obtiennent plus facilement que les cellules épithéliales ont été les premiers cultivés en lignée continue.

La lignée de fibroblastes de poulet isolés en 1914 à l'Institut Rockefeller serait d'après un récent article (Poleff [9]) toujours entretenue. La Souche L de Earle a été isolée d'une seule cellule fibroblastique provenant de la culture de tissu conjonctif sous-cutané d'une souris (Sandford, Earle et Likely [10]. C'est à l'aide de cette souche que Earle et son équipe étudièrent longuement la nutrition cellulaire.

Les fibroblastes humains normaux purent être cultivés en survie en 1953 par Swim et Parker [11] à partir de muscles sous-cutanés d'embryon humains. Cette souche était sensible à un virus poliomyélitique. Mais c'est seulement en 1951 que Gey, Coffman et Kubicek [12] réussirent à fixer une lignée de cellules épithéliales nées d'un carcinome du col utérin. Cette souche mondialement connue sous le nom de «HeLa cells» est maintenant bien fixée et se cultive avec une relative facilité. Elle a trouvé son utilisation la plus grande dans le diagnostic de la poliomyélite.

D'autres souches, la souche KB de Eagle [13], la souche «Detroit 6» de Berman, Stulberg et Ruddle [14] furent isolées en 1955 toujours à partir de tissus néoplasiques.

Si ces souches sont utiles et intéressantes, elles se trouvent exclues de par leur origine de toute utilisation pour la production d'antigènes destinés à l'homme.

En 1954, un auteur américain Chang [15] réussit à fixer un certain nombre de lignées épithéliales continues à partir d'organes humains sains.

L'obtention et l'entretien des lignées de cellules en culture continue a donné aux virologistes un instrument de travail d'une immense valeur; encore faut-il que ces cellules se reproduisent semblables à elles-mêmes, de génération en génération. Ce n'est pas toujours le cas. La souche HeLa par exemple, la mieux connue et la plus étudiée, présente parfois des mutations qui peuvent se traduire soit dans ses qualités (par exemple sa réceptivité aux virus poliomyélitiques disparaît), soit dans sa morphologie, avec apparition de cellules géantes multinucléées.

La culture des tissus animaux a été naturellement tentée sur une large échelle, mais si les primocultures de tissus les plus variées ont été maintes fois réussies par un grand nombre d'auteurs, je n'ai trouvé nulle part l'indication précise que des lignées cellulaires provenant d'animaux sains soient à l'heure actuelle entretenues dans les laboratoires et il y a là, à n'en pas douter, une lacune à combler.

## II. Culture des virus en culture de tissus

Nous allons essayer de passer en revue les principaux virus dont la mise en évidence peut être réalisée, grâce à l'emploi des cultures de tissus.

1. *Chez l'homme:* C'est la plus grande gloire de Enders, Weller et Robbins [2], d'avoir montré en 1949 au terme de longues études poursuivies pendant plus de 4 ans que les virus poliomyélitiques étaient capables de se multiplier dans les fibroblastes issus des fragments explantés de différents tissus humains ou simiens. Ils montrèrent le pouvoir cytopathogène, facilement contrôlable sous le microscope, de ces virus pour les cellules. Ils démontrèrent la spécificité des lésions cellulaires observées en neutralisant le pouvoir cytopathogène des virus à l'aide de sérum antispécifique.

Les conséquences de ces travaux furent immenses. Ils détruisaient le dogme de la spécificité cellulaire des virus et de leur tropisme étroit. Ils introduisaient en virologie un instrument de travail sans pareil.

Les cellules en culture, isolées de toute influence nerveuse ou hormonale deviennent un milieu de culture pour virus analogue au tube de bouillon des bactériologistes. D'où possibilité d'isoler des virus à partir des sources naturelles sans frais excessifs et la possibilité d'enquêtes épidémiologiques qui étaient prohibitives avec les recherches de virus sur animaux de laboratoire.

C'est ainsi que dans un laboratoire bien équipé l'isolement et le typage d'un virus poliomyélitique à partir des selles d'un malade ne demande pas plus de 4 à 5 jours.

Mais la méthode devait se révéler d'un intérêt insoupçonné au début. C'est ainsi qu'un deuxième grand groupe de virus humains, situé à côté des virus poliomyélitiques, bénéficia rapidement de ces techniques nouvelles: le groupe des virus Coxsackie. Ces virus dont la diversité antigénique est de plus en plus grande sont l'agent chez l'homme de la pleurodynie épidémique, de certaines méningites aseptiques épidémiques et d'encéphalomyocardite du nourrisson. Ils ont été isolés la première fois par Dalldorf et Sickles [16] sur souriceaux nouveau-nés, des selles de deux enfants paralysés. Dès 1954 Crowell et Syverton [17] étudiaient le pouvoir cytopathogène de 23 souches de virus Coxsackie, représentant 16 types antigéniques. Un troisième groupe de virus humains qui ne furent isolés, classés et étudiés que grâce à leur pouvoir cytopathogène in vitro, est le groupe *des virus A.P.C.* (Adenoïdal, Pharyngeal Conjonctival viruses) décrit en premier par Rowe, Huebner, Gilmore, Parrott et Ward [18] qui isolaient un agent cytopathogène des amygdales d'enfants sur cultures de cellules HeLa.

Cet agent A.D. (Adénoïd Degeneration Agent) était retrouvé indépendamment l'année suivante (1954) par Hilleman, Werner et Stewart [19] dans des liquides de lavage de gorge de malades atteints de P.A.P. (Primary atypical pneumonie) et de A.R.D. (Acute Respiration Disease), le tout rassemblé sous le vocable de «Respiration Illness». D'où le nom de R.I. 67 donné à la souche type du virus de Hilleman et Werner. Ces virus R.I. 67 et A.D. sont maintenant réunis dans le groupe des virus A.P.C. responsables non seulement de maladies de l'arbre pulmonaire, mais aussi d'une kérato-conjonctivite épidémique dont l'étiologie exacte n'a pu être fixée que grâce aux cultures de tissu.

Enfin dernier groupe de virus humains, les virus ECHO (Enteritic cytopathogen human orphan virus) ont été isolés d'abord par Melnick en 1954 [20] puis presque en même temps par Alvarez et Sabin [21]. Par la suite des souches cytopathogènes furent isolées dans différentes parties du monde et le nombre des types antigéniques des virus ECHO se monte à l'heure actuelle à 13 [22][1].

A ces grandes familles de virus humains cytopathogènes pour les cellules d'origine humaine ou simienne, il faut ajouter d'autres virus capables de se développer chez l'homme, également doués de pouvoir cytopathogène « in vitro ». Deux auteurs américains, Sherer et Syverton, montrèrent ainsi les qualités cytopathogènes du virus de la chorioméningite lymphocytaire des virus de l'encéphalite équine, type Est et type Ouest, de la vaccine, de l'herpès et du virus de la maladie d'Aujesky.

Par contre, le virus de l'encéphalite de St-Louis et celui de l'encéphalite japonaise B peuvent se multiplier en culture de tissu humain, mais n'y exercent pas un pouvoir cytopathogène [23]. Le virus de la rougeole provoque sur culture de rein de singe ou d'homme et sur cellule carcinomateuse K.B. l'apparition de cellules géantes multinucléées (Enders et Peebles [24], Dekking et McCarthy [25]). Un tel effet peut être inhibé par du sérum de convalescent.

2. *Chez l'animal:* Ainsi que je l'ai déjà souligné, je n'ai pas trouvé de trace dans la littérature de l'établissement de lignées de cellules épithéliales isolées soit de tissu sain, soit de tissu néoplasique, de nos grands animaux domestiques. Toutes les recherches publiées sur l'isolement *in vitro* de virus animaux indiquent l'emploi d'explants primaires soit fragments sur plasma, soit cellules trypsinées poussant en couche monocellulaire.

Chez le *cheval* le virus de la *stomatite vésiculeuse* a un effet cytopathogène sur les cultures de cellules épithéliales de langue de bœuf et sur les cellules de rein de cobaye. Le virus peut se multiplier aux dépens des cellules en survie s'il est mis en contact avec la suspension cellulaire fraîchement préparée. L'effet cytopathogène du virus sera facilement observé si le virus est déposé sur des cultures cellulaires en tubes roulants âgées de 5 à 7 jours. La spécificité de ces lésions est démontrée par la neutralisation spécifique par un sérum immun (Bachrach, Callis et Hess [26, 27]).

Le virus de *l'avortement de la jument* se propage dans les cultures de tissu de rate et de poumon de chat et dans les cultures de tissus adultes de cheval (Trompe de Fallope, poumon, rate, etc.). Il n'y a pas d'effet cytopathogène mais apparition d'inclusions intranucléaires spécifiques dans les cellules en culture. Le virus de quinzième passage « in vitro » provoqua l'avortement chez une jument (Randall et coll. [28, 29, 30]).

Les virus des *encéphalites équines* dont on sait l'ubiquité zoologique naturelle se propagent non seulement dans les cultures de cellules HeLa avec action cytopathogène (Sherer et Syverton [23] 1954) mais se multiplient dans les cellules d'embryon de poulet transféré in vitro (Dulbecco et Vogt 1954 [31]) et même dans des cellules d'embryons de poissons vivipares du genre gambusia (Sanders et Soret 1954 [32]).

Parmi les virus propres *aux bovins* le cow-pox a été un des premiers à être mis sur cultures de cellules. Les précurseurs utilisèrent naturellement les cellules en survie: cultures en gouttes pendantes, puis méthode de Maitland. C'est une méthode analogue qu'employèrent encore récemment Ramon et ses collaborateurs [33]. En 1940, Feller,

---

[1] Ces virus semblèrent au début être uniquement saprophytes et non pathogènes pour l'homme bien que la responsabilité de certains types de virus ECHO dans l'étiologie de certaines méningites aseptiques paraît se dégager des recherches faites ces deux dernières années. De plus le Docteur Melnick a indiqué au cours de la dernière conférence internationale de la poliomyélite (Genève, 6–12 juillet 1957) que des souches de virus ECHO ont été isolées chez le singe (sous le nom de virus ECMO) et des virus de ce groupe feront peut-être un jour leur apparition en vétérinaire puisque le Docteur Melnick a réservé les appellations de virus ECSO pour des virus isolés de l'intestin du porc et de virus ECBO pour ceux isolés de l'intestin de bovins. J'ignore s'il s'agit d'une simple précaution ou si véritablement de tels virus ont été à l'heure actuelle isolés.

Enders et Weller [34] obtiennent la multiplication du virus sur tissus embryonnaires de poulets mis en culture mais sans observer d'effets cytopathogènes. Par la suite les auteurs, et ils sont relativement nombreux, qui cultivèrent le virus vaccinal sur cellules explantées constatèrent tous une action cytopathogène du virus qui fut spécialement décrite et étudiée par Benedek et Kempe, qui cultivèrent le virus sur cellules embryonnaires de poulet, cellules de cœur d'embryon de poulet, peau et muscle embryonnaires humains et tissu rénal embryonnaire humain [35]. Wesslèn en Suède [36] cultive « in vitro » les cellules pulmonaires d'embryons de bovins de 2 à 3 mois prélevés dans leurs enveloppes à l'abattoir. Le virus ensemencé sur cultures de cellules de 6 jours provoque une dégénérescence cellulaire facilement contrôlable. Il se multiplie activement dans les cultures et il y a là un procédé non seulement de diagnostic mais aussi de production d'un virus vaccinal stérile parfaitement actif. J'ai moi-même pu cultiver le virus vaccinal sur cellules rénales de veau explantées. Après adaptation d'un virus dermotrope de génisse à la vie stérile sur cellules, les effets cytopathogènes s'observent facilement en 48 heures environ. Le titre du virus reste élevé mais les premiers essais que j'ai pu faire sur le lapin quant au pouvoir protecteur d'un tel virus, ne sont pas très encourageants [37].

Le virus de la *peste bovine*, tout au moins celui adapté au lapin, a été mis sur cellules des ganglions lymphatiques, de rate et de moelle osseuse de lapin, par Takematsu et Morimoto [38] en 1954 au Japon. J'ignore si la méthode est utilisable sur le plan diagnostique.

Le virus de la *fièvre aphteuse* a été transféré par Sellers [39] sur des cultures de cellules de rein de veau et de rein de porc en couche monocellulaire (cellules trypsinées). Bachrach, Hess et Callis [40] mettent en culture des cellules de rein, soit de porc, soit de veau suivant une technique classique, et obtiennent au cours des 14 passages qu'ils ont réalisé, à la fois des effets cytopathogènes et une multiplication du virus ce qui fut mis en évidence, soit par des tests quantitatifs de neutralisation, soit par inoculation à l'animal. L'année suivante la question est reprise par Petermann, Long et Mackowiack [41] qui obtient des résultats analogues. La multiplication du virus aphteux sur cellules épithéliales issues de tissu rénal de veau est donc un fait acquis. Ce procédé peut servir soit à la production du virus, les reins d'un seul veau permettent de préparer 50 boîtes de Roux de cellules, soit, comme méthode annexe des méthodes sérologiques pour le diagnostic de la maladie par l'isolement de souches nouvelles du virus. A ce sujet, Sellers [39] a pu montrer que si le virus de la fièvre aphteuse détruit les cellules épithéliales, il ne s'attaque pas aux fibroblastes, alors que le virus de la stomatite vésiculeuse détruit indifféremment cellules épithéliales et fibroblastes. Il pourrait y avoir là un procédé diagnostique intéressant.

Parmi les virus ubiquistes, celui de la *rage* a été mis en culture sur cellules par Vieuchange et coll. en 1954 [42] pour le virus fixe qui se multiplie sur les fibroblastes nés du cerveau de l'embryon de souris et cultivés en tubes roulants. Par contre dans ces conditions le virus des rues ne se multiplie pas et il a fallu mettre au point une technique nouvelle, celle des cultures en dialyse (Vieuchange 1955 [43]) pour réussir à multiplier le virus des rues « in vitro » [44]. Cette méthode n'a pas encore été adaptée au diagnostic de la rage.

Un autre virus ubiquiste, celui de la fièvre de la *vallée du Rift* pathogène pour l'homme, le mouton et les bovins a été cultivé sur cellules tumorales d'un hépatome ascitique du rat « in vivo et in vitro ». Dans les 2 cas le virus se développe aux dépens des cellules qu'il détruit (Takemori et coll. 1955 [45]).

Les différentes maladies à virus du *porc* ont été étudiées en plusieurs pays à l'aide des techniques de cultures de tissu. Le complexe grippe du porc, pneumonie à virus et peste porcine si souvent déroutant pour le praticien, n'est pas encore dénoué, mais quelques premières données permettent d'espérer qu'un jour un diagnostic étiologique précis et rapide départagera dans chaque cas les tenants de la peste universelle et ceux de la pneumonie dominante.

*Peste porcine.* Des tentatives anciennes furent faites par Hecke [46] en Allemagne (1932) puis par Tenbroeck [47] aux USA en 1941. Ces auteurs réussirent à maintenir le virus « in vitro » en présence de divers fragments de tissus de porcs maintenus en survie. Il ne s'agissait pas, à proprement parler, de cultures de tissu. De même en 1955, Frenkel et von Bekkum [48] multiplient du virus en cellules de rate de porc sain mises en milieu liquide. La même année en Hongrie Markovitz et Birö [49] explantent des tissus de porc sur plasma de poule et font 27 passages successifs de virus sur les cellules explantées.

La présence du virus dans les cultures et son titrage nécessitent toujours le retour au porc bien qu'en 1956, Gustafson et Pomerat [50] aient annoncé que des explants obtenus de rate de porc inoculé 6 jours auparavant de peste porcine montraient des lésions des cellules épithéliales absentes dans les cellules des explants de rate obtenus de porc sain. C'est une première indication que le virus peut agir sur la croissance cellulaire in vitro.

*La pneumonie à virus* a été étudiée en Suède. Wesslèn et Lannek [51] en 1954 isolent un agent cytopathogène pour des cellules pulmonaires et rénales de porcelet d'un jour, des poumons de porcs malades 6 fois sur 8. Hjärre, Dinter et Bakosk [52] sont moins heureux mais observent 3 fois sur 15 un virus faiblement pathogène sur cellules épithéliales et fibroblastiques de rein de porc. Le virus de Wesslèn et Lannek n'est pas neutralisé par le sérum des porcs malades ce qui laisse planer un doute sur la spécificité du virus en cause. Les virus, tant ceux de Wesslèn que ceux de Hjärre, ne sont pas hémagglutinants pour les globules rouges de poule.

Le virus de la *grippe du porc* par contre a été cultivé par Hjärre, Dinter et Bakosk [52] sur cellules pulmonaires ou rénales d'embryon de porc. Le pouvoir cytopathogène se manifeste au cinquième passage. La spécificité du virus en cause serait démontrée par des épreuves de neutralisation. Le virus de culture serait, comme les virus de la grippe humaine, hémagglutinant pour les globules rouges de poule.

Un autre virus de grande importance, celui de la *maladie de Teschen*, a été mis en présence de cellules embryonnaires de porc dans des cultures de type Maitland par Larsky [53] en Pologne en 1956. Le mode d'appréciation de la multiplication du virus, durée d'incubation de la maladie du porc inoculé avec le matériel de culture, était trop imprécis pour permettre une conclusion. Par contre, Mayr et Schwöbel [54] réussissent à infecter des cultures de tissu de rein de porc. Après plusieurs passages, l'effet cytopathogène se manifeste. Parallèlement le pouvoir pathogène des cultures augmente avec les passages « in vitro ».

Le virus de l'*exanthème vésiculeux* du porc, type B a été mis sur cellules embryonnaires de porc par McClain, Madin et Andriese en 1954 [55]. Il y a dégénérescence des cellules épithéliales. Le virus de cultures (16 passages) provoque l'exanthème chez le porc qui acquiert l'immunité. Le sérum de cobaye anti-virus B dévie le complément en présence de l'antigène de culture et neutralise l'effet cytopathogène.

Le virus de la pseudo-rage, la *maladie d'Aujesky*, pathogène pour les cellules HeLa d'origine humaine (Sherer et Syverton [23]), a été cultivé avec succès sur couche monocellulaire de cellules trypsinées de rein de lapin (Barsky, Lamy et Lépine 1955 [56]). A la même époque en Hongrie, Ivanovics, Beladi et Szöllösy [57, 58, 59, 60] montrent le pouvoir cytopathogène du virus d'Aujesky pour les cellules explantées d'embryon de poulet et pour les cellules d'embryon de souris avec modification progressive et variable de la virulence, influencée par la cellule HeLa dans laquelle le virus se développe. Des phénomènes d'interférence peuvent être mis en évidence entre ces virus modifiés et la souche originale.

Parmi les maladies à virus du *mouton*, seul le *virus claveleux* paraît avoir été jusqu'ici cultivé « in vitro » sur cellules explantées de poumons et de peau d'embryons de mouton (Aygün 1956 [61]). Le virus verrait sa virulence diminuer au cours des passages « in vitro ».

Je n'ai pu consulter qu'un résumé du travail où il n'est pas fait mention d'une action

cytopathogène du virus. Plus récemment Boué, Baltazard et Vieuchange [62] utilisent des explants de fœtus ovins ou caprins et multiplient le virus claveleux aux dépens à la fois des fibroblastes et des cellules épithéliales néoformées. Les lésions cytopathogènes interviennent après un délai de 4 à 18 jours, tandis qu'augmente le titre du virus dans les cultures.

*Chez la poule*, le virus de la *bronchite infectieuse* (Fahey et Crowley 1956 [63]) se développe en présence de cellules embryonnaires de poulet et de cellules rénales de singe, sans qu'il en résulte un effet cytopathogène.

Par contre, le virus du *Sarcome de Rous* (Tumeur ascitique de la poule) est cytopathogène pour les fibroblastes de poulet (Lo, Gey et Chapras 1955 [64]).

Le *virus de Newcastle* est cytopathogène pour les cellules explantées de différents organes, cerveau, poumon, foie, intestin, muscles d'embryon de poulets de 7 à 19 jours (Mason et Kaufman 1955 [65]). Cette action est inhibée par le sérum immun.

Seiffert [66] a décrit en 1955 une méthode élégante de diagnostic applicable à la peste aviaire, au virus de Newcastle, à la vaccine, à la variole aviaire, et à la grippe humaine. Il met en présence dans un tube des cellules provenant d'embryons de poulet de 8 jours, le produit virulent et du milieu nutritif. Après 3 jours de culture à 35°, les tubes témoins montrent un développement de fibroblastes, alors que les tubes chargés en virus montrent des dégénérescences cellulaires évidentes. L'effet cytopathogène peut être inhibé par l'adjonction de sérum anti, d'où possibilité d'un diagnostic étiologique précis et rapide.

Le pouvoir pathogène du virus de Newcastle pour l'homme se retrouve à l'échelon cellulaire. Chanock [67] en 1955 observe l'effet cytopathogène du virus de Newcastle pour les cellules de rein de singe. Cet effet n'est pas massif et les cellules qui ont résisté se montrent insensibles à l'effet destructeur des 3 virus Polio et de certains virus ECHO. Il s'agirait d'une interférence entre le virus de Newcastle et les virus polio.

De leur coté Chapronière et Pereira en 1955 [68] différencient peste aviaire vraie et virus de Newcastle par leur action cytopathogène sur les cellules de tissu embryonnaire de poumon humain. Seul le virus de la peste aviaire serait cytopathogène.

*Chez le chien*, c'est le *virus de Rubarth* qui a bénéficié le premier de la méthode des cultures de tissus.

A quelques semaines d'intervalle en 1954, Cabasso, Stebbins, Norton et Cox d'une part [69], Fieldstell et Emery [70] d'autre part, ont montré l'effet cytopathogène spécifique du virus de Rubarth sur les cellules de rein de chien. Seules les cellules épithéliales sont touchées, les fibroblastes sont indifférents.

L'effet cytopathogène est neutralisé par un sérum spécifique.

La sensibilité des cultures de tissus au virus est telle que le diagnostic de la maladie serait possible par isolement du virus à partir d'une goutte de sang de chien malade.

## Conclusions

Pour nous résumer et pour conclure, nous pouvons affirmer que au cours de ces cinq dernières années, l'étude des virus, tant humaine que vétérinaires, se libère peu à peu des entraves considérables mises à son avancement par la nécessité où se trouvait l'expérimentation d'avoir recours, soit à l'animal d'expérience toujours suspect, soit à l'œuf embryonné qui n'est pas apte à la culture de n'importe quel virus.

Les cultures cellulaires «in vitro» lorsqu'elles seront pratiquées comme technique de routine par les laboratoires de diagnostic permettront un essor considérable dans la recherche et dans le diagnostic des maladies à virus vétérinaires.

A l'heure actuelle, dans le domaine vétérinaire, la culture de tissus n'est guère utilisée qu'à des fins scientifiques, sans que le diagnostic en bénéficie encore de façon courante. Chez l'homme au contraire, les diagnostics relatifs à la poliomyélite et aux virus voisins ne connaissant plus d'autre moyen dans la pratique quotidienne que l'utilisation des cultures de tissus.

Nous nous trouvons donc dans le domaine du diagnostic des maladies à virus et spécialement dans celui des maladies à virus vétérinaires au début d'une période qui sera, j'en suis convaincu, extrêmement fertile en résultats quand l'équipement nécessaire des laboratoires de routine aura été mis en place dans les différents pays et que des techniciens valables pourront appliquer aux viroses vétérinaires les procédés qui font chaque jour leur preuve en médecine humaine. Parmi ces procédés, la culture des virus en culture de tissu a droit à une place de choix pour deux raisons. C'est un procédé rapide une fois qu'il est mis au point et c'est un procédé relativement économique si on le compare aux procédés anciens. Souhaitons donc que l'application de ces techniques vienne très bientôt aider le clinicien à préciser ses diagnostics en matière de viroses vétérinaires.

**Zusammenfassung**

Der Verfasser legt die Methoden der Gewebekultur dar und beschreibt die Möglichkeiten derselben zur Diagnose von virusbedingten Tierseuchen. In den letzten fünf Jahren hat die Virusforschung dank der Gewebekulturen große Fortschritte gemacht. Währenddem bei den menschlichen Erkrankungen die Diagnostik namentlich für Poliomyelitis und ähnliche Viren sich dieser Methoden schon weitgehend bedient, hatten sie bisher auf tierärztlichem Gebiet mehr nur wissenschaftliche Bedeutung. Aber auch wir stehen am Beginn einer für die Virusforschung fruchtbaren Periode, die einsetzen wird, sobald die Ausrüstung der Laboratorien entsprechend vervollkommnet sein wird.

**Riassunto**

L'autore espone i metodi delle colture di tessuti e descrive le rispettive possibilità per la diagnosi delle virosi. Grazie alle colture tissurali, le indagini sui virus hanno conseguito grandi progressi. Mentre nelle malattie umane la diagnostica, specie per la polimielite e simili virus, si è servita largamente di questi metodi, finora nel campo veterinario essi ebbero solamente un'importanza piuttosto scientifica. Tuttavia per le indagini sui virus anche noi siamo all'inizio di un periodo fertile, che incomincierà appena sarà rispettivamente perfezionato l'attrezzamento dei laboratori.

**Summary**

The author describes the methods of cultivating tissues and the possibilities to recognize virus infections in animals by this methods. Great progress was realized during the last 5 years on this line. In human pathology these methods are frequently used, especially in the diagnosis of poliomyelitis and similar viruses, in veterinary science they were of more scientific importance. Also in veterinary medicine a productive period will begin with the suitable laboratory equipments.

## Bibliographie

[1] Harrison R. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 1906–07, *4*, 140. – [2] Enders J. F., Weller Th. and Robbins F. C.: Science 1949, *109*, 85. – [3] Frenkel H. S.: Bull. Off. Int.

des Epizooties, 1947, *28*, 156. – [4] Id.: Ibid. 1953, *39*, 91. – [5] André Thomas J. et Coll.: C. R. Acad. Sc. 1952, *235*, 518; ibid. 1953, *236*, 1758; ibid. 1953, *237*, 1186; ibid. 1954,:*239*, 1557; ibid. 1956, *242*, 694. – [6] Borrel A.: Annales Inst. Pasteur, 1903, *17*, 123. – [7] Rustigian R., Johnston P. et Reinhardt H.: Proc. for Exp. Biol. a med., 1955, *88*, 8. – [8] Hull R. N., Minner J. R. et Smith J. W.: Am. J. Hyg., 1956, *63*, 204. – [9] Poleff L.: Maroc Médical 1957, *36*, 25. – [10] Sandford K. K., Earle W. R. and Likely G. D.: J. Natl. cancer Inst. 1948, *9*, 229. – [11] Swim H. E. et Parker R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 1953, *83*, 577. – [12] Gey G. O., Coffman W. D., Kubicek M. T.: Cancer Research 1952, *12*, 264. – [13] Eagle H.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1955, *89*, 362. – [14] Berman L., Stulberg C. S. et Ruddle T. H.: Blood, 1955, *10*, 896. – [15] Shin-Man Chang R.: Proc. f. Exp. Biol. a med. 1954, *87*, 840. – [16] Dalldorf G. et Sickles G. M.: Science 1948, *108*, 61. – [17] Crowell R. L. et Syverton J. T.: Journal of Immunology, 1955, *74*, 169. – [18] Rowe V. P., Huebner R. J., Gilmore L. K., Parrott R. H. et Ward T. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med. 1953, *84*, 570. – [19] Hilleman M. R., Werner J. H. and Stewart M. T.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med. 1955, *90*, 555. – [20] Melnick J. L.: Am. J. Public Health, 1954, *44*, 571. – [21] Ramos, Alvarez M. et Sabin A. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med. 1954, *87*, 655. – [22] *Committee on the ECHO Viruses*. Science 1955, *122*, 1187. – [23] Sherer W. F. et Syverton J. T.: Amer. J. Path., 1954, *30*, 1057. – Ibid.: 1954, *30*, 1075. – Ibid.: Amer. J. Path., 1955, *31*, 31. – [24] Enders J. F. et Peebles T. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1954, *86*, 277. – [25] Dekking F. et McCarthy K.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1956, *93*, I. – [26] Bachrach H. L., Callis J. J. et Hess W. B.: J. immun., 1955, *75*, 186. – [27] Bachrach H. L., Callis J. J. et Hess W. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1956, *91*, 178. – [28] Randall C. C., Turner D. et Doll E. R.: Amer. J. of Path., 1955, *25*, 230. – [29] Randall C. C.: Amer. J. Path., 1955, *31*, 1165. – [30] Randall C. C. et Doll E. R.: Cornell Vet., 1956, *46*, 64. – [31] Dulbecco R. et Vogt M.: Journ. Exp. med., 1954, *98*, 183. – [32] Sanders M. et Soret M. G.: Trans. N. Y. Acad. Sc., 1954, *17*, 19. – [33] Ramon G., Richou R. Thiery J. P., Salomon L. et Doucet M. P.: Revue Immunologie, 1954, *18*, I. – [34] Feller A. E., Enders J. F. et Weller T. H.: J. Exp. Med., 1940, *72*, 367. – [35] Benedek A. L. et Kempe C. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1953, *82*, 520. – [36] Wesslen T.: VIe Congrès Intern. Microbiol., Rome, Vol. II, 115. – [37] Martin L. A.: Travaux inédits. – [38] Takematsu M. et Morimoto T.: Jap. J. Vet. Sc., 1954, *16*, 55. – [39] Sellers R. F.: Nature, 1955, *176*, 547. – [40] Bachrach H. L., Hess W. B. et Callis J.: Science, 1955, *122*, 1269. – [41] Petermann H. G., Lang R. et Mackowiack C.: C. R. Acad. Sc., 1956, *243*, 921. – [42] Béquignon R., Gruest J., Vialat Ch. et Vieuchange J.: C. R. Acad. Sc., 1954, *239*, 1162. – [43] Vieuchange J.: C. R. Acad. Sc., 1955, *241*, 1869 – [44] Id.: C. R. Acad. Sc., 1956, *242*, 201. – [45] Takemori N., Nakano M., Hemmi M. et Kitaoka: Virology, 1955, *1*, 58. – [46] Hecke F.: Zentralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig., 1932, *126*, 517. – [47] Tenbroek C.: Journ. of Exp. med., 1941, *74*, 427. – [48] Frenkel S., von Bekkum J. C. et Frenkel H. S.: Bull. Off. Int. Epiz., 1955, *43*, 327. – [49] Markovits P. et Birö J.: Acta vet. Acad. Sc. Hung., Budapest, 1955, *5*, 71. – [50] Gustafon D. P. et Pomerat C. M.: Amer. J. vet. Res., 1956, *17*, 165. – [51] Wepplèn T. et Lannek N.: Nord. Vet. Med., 1954, *6*, 481. – [52] Hjärre A., Dinter Z. et Bakosk: Nord. Vet. Med., 1954, *6*, 919. – [53] Larsky Z.: Med. weteryn (Pologne), 1955, *11*, 589. – [54] Mayr A. et Schwöbel W.: Mh. Tierheilk., 1956, *8*, 49. – [55] Mc Clain M. E., Madin S. H. et Andriese P. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1954, *86*, 771. – [56] Barsky G., Lamy et Lépine P.: Annales I. P., 1955, *89*, 415. – [57] Ivanovics G., Abraham E. et Koch A.: Zbl. f. Bakt., I. Orig., 1954, *161*, 3. – [58] Ivanovics G., Beladi I. et Szöllösy E.: Acta microbiologica hung., 1955, *3*, 159. – [59] Beladi I. et Szöllösy E.: Acta microbiol. hung., 1955, *3*, 213. – [60] Ivanovics G., Beladi H. et Szöllösy E.: Nature 1955, *176*, 972. – [61] Aygün S. T.: Archiv. J. experiment. veterinarmedizine, 1955, *9*, 415. – [62] Boué A., Baltazard M. et Vieuchange J.: C. R. Acad. Sc., 1957, *244*, 1571. – [63] Fahey J. E. et Crowley J. F.: Canada J. microb., 1956, *2*, 503. – [64] Lo W. H. Y., Gey G. O. et Shapras P.: Bull. Johns. Hosp., 1955, *97*, 248. – [65] Mason E. J. et Kaufman N.: Amer. J. Path., 1955, *31*, 883. – [66] Seiffert G.: Münch. tierärztliche W'schr., 1955, *68*, 388. – [67] Chanock R. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1955, *89*, 379. – [68] Chapronière D. M. et Pereira H. G.: British J. Exp. Path., 1955, *36*, 607. – [69] Cabasso V. J., Stebbins M. R., Norton T. W. et Cox H. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1954, *85*, 239. – [70] Fieldstell A. H. et Emery J. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. a med., 1954, *86*, 819.