

LA RÉACTION CINÉTIQUE DE SÉRO-NEUTRALISATION DES VIRUS POLIOMYÉLITIQUES

PIERRE LÉPINE, FRANCIS ROGER,
ANNIE ROGER,

*Service des Virus
Institut Pasteur, Paris*

RÉSUMÉ

Une réaction de neutralisation *in vitro* des virus poliomyélitiques selon un procédé simple et précis basé sur le contrôle du temps de destruction des cellules sensibles est décrite par les auteurs. Cette méthode permet une mesure qualitative des anticorps. Elle est applicable à des recherches épidémiologiques.

L'épidémiologie de la poliomyélite est, du point de vue des recherches de laboratoire, dominée par deux problèmes: celui des virus et celui des réactions antigéniques qu'ils provoquent chez les sujets sensibles, qu'il s'agisse de la maladie naturelle, de l'immunisation spontanée ou du contrôle des vaccinations. Nos recherches touchent à ce deuxième aspect de la question.

Nous n'envisagerons pas ici les réactions de déviation du complément, mais uniquement les réactions sérologiques de neutralisation, plus spécifiques et plus directement liées à l'état d'immunisation de l'organisme. Elles sont basées sur la recherche des anticorps neutralisants sériques et sur leur aptitude à empêcher le pouvoir cytopathogène propre des virus poliomyélitiques, si facilement observable *in vitro* sur des cellules sensibles en culture; leur spécificité étroite permet en particulier de distinguer nettement les 3 types désormais classiques du virus de la poliomyélite.

Il existe deux variétés de réactions de séro-neutralisation, toutes deux théoriquement utilisables pour des enquêtes épidémiologiques: les unes sont des réactions quantitatives et les autres des réactions qualitatives.

Les réactions quantitatives ont pour but de déterminer le titre limite des dilutions sériques susceptibles de protéger les cellules contre leur destruction par les virus: elles nous renseignent ainsi sur le *niveau* des anticorps protecteurs sériques, niveau qui, dans une certaine mesure, peut être en corrélation avec le degré de protection.

Les réactions qualitatives, au contraire, ne fournissent que l'indication d'un niveau minimum et se contentent de signaler la *présence* ou l'*absence* des anticorps protecteurs.

Lorsqu'on emploie des réactions dans un but strictement épidémiologique, on doit évidemment adopter les modalités qui conviennent le mieux au but poursuivi. Il faut donc tenir compte d'abord de la loi fondamentale des enquêtes qui commande impérieusement l'étude d'échantillons assez nombreux pour être statistiquement représentatifs. D'où l'intérêt croissant que présentent les réactions qualitatives lorsqu'elles offrent les qualités de fidélité requises.

Les réactions quantitatives, fort précises certes, mais trop complexes, nécessitent des manipulations longues et relativement coûteuses de nature à limiter le nombre des échantillons examinés.

Cette limitation de nombre est beaucoup reculée, au contraire, avec les réactions qualitatives dont la simplification maximum peut rester compatible avec une excellente précision.

Cet avantage de commodité justifie que l'on délaisse en épidémiologie les séro-neutralisations quantitatives au profit des réactions de type qualitatif: du point de vue de l'expression des résultats, le passage de l'une des deux catégories de réaction à l'autre entraîne simplement l'abandon de l'étude *du niveau moyen des anticorps* en faveur de *l'évaluation de la fréquence moyenne* des sujets sensibles sur une population donnée ou dans des conditions données.

Le processus technique choisi doit cependant être étalonné avec minutie de façon à fournir des renseignements réellement significatifs applicables au problème choisi; c'est dans ce but qu'a été développée la technique qualitative du Service des Virus de l'Institut Pasteur que nous nous proposons de rapporter ici dans ses grandes lignes¹ et de commenter de façon à en faire comprendre les raisons déterminantes.

PARTIE PRATIQUE

Les réactifs

A. Milieux

Le milieu de base est celui qui a été décrit par Lépine et al. (1956, 1957) sous le nom de « milieu semi-synthétique à l'hydrolysate de caséine », actuellement préparé et distribué sous une forme 10 fois concentrée par l'Institut Pasteur. C'est une solution saline équilibrée de Earle (voir Earle, 1943) enrichie en glutamine, en cystéine et en vitamines du groupe B conformément aux indications de Eagle (1955). La solution renferme aussi les 13

¹ La description détaillée de la technique est distribuée sur demande adressée au Service des Virus de l'Institut Pasteur, Paris.

acides aminés indispensables à la croissance des cellules de souche d'origine humaine (Eagle, 1955), tirés d'un hydrolysate enzymatique.

Ce milieu de base doit être complété par addition de solutions tampons, de sérum et d'antibiotiques.

Les solutions tampons, relativement interchangeables, sont au nombre de deux: l'une renferme un tampon volatil (solution au bicarbonate) et l'autre un tampon organique fixe (solution au « Tris »). Les deux solutions contiennent aussi du rouge de phénol qui sert d'indicateur de pH aux milieux définitifs.

1. La solution de bicarbonate est celle qui a été originellement prévue pour le milieu de Lépine et al. (1956, 1957). Elle est également préparée par l'Institut Pasteur et doit être utilisée à raison de 40 ml par litre de milieu.

2. Solution de « Tris ». Gomori (1946) a proposé le premier l'utilisation du tris (hydroxyméthyl)-amino-méthane, ou Tris, comme tampon organique fixe; son application aux cultures cellulaires est due à Swim & Parker (1955). Nous utilisons la formule suivante:

Tris (hydroxyméthyl)-amino-méthane ¹	15 g
ClH concentré	5,8 ml
Phénol-sulfone-phtaléine	0,200 g
Eau bidistillée	100 ml

Nous employons 10 ml de cette solution par litre de milieu.

Sérums. On peut indifféremment employer, pour les cultures, du sérum de veau ou du sérum de poulain.

Tous les sérums ne conviennent cependant pas, et tout particulièrement les sérums d'animaux qui ont été saignés trop souvent; en outre, chaque fois qu'on utilisera des sérums d'animaux dans les réactions de séro-neutralisation elles-mêmes, on devra éliminer préalablement ceux qui contiendraient des anticorps ou des inhibiteurs.

Chaque lot individuel de sérum doit donc être l'objet d'essais systématiques avant usage.

Antibiotiques. Nous employons ordinairement l'association de 200 000 U.O. (Unités Oxford) de pénicilline et de 50 mg de streptomycine par litre de milieu.

Après leur préparation, les milieux sont stérilisés sur bougie Chamberland L₃ ou sur filtre Seitz EKS.

¹ (CH₂OH)₃-C-NH₂; P.M.: 121,4. Commercial Solvents Corporation, 260 Madison Ave., New York, N.Y. (en France: Ets Arnaud, 22 bis boulevard de la Bastille, Paris 12^e). L'emploi du Tris a été mis au point dans notre laboratoire par le D^r Philippe Daniel qui avait également procédé à des essais d'emploi de cellules KB pour la sérologie de la poliomyélite et dont l'expérience acquise dans ces tentatives préliminaires nous a été très précieuse lors de l'élaboration de notre technique. Nous lui exprimons nos sincères remerciements.

B. Souche cellulaire

C'est la souche KB qui provient d'un épithélioma buccal humain, et dont la sensibilité aux virus poliomyélitiques a été démontrée par Eagle et al. (1956).

Cette souche est entretenue directement au contact du verre en boîtes de Roux de 1 litre en verre Pyrex, hermétiquement bouchées au caoutchouc gris et en présence de 100 ml de milieu au bicarbonate avec une concentration de sérum animal de l'ordre de 16,6 %. Après 5 à 7 jours d'incubation à plat à l'étuve à 37°C, on observe le développement d'une culture en nappe homogène à la surface du verre: au microscope, le film cellulaire doit alors être continu et revêtir un aspect franchement épithélial; les cellules, dont les limites sont nettement visibles, doivent être claires, pourvues d'un seul noyau et ne présenter aucun symptôme de dégénérescence.

Elles sont alors utilisables soit pour le passage en série à de nouvelles boîtes de Roux, soit pour les réactions de séro-neutralisation.

Dans les deux cas, on rejette d'abord le milieu contenu dans les boîtes puis on décolle les cellules et on les sépare les unes des autres par trypsination selon le procédé de Dulbecco & Vogt (1954). A cet effet, nous utilisons ordinairement une trypsine purifiée, préparée par l'Institut Pasteur et que nous employons en solution dans du liquide de Hanks, à raison de 10 ml de trypsine à 3 ‰ par boîte de Roux. La solution de trypsine est stérilisable sur bougie Chamberland L₃ ou sur filtre Seitz EKS; elle est conservée ensuite à +4°C et garde son activité pendant plusieurs mois.

Pour l'entretien des souches, la numération des suspensions est inutile: il suffit de centrifuger le liquide de trypsination à 1000 t/m pendant 5 minutes, de recueillir le culot cellulaire, de le remettre en suspension par aspiration et refoulement, et de l'ensemencer dans 2 ou 3 nouvelles boîtes de Roux avec 100 ml de milieu neuf.

C. Souches de virus

On doit disposer pour les séro-neutralisations de suspensions-stocks de virus des 3 types. Tous les virus poliomyélitiques de type parfaitement connu sont utilisables, quelle que soit leur origine, qu'ils aient été obtenus sur cellules de souche ou sur cellules de première explantation, à condition que leur titre atteigne ou dépasse 10⁶.

Cependant, il est commode de préparer également les virus sur cellules KB en employant des souches standard, et le processus suivant nous a toujours donné des résultats d'une grande régularité.

Après avoir trypsiné les cellules provenant de boîtes suffisamment riches, on procède à leur numération selon le procédé de Sanford et al. (1951), puis on prépare une suspension à 800 000 cellules par ml, cette suspension étant effectuée dans du milieu au bicarbonate contenant 16,6% d'un sérum dépourvu d'anticorps. On ensemence 100 ml de cette suspension dans une boîte de Roux de 1 litre; on y ajoute 1 ml de virus titrant environ

10⁶ et on place la boîte à plat à l'étuve à 37°C. On assiste rapidement au collage des cellules sur le verre et à un début de multiplication mais, après environ 2 jours, les cellules sont brusquement détruites ce qui provoque le décollement total du film cellulaire. On récolte aussitôt le liquide; on le centrifuge à 3000 t/m pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires et on répartit en ampoules Pyrex à raison de 1 ml par ampoule; on scelle au chalumeau et on stocke à -20°C.

D. Sérums à tester

Ceux-ci ont été stockés à -12°C en ampoules scellées dès leur arrivée au laboratoire et jusqu'à leur utilisation.

On les inactive alors préalablement par chauffage d'une 1/2 heure à 56°C.

Titrages des virus

Les titrages doivent être faits dans les conditions mêmes de la réaction et de préférence dans les jours qui suivent la récolte du virus. Ils resteront valables pendant plusieurs mois en raison de la grande stabilité des virus poliomyélitiques à basse température.

On fera d'abord des dilutions de virus régulièrement échelonnées de 0,5 log en 0,5 log de 10⁻¹ à 10^{-8,5} (1/10, 1/32, 1/100, 1/320, etc.) en ayant soin de changer de pipette entre chaque dilution et en utilisant exclusivement du milieu au Tris *sans sérum*.

On distribuera ensuite 0,45 ml du liquide correspondant à chaque dilution dans des tubes de Kahn en verre neutre verticalement disposés, en employant 6 à 8 tubes par dilution.

On porte les tubes pendant 3 heures à 37°C, puis on distribue dans chaque tube 0,25 ml d'une suspension de cellules à 100 000 cellules par ml (suspension également réalisée dans du milieu au Tris *sans sérum*), enfin on agite vigoureusement les portoirs.

On laisse les cellules au contact du virus pendant 1/2 heure à la température du laboratoire, puis on ajoute 0,25 ml de milieu au Tris avec sérum (sérum: 40 parties; milieu au Tris: 100 parties), ce qui correspond à une concentration finale de 9% de sérum animal. On agite à nouveau vigoureusement et on recouvre la surface libre du liquide avec 0,4 ml d'huile de vaseline stérilisée par autoclavage à 105°C.

Il ne reste plus alors qu'à mettre les portoirs à l'étuve à 37°C.

Lectures : il est indispensable de faire deux lectures. La première aura lieu après 48 heures d'incubation, la seconde après 72 heures.

On recherchera l'effet cytopathogène des virus poliomyélitiques par observation directe des cellules au microscope inversé (type microscope de chimiste de Leitz) avec un grossissement de l'ordre de 60 à 100 fois.

Détermination du titre utilisable : on choisira pour les réactions de séro-neutralisation la plus faible quantité de virus permettant d'obtenir une lyse

homogène totale au 3^e jour dans l'ensemble des 6 à 8 tubes correspondants. Cette quantité de virus ne doit en revanche avoir provoqué aucune destruction des cellules au 2^e jour dans les mêmes tubes. Toute diminution dans le titre du virus doit immédiatement entraîner son élimination et son remplacement par une autre suspension stock.

Réaction de séro-neutralisation proprement dite

Comme le dosage des virus, la réaction se pratique dans des tubes de Kahn verticaux.

Pour chaque sérum, on utilise 7 tubes de Kahn: 2 tubes réactifs (TR) par type de virus et un témoin-sérum (TS) dans lequel le virus sera remplacé par une quantité équivalente de milieu au Tris *sans sérum*.

Les TR recevront donc le virus, le sérum examiné et les cellules, alors que le témoin-sérum recevra simplement le sérum examiné et les cellules.

A. Disposition de la réaction pour les sérums eux-mêmes

On commence par distribuer 0,45 ml de chaque virus à la dilution convenable dans les tubes correspondant à chaque type, la dilution du virus étant effectuée dans le milieu au Tris *sans sérum*. Dans le TS, on distribue de la même façon 0,45 ml de milieu au Tris *sans sérum*.

On ajoute ensuite 0,05 ml de sérum à examiner dans chacun des 7 tubes correspondant à chaque sérum: le sérum examiné se trouve ainsi automatiquement dilué à 1/10 dans la suspension de virus.

On agite vigoureusement les portoirs et on porte pendant 3 heures à 37°C, puis on ajoute dans tous les tubes 0,25 ml d'une suspension à 100 000 cellules par ml (la suspension étant faite dans du milieu au Tris *sans sérum*).

On laisse ½ heure à la température du laboratoire et on ajoute encore 0,25 ml de milieu au Tris à 9% de sérum.

On recouvre d'huile de vaseline et on porte à 37°C jusqu'au moment des lectures.

B. Témoins : on peut adjoindre aux tubes contenant les sérums examinés :

a) un témoin-sérum positif (qui sera traité exactement comme les sérums examinés)

b) des témoins-cellules (qui recevront simplement 0,25 ml de suspension cellulaire, 0,50 ml de milieu au Tris sans sérum et 0,25 ml de milieu au Tris avec sérum.

Mais il est surtout rigoureusement indispensable de coupler à la réaction des témoins-virus (TV) en nombre suffisant (8 à 10 par type de virus et par dose): chacun d'eux reçoit 0,45 ml de virus, 0,25 ml de suspension cellulaire et 0,25 ml de milieu au Tris avec sérum. Il est bon d'encadrer les témoins-

virus qui contiennent la même quantité de virus que les tubes réactifs par deux autres groupes de TV, en nombre identique, mais où les tubes contiendront dans l'un dix fois plus de virus et dans l'autre dix fois moins, soit 1 log au-dessous et 1 log au-dessus de la dilution utilisée.

C. Lectures : après 48 heures, on peut lire tous les tubes de la réaction et apprécier ainsi l'état d'ensemble des cellules avant tout effet cytopathogène.

Mais ce sont surtout les témoins-virus qu'il faut absolument lire à cette date : au 2^e jour, les cellules doivent être rigoureusement indemnes dans les TV qui renferment la quantité utilisée pour la réaction; elles doivent, en revanche, être détruites dans les TV qui contiennent une quantité 10 fois plus forte.

Après 72 heures, la destruction des cellules doit être complète dans l'ensemble des témoins-virus contenant la dose correcte de virus; elle doit être nulle dans les TV où se trouve la quantité 10 fois plus faible.

Si la marche de la destruction cellulaire, ainsi contrôlée par les TV, a été normale, on procède sans plus attendre à la lecture de tous les tubes réactifs.

Les sérums doivent être considérés comme positifs contre un type de virus seulement s'ils protègent les cellules dans les 2 tubes réactifs correspondant à ce type; ils sont considérés comme négatifs dans le cas contraire (même si les cellules sont détruites dans l'un seulement des 2 TR).

Chaque fois qu'il y aura une destruction complète des cellules avec les 3 types de virus en présence d'un sérum donné, *on n'oubliera jamais d'examiner le TS* où les cellules devront être rigoureusement intactes: la destruction des cellules ne saurait, en effet, avoir aucune signification spécifique dans les TR si le sérum étudié est par lui-même cytopathogène.

PARTIE THÉORIQUE

Les réactions de séro-neutralisation qualitatives *in vitro* impliquent l'utilisation de trois éléments :

- les anticorps dont il s'agit de déceler la présence,*
- le virus,*
- et les cellules sensibles.*

Le système virus-cellules constitue l'indicateur de la réaction et le phénomène observé est l'action protectrice éventuelle exercée par le sérum sur la destruction des cellules sensibles par le virus.

Alors que dans d'autres réactions antigène-anticorps l'union de l'antigène et de l'anticorps est matérialisée par son intervention dans un système cellulaire inerte (système hémolytique; hémato-agglutination), dans le cas

d'une réaction de neutralisation, l'intervention d'un système cellulaire en culture introduit un élément supplémentaire de complexité.

Dans le premier cas, il s'agit simplement de maintenir intacts des éléments dont le métabolisme est pratiquement suspendu; dans le second, au contraire, on doit faire entrer en jeu des cellules en vie dont le comportement ne doit être perturbé par aucun autre facteur que ceux dus au virus lui-même.

Le virus est, en effet, titré par rapport au système cellulaire et c'est en définitive *sur la sensibilité de ce dernier et sur l'homogénéité de sa réponse* que repose la précision des mesures.

Il est donc indispensable de parvenir d'abord à un contrôle rigoureux des conditions d'utilisation des cellules elles-mêmes.

Cellules

Pour les réactions de neutralisation comme pour les dosages il est évidemment indispensable de s'adresser à des cellules sensibles aux virus poliomyélitiques, mais il est commode d'utiliser des cellules de souche plutôt que des cellules de première explantation.

Les cellules de souche peuvent, en effet, être cultivées en série pour un prix de revient suffisamment faible, ce qui rend l'utilisateur totalement indépendant d'une source extérieure de cellules, sujétion malheureusement inséparable des cellules de première explantation. Les cellules de souche ont, en outre, l'avantage de fournir une population de sensibilité homogène.

Dans la pratique, nous avons choisi la souche cellulaire KB de Eagle en raison de sa vigoureuse vitalité en culture et de la facilité de sa multiplication dans un milieu simple à base d'hydrolysats de caséine.

Avec des cellules de première explantation, comme les cellules épithéliales de rein de singe, on a coutume d'utiliser pour les séro-neutralisations un système comportant des cellules en survie, dont le nombre reste sensiblement constant pendant toute la durée des observations jusqu'au moment où commence à apparaître le pouvoir cytopathogène propre des virus: l'observation se ramène à celle d'un système statique.

On peut aussi maintenir les cellules de souche en survie et employer par conséquent avec elles un système analogue pour les séro-neutralisations, mais le dispositif correspondant est peu commode car il oblige à procéder en deux temps: on doit d'abord pratiquer la culture des cellules dans les tubes en présence d'une quantité relativement importante de sérum puis il faut remplacer le milieu au sérum par un milieu sans sérum au moment où l'on place au contact des cellules le mélange de virus et de sérum examiné.

Cette disposition oblige à des manipulations nombreuses, longues et relativement compliquées qui font perdre aux réactions qualitatives une grande part de leur intérêt.

Il nous est apparu beaucoup plus avantageux de procéder en un seul temps. Ainsi nous opérons dans des conditions assez proches de celles décrites par Salk et al. (1954) sous le nom de technique colorimétrique en portant simplement une suspension de cellules obtenue par trypsination au contact du mélange virus-sérum examiné.

Mais il faut alors que les cellules adhèrent au verre après leur ensemencement et qu'elles fournissent le film épithélial régulier et continu indispensable pour l'observation. Pour cela, le moyen le plus commode consiste à introduire dans le milieu une quantité relativement importante de sérum animal. C'est pourquoi nous procédons aux séro-neutralisations en présence de sérum de veau ou de poulain.

Dans ces conditions, les cellules de souche ne sont plus simplement en survie: elles se multiplient au contraire de façon continue.

Il en résulte que le système choisi diffère essentiellement du système « statique » usuel à cellules de rein de singe: il s'agit, en effet, d'un système « cinétique » où la multiplication des cellules se poursuit activement.

Les différences intrinsèques des deux systèmes cellulaires deviennent d'ailleurs encore plus marquées dès qu'on les utilise pour des réactions de séro-neutralisation ou pour des titrages: les deux systèmes se rapprochent en effet ou diffèrent notablement selon la quantité de virus présent dans le milieu au départ.

Si la concentration du virus dans l'inoculum est élevée, l'effet cytopathogène s'exerce d'emblée dans les deux systèmes: il n'y a donc aucune multiplication notable des cellules pendant la durée des observations, même si on utilise un système cinétique potentiel.

Il n'en va pas de même *dès qu'on diminue* la quantité de virus inoculée, ce qui est précisément le cas dans les réactions de séro-neutralisation. L'apparition des lésions caractéristiques est alors retardée. La multiplication des cellules devient ainsi possible à l'intérieur des systèmes cinétiques, ce qui en matérialise l'individualité.

Théoriquement, la présence d'un sérum animal en concentration relativement importante dans le système cinétique introduit une complication supplémentaire liée à la présence possible dans ce sérum d'anticorps ou d'inhibiteurs. Pour éviter toute influence inhibitrice des sérums de veau ou de poulain, nous avons pris deux ordres distincts de précautions.

La première est de n'employer que des sérums d'animaux préalablement testés pour leur contenu en anticorps: seuls sont, en effet, utilisables dans les séro-neutralisations ou les dosages, les sérums d'animaux qui ne renferment aucun facteur inhibiteur à la concentration où ils sont utilisés.

La deuxième est d'introduire toujours le sérum animal en tout dernier ressort dans les tubes de Kahn, c'est-à-dire de ne l'ajouter au milieu qu'après la fixation du virus sur les cellules sensibles, ce qui réduit énormément les possibilités d'interférence.

Choix et titrage des suspensions virulentes en vue des réactions de séro-neutralisation

A. Détermination de la quantité optimum utilisable

On sait qu'il existe, avec les virus poliomyélitiques en particulier, une relation linéaire entre le logarithme des quantités de virus neutralisées et le logarithme des quantités de sérum neutralisantes (Ledinko et al., 1952).

La sensibilité d'une réaction de séro-neutralisation augmente donc lorsque la quantité de virus à inactiver devient plus faible.

On pourrait par suite employer théoriquement la dose cytopathogène 50 pour cent (DCT_{50}), celle-ci répondant avec les systèmes quantiques de mesure à la plus faible quantité qui puisse être mesurée avec précision.

Toutefois, ce procédé exigerait pour chaque sérum un nombre relativement considérable de tubes réactifs et serait, par conséquent incompatible avec la simplicité obligatoirement requise des réactions de type qualitatif.

En dehors de ce point de vue pratique, on peut du reste se demander si l'emploi des DCT_{50} présente un avantage réel dans l'exécution d'une réaction basée sur la destruction cellulaire. Il y a lieu en effet de remarquer que l'on n'emploie jamais *une* DL_{50} dans les réactions de séro-neutralisation, mais seulement des multiples de la DL_{50} . Or dès que l'on introduit dans un système des multiples d'une DL_{50} , soit n , on y ajoute en fait $n DL_{50} > DL_{100}$. Toute la question est de savoir si la reproductibilité des effets cytopathogènes est meilleure avec des DL_{100} exactement observées qu'avec des multiples calculés de la DL_{50} . Nous avons donc examiné la reproductibilité des effets cytopathogènes obtenus avec des multiples de la DL_{50} .

Nous avons titré plusieurs lots d'un même type de virus sur cellules KB avec la technique usuelle, c'est-à-dire avec un intervalle de 1 log entre les différentes dilutions, et nous avons utilisé les différents lots titrés à raison de 400 DL_{50} par tube inoculé en employant 10 tubes par dilution et par lot.

Contrairement à ce qui aurait dû se produire si les titrages exprimés en DL_{50} donnaient des résultats homogènes, nous avons observé un temps de destruction cellulaire différent d'un lot de virus à l'autre, le lot le plus précoce détruisant les cellules en 48 heures, le lot le plus tardif en 96 heures.

L'utilisation des multiples de la DL_{50} selon les procédés classiques de titrage, ne conduit donc pas à une bonne reproductibilité des titrages lorsque ceux-ci reposent sur la lecture d'un effet cytopathogène. C'est pourquoi nous avons employé le *temps de destruction cellulaire* pour la détermination de la quantité de virus : soit la « dose 3^e jour » c'est-à-dire celle qui détruit les cellules au 3^e jour *quel que soit le lot de virus utilisé et titré*. La reproductibilité est ainsi beaucoup plus grande, comme on pourra le voir à la lecture du tableau 1 obtenu pour chacun des trois types du virus lors de six titrages échelonnés sur une durée de trois mois. On peut constater que la reproductibilité est parfaite et la concordance des titrages d'un même virus absolue.

TABEAU 1. REPRODUCTIBILITÉ DE LA DL₁₀₀ (3^e jour)

	Virus I (lot 2)			Virus II (lot 12)			Virus III (lot 10)		
Nombre des titrages	6			6			6		
Titres « 3 ^e jour » obtenus	6,5	6,5	6,5	5	5	5	5,5	5,5	5,5
	6,5	6,5	6,5	5	5	5	5,5	5,5	5,5
Titrages échelonnés sur	3 mois			3 mois			3 mois		

Au contraire, dans le cas d'emploi de doses DL₅₀, à doses de virus égales le temps de destruction cellulaire varie nettement d'un type de virus à l'autre: la destruction est plus rapide avec le type I, elle est plus lente avec le type 2, et le type 3 occupe habituellement une position intermédiaire. Si l'on emploie par exemple 200 DL₅₀ (le dosage étant effectué avec une échelle de 0,5 log en 0,5 log) les cellules seront détruites en 48 h avec le type 1, en trois jours avec le type 3, en quatre jours avec le type 2. Il en résulte, si l'on emploie une quantité identique des trois virus dans les réactions de séro-neutralisation, la nécessité de pratiquer les lectures pendant trois jours au moins. Cet inconvénient n'existe pas si l'on emploie la dose 3^e jour pour chacun des trois virus; cette façon de faire étant légitime si on lit les portoirs au moment même où les destructions se produisent dans les témoins, c'est-à-dire précisément au 3^e jour.

C'est pourquoi on est obligé d'utiliser une quantité de virus capable de provoquer une destruction totale des cellules: tout le problème revient alors à rechercher la plus faible dose 100 pour cent (DCT₁₀₀) possible.

Or, il existe une relation entre la quantité de virus inoculée dans les cultures et le temps de latence des destructions cellulaires, si on prend la précaution, bien entendu, d'effectuer les dosages de virus avec des milieux strictement comparables et surtout avec un nombre de cellules rigoureusement constant au départ.¹

Il nous faut donc déterminer simultanément la plus faible dose 100% possible et le temps de destruction cellulaire correspondant.

Mais il se trouve qu'avec les plus faibles doses 100% mortelles, le temps de destruction cellulaire ne peut plus être mesuré avec précision.

Avec les plus petites quantités de virus, la nécrose des cellules se produit en effet à des moments différents selon le tube considéré: pour une même dilution de virus, par exemple, il pourra y avoir entre les tubes un écart de plus de 2 jours.³

¹ Ce point sera étudié en détail dans un travail ultérieur.

La plus petite dose 100 % possible si l'on veut s'en tenir à des conditions de reproductibilité régulière est donc finalement la plus petite quantité de virus capable de provoquer une nécrose cellulaire homogène dans un même temps pour tous les tubes considérés.

En pratique, avec le système KB utilisé, la destruction des cellules cesse d'être homogène après le 3^e jour, c'est pourquoi nous avons choisi comme dose optimum de virus celle qui provoque la destruction des cellules au 3^e jour de leur culture.

Supposons maintenant que l'on utilise une concentration constante de virus pour les séro-neutralisations et qu'un sérum étudié renferme une quantité d'anticorps trop faible pour neutraliser la totalité de ce virus. Il restera finalement une certaine quantité de virus libre après l'inactivation immunologique: cette quantité sera inférieure à celle qui aura été initialement introduite mais elle restera néanmoins capable de provoquer la destruction finale des cellules inoculées. En revanche, le temps de destruction des cellules sensibles sera augmenté par suite de la diminution de la quantité de virus libre et la période de latence de l'effet cytopathogène sera donc plus longue.

Supposons que l'on procède dans ce cas à deux examens successifs des tubes réactifs envisagés :

a) si le premier examen a lieu au moment où les cellules des témoins-virus viennent d'être détruites, les tubes réactifs correspondant à la neutralisation partielle apparaîtront comme protégés par suite de l'augmentation du temps de latence de leur nécrose.

b) si le second examen est effectué beaucoup plus tard, la période de latence pourra être dépassée de sorte que la neutralisation partielle passera inaperçue.

Pour qu'une réaction de séro-neutralisation qualitative soit sensible, il faut donc que la lecture soit effectuée au moment précis où les cellules des témoins-virus sont détruites.

C'est donc avec le système cinétique KB au 3^e jour que doivent être effectuées les lectures.

Or, le procédé colorimétrique ne permet pas de satisfaire à cette exigence: il faut en effet retarder l'examen de 2 à 3 jours par rapport aux destructions cellulaires pour que devienne apparente avec cette méthode la différence de pH entre les tubes où les cellules sont restées vivantes et ceux où elles ont été détruites.

C'est pourquoi nous avons préféré la technique microscopique.

Ceci dit on peut se demander quel résultat donne la comparaison par rapport à la méthode cinétique des autres méthodes appliquées à des sérums identiques.

Pour les réactions qualitatives qui seules nous intéressent ici les résultats obtenus sont identiques avec la technique cinétique et avec la technique

classique sur rein de singe. ¹ On peut constater en effet, d'après le tableau 2 portant sur l'examen comparatif de 40 sérums examinés chacun deux fois par la même méthode (soit deux fois par la méthode cinétique sur cellules KB et deux fois également par la méthode sur rein de singe) que les deux méthodes concordent dans 94,2% des cas, la concordance des réactions exécutées sur rein de singe étant de 95,8% alors que la reproductibilité de la méthode cinétique donne 98,3% de réponses identiques: les faibles différences entre les deux méthodes sont donc dues davantage à la variabilité des réponses de la méthode classique qu'à des divergences avec la méthode cinétique.

TABEAU 2. REPRODUCTIBILITÉ COMPARÉE DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LA TECHNIQUE CINÉTIQUE SUR CELLULES KB ET AVEC LA TECHNIQUE CLASSIQUE SUR REIN DE SINGE (R.S.)

		Reproductibilité sur KB (sérums examinés 2 fois)	Reproductibilité sur R.S. (sérums examinés 2 fois)	Comparaison par examen simultané sur R.S. et sur KB
Nombre de sérums examinés (mêmes sérums pour les 3 rubriques)		40	40	40
Nombre de réponses (pour les 3 types de virus)		120	120	120
Réponses identiques		118	115	113
Réponses différentes		2	5	7
Réponses identiques (%)		98,3	95,8	94,2
Nombre de réponses divergentes	type I	0	0	$\frac{1}{(KB - R.S. -)}$
	type II	1	3	$\frac{4}{(KB + R.S. - = 2)}$ $\frac{2}{(KB - R.S. - = 2)}$
	type III	1	2	$\frac{2}{(KB + R.S. -)}$
Nombre de réponses également différentes dans la comparaison KB/R.S.)		2	3	

B. Elimination des suspensions contenant une quantité appréciable de virus inactivé

Les anticorps neutralisants ne peuvent être décelés directement que par l'inactivation immunologique qu'ils provoquent.

¹ Dans les réactions quantitatives, au contraire, le titre limite des sérums est toujours plus élevé avec la technique cinétique (en moyenne quatre fois). Nous reviendrons sur cette question dans un prochain travail.

Ils n'en demeurent pas moins capables de se combiner avec des particules préalablement soumises à d'autres processus d'inactivation (Gomori, 1946), dans la mesure où ces processus (thermiques ou chimiques) ont ménagé l'antigénicité du virus en cours d'inactivation.

Il faut donc éviter tout traitement susceptible d'entraîner une inactivation partielle des suspensions virulentes utilisées pour les séro-neutralisations sous peine de voir des particules avirulentes ainsi produites entrer en compétition avec le virus infectant vis-à-vis des anticorps, ce qui peut entraîner une diminution marquée dans la sensibilité des réactions.

Pour la même raison il faudra rejeter systématiquement les suspensions virulentes dont le titre aura diminué en cours de conservation. Toute diminution du titre s'accompagne, en effet, d'un accroissement du nombre des particules antigéniques avirulentes et provoque, par conséquent, une diminution appréciable dans la proportion des sérums positifs détectés dans les séro-neutralisations qualitatives.

Choix d'une concentration de sérum pour les réactions de séro-neutralisation

La droite d'inactivation immunologique nous apprend que la quantité de virus inactivée augmente comme une puissance de la quantité de sérum inactivante.

Il y aurait donc théoriquement intérêt à utiliser la plus grande quantité possible de sérum examiné.

Cependant, les anticorps ne peuvent être considérés comme les témoins d'une protection efficace que s'ils atteignent un certain niveau. On doit donc s'en tenir à des dilutions sériques significatives.

Avec le système cinétique KB, le titre significatif est de 1/10, ce qui veut dire que la concentration finale de sérum examiné dans le mélange sérum-virus doit être de 1/10 pendant le temps d'inactivation proprement dit.

Détermination de la température et du temps optimum d'inactivation

On sait que l'inactivation sérologique d'un virus est une réaction qui demande un certain temps et dont la rapidité augmente avec la température.

Pour les virus poliomyélitiques dont l'inactivation thermique est relativement lente, il y a donc intérêt à opérer à 37°C.

Mais il demeure indispensable de mesurer avec précision le temps d'inactivation car celui-ci est une caractéristique particulière à chaque système de séro-neutralisation.

Pour notre part, nous avons observé que la proportion des sérums protecteurs augmente pendant les deux premières heures d'incubation à 37°C pour se maintenir constant ensuite pendant plusieurs heures.

Nous avons donc choisi un temps d'inactivation tel que le système se trouve placé dans une zone où le pourcentage des sérums reconnus positifs

n'augmente plus; c'est pourquoi nous consacrons toujours 3 heures à la période effective d'incubation. Cette pratique est du reste en accord avec les vues exprimées par Gard (1957) dans son étude de la neutralisation du virus et elle concorde avec les observations faites d'autre part par Perkins et al. (1958).

En résumé, la méthode cinétique que nous proposons a été expérimentée pendant sept mois sur plus de 18 000 sérums et sa valeur pratique a été confirmée depuis dans un nombre considérable de réactions (plus de 30 000 à l'heure actuelle). Elle apporte au laboratoire une technique à la fois pratique et fidèle. Sa reproductibilité s'est montrée supérieure à la reproductibilité obtenue par toute autre méthode essayée jusqu'à ce jour. Mais elle a de plus l'avantage considérable, par sa technique simplifiée, de faire gagner un temps important sans rien perdre de la précision qu'on est en droit d'en attendre, et de permettre à un même laboratoire, disposant du même matériel, des mêmes locaux et du même personnel, d'opérer au moins 10 fois plus de réactions qu'avec la méthode classique.

Le tableau 3 montre le rendement, dans notre propre laboratoire et dans des conditions rigoureusement comparables, du nombre des réactions effectuées par trois techniciens travaillant à temps complet pendant une durée de trois mois. Du 1^{er} décembre 1957 au 28 février 1958, ces techniciens ont pu examiner 900 sérums (en employant la méthode sur rein de singe) ce qui représente déjà, avec la technique classique, une performance.

TABEAU 3. RENDEMENT COMPARÉ DE LA TECHNIQUE CLASSIQUE SUR CELLULES DE REIN DE SINGE ET DE LA TECHNIQUE CINÉTIQUE SUR CELLULES KB

	Technique sur rein de singe	Technique cinétique sur KB
Périodes de 3 mois comparées	1 ^{er} décembre 1957 au 28 février 1958	1 ^{er} décembre 1958 au 28 février 1959
Nombre de techniciens (utilisés exclusivement pour les séro-neutralisations)	3	3
Nombre de sérums examinés	900	10 252
Augmentation du rendement avec la technique cinétique	$\frac{900}{10\,252} = 11,391$, soit plus de 11 fois	

Les mêmes techniciens, pendant la période de trois mois du 1^{er} décembre 1958 au 28 février 1959, employant la technique cinétique sur cellules KB ont pu examiner 10 252 sérums, soit 11 fois plus qu'avec la méthode classique.

Nous insistons encore sur le fait que cette augmentation considérable du rendement, loin de s'être faite au détriment de la précision des résultats a permis au contraire d'augmenter considérablement cette dernière, ainsi que nous le verrons dans un travail prochain qui sera consacré aux méthodes de mesure et de contrôle du pouvoir antigénique du vaccin antipoliomyélitique.

En conclusion, le procédé décrit se distingue par l'association d'une grande simplicité pratique et d'un niveau élevé de précision.

Il doit, en particulier, sa sensibilité à la détermination et au contrôle rigoureux des temps de destruction cellulaire.

Sa fidélité, condition essentielle de la réaction sérologique, résulte tout entière de l'usage d'une quantité optimum de virus, choisie pour la reproductibilité régulière dans le temps des destructions cellulaires qu'elle provoque.

SUMMARY

The authors describe an *in vitro* poliovirus neutralization reaction based on determination of the destruction time of sensitive cells; this provides a qualitative antibody estimation applicable to epidemiological investigations. KB cells in the active-growth phase are used and maintained in a constant medium for set periods of time in the presence of the lowest TCD₁₀₀ of each poliovirus type capable of destroying those cells in 72 hours.

This technique is very simple to carry out and highly accurate. Its great sensitivity is due to adherence to a strict time schedule in determining cell destruction. As it requires the use of an optimum quantity of virus selected for regular reproductivity of cell-destruction time, it is also very consistent. Its advantages and practical value have been amply demonstrated in examinations of over 30 000 sera.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dulbecco, R. & Vogt, M. (1954) *J. exp. Med.*, **99**, 165
 Eagle, H. (1955) *Science*, **122**, 501
 Eagle, H., Habel, K., Rowe, W. P. & Huebner, R. J. (1956) *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **91**, 361
 Earle, W. R. (1943) *J. nat. Cancer Inst.*, **4**, 165
 Gard, S. (1957) *Arch. ges. Virusforsch.*, **7**, 449
 Gomori, G. (1946) *Proc. Soc. exp. Biol.*, **62**, 33
 Krech, U. (1955) *J. exp. Med.*, **101**, 331
 Ledinko, N., Riordan, J. T. & Melnick, J. L. (1952) *Amer. J. Hyg.*, **55**, 323
 Lépine, P., Slizewicz, P., Daniel, P. & Paccaud, M. (1956) *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 654
 Lépine, P., Daniel, P., Pelmont, J. & Slizewicz, P. (1957) *Ann. Inst. Pasteur*, **92**, 567
 Perkins, F. T., Placido Sousa, C. A. & Tobin, J. O'H. (1958) *Brit. J. exp. Path.*, **39**, 171
 Salk, J. E., Youngner, J. S. & Ward, E. N. (1954) *Amer. J. Hyg.*, **60**, 214
 Sanford, K. K., Earle, W. R., Evans, V. S., Waltz, H. H. & Shannon, J. E. (1951) *J. nat. Cancer Inst.*, **11**, 773
 Swim, H. E. & Parker, R. F. (1955) *Science*, **122**, 466