

ÉTUDE DE L'INFECTION ROUGEOLEUSE *IN VITRO* ET DE SA PERSISTANCE DANS LES CELLULES NERVEUSES EN CULTURE

par B. Rentier

Section on Electron Microscopy, Infectious Diseases Branch, NINCDS, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA).

« Visiting Associate » du « Fogarty International Center » lors de la réalisation de ce travail.

Mots-clés : Virus rougeoleux, Système nerveux ; Infection *in vitro*, PESS ; Revue.

Abbreviations

Cellule K = cellule tueuse (killer).
LCH = liquide céphalo-rachidien.
Cellule NK = cellule tueuse naturelle (natural killer).
NP = nucléoprotéine.
P = polypeptide P, polymérase de l'ARN viral.
CLDA = cytotoxicité lymphocytaire dépendant des anticorps.
PESS = panencéphalite sclérosante subaiguë.
F₁ = fragment non-glycosylé de la protéine F.
Protéine F = protéine de fusion.
F₂ = fragment glycosylé de la protéine F.
Protéine M = protéine de membrane.
SNC = système nerveux central.
HA = hémagglutinine (glycosylée).
UFS = unité formatrice de syncytium.

I. — INTRODUCTION GÉNÉRALE

La rougeole est une maladie virale familière puisqu'elle affecte chacun d'entre nous une fois pendant son existence, habituellement lors de la jeune enfance. La maladie est, de nos jours, généralement bénigne. Quelquefois cependant des complications diverses peuvent survenir suite à l'infection rougeoleuse, en particulier des désordres neurologiques lorsque l'affection gagne le système nerveux central (SNC). L'encéphalite post-rougeoleuse aiguë et la panencéphalite sclérosante subaiguë (PESS) sont, on le sait, dues à l'infection du SNC par le virus rougeoleux.

Le virus rougeoleux est donc un virus dont il est particulièrement intéressant d'étudier les caractéristiques infectieuses, en raison des syndromes cliniques dont il est responsable, et également en tant que modèle d'infection lente du système nerveux. Depuis une dizaine d'années, beaucoup d'efforts ont été déployés en vue de mieux comprendre pourquoi le virus, dans certains cas, s'attaque au système nerveux, et pourquoi les caractéristiques biologiques de cette infection sont différentes de celles de l'infection normale. En 1978 Fraser et Martin [54] ont fait, de façon très complète et détaillée, le point des connaissances sur le virus rougeoleux et sa biologie.

Notre approche a tout d'abord été l'examen de certains phénomènes qui accompagnent l'infection lytique de cellules en culture par le virus rougeoleux, la production des composants viraux et leur assemblage dans la membrane cellulaire, ainsi que la reconnaissance par le système immunitaire des modifications induites par le virus dans cette membrane. Ensuite nous avons recherché, lors de l'infection persistante des cellules nerveuses, les éléments qui concourent au dysfonctionnement de l'assemblage du virus et à l'établissement de la persistance virale.

Cet exposé est divisé en trois parties introduites et discutées séparément. La première consiste en une description du virus rougeoleux et de sa maturation dans les cellules permissives en culture. La seconde est une étude de divers aspects de l'interaction du système immunitaire (des anticorps et de certains lymphocytes) avec les cellules infectées par le virus. La troisième est consacrée à l'infection du SNC par le virus rougeoleux et, en particulier, à l'étude de l'infection rougeoleuse chronique de neurones *in vitro*.

Nous avons rédigé ce travail comme une revue des connaissances actuelles en ce qui concerne l'infection rougeoleuse lytique ou persistante, et y avons inséré et développé le détail des contributions que nous avons apportées. Nous n'avons décrit explicitement ni le matériel employé, ni le détail des procédures expérimentales. Ces informations — et notamment une abondante iconographie — pourront être aisément trouvées dans nos articles originaux [42, 43, 75, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 205].

II. — LE VIRUS ROUGEOLEUX ET L'INFECTION « IN VITRO »

A. — STRUCTURE DU VIRUS

Le virus rougeoleux, isolé pour la première fois en 1954 par Enders et Peebles [50], fait partie du genre des *Morbillivirus* et appartient à la famille des *Paramyxoviridae* (tableau I). C'est un grand virus enveloppé, de 400 nm de diamètre environ, dont la nucléocapside est organisée en structure tubulaire hélicoïdale et est assemblée dans le cytoplasme de la cellule infectée.

TABLEAU I. — Classement des virus représentatifs de la famille des *Paramyxoviridae* [108].

Famille	Genre	Espèce commune	Nombre d'espèces
<i>Paramyxoviridae</i>	Paramyxo-virus	— Virus des oreillons	1
		— Virus parainfluenza humain	4
		— Virus Sendai (souris)	1
		— Virus de la maladie de Newcastle (NDV) (volaille)	1
		— Virus d'autres espèces de mammi-fères et d'oiseaux	≥ 6
		— Virus de la rougeole	1
	.Morbilli-virus	— Virus de la maladie de Carré (CDV)	1
		— Virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants	1 ou 2
	Pneumo-virus	— Virus syncytial respiratoire humain et bovin	?
		— Virus de la pneumonie de la souris	?

La nucléocapside virale est large de 16 à 18 nm et longue d'environ 1 µm. L'enveloppe du virus est formée par un bourgeonnement de la membrane cellulaire et est constituée d'une double couche lipidique à laquelle sont associées une protéine non glycosylée et deux glycoprotéines spécifiques du virus organisées en projections superficielles. Ces glycoprotéines sont le support de l'antigénicité de la surface externe du virus ainsi que de certaines activités biologiques : l'activité hémagglutinante et la propriété d'induire la fusion cellulaire. Contrairement aux *Paramyxovirus*, les *Morbillivirus* n'ont pas d'activité neuramini-dasique.

La difficulté que l'on rencontre lorsqu'on s'efforce de cultiver le virus rougeoleux en quantité suffisante pour en faire l'analyse biochimique est la raison pour laquelle la composition polypeptidique du virus ne fut connue que relativement tard [62, 167], et a continué à susciter des controverses depuis lors [207, 24, 115, 191, 69, 210, 11] (tableau II). Cinq polypeptides sont clairement spécifiques du virus : l'hémagglutinine glycosylée (HA), la polymérase de l'ARN viral (P), la nucléoprotéine (NP), le fragment non glycosylé de la protéine de fusion F (F_1) et la protéine de membrane (tableau II). Un sixième polypeptide de poids moléculaire intermédiaire entre NP et F_1 correspond à l'actine cellulaire. Celle-ci est apparemment incorporée dans la particule virale lors du bourgeonnement de divers virus enveloppés [206, 96] et du virus rougeoleux en particulier [115, 191, 192].

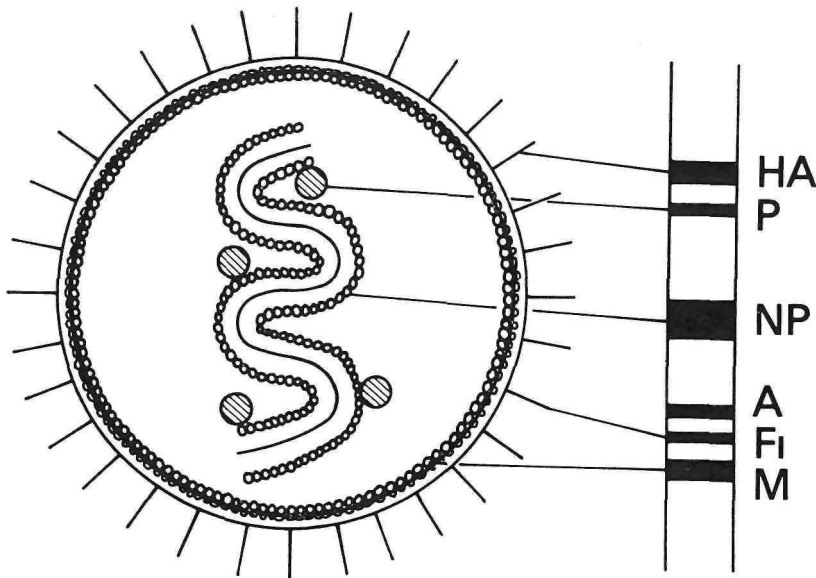
Toutefois, il se pourrait qu'un polypeptide viral comigre avec l'actine lors de l'électrophorèse [11]. La fraction glycosylée F_2 de la protéine de fusion F n'apparaît généralement pas sur les gels, sauf dans des conditions particulières de marquage [69, 191].

TABLEAU II. — Poids moléculaire des polypeptides composant le virus rougeoleux, d'après différents auteurs.

Hall et Martin [62]	Waters et Bussell [207]	Mountcastle et Choppin [115]	Graves et coll. [60]	Tyrrell et Norrby [191]	Bellini et coll. [11]	
75	78(*)	80 (*)	80 (*)	79 (*)	76(*)	HA
69 (*)	71,2	70	70	72	70	P
60	61	61	62	60	G0	NP
53 (*)	53	55	—	—	—	—
51	—	—	—	—	—	—
45,7	45	42	42	43	43	F
	—	—	40	40	41	actine
	37,5	37	37	36	37	M

Le poids moléculaire est exprimé en milliers de daltons. (*) Glycosylé.

FIG. 1. — Schéma de l'organisation des protéines virales dans le virion rougeoleux.



La répartition des différents polypeptides dans la particule virale est schématisée par la figure 1. Le polypeptide P est phosphorylé et correspond à la polymérase de l'ARN du virus. Il est associé à la nucléocapside lors de l'empaquetage du virion [115]. Les glyco-protéines sont de deux types, en fonction de leur activité biologique : l'une (HA) est responsable de l'hémagglutination par le virion, de l'hémadsorption par les cellules infectées, et vraisemblablement de l'attachement du virus à sa cellule-hôte ; l'autre (F) est responsable de la fusion cellulaire induite lors de l'infection virale. Ces glyco-protéines sont implantées dans la double membrane lipidique de l'enveloppe virale par leurs résidus hydrophobes et distribuées de façon homogène sur la surface de la particule. La protéine M — ou protéine de membrane — est, elle aussi, associée à l'enveloppe virale, bien que sa localisation précise et son degré d'association avec la double couche lipidique soient encore sujets à controverse. Elle pourrait également être responsable du manchon granuleux entourant les nucléocapsides cytoplasmiques [193]. Par analogie avec une théorie proposée pour les *Myxoviridae* et les autres *Para-myxoviridae* [166], on pense que la protéine M pourrait jouer un rôle lors de la maturation et l'assemblage des composants du virus et le bourgeonnement viral. Son rôle consisterait tout d'abord à s'attacher, par un contact transmembranaire, aux glycoprotéines virales déjà insérées dans la membrane plasmique [192], ensuite à arrimer la nucléocapside [107, 177, 191, 192], formant ainsi le maillon médian du complexe transmembranaire $\left[\begin{array}{l} \text{HA} \\ \text{F} \end{array} \right] \text{M-NP}$ prêt à former le virion complet. Le mécanisme du bourgeonnement viral n'est cependant pas encore élucidé.

B. — INFECTION LYTIQUE

Deux lignées de cellules permissives pour le virus rougeoleux sont le plus souvent utilisées : des cellules de rein de singe appelées Vero et des cellules épithéliales humaines appelées Hep-2. Le virus effectue un cycle complet de reproduction dans ces cellules, y provoque la fusion et la lyse cellulaires, et cette infection s'accompagne de la production de nombreuses particules ou virions qui sont libérés dans le milieu ambiant et vont, en infectant à leur tour d'autres cellules, engager le second cycle de reproduction virale. Le cycle consiste en rattachement du virus à la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte, la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire, la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule, la décapsidation de l'ARN viral et sa transcription en ARN messagers, la synthèse des protéines virales et leur assemblage, et enfin le bourgeonnement des virions.

a) Adsorption

Le virus s'adsorbe sur la surface de la cellule-cible au niveau de « récepteurs » spécifiques de sa glycoprotéine HA. On sait que les sites d'adsorption des *Myxo-* et *Paramyxoviridae* sur les cellules, commodément appelés récepteurs, sont sensibles à la neuraminidase [71]. Un sialoglycopeptide qui pourrait être ou contenir le « récepteur » du virus rougeoleux a été isolé de la membrane de globules rouges de singe rhésus [52].

b) Pénétration

Le virus rougeoleux pénètre dans les cellules par fusion de son enveloppe avec la membrane plasmique [40]. Dubois-Dalcq, par la technique des répliques de surface, a montré que les particules situées à la surface de la membrane cellulaire normale, et qui représentent vraisemblablement des oligomères de protéines [34], s'écartent du site d'entrée du virus, à cause de l'intégration de l'enveloppe virale dans la membrane. L'enveloppe est encore reconnaissable, après sa fusion avec la membrane cellulaire, par la présence de sous-unités correspondant aux projections glycoprotéiniques virales. La zone occupée par les composants viraux dans la membrane s'estompe ensuite en raison du mélange des matériaux viraux et cellulaires (voir chapitre IV, B et [43]).

c) Modifications de la membrane cellulaire

1) Apparition précoce de composants du virus.

Après la pénétration du virus dans la cellule-hôte, une période d'éclipse intervient pendant une vingtaine d'heures. La première indication d'une modification de la membrane plasmique est l'accumulation d'antigènes viraux en petits groupes de tailles diverses détectables par immunomarquage à la peroxydase, en utilisant des anticorps dirigés contre le virus [41, 43]. Ces petits groupes sont même quelquefois visibles sans marquage au microscope électronique à balayage à haute résolution [43].

2) Formation de rubans.

Après leur apparition en petits groupes sur la membrane cellulaire, les antigènes viraux s'organisent en rubans dont la taille et la forme correspondent à la longueur des nucléocapsides virales accolées à la face interne de la membrane cellulaire [41, 46]. Le tracé sinueux des rubans sur la membrane correspond à celui de la nucléocapside sous-jacente, comme le démontrent les coupes fines [40]. Il semble donc que la transition entre l'arrangement des antigènes viraux en petits groupes circulaires et leur organisation en rubans survienne lors de l'apposition de la nucléocapside à la face interne de la membrane plasmique. L'utilisation du microscope électronique à balayage à émission de champ nous a permis d'examiner la localisation des rubans sur de grandes surfaces de cellules infectées, en particulier sur les cellules géantes ([156, 157] et chapitre II, B, e).

En 1975, Dubois-Dalcq et Reese [41] ont montré que les rubans semblent se mouvoir latéralement dans le plan de la membrane pour s'accoler les uns aux autres aux sites de bourgeonnement du virus, et ont distingué deux types différents de rubans. Les premiers sont minces, composés d'une succession de particules rangées l'une à la suite de l'autre, et ils sont larges d'une ou parfois deux particules (fig. 2 a et [43]). Les seconds sont larges de trois ou quatre particules juxtaposées (fig. 2 b et [43]). Les rubans minces sont régulièrement espacés et forment un réseau dense sur la membrane. Les rubans larges sont de forme plus contournée. La longueur des rubans correspond à celle de la nucléocapside virale. La structure des rubans a pu être mieux étudiée par une combinaison de procédés récents pour l'étude des surfaces membranaires à haute résolution (voir Appendice). Après congélation rapide et ombrage rotatif partiel [42, 43], nous avons pu observer le détail de la structure des unités formant le ruban. Chacune de ces unités paraît formée de plusieurs sous-unités juxtaposées autour d'une

dépression centrale [42]. Lorsque le cryodécapage est réalisé sur les mêmes spécimens, on peut mettre en évidence sur une même micrographie la face externe du feuillet interne de la double membrane lipidique et la face externe du feuillet externe, c'est-à-dire la vraie surface externe de la cellule (fig. 3 et [43]). Le lien qui doit exister entre les particules externes formant le ruban, d'une part, et la nucléocapside, d'autre part, n'est pas visible en tant que particule intramembranaire d'une taille comparable à celle des particules externes. Une granularité plus fine a été observée au niveau des rubans, sur les deux faces hydrophobes de la membrane cellulaire [41]. De même, des travaux récents sur la maturation du paramyxovirus Sendai [8] ont montré, dans les zones du feuillet interne de la membrane cellulaire infectée adjacentes aux zones de la surface externe chargées d'antigènes viraux, l'accumulation de particules de petite taille, organisées en un réseau paracristallin. La granularité dans un cas et le réseau de microparticules dans l'autre, paraissent équivalents et pourraient bien correspondre à la protéine de membrane du virus faisant irruption dans l'espace intramembranaire au travers de la couche lipidique interne.

Les rubans couvrent entièrement certaines régions de la membrane cellulaire et sont enroulés sur la particule virale bourgeonnante. Un traitement léger par la trypsine est souvent nécessaire pour mettre ce fait en évidence [43], mais l'enroulement est parfois visible dans des préparations non traitées par l'enzyme (fig. 2 a).

L'adaptation de la technique d'immunoperoxydase aux répliques de surface [41], et à la microscopie à balayage à haute résolution [75, 153, 156] a permis de démontrer que les rubans contiennent les antigènes viraux de surface. En effet, lorsqu'on examine une zone cellulaire où les rubans ne sont pas trop accumulés, on détecte les grains de marquage formés par le produit de réaction de la peroxydase sur un tracé sinueux correspondant à la forme et à la longueur d'un ruban [156]. Lorsque les rubans sont accumulés les uns contre les autres, le marquage couvre uniformément toute la membrane [75].

Outre les antigènes de surface, on trouve, au niveau des rubans, les sites responsables de l'hémadsorption, c'est-à-dire l'hémagglutinine virale. En effet, si on ajoute à la culture infectée une suspension de globules rouges de singe que l'on sait être agglutinables par le virus rougeoleux [131, 161], on observe, après lavage, l'adsorption de globules sur les structures contenant de l'hémagglutinine virale c'est-à-dire les membranes cellulaires riches en rubans et les micro-villosités ([153, 157] et fig. 4 a et 4 b). L'identité complète ou partielle des sites hémadsorbants et antigéniques est vraisemblable, mais n'est pas démontrée.

d) *Bourgeoisement*

L'enroulement de la nucléocapside dans le bourgeon viral en formation est un phénomène encore très mal compris. La présence d'actine dans la particule virale complète semble indiquer que cette protéine du cytosquelette joue un rôle dans la formation et l'étranglement de la particule virale. Cependant, la contamination par l'actine cellulaire des préparations d'un virus difficile à purifier n'est pas exclue. D'autre part, l'actine n'est pas incorporée dans tous les virus bourgeonnants [206]. Si le mécanisme du bourgeoisement n'est pas connu, il est certain que la production d'un virion complet se fait par l'assemblage des divers composants du virus et l'enroulement de la nucléocapside flexible sous l'enveloppe du virion. Le processus commence par la réduction de l'espace séparant les rubans, excluant ainsi les protéines cellulaires pour composer une membrane virale [41]. Aussi longtemps que le virion reste attaché à la membrane cellulaire, les dessins formés par les glycoprotéines virales sur le bourgeon trahissent l'organisation de la nucléocapside sous-jacente. Cette organisation n'est plus visible sur la particule libre. Il est évident que les rapports entre les différents composants du virus se modifient dans la particule libre et que la nucléocapside se détache de l'enveloppe. De même, le réseau paracristallin intramembranaire détecté lors de l'infection par le virus Sendai disparaît progressivement de l'enveloppe des virions libres [8].

FIG. 2. — Détails de la membrane des cellules Vero géantes lors de l'infection par le virus rougeoleux.
a) Les rubans minces recouvrent la membrane cellulaire et sont également visibles sur un bourgeon viral (b). v = microvillosité, r = repli de membrane.
b) Les rubans larges sont séparés par des zones de membrane contenant des petites particules de 15 nm de diamètre environ (pointes de flèche), présentes également sur la membrane de cellules non infectées [156].
Microscope électronique à balayage à émission de champ (x 41 250).

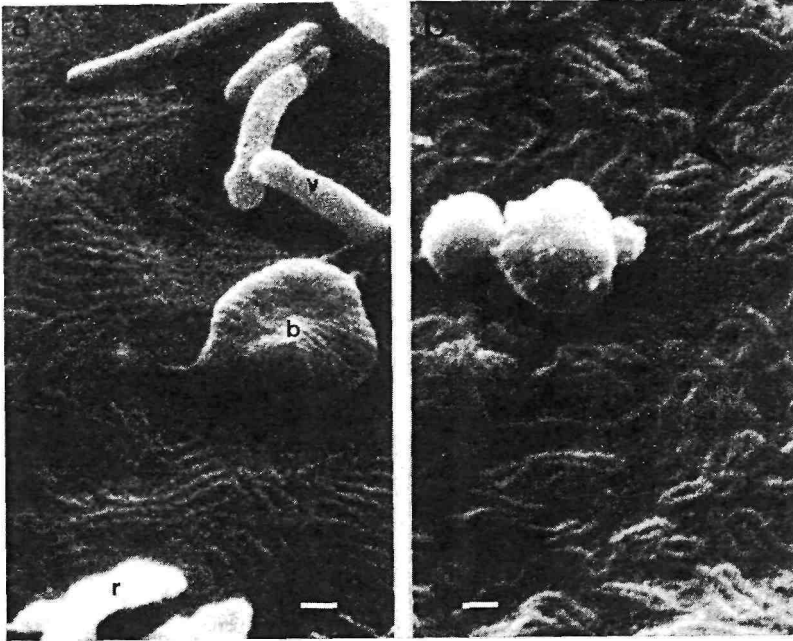


FIG. 3. — Détails, à très haute résolution, de la surface d'une cellule Vero infectée par le virus rougeoleux. Les rubans (entre les flèches) sont composés de particules dont l'aspect cylindrique indique qu'ils sont probablement formés par le groupement de plusieurs sous-unités. La fracture a séparé les deux feuillets de la membrane cellulaire. P = face protoplasmique, c'est-à-dire face externe du feuillet interne de la membrane. S = surface de la membrane. Les particules externes des rubans n'ont pas de correspondant intramembranaire de taille semblable sur la face P. I = glace non sublimée [43], Congélation ultra-rapide, cryodécapage, sublimation prolongée, réplique de surface par ombrage semi-rotatif (x 75 730).

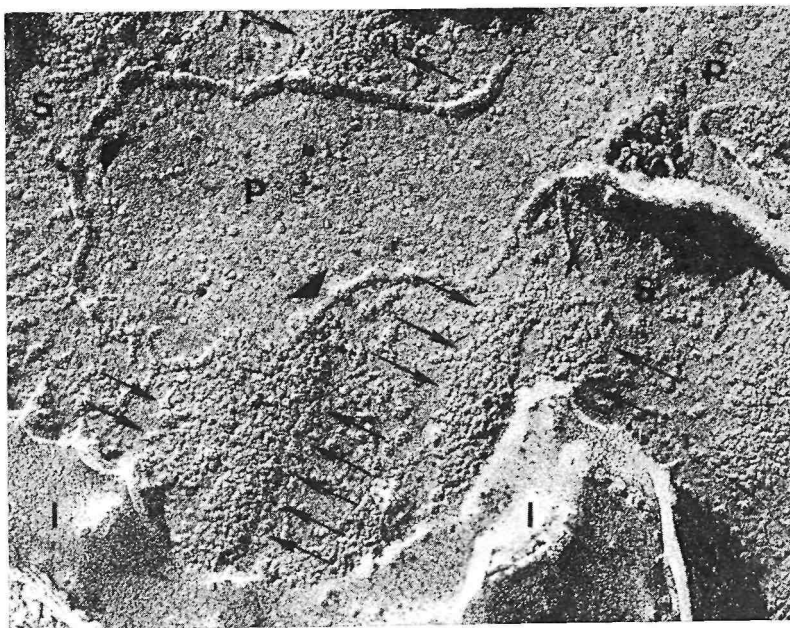
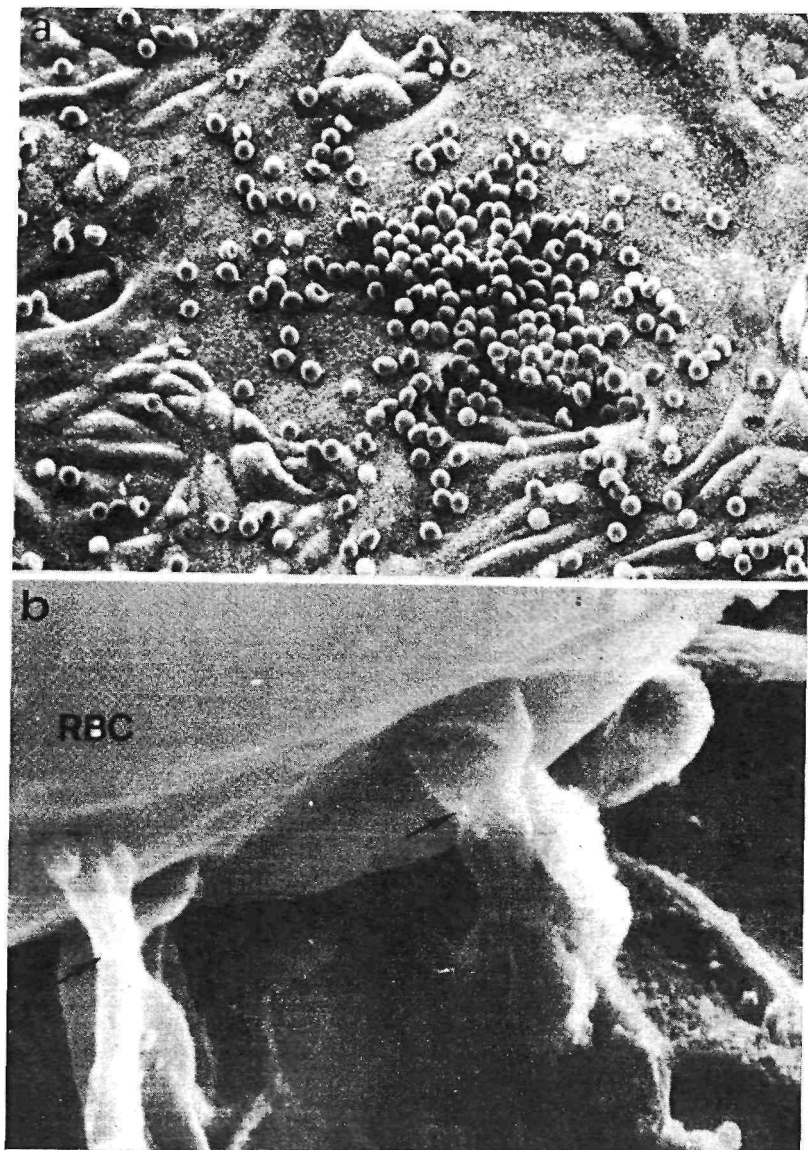


FIG. 4. — Hémadsorption sur des cellules Vero infectées par le virus rougeoleux [43].

a) Les globules rouges s'attachent préférentiellement sur la cellule géante formée au centre du champ, et plus particulièrement au centre de celle-ci. L'hémadsorption est moins fréquente sur les cellules mononucléées à la périphérie. Microscope électronique à balayage (X 830).

b) Les microvillosités de la cellule géante contribuent à arrimer l'érythrocyte (RBC). Un marquage très léger à la peroxydase montre la présence d'antigènes viraux sur ces extensions membranaires (flèches). Microscope électronique à balayage à émission de champ (x 32 680).



e) *Fusion cellulaire*

La fusion cellulaire est un effet cytopathogène fréquent lors de l'infection par de nombreux virus appartenant à des groupes très différents [137]. Les grands virus à RNA et enveloppe lipoprotéique peuvent induire la fusion cellulaire dans deux conditions différentes [19]. Ces deux types de fusion sont appelés « fusion de l'extérieur » et « fusion de l'intérieur ». La fusion de l'extérieur est indépendante du pouvoir infectant du virus et ne requiert pas de synthèse des protéines virales. Elle se produit en présence de grandes quantités de particules virales qui fusionnent simultanément avec des cellules voisines. La fusion maximale est obtenue dans ce cas après 1 à 3 h. C'est ce type de fusion qui a justifié l'utilisation fréquente du para-myxovirus Sendai inactivé pour l'obtention d'hybrides cellulaires. Le virus rougeoleux, dans certaines conditions, est capable de produire ce type de fusion [29].

La « fusion de l'intérieur » est un effet cytopathogène résultant de l'infection virale, et commence plus tard, même à faible multiplicité. La réplication intracellulaire du virus et la synthèse des protéines virales sont nécessaires pour que ce type de fusion se produise. Toutefois, la production de virus infectieux n'est pas nécessairement associée à la fusion, comme cela a été démontré par l'utilisation de mutants létaux conditionnels [137]. L'incorporation de la protéine de fusion F dans la membrane cellulaire semble être l'événement nécessaire à la fusion entre cellules. Bien que les conditions dans lesquelles les deux types de fusion se réalisent soient différentes, il est probable que les mécanismes moléculaires soient identiques [138]. Nous avons étudié l'évolution de la fusion cellulaire « de l'intérieur » induite par le virus rougeoleux dans une monocouche de cellules Vero [153, 157]. En utilisant une faible multiplicité d'infection, nous obtenons après 2 jours des petits foyers de fusion dispersés dans la culture [156]. Après 4 à 5 jours, les syncytiums progressant par recrutement de cellules voisines atteignent une taille maximale (500 à 800 µm) et cessent de s'agrandir. Peu après, le centre des syncytiums s'altère, la membrane se détériore, et un ou plusieurs trous se forment et représentent le début de la lyse cellulaire. Cette lyse progresse alors de façon radiale vers les bords du syncytium jusqu'à sa désintégration complète, formant ainsi une « plaque », visible à l'œil nu. Par conséquent, lors de la progression de l'infection, la proportion de la surface occupée par les syncytiums augmente par rapport à la surface couverte par les cellules non fusionnées, jusqu'à dépasser 90 % sept jours après infection [156].

Le titre du virus produit par ces cellules atteint un maximum à cinq jours et diminue par la suite. Après cinq jours, la relation entre la croissance des cellules géantes et la production de virus est inversée, comme si les syncytiums ne produisaient pas de virus. Il est également important de noter que lorsque le milieu de culture est changé quotidiennement, la production de virus est plus élevée, et l'accroissement de la surface occupée par les cellules géantes est moins rapide que lorsque le même milieu est maintenu pendant toute la durée de l'expérience.

La microscopie électronique à balayage à haute résolution révèle des détails de la surface des cellules infectées qui ont permis d'expliquer notre observation de la relation inverse entre production de virus et fusion cellulaire, un phénomène constaté dans d'autres conditions, avec le paramyxovirus SV5 [74]. En effet, les cellules mononucléées, qui n'ont pas encore été recrutées par un syncytium, sont littéralement couvertes de bourgeons viraux [156]. Elles paraissent donc être d'excellentes productrices de virions. Par contre, les cellules géantes sont pratiquement dépourvues de bourgeons et présentent une surface relativement plane où, à fort grossissement, on constate l'accumulation de rubans de glycoprotéines virales (fig. 2 a et 2 b et [156]). Seule la zone marginale des syncytiums porte encore de nombreux bourgeons. Cette zone est constituée par la membrane de cellules qui ont récemment fusionné et dont les bourgeons ne se sont pas encore détachés. Cette accumulation de rubans et la quasi-absence de bourgeonnement indiquent une déficience de la maturation virale dans les cellules géantes. Le cycle s'arrête au niveau de la constitution des rubans et l'étape consistant en l'évagination du bourgeon et l'enveloppement de la nucléocapside virale ne se produit pas ou rarement. Au niveau de la cellule géante, l'infection rougeoleuse est donc une infection avortée.

f) *Hémadsorption*

Comme nous l'avons décrit plus haut (voir chapitre II, B, c, 2) les globules rouges de singe s'adsorbent sur les zones de la culture infectée riches en rubans et villosités. C'est donc sur les cellules géantes qu'on observe une adsorption massive de globules, en raison de la présence de grandes quantités de rubans sur une surface plane, offrant ainsi un grand nombre de sites hémagglutinants pour l'accrochage des globules rouges. Les microvillosités, également fréquentes sur les syncytiums et chargées de glycoprotéines virales, offrent aussi une grande surface d'adsorption (fig. 4 a et [156]).

Il était tout d'abord surprenant de ne pas observer d'hémadsorption — ou d'en observer relativement très peu — sur les cellules mononucléées, bien que celles-ci soient couvertes de bourgeons viraux riches en hémagglutinine. Force est cependant de conclure que le nombre de sites hémagglutinants offerts par les bourgeons viraux sphériques à la surface de cellules arrondies est bien moindre que le nombre de sites disponibles sur la cellule géante. Pour cette raison, les globules rouges moins fermement amarrés sur les cellules mononucléées, se détacheraient lors du lavage.

Sur la cellule géante, les globules rouges tendent à s'adsorber plus particulièrement au centre où on détecte à fort grossissement une accumulation massive de rubans [156]. Cependant, nous avons constaté que cela n'est vrai que pour les très grands syncytiums (500 à 800 microns environ). Les syncytiums de taille moyenne (200 à 500 microns environ) adsorbent les érythrocytes également de préférence en leur centre, mais ils n'y possèdent pas une telle concentration de sites hémadsorbants. Les petits syncytiums (moins de 200 microns), eux, ont une

répartition homogène de sites hémasorbants et les globules rouges y sont dispersés [156]. Dans tous les cas, la périphérie des syncytiums est très peu hémasorbante, et correspond à la couronne de bourgeons viraux vue plus haut.

Sur les syncytiums ayant atteint leur taille maximale et ayant arrêté leur croissance depuis quelques heures, on constate que les érythrocytes concentrés au centre, forment un anneau caractéristique [156]. Plus le syncytium est âgé, plus l'anneau est clairement marqué, et moins on constate d'hémasorption au centre de celui-ci. L'examen de la surface cellulaire à l'intérieur de l'anneau de globules rouges montre que la membrane, riche en microvillosités, est devenue plate et sans relief [156]. Cette perte des caractéristiques de la membrane explique l'incapacité d'hémasorber et préfigure la lyse cellulaire qui commence toujours au centre du syncytium [156]. Les sites hémasorbants sur les cellules géantes tendent donc à s'accumuler en leur centre, ce qui suggère l'existence d'une migration centripète des sites hémasorbants sur les syncytiums. Cette hypothèse est appuyée par l'expérience consistant à bloquer les sites hémasorbants par des anticorps spécifiques du virus, puis à replacer les cellules dans un milieu sans anticorps et laisser les syncytiums réintégrer les nouveaux sites dans leur membrane. Ces nouveaux sites apparaissent à la périphérie des syncytiums [156] et semblent coloniser progressivement l'ensemble de la surface cellulaire. Ce phénomène ne se produit toutefois que sur les petits syncytiums n'ayant pas encore atteint leur taille maximale, ce qui suggère que la réinsertion de nouveaux sites pourrait être en relation avec la progression de la fusion cellulaire. Cette interprétation ne repose cependant que sur des observations faites à un moment particulier et non sur une étude dynamique. S'il nous paraît que la fusion cellulaire est responsable de ce que nous considérons comme des mouvements, nous ne pouvons exclure la possibilité, dans les cellules Vero géantes, d'un recyclage constant des composants de la membrane cytoplasmique, comme il a été démontré pour d'autres types cellulaires [179].

C. — INFECTION PERSISTANTE

Comme plusieurs autres virus appartenant à des groupes très divers, le virus rougeoleux est capable d'infecter des cellules de façon persistante, sans y produire les perturbations entraînant la lyse cellulaire mais en s'y maintenant de façon prolongée et plus ou moins « silencieuse ». *In vivo*, la persistance du virus rougeoleux se rencontre en particulier dans le SNC avec, pour conséquence, l'apparition d'une maladie progressive (voir chapitre IV). Il a été suggéré que le virus puisse également persister dans les cellules lymphoïdes avec, pour effet, le maintien de l'immunité au virus chez les individus normaux [22].

In vitro, on a établi des lignées cellulaires infectées de manière persistante par le virus rougeoleux en maintenant les cellules en présence d'anticorps spécifiques du virus, ou en clonant les cellules ayant résisté à la lyse par le virus [164, 120, 110, 58, 92, 49, 109]. Ces lignées cellulaires ne manifestent guère d'effet cytopathogène et ne produisent pas de virions infectieux ou en produisent peu. Elles contiennent des antigènes viraux intracytoplasmiques et des nucléo-capsides de type granuleux bien qu'il n'y ait pas d'alignement de nucléocapsides sous la membrane [92, 109]. Cependant, la quantité d'antigènes viraux sur la membrane cellulaire et leur distribution varient énormément d'une lignée à l'autre. Des infections persistantes ont également été établies par coculture de cellules de cerveaux de patients atteints de PESS avec des cellules permissives pour le virus rougeoleux [38, 23]. L'étude morphologique d'une de ces lignées a montré la formation de syncytiums et la présence de nucléocapsides du type lisse dans le cytoplasme. On ne trouve ni nucléocapsides sous-jacentes à la membrane ni bourgeons viraux [44]. La couche granuleuse entourant ordinairement la nucléocapside paraît nécessaire à l'adhésion de cette dernière à la membrane cellulaire car les nucléocapsides de type lisse ne s'alignent jamais sous la membrane plasmique.

Par inoculation d'une souche de virus de la PESS isolée d'une coculture productrice de virions infectieux, une infection chronique a été établie dans une lignée de cellules d'adénome de prostate humaine. Plus de 95 % de ces cellules présentent de l'antigène viral à leur surface [178]. Ces cellules fusionnent rarement, produisent peu de virus et possèdent à leur surface des rubans d'antigènes viraux dont l'aspect rigide, en épingle à cheveux les différencie des rubans observés lors de l'infection lytique [46]. Les nucléocapsides virales s'alignent donc sous la membrane cellulaire, mais d'une façon anormale [43], et sont incapables de s'enrouler dans un bourgeon. Les seules formations ressemblant à des bourgeons sont allongées comme des microvillosités. Cette infection est donc caractérisée par un blocage tardif de la formation du bourgeon et de son détachement.

III. — INTERACTION AVEC LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

A. — IMMUNITÉ HUMORALE

a) *Introduction*

L'infection rougeoleuse persistante du SNC chez l'homme se déroule en présence d'un système immunitaire alerté et dûment fonctionnel. La PESS, en effet, survient et progresse alors qu'un taux élevé d'anticorps anti-virus rougeoleux se maintient dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ces anticorps sont principalement des immunoglobulines G oligoclonales, apparemment synthétisées localement dans le LCR [200], et complètement absorbables par le virus rougeoleux [201].

Il a été suggéré que la cytolysse par les anticorps et le complément pourrait jouer un rôle dans la pathogénie de la PESS. En effet, des IgG et le complément ont été trouvés aux mêmes endroits que les nucléocapsides virales dans un cerveau de patient atteint de PESS [83]. De plus, on peut obtenir la lyse de cellules en cultures dérivées de cerveau de PESS par le sérum du patient lui-même, ou par d'autres sérums contenant des anticorps anti-virus rougeoleux, en présence de complément [124], à la condition que les cellules en culture expriment des antigènes viraux à leur surface. Or on n'a jamais pu démontrer la présence d'antigènes rougeoleux à la surface des cellules nerveuses *in vivo* lors de l'infection. Le rôle du complément dans la pathologie de l'infection reste donc hypothétique.

Un autre effet potentiel des anticorps sur l'infection est le phénomène de modulation antigénique [17, 18, 122] qui a été observé lors de l'infection rougeoleuse *in vitro* [87, 123]. Lorsqu'une cellule est exposée constamment à l'action d'anticorps spécifiques des antigènes de sa membrane, elle finit par devenir insensible à la lyse par le complément.

Il a même été affirmé que la présence d'anticorps anti-virus rougeoleux dans le milieu de culture modifie la synthèse de certaines protéines virales dans les cellules infectées [55, 125]. Ces résultats n'ont toutefois pas été reproduits.

b) *Redistribution des antigènes viraux par les anticorps*

En l'absence de complément, l'attachement d'anticorps bivalents ou multivalents aux antigènes exprimés sur la surface externe des cellules induit de considérables modifications de la distribution de ces antigènes. Les complexes antigène-anticorps ou complexes immuns ainsi formés sont redistribués sur la membrane cellulaire, tout d'abord en petits groupes distincts, séparés par des régions de membrane dépourvues de ces complexes. Ce regroupement — ou « patch-ing » — est un processus dans lequel la cellule est passive et est permis par les propriétés de diffusion de la membrane lipoprotéique. Ensuite, les complexes immuns se regroupent tous à un pôle de la cellule (phénomène appelé « capping »). Cette étape requiert de l'énergie et dépend du métabolisme cellulaire [169, 35, 104]. Une endocytose des complexes immuns survient alors, suivie d'une libération de ces complexes dans le milieu extérieur (phénomène appelé « shedding »). Cette succession de phénomènes se produit quel que soit l'antigène impliqué ; et si la membrane cellulaire contient des antigènes viraux, ceux-ci seront redistribués de la même façon en présence de leurs anticorps spécifiques, comme il a été démontré pour les virus rougeoleux, influenza, ou de tumeur aviaire [86, 97, 136, 165, 134, 95, 125, 127]. La plupart de ces études ont été réalisées sur des cellules isolées, en suspension. Nous avons examiné l'effet des anticorps sur la localisation et la disponibilité des antigènes rougeoleux exprimés à la surface de cellules Vero en monocouche confluente, c'est-à-dire des cellules qui ont établi entre elles des contacts et des jonctions et qui sont attachées à un substrat par près de la moitié de la surface totale de leur membrane plasmique [75]. Ces conditions sont proches de celles qui régissent dans un environnement tissulaire. Nous nous sommes intéressés en particulier aux cellules géantes sur lesquelles nous avons étudié la mobilité des structures virales dans la membrane, et la migration centripète des sites hémasorbants (chapitre II, B, f).

1) *Distribution normale.*

Les antigènes du virus rougeoleux sont distribués de façon homogène sur la surface de la cellule géante. En effet, après 1 h à 4° C en présence d'IgG anti-virus rougeoleux, l'immunomarquage est réparti uniformément sur la cellule (fig. 5 a et [75]).

2) « Patching ».

Si, après le traitement de 1 h à 4° C avec les anticorps, on maintient les cellules dans un milieu sans anticorps pendant 1 h à 37° C, les antigènes se redistribuent en agglomérats séparés les uns des autres par des zones de membrane dépourvues d'antigènes viraux. La microscopie électronique montre que les agglomérats sont localisés sur des replis de la membrane cellulaire (fig. 5 b et [75]).

3) « Capping ».

Si, après avoir maintenu les cellules en présence d'anticorps pendant 1 h à 4° C, on les place dans un milieu sans anticorps pendant 3 h à 37° C, on assiste au regroupement des complexes antigène-anticorps au centre de la cellule géante. Sur les syncytiums de grande taille, le regroupement central n'est apparemment pas complet, et il se forme un anneau péricentral de complexes immuns [75] rappelant l'anneau de globules rouges observé lors de l'hémadsorption (chapitre ii, B, f).

4) Endocytose et « shedding ».

Quel est le sort des complexes antigène-anticorps ainsi formés et regroupés ? Si l'on marque les anticorps par l'iode radioactive, on constate qu'après 3 h à 37° C la moitié environ de la radioactivité est relâchée dans le milieu de culture, et qu'après 24 h les 9/10^e sont libérés [75]. Cependant, l'examen de coupes de cellules ayant été en contact avec les anticorps pendant 1 h à 4° C puis maintenues pendant 3 h à 37° C en l'absence d'anticorps, révèle qu'une partie des complexes immuns est ingérée par la cellule avant d'être rejetée dans le milieu extérieur.

L'endocytose est une étape importante du mécanisme d'élimination des complexes immuns par les lymphocytes [35] et elle a été observée lors du traitement par les anticorps de cellules HeLa infectées par le virus de la grippe [165]. Elle n'avait pas été remarquée lors du traitement de cellules HeLa infectées par le virus rougeoleux [97, 134] mais a été confirmée depuis lors [1251].

Vingt-quatre heures après le traitement par les anticorps, très peu de complexes antigène-anticorps peuvent encore être détectés sur la membrane cellulaire ou dans le système lysosomal. Si des anticorps marqués sont alors ajoutés, le marquage est similaire à celui qu'on observe au départ, la cellule ayant remplacé les antigènes viraux sur sa membrane plasmique [75]. Nous ne savons cependant pas si les nouveaux antigènes insérés ont été synthétisés pendant les 24 h de l'expérience ou s'il s'agit des antigènes originaux endocytosés, débarrassés des anticorps dans les lysosomes et recyclés dans la membrane cellulaire.

5) Discussion et conclusion.

Les cellules Vero, organisées en une couche confluente, infectées et fusionnées par le virus rougeoleux, sont capables de déplacer activement les complexes antigènes viraux-anticorps sur leur membrane plasmique. Le mécanisme de déplacement et d'élimination de ces complexes immuns procède par étapes distinctes et est comparable à celui qu'on observe dans le cas des lymphocytes ou d'autres cellules en suspension. Il ne se produit pas en présence d'anticorps monovalents (Fab) ou d'inhibiteurs du métabolisme cellulaire, mais se déroule de façon identique si les anticorps sont dirigés contre des constituants normaux de la membrane cellulaire [75],

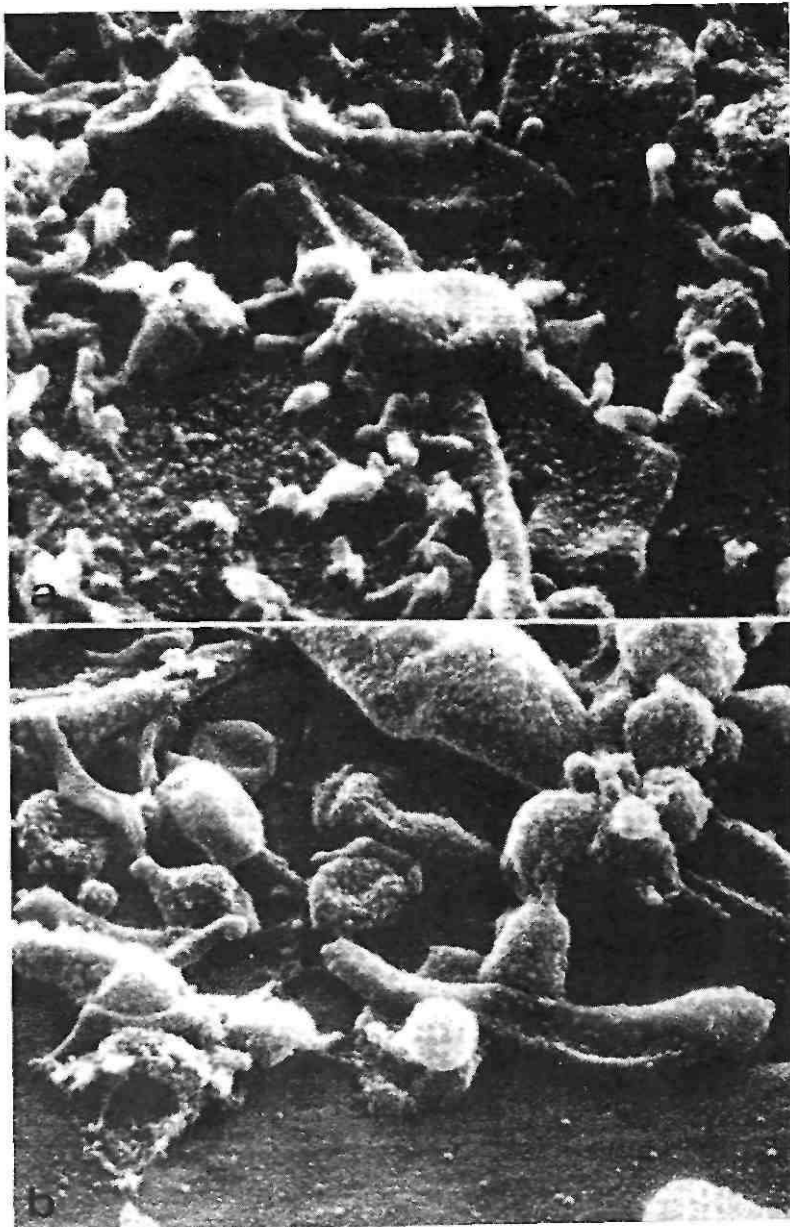
Le rôle biologique de ces déplacements de complexes immuns reste une énigme. Plusieurs hypothèses ont été émises [125]. Ce phénomène paraît être un moyen efficace dont dispose la cellule pour se débarrasser d'antigènes étrangers. Le regroupement des complexes immuns se produit assez rapidement, même avant la lyse cellulaire dans le cas où le complément est présent. Il est donc possible que le regroupement des complexes ait pour effet de faciliter l'action cytotolytique du complément, ou la reconnaissance par les lymphocytes cytotoxiques.

La redistribution des antigènes de membrane en présence d'anticorps spécifiques a été observée sur un grand nombre de lignées cellulaires. Toutefois, les fibroblastes de rat en culture primaire sont incapables d'opérer ces mouvements [168] de même que les cellules dites « non transformées » [48]. Il se pourrait donc que les cellules en primoculture, à l'exception des lymphocytes, ne permettent pas la redistribution de leurs antigènes de surface. Nous avons remarqué récemment ([160] ; et Rentier et Rammohan, en préparation) que les neurones de souris en primoculture ne redistribuent pas les antigènes du virus rougeoleux sur leur membrane, même en 10 jours (chapitre IV, D), ce qui indique que la redistribution des antigènes en un amas localisé — ou « cap » — serait nécessaire à leur intériorisation par la cellule. Ces observations jettent évidemment un doute sur la signification biologique des mouvements de complexes immuns dans les membranes cellulaires, et même sur leur existence *in vivo*.

FIG. 5. — Déplacement à 37° C des complexes antigène-anticorps sur la surface d'une cellule Vero géante obtenue après infection par le virus rougeoleux, révélé par marquage à l'immunoperoxydase [43].

a) Les complexes antigène rougeoleux-anticorps sont distribués de façon homogène sur la membrane et ses replis, à 4° C.

b) Après 1 h à 37° C, la membrane ne porte presque plus de complexes antigène-anticorps, mais ces derniers sont accumulés sur les replis. Microscope électronique à balayage à émission de champ [75] (x 19 000).



B. — IMMUNITE CELLULAIRE

a) Introduction

Le rôle de l'immunité cellulaire lors des infections du SNC par le virus rougeoleux est loin d'être bien connu. On sait que les infections subaiguës et certaines infections aiguës s'accompagnent d'une réaction inflammatoire quelquefois importante (chapitre IV). Des lymphocytes dont les caractères ne sont pas établis, ainsi que des plasmocytes, sont présents dans le cerveau de sujets atteints de PESS, souvent dans les zones de démyélinisation [184, 119].

Les foyers de démyélinisation contiennent des macrophages dont le rôle véritable, primaire ou secondaire, n'est pas élucidé. La plupart des études des cellules lymphoïdes de patients ont été réalisées sur de grandes quantités de cellules du sang circulant, et non sur des cellules du LCR ou provenant directement des lésions cérébrales, pour des raisons évidentes de disponibilité et d'éthique. Il est donc très difficile de faire la part de ce qui est attribuable à l'infection rougeoleuse normale elle-même ou à ses complications neurologiques. Il convient cependant de vérifier le fonctionnement de l'immunité cellulaire au cas où, comme il a été suspecté, celle-ci interviendrait dans l'établissement de l'infection chronique du SNC.

En 1968, Burnet [22] fut le premier à suggérer que la PESS humaine puisse être due à la persistance du virus rougeoleux en raison d'une immunité cellulaire aberrante ou affaiblie. Selon lui, cette modification de l'immunité cellulaire proviendrait elle-même de la multiplication du virus dans le thymus. Cette hypothèse, basée sur l'observation classique de la perte de réaction à la tuberculine chez les malades atteints de rougeole et sur d'autres observations cliniques plus récentes [113], a suscité de nombreux travaux et controverses. En effet, les résultats expérimentaux ont présenté deux situations contradictoires, probablement parce qu'il n'est pas possible d'énoncer une règle générale quant au fonctionnement de l'immunité cellulaire chez les malades atteints de PESS. Certains sujets n'ont montré aucune altération de la réponse cytotoxique de leurs cellules T [81, 175, 100, 94, 15] alors que d'autres ont manifesté une déficience de l'immunité cellulaire attribuable au dysfonctionnement des lymphocytes T [56, 114, 102, 111, 91, 103]. Le défaut de réactivité des lymphocytes T pourrait être attribué à leur infection par le virus [173] ou à un facteur circulant inhibant leur fonction et présent dans le sérum et le LCR des malades [3, 174, 178, 181], peut-être sous la forme d'un complexe antigène-anticorps dont le taux varie d'un sujet à l'autre [2]. La stimulation ou la « reconstitution » de la fonction normale des lymphocytes T paraît améliorer quelque peu l'état clinique des malades atteints de PESS et dont l'immunité cellulaire est déficiente [56, 15, 88, 126, 196, 204]. Toutefois, la variabilité des résultats observés chez les malades indique que le mécanisme ainsi proposé ne suffit pas à expliquer la pathogénie de la maladie.

Tous ces travaux ont été réalisés sur les lymphocytes T, qui ont été considérés longtemps comme seuls responsables de l'immunité cellulaire. Depuis, on sait que d'autres populations de lymphocytes non-T appelées cellules K — « killer cells » — jouent un rôle immunitaire en présence d'anticorps [132] et que, d'autre part, certains lymphocytes, appelés cellules NK — « natural killer cells » — sont à même d'exercer une action cytolytique à l'égard de cellules exprimant des antigènes étrangers, sans avoir été sensibilisées par ces antigènes et sans requérir la présence d'anticorps [139]. La situation s'est encore compliquée depuis la découverte d'une sous-population de lymphocytes T non-sensibilisés capables d'exercer une cytolysse en présence d'anticorps [154, 155, 205]. Le rôle éventuel des cellules K et NK dans l'infection rougeoleuse est encore très mal connu.

b) *Cytotoxicité lymphocytaire dépendant des anticorps*

La cytotoxicité lymphocytaire dépendant des anticorps (CLDÀ) est une forme de défense immunitaire importante lors des infections virales car son intervention ne requiert que la présence d'anticorps spécifiques du virus sur la surface des cellules [132]. Les lymphocytes responsables de la lyse cellulaire, dans ces conditions, portent sur leur membrane externe des récepteurs de la portion Fc des immuno-globulines [133, 172]. La portion Fc est située à l'extrémité de la molécule d'anticorps opposée à celle qui se fixe spécifiquement à l'antigène. Elle peut, par conséquent, se lier à son récepteur s'il est présent, tandis que l'anticorps s'attache à l'antigène correspondant. La CLDA a été démontrée lors de l'infection par un rétrovirus *in vivo* [67, 68]. Elle pourrait bien jouer un rôle important dans certaines complications de l'infection rougeoleuse, puisque les anticorps anti-virus rougeoleux persistent dans le sérum après l'infection et que le sérum et le LCR des sujets atteints de PESS contiennent une concentration élevée d'anticorps anti-virus rougeoleux.

Les lymphocytes responsables de la CLDÀ sont appelés cellules tueuses ou cellules K (killer cells) et ont été définis comme des cellules non-T, portant des récepteurs des Fc.

En combinant la microscopie électronique avec le dosage biologique de la cytotoxicité, nous avons, avec W. C. Wallen, identifié les différents types de lymphocytes intervenant dans la CLDA et observé les caractéristiques morphologiques de l'interaction entre cellules K et cellules-cibles. A cet effet, nous avons utilisé des cellules infectées par le virus rougeoleux et des lymphocytes circulants de sujets séronégatifs dont les lymphocytes n'ont pas d'activité cytotoxique en l'absence d'anticorps [154, 155, 157, 205].

1) *Reconnaissance et contact.*

La CLDA débute par une phase de reconnaissance durant 15 à 30 min pendant laquelle les lymphocytes s'adsorbent aux cellules-cibles [171, 213], sur des régions de la membrane modifiées par l'infection et où on

décèle, en coupe, les nucléocapsides virales [155]. L'adsorption résiste aux lavages vigoureux qui éliminent les lymphocytes non adsorbés. Durant cette période, aucune interaction n'est visible entre les lymphocytes et les cellules infectées si l'on ne considère pas l'adsorption comme une interaction.

2) *Interaction.*

Après la période d'adsorption, l'interaction entre cellule K et cellule-cible commence à se manifester. On reconnaît alors deux types de lymphocytes adsorbés : ceux qui interagissent avec la cellule-cible en subissant eux-mêmes des déformations et ceux qui conservent leur forme originale et paraissent inactifs [155, 43]. La proportion des lymphocytes réactionnels augmente régulièrement jusqu'à atteindre environ 50 % après 4 h de contact avec les cellules-cibles. Cette augmentation correspond aux mesures de cytotoxicité effectuées par la méthode de la libération de chrome radioactif [155]. Nous considérons donc que les cellules qui interagissent avec les cellules-cibles doivent être responsables de la CLDA.

L'interaction est, dans la plupart des cas, très violente et se manifeste par la déformation tant du lymphocyte que de la cellule-cible, à tel point qu'il devient très difficile de discerner les détails de leurs structures [155]. Afin de pouvoir réaliser nos observations morphologiques, nous avons utilisé une cellule-cible relativement peu sensible à la CLDA, et présentant une grande surface plane à l'adsorption des lymphocytes : la cellule géante induite dans les cultures de cellules Vero par le virus rougeoleux. La cellule-cible ne se détériore pas rapidement, il est possible : 1) d'examiner les relations membrane-membrane entre les deux protagonistes et 2) de réaliser des marquages différentiels des lymphocytes réactionnels ou non-réactionnels afin de les identifier.

3) *Ultrastructure.*

Les lymphocytes qui réagissent avec la membrane de la cellule-cible le font de deux manières différentes.

a) L'une, de loin la plus fréquente, consiste en l'étalement du lymphocyte, l'extension par celui-ci de longs filopodes radiaires et l'apparition à sa surface de boursouffures et d'évaginations membranaires multiples [155, 43]. La cellule-cible, elle-même, réagit à cette agression par l'extension de microvillosités sur la cellule K. Le lymphocyte paraît « aspirer » une partie de la cellule-cible dans ses propres replis et des extensions des deux cellules en présence sont entremêlées. Toutefois, aucune fusion entre elles n'a été observée. Les cytoplasmes restent distincts [155]. L'attaque se fait sur une région de la cellule infectée où des nucléocapsides sont alignées sous la membrane plasmique [55] ou assemblées en grandes inclusions cytoplasmiques [155].

b) L'autre type d'interaction est beaucoup plus discret et bien plus rare. Il consiste en l'extension par le lymphocyte d'un grand uropode unique sur la membrane de la cellule-cible. L'uropode émet de minces filopodes à son extrémité et suscite également une réponse de la cellule-cible, sous la forme de microvillosités convergentes [155]. Quelquefois, ces lymphocytes se trouvent à l'intérieur des cellules géantes, au voisinage de zones de nécrose [155], ou s'infiltrèrent entre deux cellules-cibles, se frayant un chemin avec leur uropode [155].

L'uropode des lymphocytes a été décrit depuis très longtemps et associé à leur motilité [101,33]. On l'a également observé dans diverses conditions, telles que l'adhésion aux macrophages [141], la stimulation par des anticorps anti-immunoglobulines [195] ou par des complexes antigène-anticorps [13, 5] et même dans des conditions apparemment normales [105].

En conclusion, nous constatons l'existence d'au moins trois sortes de lymphocytes adsorbés sur les cellules-cibles, apparemment identiques avant l'interaction mais aisément reconnaissables après 4 h d'incubation dans les conditions de la CLDA : 1) les lymphocytes non réactionnels, n'intervenant pas dans le processus cytotoxique, décrits précédemment [70] ; 2) les lymphocytes réagissant avec la cellule-cible de manière intense, avec déformations importantes, boursouffures et extensions radiaires (type I) ; 3) les lymphocytes interagissant avec la cellule-cible par l'extension d'un grand uropode unique (type II).

4) *Identification des lymphocytes par marquage in situ.*

Nous avons entrepris de caractériser ces trois types de lymphocytes en utilisant des marqueurs spécifiques, aisément reconnaissables en microscopie électronique à balayage.

1) *Globules rouges de mouton.* — Ces globules ont la propriété de s'adsorber spécifiquement aux lymphocytes T. Nous les avons utilisés pour identifier les cellules T *in situ* après 4 h de CLDA. La plupart des lymphocytes non-réactionnels sont marqués [155, 43]. Les lymphocytes réactionnels du type I ne sont jamais

marqués. Par contre, les lymphocytes du type II sont marqués et les globules s'adsorbent sur l'uropode (fig. 6). Une partie importante des cellules non-réactionnelles adsorbées est donc constituée de lymphocytes T. Les lymphocytes à uropode sont également des lymphocytes T. Il a été suggéré que la formation d'un uropode est caractéristique des cellules T [162] et nos expériences de marquage *in situ* confirment clairement cette hypothèse.

2) *Globules rouges de poulet couverts d'anticorps*, — Nous avons recouvert des globules rouges de poulet d'une couche d'immuno-globulines G anti-globules rouges de poulet. Les extrémités Fc des immunoglobulines ainsi exposées s'attachent aux lymphocytes porteurs de récepteurs des fragments Fc.

Après 4 h de CLDA, les érythrocytes de poulet sont adsorbés sélectivement aux lymphocytes réactionnels [155, 43]. Les cellules K étant, par définition, porteuses de récepteurs des Fc, elles correspondent donc à celles qui interagissent avec la cellule-cible.

5) *Rôle des lymphocytes T porteurs de récepteurs des portions Fc*.

Bien que la présence de récepteurs des fragments Fc sur certaines cellules T animales et humaines soit connue [212, 21, 37, 198, 53, 180, 36], les cellules T ont toujours été considérées comme inactives dans la CLDA [199, 20, 172, 117].

Un fait inattendu, cependant, se dégage de nos observations. En effet, nos mesures de cytotoxicité indiquent que les cellules T purifiées exercent une activité faible, mais reproductible lors de la CLDA [155]. D'autre part, nous avons observé la présence de cellules T étendant un long uropode sur la cellule-cible. Il semble donc que certaines cellules T soient capables d'intervenir dans la CLDA. Afin de démontrer clairement cette intervention, nous avons procédé à la purification de sous-populations de lymphocytes [154, 155, 157, 205]. Tout d'abord, nous avons séparé les cellules T des cellules non-T par la technique des rosettes d'érythrocytes de mouton. Ensuite, à partir des cellules T purifiées, nous avons isolé les cellules portant des récepteurs des Fc (cellules TFc⁺) en formant des rosettes d'érythrocytes de poulet recouverts d'anticorps. La proportion de cellules TFc⁺ dans la population des lymphocytes circulants est très faible (1 % environ). Par conséquent, il est difficile de démontrer leur activité cytotoxique par la méthode de la libération de chrome radioactif.

FIG. 6. — *Marquage in situ* par les érythrocytes de mouton, d'un lymphocyte étendant un uropode sur une cellule Vero géante, après 4 h en présence d'anticorps anti-virus rougeoleux. Le marquage démontre l'origine thymique (cellule T) du lymphocyte à uropode. Remarquez l'adsorption des érythrocytes sur l'uropode et non sur le corps cellulaire [155]. Microscope électronique à balayage (x 6 500).

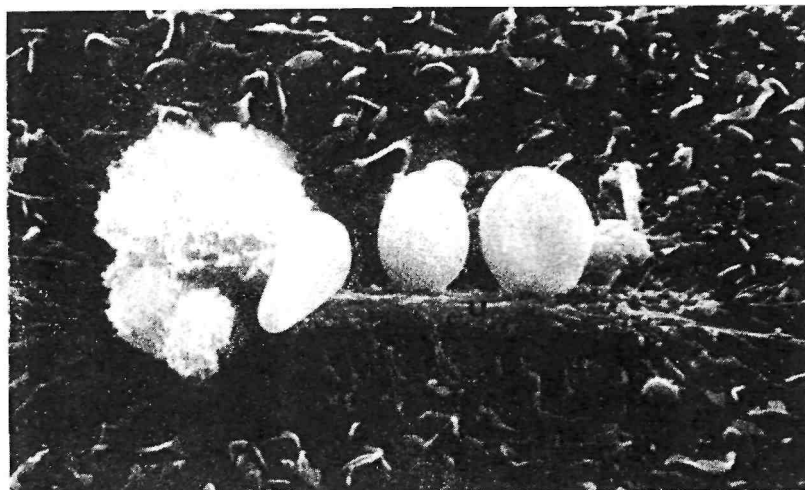
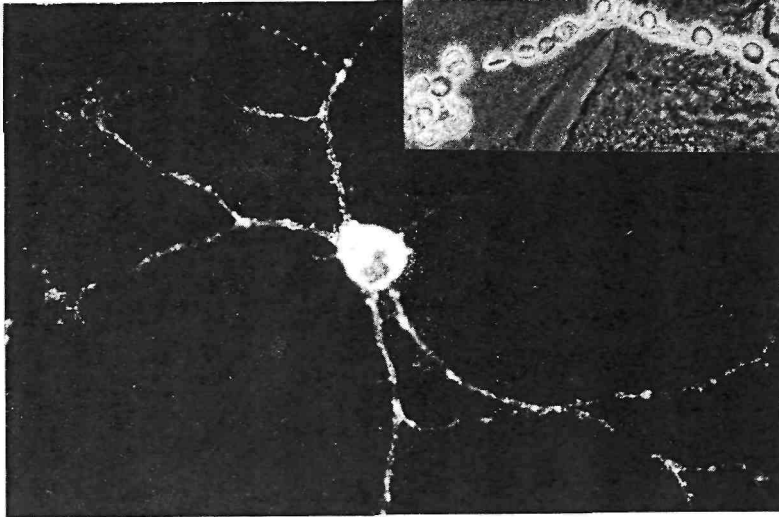


FIG. 7. — Marquage par immunofluorescence d'un neurone de souris en culture infecté depuis 7 jours par le virus rougeoleux en présence d'anticorps spécifiques du virus. Les neurones sont le seul type cellulaire infecté ($\times 1\ 200$). Cartouche : hémadsorption d'érythrocytes de singe sur le corps cellulaire (à gauche) et sur le neurite d'un neurone infecté. Microscope optique ($\times 1\ 200$).



Nous avons donc essayé de visualiser les cellules portant les deux récepteurs qui les identifient comme cellules TFc^+ et réagissant avec la cellule-cible. Nous avons placé les cellules TFc^+ purifiées sur des cellules-cibles pendant 4 h à 37°C en présence d'anticorps, et les avons soumises ensuite à un double marquage *in situ* par des érythrocytes de mouton et par des érythrocytes de poulet recouverts d'anticorps. La taille et la forme de ces deux types d'érythrocytes sont aisément reconnaissables. Cette technique nous a permis de photographier des cellules TFc^+ étendant un uropode sur la cellule-cible [155], démontrant ainsi l'implication d'une sous-population de cellules T, porteuses de récepteurs des Fc, dans la CLDA.

Bien que ces cellules soient très peu nombreuses et manifestent une activité faible, nous pensons qu'elles pourraient bien jouer un rôle plus important qu'il n'y paraît à première vue. En effet, les transformations importantes des cellules K de type I lors de leur interaction avec la cellule-cible sont telles qu'il paraît peu probable que les lymphocytes survivent à l'attaque cytotoxique. La cytotoxicité de type I semble suicidaire. Par contre, la déformation subie lors de l'interaction de type II, caractéristique des cellules TFc^+ , est relativement bénigne et pourrait être réversible. Il ne s'agit ici que d'une hypothèse, mais si elle s'avère exacte, les cellules TFc^+ pourraient intervenir plusieurs fois de suite, comme le font les lymphocytes T sensibilisés, alors que les cellules K-non-T ne pourraient exercer leur activité cytotoxique qu'une seule fois [155].

6) Conclusion.

Nos résultats démontrent tout d'abord que la CLDA est un processus susceptible d'opérer lors de l'infection rougeoleuse naturelle, car il se déroule efficacement *in vitro*. D'autre part, nous avons montré que la CLDA n'est pas le fait des seuls lymphocytes non-T, mais qu'une sous-population de cellules T portant des récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines participe à l'action cytotoxique.

Il reste toutefois important de déterminer l'aptitude des lymphocytes de malades atteints de complications neurologiques de la rougeole, à exercer la CLDA.

IV. — LE VIRUS ROUGEOLEUX ET LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Le virus rougeoleux, lorsqu'il pénètre dans le SNC, peut y provoquer divers types de complications neurologiques [113, 39]. La pathologie du SNC attribuable au virus rougeoleux se manifeste essentiellement sous deux aspects différents, l'infection aiguë et l'infection chronique ou subaiguë. Lors de l'infection aiguë, on trouve généralement du virus libre dans le cerveau. Dans ce cas, les surnageants des broyats de cerveaux sont infectieux pour des cellules permissives en culture. Par contre, lors de l'infection chronique du SNC, le virus n'est habituellement pas à l'état libre dans le cerveau et reste associé aux cellules à cause d'un défaut de la maturation virale. On doit alors recourir à la technique de coculture des cellules nerveuses infectées avec des cellules permissives *in vitro* pour extraire le virus. Il y a cependant des exceptions à cette règle, et le tableau anatomo-pathologique n'est pas toujours aussi tranché. La réponse immunitaire également est différente dans ces deux formes extrêmes d'encéphalite, les anticorps étant présents dans le cerveau lors de l'infection subaiguë mais non lors de l'infection aiguë.

Nous passons en revue dans ce chapitre les caractéristiques des infections humaines et expérimentales du SNC par le virus rougeoleux, et rapportons en détail l'infection rougeoleuse persistante que nous avons établie dans des neurones de souris *in vitro*.

A. — L'INFECTION HUMAINE

a) *Infection aiguë*

L'atteinte du SNC par le virus rougeoleux peut se développer à des degrés divers. Il n'est pas rare, lors d'infections rougeoleuses banales, de déceler chez les enfants une pléiocytose du LCR [121] ou certaines anomalies de l'électroencéphalogramme [57] sans que cela n'implique une atteinte sérieuse du SNC [66].

Dans d'autres cas, une encéphalite aiguë post-rougeoleuse se développe 4 à 6 jours environ après l'apparition de l'exanthème. La pathologie de l'encéphalite se caractérise par une inflammation et une démyélinisation périvaseulaire, quelquefois en plaques, avec infiltration de cellules microgliales, d'astrocytes fibreux et parfois de mononucléaires, tableau rappelant l'encéphalite allergique expérimentale chez l'animal [6]. L'encéphalite survient le plus fréquemment chez les enfants de plus de 3 ans ainsi que chez les adolescents ou les adultes. On trouve, dans les cellules de cerveaux infectés, des inclusions cytoplasmiques et nucléaires de nucléocapsides virales [1]. et on a pu isoler le virus rougeoleux du cerveau et du LCR de patients [186, 140]. Les antigènes rougeoleux sont présents dans les neurones, les cellules gliales et les cellules du LCR. Dans d'autres cas, il a été nécessaire de réaliser une coculture pour récupérer le virus, bien que la maladie fût de type aigu.

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer la pathogénie de l'encéphalite post-rougeoleuse aiguë : 1) l'incorporation d'antigènes de l'hôte dans les enveloppes virales, suscitant une autoimmunité contre des antigènes du cerveau et, en particulier, de la myéline, par analogie avec l'encéphalite allergique expérimentale ; 2) la destruction des cellules nerveuses par le virus lui-même [127, 90, 113].

b) *Infection aiguë retardée*

Parfois l'encéphalite aiguë se développe plusieurs années après l'infection rougeoleuse, avec un décours rapide et une pathologie similaire à celle de l'encéphalite post-rougeoleuse aiguë [59].

Une infection du SNC par le virus rougeoleux est parfois observée chez des enfants dont l'immunité cellulaire est déficiente. Ces enfants manifestent, 6 mois environ après avoir contracté la rougeole, une encéphalite fatale qui dure environ 2 mois. Dans cette encéphalite, les lésions sont plus limitées et n'atteignent pas la matière blanche. Des antigènes rougeoleux sont présents dans les cellules nerveuses. Il s'agit vraisemblablement d'une infection latente, activée par la déficience de l'immunité cellulaire [39].

e) *Infection subaiguë et chronique*

La PESS [32, 135, 197] est une maladie rare (un cas par million, environ) frappant des enfants qui ont contracté la rougeole avant l'âge de 2 ans [82] et survenant 5 à 7 ans plus tard. L'incidence de la maladie semble en relation avec le nombre de cas de rougeole.

Aux Etats-Unis, la PESS est devenue extrêmement rare environ 5 ans après la généralisation de la vaccination, et a maintenant presque disparu. Bien que des complications neurologiques se produisent parfois après la

vaccination, sous forme d'encéphalite aiguë, l'incidence en est mille fois moindre qu'après la rougeole naturelle [98]. Les risques de développer une PESS sont dix fois moindres après vaccination [112].

Il paraît clair qu'avant de déclencher une PESS, le virus reste présent dans l'organisme, vraisemblablement dans le SNC où il progresse lentement pour finir par entraîner des dommages décelables cliniquement. La maladie dure de 6 mois à 3 ans en moyenne, mais peut se prolonger pendant une vingtaine d'années. Elle consiste en une dégénérescence progressive des fonctions mentales et motrices, et malgré de rares cas de rémission temporaire, elle est invariablement fatale.

Dans les lésions, on trouve une infiltration périvaseulaire, on remarque la présence d'astrocytes fibreux, de lymphocytes, de plasmocytes et de microglie. Les neurones et les oligodendrocytes contiennent des inclusions nucléaires. On observe la perte de neurones et la présence de foyers de démyélinisation dans la substance blanche. Les inclusions nucléaires [32] consistent en amas de nucléocapsides virales [16, 182, 130]. Des nucléocapsides ont également été observées dans le cytoplasme des neurones, dans les axones myélinisés, les dendrites et les zones post-synaptiques [188, 189]. On n'a cependant jamais décelé d'alignement de nucléocapsides virales sous les membranes cellulaires, ni de bourgeonnement de particules virales. Le taux des anticorps dirigés contre le virus rougeoleux est très élevé dans le sérum et dans le LCR [31]. Les antigènes rougeoleux ont été mis en évidence dans des coupes de cerveau [31, 184], ainsi que des anticorps anti-virus rougeoleux et du complément au niveau des lésions [83]. Dans des cultures cellulaires réalisées à partir de biopsies cérébrales, on a décelé des fusions et la présence d'antigènes viraux [10]. Le virus rougeoleux a été isolé pour la première fois par coculture de cellules cérébrales avec des cellules permissives par Horta-Barbosa et coll. [76] et à partir de cerveau ou de ganglion lymphatique depuis lors [77, 30, 89, 186, 194]. Tous ces éléments ont établi sans conteste la responsabilité du virus rougeoleux dans la PESS, bien que la pathogénie de la maladie soit encore inconnue. Il a été suggéré qu'un mutant du virus rougeoleux puisse survenir et infecter le SNC sans pouvoir s'y répliquer en cycle complet [128, 144, 146, 194, 113, 183, 209]. C'est sur la base de cette hypothèse que les virus isolés de cultures de cellules nerveuses de malades atteints de PESS ont été appelés « virus de la PESS ». On a même cru localiser la mutation dans la partie du génome viral codant pour la protéine M. Cette proposition s'appuyait sur l'absence de protéine M dans les cellules dérivées de cerveaux infectés [64] et sur l'absence de réaction sérologique croisée entre la protéine M d'un virus de PESS et celle d'un virus rougeoleux sauvage [63, 163]. De plus, le sérum des patients atteints de PESS ne paraissait pas contenir d'anticorps anti-protéine M [64], et cela était interprété comme le reflet d'une diminution de la synthèse de cette protéine chez ces malades. En fait, des études récentes ont montré que, d'une part, des anticorps anti-protéine M peuvent être détectés par une méthode plus sensible dans le sérum et le LCR de sujets atteints de PESS [190] et que d'autre part le sérum de sujets normaux est très souvent dépourvu d'anticorps anti-protéine M. Seuls les convalescents de rougeole possèdent ces anticorps de façon régulière (W. G. Bellini, communication personnelle).

Enfin, on a cru que la PESS pouvait être provoquée par la conjonction de deux agents viraux au moins, le virus rougeoleux et un papovavirus [93, 116, 211]. Cette hypothèse est maintenant abandonnée.

Il est donc à présent clairement établi que la PESS résulte d'une invasion progressive du SNC par le virus rougeoleux, d'une modification de ce virus dans le SNC ou de l'inaptitude des cellules nerveuses à répliquer normalement le virus, ce qui induirait une persistance de l'infection. Quant au système immunitaire, son rôle dans le décours de l'infection est soupçonné, mais reste à explorer.

B. — LES MODELES ANIMAUX EXPERIMENTAUX

Depuis plus d'une décade, de nombreux modèles d'infection aiguë, subaiguë et chronique par le virus rougeoleux ont été établis chez des animaux de laboratoire afin de mieux comprendre l'infection humaine du SNC sous ses formes diverses. Pour infecter le SNC des animaux, on a utilisé une variété de souches de virus provenant soit d'infections rougeoleuses banales (virus rougeoleux), soit d'infections subaiguës (virus de la PESS).

Parmi les souches de virus rougeoleux, on compte notamment les souches Edmonston, Schwartz et Philadelphia, qui ont toutes une longue histoire de passages en culture de cellules et parfois chez l'animal. Un virus dérivé de la souche Philadelphia, après plus de 100 passages successifs en cerveaux de hamster et appelé HNT est devenu encéphalotogène pour le hamster, le rat et la souris [23, 170, 25]. Cette souche reste associée aux cellules qu'elle infecte et ne produit pas de virus libre.

Parmi les souches de virus de la PESS, on trouve plusieurs souches isolées directement de cerveaux de patients atteints de PESS ainsi que des souches dérivées de celles-ci après passages dans des cerveaux d'animaux divers,

comme le furet [187], le hamster et le singe [4]. Certaines souches produisent du virus libre en cultures cellulaires; d'autres restent rigoureusement associées aux cellules qu'elles infectent et ne peuvent être propagées que par inoculation d'extraits cellulaires non centrifugés.

a) *Infection inflammatoire aiguë*

Une encéphalite aiguë rapidement fatale a été obtenue chez le hamster nouveau-né par inoculation intracérébrale de virus rougeoleux neuroadapté ou de virus de la PESS. La pathologie de cette infection a été étudiée en détail, de même que la localisation des antigènes viraux dans le SNC [9, 84, 26, 147, 45]. L'infection est localisée principalement dans les neurones, bien que d'autres types cellulaires soient atteints également. On observe une légère inflammation et des cellules géantes contenant des inclusions cytoplasmiques de nucléocapsides de type granuleux, mais on n'observe pas d'inclusions nucléaires. Les nucléocapsides s'alignent sous la membrane plasmique, et les antigènes viraux sont présents à la surface des cellules infectées et au niveau des inclusions cytoplasmiques. On trouve également des antigènes viraux, sans support structural reconnaissable, dans le cytoplasme et parfois dans le noyau. On peut isoler du virus libre du cerveau.

Il paraît clair que le caractère aigu de la maladie est en relation avec l'immaturation du système immunitaire des animaux nouveau-nés. En effet, les hamsters adultes recevant les mêmes virus ne sont pas affectés [99, 26, 61] sauf si leur système immunitaire est expérimentalement altéré, auquel cas ils succombent à une encéphalite identique à celle du nouveau-né [27, 85].

b) *Infection aiguë sans inflammation ni encéphalopathie*

Chez la souris BALB/c jeune, la souche HNT provoque une infection aiguë, tuant un tiers des animaux, sans altérations pathologiques du cerveau ni inflammation ni démyélinisation [61]. Cette infection n'est cependant pas obtenue chez les souris nouveau-nées ou plus âgées, même après immunosuppression. L'expression du virus dans le cerveau dépend donc étroitement de l'âge de l'animal. Un état de maturation particulier de certaines cellules semble donc requis pour l'infection. On ne trouve pas de nucléocapsides dans les cellules infectées, mais une accumulation d'antigènes viraux non structuraux dans certains neurones [72], ce qui indique que la maturation virale ne doit pas nécessairement se développer jusqu'à l'assemblage de nucléocapsides pour provoquer la mort des animaux.

L'adaptation du virus HNT par passages successifs dans des cerveaux de souris BALB/c a produit une souche qui provoque une encéphalopathie similaire chez la souris BALB/c adulte. Les antigènes viraux sont exclusivement localisés dans les neurones. Ceux-ci ne montrent aucun signe cytopathologique et il n'y a pas d'assemblage viral. Des nucléocapsides de type granuleux ou lisse sont présentes dans le cytoplasme et le noyau des neurones. Des antigènes viraux non structuraux sont dispersés dans le cytoplasme, s'accumulant à l'extrémité des dendrites, dans les zones post-synaptiques [203]. Ces observations suggèrent que le dysfonctionnement neuronal chez l'animal infecté est dû à la présence des antigènes viraux au niveau des synapses. En outre, il se peut que cette accumulation trahisse une propagation transsynaptique des éléments viraux d'un neurone à l'autre.

c) *Infection subaiguë et chronique*

La première encéphalite chronique établie expérimentalement chez l'animal avec le virus rougeoleux fut obtenue en présence d'anticorps spécifiques du virus [208]. La souche Schwartz adaptée au cerveau de hamster est inoculée à des hamsters nouveau-nés dont les mères ont été immunisées contre le virus rougeoleux, et les animaux développent une encéphalite chronique qui dure plus de 2 mois.

L'inoculation d'une souche de virus de la PESS à de jeunes hamsters [26, 145] ou de la souche HNT à des rats adultes [170] provoque chez ces animaux une infection chronique du SNC avec démyélinisation, dégénérescence neuronale et inflammation. Dans le cas des hamsters, l'élévation du taux d'anticorps va de pair avec un défaut de maturation virale et l'établissement de l'infection chronique. La présence d'immunoglobulines G a été démontrée au niveau des lésions comme dans le cas de la PESS humaine. Comme dans la maladie humaine également, le virus ne peut être recouvert que par coculture. De même, il n'y a pas d'alignement de nucléocapsides sous la membrane cellulaire, ni de bourgeons viraux. Cependant, les cellules géantes, fréquentes dans les cerveaux de hamster, n'ont été observées qu'une seule fois dans un cerveau humain lors d'une PESS [80]. Ce modèle expérimental chez le hamster est remarquablement similaire à la PESS humaine malgré quelques différences quant à la localisation des lésions.

D'autres modèles ont été établis, par inoculation de souches de virus de la PESS, chez le furet [187] et chez le singe rhésus [4]. Ces virus sont intimement associés aux cellules géantes que l'on a inoculées directement aux animaux. Un décours clinique et une pathologie semblables à ceux de la PESS humaine sont obtenus chez les animaux possédant déjà une immunité au virus rougeoleux.

Enfin, récemment, un modèle d'encéphalite subaiguë a été établi chez la souris SJL avec le virus HNT [148] ou chez la souris BALB/c, par injection de virus HNT dans des conditions où le virus tue l'animal, et administration d'anticorps anti-virus rougeoleux [150, 151]. La plupart des souris sont protégées dans ces conditions, mais une petite proportion d'entre elles contracte une encéphalite subaiguë tardive. Ce phénomène est également observé avec certains anticorps monoclonaux anti-hémagglutinine du virus [149].

En conclusion, il existe de nombreux aspects de l'infection rougeoleuse expérimentale du SNC, de même qu'il existe une gamme étendue d'infections naturelles. Bien que les systèmes expérimentaux soient très artificiels, il paraît évident que certains anticorps spécifiques du virus pourraient jouer un rôle important dans le retard et le caractère subaigu de l'infection. L'immunité cellulaire pourrait, elle aussi, intervenir, mais son rôle est encore très peu compris.

C. — L'INFECTION CHRONIQUE DE CELLULES NERVEUSES « IN VITRO »

a) *En cultures organotypiques*

Relativement peu de travaux ont été réalisés sur l'infection rougeoleuse de cellules nerveuses en culture. Raine et coll. [142, 143, 144, 145] et Sheppard et coll. [176] ont infecté des cultures organo-typiques de SNC ou périphérique de rongeurs par du virus rougeoleux ou du virus de la PESS. Ils ont trouvé tous les stades de maturation virale décrits plus haut (chapitre II, *b*) avec toutefois, en plus, la présence d'inclusions intranucléaires de nucléocapsides virales.

L'introduction de la souche rougeoleuse type sauvage Edmonston dans des cultures organotypiques de ganglion sensoriel de hamster provoque une infection persistante, durant plus de 2 mois. Du virus infectieux est produit durant toute cette période, et les nucléocapsides virales s'alignent sous la membrane cellulaire et sont incorporées dans les bourgeons viraux [143].

Lorsque le même virus est inoculé à des cultures organotypiques de cervelet de hamster, des cellules géantes apparaissent après 5 ou 6 jours, des nucléocapsides abondent dans le cytoplasme et s'accrochent à la membrane, des virions bourgeonnent. Ultérieurement, de nombreuses nucléocapsides apparaissent dans les noyaux. Certains bourgeons viraux contiennent des microtubules. Les neurones sont relativement rapidement éliminés [142]. Des observations similaires sont faites avec un virus libre de la PESS qui provoque la fusion de neurones entre eux ou avec des cellules gliales [144].

Par contre, si du virus intimement associé aux cellules d'une lignée dérivée d'un cerveau de malade atteint de PESS est administrée aux cultures de cervelet de hamster, il n'y a pas ou très peu de virus infectieux produit, mais tous les types cellulaires sont infectés et on observe des fusions cellulaires [176].

b) *En cultures de cellules dissociées*

Nous avons entrepris l'étude de l'infection rougeoleuse du SNC *in vitro* en infectant des cultures de neurones dissociés par le virus rougeoleux sauvage. Ces cultures permettent de contrôler avec précision la multiplicité d'infection et de réaliser de l'immuno-marquage, deux facteurs essentiels de notre étude, non réalisables en cultures organotypiques.

1) *Les cellules.*

Les cultures de neurones sont obtenues par dissociation enzymatique et mécanique de moelle épinière d'embryons de souris prélevés *in utero* à 12 ou 13 jours de gestation. Elles sont entretenues dans un milieu nutritif adéquat, contenant une concentration élevée de glucose et un inhibiteur de la prolifération d'autres types cellulaires [129, 152, 51]. Les cultures s'établissent en monocouche et contiennent plusieurs types cellulaires : des neurones, des cellules gliales et des fibroblastes. Les neurones, dont la croissance a été favorisée sélectivement, achèvent leur maturation en 3 à 4 semaines. Ils étendent dans la culture un réseau dense de neurites, forment des synapses entre eux et deviennent stables quant à leur morphologie, leur taille, leurs contacts synaptiques et leur activité électrophysiologique [118]. Les cultures peuvent ainsi être maintenues pendant deux

mois sans perte appréciable de neurones.

2) *Le virus.*

Parmi plusieurs souches de virus rougeoleux ou de la PESS, seule la souche rougeoleuse Edmonston a provoqué une infection dans les cultures. Cette souche nous a été fournie par W. J. Bellini. Elle a été clonée et concentrée à 5×10^7 particules infectieuses par ml.

L'utilisation pour cette étude d'une souche de virus rougeoleux de type sauvage, et non d'un virus de la PESS ou neuroadapté, présente un intérêt particulier. En effet, cela correspond aux conditions qui semblent prévaloir dans la nature. Les virus ayant infecté le SNC ne se transmettent pas. Seul le virus rougeoleux sauvage se transmet d'individu à individu et envahit quelquefois le SNC, provoquant une infection erratique, sans avenir pour l'agent infectieux.

3) *L'infection est conditionnelle.*

Deux conditions se sont avérées essentielles pour l'infection des cultures de neurones dissociés. La première est l'inoculation d'une suspension très concentrée de virus rougeoleux, à la multiplicité d'infection d'au moins 20 unités infectieuses par cellule. La seconde condition est l'âge des cellules en culture. Il est clair que l'infection des neurones ne survient que si les cellules sont en culture depuis 8 à 12 jours au moment de l'infection. Cela suggère que l'état de maturation des cellules nerveuses est d'une importance majeure pour le succès de l'infection, comme il a été démontré chez l'animal (61, 72).

4) *L'infection est persistante et sélective pour les neurones.*

Deux jours après l'infection, 10 % environ des neurones présents contiennent des antigènes rougeoleux détectables par immuno-fluorescence. Les antigènes viraux forment des inclusions péri-nucléaires dans le corps cellulaire des neurones, mais sont généralement absents des neurites [159]. Sept jours après l'inoculation, 40 % des neurones sont infectés ; ce pourcentage se maintient pendant toute la durée de l'infection, aussi longtemps que les cellules sont maintenues en culture. Sur des préparations fixées, les antigènes viraux sont détectés dans les grandes inclusions cytoplasmiques périnucléaires, le long des neurites et sur la membrane plasmique des neurones (fig. 7). Sur des préparations vivantes colorées par immuno-fluorescence, les antigènes viraux sont détectés en grand nombre sur la membrane cellulaire des neurones. Des anticorps monoclonaux ont été préparés par D. E. McFarlin *et al.* [106] et sont spécifiques de l'hémagglutinine du virus rougeoleux. Ces anticorps détectent l'hémagglutinine virale sur la membrane des neurones infectés. La présence de l'hémagglutinine sur les neurones est confirmée par l'hémadsorption. Le corps cellulaire des neurones et les neurites sont hémadsorbants. Les mêmes neurones hémagglutinent et portent les antigènes viraux (fig. 7).

Après trois semaines d'infection environ, un réseau dense de neurites s'est établi dans la culture, et les antigènes viraux s'y répartissent [159]. Nous n'avons pas décelé d'effet cytopathogène du virus sur les cellules infectées. En fait, sans recourir à l'immuno-marquage, il est impossible de distinguer les neurones infectés des neurones non infectés, ou les cultures infectées des témoins. Aucune fusion cellulaire ne se manifeste, pas plus qu'un changement de forme des neurones ou une inhibition de la croissance des neurites. A part les neurones, aucun autre type cellulaire n'est apparemment infecté pendant toute la durée de l'infection.

5) *Les anticorps n'induisent pas la redistribution des antigènes viraux sur les membranes neuronales.*

Nous avons observé, avec Rammohan [160], l'effet d'anticorps anti-virus rougeoleux sur les neurones vivants infectés par le virus. Nous avons utilisé un sérum hyperimmun de souris ou des anticorps monoclonaux spécifiques de déterminants antigéniques situés sur l'hémagglutinine virale [106], ou encore un sérum de malade atteint de PESS, et nous avons examiné la distribution des antigènes correspondants sur les neurones vivants, par immunofluorescence.

Tous les anticorps utilisés se fixent à la surface des neurones et des neurites. Le sérum hyperimmun et le sérum de malade bloquent complètement les sites antigéniques disponibles. Les anticorps monoclonaux bloquent les antigènes dont ils sont spécifiques mais, après leur attachement, il est encore possible d'y fixer le sérum hyperimmun ou le sérum de malade qui réagissent également avec d'autres déterminants.

Après avoir été mis en contact avec les neurones infectés pendant 1 h, les anticorps se maintiennent sur la membrane et sont encore détectables après 10 jours. De même, si les anticorps sont maintenus dans le milieu de

culture pendant 10 jours, ils recouvrent les neurones infectés et bloquent les antigènes rougeoleux pendant toute la durée du traitement.

Il existe donc une différence importante entre les neurones et les cellules Vero quant à leur aptitude à redistribuer et éliminer les complexes antigène-anticorps formés sur leur membrane (chapitre III, A, b).

6) *L'infection n'est pas productive.*

A aucun moment, le milieu de culture des neurones infectés ne contient de virus infectieux. Les cellules Vero auxquelles ces échantillons sont ajoutés ne montrent ni fusion cellulaire, ni antigènes viraux pendant 7 jours d'incubation à 37 ou à 32° C. Les mêmes échantillons ne transmettent pas l'infection à d'autres cultures de neurones âgées de 10 jours.

La seule façon de récupérer du virus infectieux des cellules nerveuses est de réaliser une coculture de ces cellules avec des cellules Vero. Dans ces conditions, on voit apparaître des foyers de fusion cellulaire aux alentours immédiats de neurones après 2 jours, lorsque les cellules Vero occupent toute la surface libre de la culture. A ce moment, les cellules géantes ainsi que les neurones voisins contiennent des antigènes viraux détectés par immunofluorescence. Le milieu des cocultures contient du virus infectieux. Les cocultures les plus productives sont réalisées avec des neurones infectés depuis 18 jours (tableau III).

7) *L'assemblage viral est défectif.*

L'observation au microscope électronique de coupes de neurones infectés, après marquage à l'immunoperoxydase, révèle la présence d'antigènes viraux sur la membrane plasmique [159], comme on pouvait s'y attendre au vu de l'immunofluorescence de surface. Le cytoplasme des neurones que l'on reconnaît à leurs contacts synaptiques, contient de grandes inclusions formées de nucléocapsides virales granuleuses. Les nucléocapsides ne s'alignent pas sous la membrane cellulaire comme lors des infections productives. Les neurites eux-mêmes contiennent des amas de nucléocapsides granuleuses, non alignées sous la membrane et quelquefois des nucléocapsides lisses. La membrane plasmique des neurones forme de nombreuses protubérances de la taille de bourgeons viraux, couvertes d'antigènes rougeoleux mis en évidence par l'immunoperoxydase. Toutefois, la plupart de ces bourgeons se distinguent de vrais bourgeons viraux par l'absence de nucléocapside virale enroulée en spirale. Ces protrusions sont, au contraire, remplies de vésicules et de tubules, d'une trentaine de nanomètres de diamètre et de nature indéterminée [159]. Ces pseudo-bourgeons s'accumulent en grand nombre sur la membrane cellulaire des neurones et ne paraissent pas s'en détacher. Dans de rares cas, on observe à l'intérieur des protrusions des filaments dont les dimensions sont celles des nucléocapsides mais qui ne sont pas enroulés [159].

TABLEAU III. — *Pouvoir infectant du milieu de coculture.*

Temps auquel la coculture est réalisée (en jours après l'infection)	Pouvoir infectant du milieu de la coculture après 2 jours déterminé en SFU (unités formatrices de syncytiums)
7	1×10^1
14	1×10^3
18	2×10^4
25	2×10^2

L'assemblage des virions est donc défectif puisque les bourgeons ne se détachent pas, contiennent rarement de nucléocapside mais souvent du matériel d'origine cellulaire.

8) *La synthèse des protéines virales est complète, mais modifiée.*

La synthèse des polypeptides viraux lors de l'infection des neurones a été examinée en collaboration avec Bellini [158, 159], afin de déterminer si le défaut de maturation du virus est dû à l'absence ou la modification d'une ou plusieurs protéines virales. L'analyse est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide de lysats cellulaires obtenus après incorporation de méthionine radioactive et immunoprécipités. L'immunoprécipitation est effectuée par un sérum hyperimmun qui contient des anticorps réagissant avec tous les polypeptides du virus ou par des anticorps monoclonaux spécifiques de l'hémagglutinine virale [106]. L'autoradiographie des gels

[159] démontre la synthèse de tous les polypeptides du virus rougeoleux dans les neurones. L'absence d'un polypeptide ne peut donc être incriminée dans l'avortement de la maturation virale.

La NP est synthétisée en quantité relativement faible. Dans cette expérience, le marquage à la méthionine radioactive a lieu du 13 au 14^e jour de l'infection et, à ce moment, la microscopie électronique a montré une abondance de nucléocapsides dans les neurones.

Il semble donc exister un phénomène d'auto-régulation sélective de la synthèse de nucléoprotéine (NP) par son accumulation dans la cellule neuronale. La polymérase virale (P) est également synthétisée en faible quantité, et sa migration électrophorétique est ralentie. La protéine M est synthétisée dans les neurones. Sa vitesse de migration électrophorétique et son antigénicité sont celles de la protéine M du virus original. On ne peut donc apparemment pas invoquer une modification de cette protéine pour expliquer l'échec de l'assemblage des composants viraux.

Le polypeptide HA synthétisé dans les neurones migre plus rapidement que celui qu'on trouve dans le virus ou dans des cellules lors d'infections productives. Cette modification de l'HA est observée également lorsqu'on utilise pour l'immunoprécipitation des lysats de neurones, les anticorps monoclonaux anti-HA. L'HA est donc modifiée lors du passage du virus sauvage dans les neurones, peut-être dans son degré de glycosylation. Cependant, son antigénicité est préservée, car elle réagit avec les anticorps spécifiques de l'HA virale en immunofluorescence et en immunoprécipitation. De plus, sa fonction est intacte, puisque les neurones infectés sont hémadsorbants.

Enfin, les polypeptides viraux synthétisés dans les cocultures de neurones infectés et de cellules Vero sont identiques à ceux du virus original, et sont produits en quantité telle qu'ils masquent complètement les polypeptides modifiés produits par les neurones. Le virus recouvré des cocultures est donc identique à celui qui a infecté les neurones.

9) *La réplication de l'ARN viral est anormale.*

En collaboration avec J. Milstien (résultats non publiés), nous avons analysé l'ARN viral présent dans les neurones et constaté qu'il consiste en une quantité égale de chaînes négatives (polarité de l'ARN du virion) et positives (polarité de l'ARN messager) comme dans les cellules Vero. Cependant, lorsqu'on isole les nucléocapsides des neurones, on constate que les chaînes positives et négatives sont encapsidées, contrairement à la situation dans les cellules Vero où seules les chaînes négatives sont encapsidées. Cette accumulation de chaînes positives dans les nucléocapsides pourrait donc priver la cellule de l'ARNm viral nécessaire à la replication normale du virus. On ne trouve en effet ni forme répliquative à double chaîne, ni chaîne positive de la taille du messager à l'état libre en quantité détectable dans les neurones. Par contre, on y trouve des petites chaînes négatives, de taille subgénomique et qui pourraient jouer un rôle dans l'infection en produisant, des particules interférentes défectives.

Il ne s'agit encore que de résultats préliminaires qui demandent à être reproduits, mais il paraît clair que la réplication de l'ARN viral ne se déroule pas de façon normale. Bien que le mécanisme de ce malfonctionnement et son rôle possible dans l'établissement de la persistance ne soient pas clairs, c'est peut-être là que réside le défaut de maturation du virus.

10) *Discussion et conclusion.*

En inoculant un virus rougeoleux de type sauvage à des cultures de cellules dissociées de moelle épinière de souris, nous avons créé une infection persistante, sélective pour les neurones, ne manifestant pas l'effet cytopathogène visible en microscopie optique, et n'induisant pas la production de virions infectieux bien que tous les composants du virus soient synthétisés dans les cellules infectées.

Les raisons de l'assemblage avorté et de la formation de bourgeons aberrants ne sont pas évidentes. Il est clair que les abondantes nucléocapsides virales, bien que de type granuleux pour la plupart, ne s'alignent pas sous la membrane et ne sont, pratiquement jamais incorporées dans les bourgeons. L'absence de protéine a été souvent considérée comme la raison majeure de l'incapacité de la NP à s'accrocher à la membrane en vue du bourgeonnement [64]. Dans les neurones que nous avons étudiés, la protéine M est présente en quantité normale et n'est pas modifiée quant à sa mobilité électrophorétique et son antigénicité. L'absence de protéine M n'est donc pas le seul facteur qui puisse induire une déficience du bourgeonnement. Tous les composants nécessaires à la formation de virions sont présents. Les polypeptides HA et P sont modifiés, mais nous ignorons si cette

modification, qui n'affecte pas leurs propriétés antigéniques et fonctionnelles, peut résulter en une altération de l'assemblage des protéines de l'enveloppe virale avec la nucléo-capside. Enfin, une anomalie de la réplication de l'ARN viral paraît se produire et pourrait être responsable de l'avortement de l'infection. On sait en effet que les particules interférentes défectives de virus peuvent jouer un rôle dans l'établissement d'infections persistantes [79] et que cette propriété s'appliquerait également au virus rougeoleux [65].

Nous n'avons utilisé, comme source de matériel infectieux, ni un variant, ni un mutant du virus rougeoleux, ni une souche virale adaptée ou modifiée par les conditions de culture, mais un virus de type sauvage dont nous connaissons les propriétés lytiques dans les cellules permissives. De plus, nous n'avons pas modifié ou modulé l'infection par la présence d'anticorps ou par des passages répétés en cultures de cellules. Il faut donc conclure que la cellule hôte joue un rôle primordial dans le déroulement de l'infection. Les neurones sont infectés, produisent toutes les protéines virales, mais ne sont pas capables de fournir l'ensemble complet des conditions nécessaires à la réalisation du cycle infectieux. Lorsque ces conditions sont offertes par les cellules Vero lors de la coculture, le virus est récupéré et il est identique au virus utilisé pour l'infection originale des neurones.

L'obtention d'une infection persistante de neurones *in vitro* avec le virus rougeoleux sauvage démontre le rôle essentiel que la cellule hôte peut jouer dans l'établissement d'infections chroniques du SNC par le virus rougeoleux.

V. — CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons étudié l'infection rougeoleuse aiguë ou persistante de cellules *in vitro* ainsi que l'effet des anticorps spécifiques du virus et de certains lymphocytes sur les cellules infectées.

1) En utilisant la souche Edmonston du virus rougeoleux, nous avons tout d'abord examiné les modifications induites par l'infection dans la membrane plasmique des cellules Vero, une lignée continue de cellules non différenciées. La fusion cellulaire par le virus provoque la formation de cellules géantes. Celles-ci s'avèrent être, parmi les cellules productrices de virus infectieux, des îlots d'infection avortée dans lesquels la maturation virale est bloquée au niveau de la formation de rubans et où le bourgeonnement viral ne se produit pas.

Nous avons localisé les sites hémagglutinants sur ces cellules géantes, et suggéré que ces sites pourraient se déplacer dans le plan de la membrane plasmique lors de la progression de la fusion cellulaire.

Ensuite, nous avons examiné l'effet des anticorps spécifiques du virus sur les cellules Vero infectées en monocouche, et démontré qu'ils induisent la redistribution des antigènes rougeoleux sur la membrane cellulaire.

Nous avons observé l'interaction entre cellules infectées et lymphocytes non sensibilisés, en présence d'anticorps anti-virus rougeoleux, et nous avons identifié, sur la base de marquages différentiels, les populations de lymphocytes impliquées dans cette réaction cytotoxique.

2) Nous avons établi, avec la même souche de virus rougeoleux, une infection persistante et sélective de neurones de souris en culture. Nous avons déterminé les caractéristiques de cette infection lente, où la maturation virale est inhibée avant la formation de rubans et le bourgeonnement viral. Nous avons recherché les raisons de l'établissement de la persistance dans ces cellules en voie de différenciation, et suggéré que la réplication de l'ARN viral pourrait être déficiente. Nous avons entrepris et poursuivons actuellement l'étude de l'effet des anticorps sur l'infection persistante des neurones *in vitro*. Nos résultats démontrent l'incapacité des neurones de se débarrasser des complexes antigène-anticorps présents à leur surface.

En utilisant, comme unique source de matériel infectieux, la souche sauvage Edmonston, nous avons pu comparer l'infection, par un même agent, de cellules différentes et constaté que le profil de l'infection dépend de la cellule hôte. Pour expliquer cette différence, on peut envisager soit une mutation du virus comme il a été suggéré lors de l'infection humaine (chapitre IV, A, c), soit des propriétés différentes des cellules hôtes. L'hypothèse de la mutation virale lors de l'infection des neurones peut-être écartée puisque le virus récupéré après coculture avec des cellules Vero est identique à celui qui a servi à infecter les neurones. La cellule hôte joue donc un rôle primordial dans le contrôle de la réplication du génome viral et de l'assemblage des composants du virus, ainsi que dans l'établissement de la persistance *in vitro*.

Il convient d'être prudent lorsqu'on établit une comparaison entre les événements qui se déroulent en culture de cellules et ceux qui prévalent chez l'animal ou chez l'homme. Toutefois, certaines similitudes permettent d'émettre des hypothèses quant à la pathogenèse de l'infection des cellules nerveuses *in vivo*. L'accumulation de nucléocapsides dans le cytoplasme, le défaut d'assemblage des composants viraux à la membrane plasmique et l'absence de bourgeonnement viral sont des caractéristiques communes aux neurones de souris infectés *in vitro* et aux cellules nerveuses lors de la PESS (chapitre IV). De même, la récupération d'un virus lytique après coculture avec des cellules permissives pour le virus rougeoleux a été obtenue dans les deux cas. Ces analogies soutiennent l'hypothèse de la responsabilité de la cellule hôte dans la persistance de l'infection *in vivo*.

De nombreux aspects de la pathogénie des infections persistantes du SNC par le virus rougeoleux sont cependant encore obscurs, par exemple : (1) la pénétration du virus dans le SNC, qui pourrait se produire à la suite d'un traumatisme [78] lorsque le virus est présent dans le sang; (2) la propagation du virus d'une cellule à l'autre, peut-être par les contacts intercellulaires et les synapses et comme chez la souris [203] ; (3) la longue période d'incubation du virus et sa progression dans le SNC.

L'effet des anticorps sur l'infection rougeoleuse du SNC est encore inconnu. Le taux des anticorps anti-virus rougeoleux dans le LCR et au niveau des lésions cérébrales chez les patients atteints de PESS est très élevé. Si, comme nous l'avons démontré *in vitro*, les neurones sont incapables d'éliminer les complexes antigène-anticorps de leur membrane (chapitre IV, C, b, 5) le phénomène de modulation anti-génique (chapitre III, A, a) ne peut se produire. Ces cellules restent alors couvertes d'anticorps, ce qui les rend peut-être plus vulnérables à une lyse par le complément ou à une attaque lymphocytaire. On constate une réaction inflammatoire plus importante dans les encéphalites subaiguës que dans les encéphalites aiguës. Il semble donc que le système immunitaire, tant humoral que cellulaire, intervienne plus activement dans les infections rougeoleuses subaiguës du SNC.

On peut se demander si la présence d'anticorps n'est pas, tout du moins en partie, responsable de la forme subaiguë de l'infection après que le virus ait pénétré dans le SNC. Rappelons ici les modèles expérimentaux (chapitre IV, B, c) où une infection subaiguë chronique a été établie chez des animaux possédant déjà une immunité active ou passive contre le virus rougeoleux [26, 187, 4, 149, 150, 151]. Par ailleurs, Rammohan et coll. [150] ont signalé le cas d'un enfant atteint de PESS qui avait bénéficié d'une séroatténuation. Dans ce cas, comme dans les modèles animaux expérimentaux, l'administration précoce d'anticorps lors de l'infection, combinée avec le passage du virus dans le SNC pourrait avoir créé les conditions favorables à l'établissement de la PESS. Le rôle de l'immunité cellulaire est encore très mal compris, mais il n'est pas impossible que son immaturité chez les jeunes enfants favorise l'établissement de l'infection persistante.

Nous ne voulons nullement présenter l'infection persistante de neurones de souris par le virus rougeoleux comme un modèle absolu de la PESS où d'autres encéphalites rougeoleuses. Il existe en effet des différences entre cette infection et les cas cliniques. De plus, les relations entre différents types cellulaires sont beaucoup moins complexes *in vitro*, et la réponse immunitaire y est inexistante. Toutefois, notre modèle, par sa simplification, permet l'analyse d'un composant du processus pathologique et son étude démontre l'importance essentielle de la cellule hôte dans l'avortement de l'infection virale et sa persistance.

APPENDICE

Une grande partie des résultats que nous avons exposés ici a été obtenue grâce à l'usage de techniques que nous avons mises au point ou adaptées de méthodes déjà décrites, ainsi que d'appareillages développés très récemment. Plusieurs de ces techniques nouvelles sont décrites en détail dans la revue que nous avons faite de l'application des méthodes d'observation des surfaces cellulaires en virologie [43]. Quant aux techniques cytologiques, virologiques, immuno-logiques ou morphologiques courantes, elles sont exposées de façon détaillée ou sous forme de références dans nos articles publiés.

Cependant, nous avons cru bon, au terme de ce travail, de donner quelques informations sur certaines techniques spécialisées que nous avons utilisées pour la première fois dans des études virologiques, ainsi que quelques améliorations méthodologiques que nous avons pu apporter.

1) Méthode de titrage du virus rougeoleux.

La méthode classique du titrage du virus rougeoleux en culture de cellules consiste à infecter ces cellules avec une série de dilutions de la suspension de virus, à recouvrir ensuite les cellules d'une couche nutritive

imperméable au virus pour éviter les infections secondaires et à compter les plages c'est-à-dire les trous formés dans la monocouche par la lyse cellulaire 3 à 4 jours plus tard.

Nous avons observé que les cellules géantes qui se forment dans la culture en monocouche adsorbent préférentiellement les globules rouges de singe. L'hémadsorption permet de repérer les cellules géantes dès le 2^e jour d'infection par l'accumulation de globules rouges à leur surface. Nous avons donc établi une nouvelle unité infectieuse pour le virus rougeoleux que nous avons appelée « unité formatrice de syncytium » ou « syncytium-forming unit, » (SFU). Il s'avère que les syncytiums ne sont pas seulement décelables 1 à 2 jours plus tôt que les plages, mais leur dénombrement permet une meilleure évaluation du nombre d'unités infectieuses contenues dans l'inoculum. En effet, nos observations ont montré que plusieurs cellules géantes concourent à la formation d'une plage de lyse. Par conséquent, sauf aux dilutions de la suspension de virus créant des plages très dispersées dans la culture, le nombre de plages de lyse est généralement inférieur au nombre de syncytiums, pour un même échantillon. Le dénombrement des syncytiums peut, en outre, se faire sur des surfaces plus petites, permettant ainsi l'utilisation d'une microméthode pour la mesure du pouvoir infectant du virus rougeoleux. Cette nouvelle méthode présente donc des avantages au point de vue de la rapidité, de l'exactitude et de la miniaturisation du titrage [156].

2) *Microscopie électronique à balayage à haute résolution* [43].

Dans le passé, le microscope électronique à balayage ne suscitait guère d'intérêt en virologie car les limites de son pouvoir de résolution ne permettaient de déceler que des effets cytopathogènes observables au microscope optique. Plusieurs nouveautés technologiques ont permis récemment au microscope électronique à balayage de devenir un outil utile dans l'étude des modifications de la membrane des cellules infectées par des virus enveloppés. Les principales innovations qui méritent d'être mentionnées et que nous avons décrites en détail [43] sont les suivantes : 1) *le canon à électrons en hexaborure de lanthane*, produisant un faisceau électronique plus puissant que celui qu'émettent les filaments de tungstène classiques ; le faisceau étant plus puissant, il peut donc être plus mince et, par conséquent, augmenter remarquablement la résolution du microscope ; 2) *l'émission de champ*, qui arrache les électrons d'un cristal de tungstène ou d'hexaborure de lanthane, dans la direction du spécimen, leur donnant une puissance supérieure à celle qu'ils obtiennent par simple échauffement ; 3) *la détection des électrons secondaires dans un microscope électronique à transmission* équipé d'un système de balayage, combinant ainsi les avantages du microscope à transmission quant à la qualité et la puissance des lentilles magnétiques et les performances du système de vide.

Nous avons appliqué ces techniques nouvelles à des études virologiques. Bien que, dans les meilleures conditions, les systèmes de microscopie à balayage n'égalent pas les techniques de réplique de surface en ce qui concerne la résolution des images, ils offrent cependant maintenant une qualité d'observation qui fait d'eux des outils parfaitement adaptés aux besoins du virologue. De plus, ils présentent l'avantage important de permettre, d'une part, l'observation de grandes surfaces et de localiser ainsi les observations dans les cultures cellulaires par la combinaison de forts et faibles grossissements, et, d'autre part, la préservation de grandes structures tridimensionnelles telles que des globules rouges ou marqueurs de grande taille, qui s'effondrent lors de la réplique de surface.

Il convient de mentionner ici que toutes nos observations faites au microscope électronique à balayage, quel que soit son type, ont été réalisées sur du matériel préalablement séché au point critique [7], technique fournissant des spécimens où les structures tridimensionnelles sont bien préservées.

3) *Répliques de surface*.

Cette technique est bien au point depuis longtemps et apporte des informations très précises quant à l'aspect de la membrane cellulaire et de ses microparticules. Toutefois, certaines améliorations ont été apportées récemment et nous les avons utilisées à quelques reprises. La première concerne la méthode de congélation des échantillons avant réplique. En 1979, Heuser et coll. [73], modifiant une méthode de Van Harreveld et coll. [202], ont mis au point une technique appelée « quick-freezing » ou congélation rapide, capable de congeler une épaisseur de 20 µm de tissu en 2 ms environ. Cette prouesse technique a pour avantage de permettre l'observation de spécimens non fixés, ce qui élimine les artefacts de fixation, de dispenser de l'usage de substances cryoprotectrices, ce qui permet la sublimation de la glace formée et enfin d'interrompre et de figer instantanément les structures biologiques.

La seconde amélioration concerne l'ombrage des spécimens. La technique d'ombrage des répliques de surface consiste habituellement en une projection de carbone, puis de platine, unidirectionnellement sur la préparation.

Cela provoque une accumulation de métal opaque aux électrons dans les zones exposées, créant un effet d'ombre et de lumière lorsque la préparation est examinée au microscope à transmission [43]. L'amélioration consiste à effectuer approximativement la moitié de l'ombrage de la manière classique, puis à opérer une rotation rapide du spécimen pour la seconde moitié. Cela permet de réaliser un éclairage partiel des zones d'ombre afin d'y discerner des détails et de décroître la vigueur du contraste [42, 43].

4) Immunomarquage.

Nous avons souvent fait usage de techniques d'immunomarquage éprouvées, utilisant des anticorps marqués par la fluorescéine, la rhodamine ou la peroxydase. Les anticorps ont été couplés à ces composés directement ou par l'intermédiaire de protéine A de staphylocoque [47]. Nous avons, pour la première fois, utilisé l'immunoperoxydase pour le marquage d'antigènes en microscopie électronique à balayage à haute résolution [156, 43]. Ses propriétés de marqueur en microscopie optique, électronique à transmission ou en répliques de surface et, maintenant, en microscopie à balayage, font de l'immunoperoxydase un outil extrêmement polyvalent et remarquablement commode pour la localisation d'antigènes. De plus, en contrôlant le temps de réaction de la peroxydase et de son substrat, il est possible, dans une certaine mesure, de calibrer la taille des grains de marquage formés et, par conséquent, d'obtenir un marqueur suffisamment grand pour être détecté et suffisamment petit pour ne pas masquer l'ultrastructure des membranes.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monique Dubois-Dalcq qui a participé à la plupart des travaux sur lesquels cette revue est basée.

Je remercie également mes autres collaborateurs : E. Hooghe-Peters, W. C. Wallen, W. J. Bellini, K. W. Rammohan, J. B. Milstein, T. S. Reese et T. E. McFarlin.

J'ai bénéficié de l'aide compétente de A. P. Claysmith, de R. T. Rusten, de B. Reese et de J. Herteler.

J'ai reçu le soutien financier du « Fogarty International Center » et du Fond National de la Recherche Scientifique de Belgique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADAMS, J. M., VAIRD, C. & FILLAY, L., Inclusion bodies in measles encephalitis. *J. Amer. med. Ass.*, 1966, 195, 290-298.
- [2] AHMED, A., STRONG, D. M. & SELL, K. W., Characterization of a specific blocking factor of cellular immunity in the plasma and spinal fluid of patients with SSPE. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 500.
- [3] AHMED, A., STRONG, D. M., SELL, K. W., THURMAN, G. B., KNUDSEN, R. C., WISTAR, R. & GRACE, W., Demonstration of a blocking factor in the plasma and spinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. exp. Med.*, 1974, 139, 902-924.
- [4] ALBRECHT, P., BURNSTEIN, T., KLUTCH, M. J., HICKS, J. T. & ENNIS, F. A., Subacute sclerosing panencephalitis: experimental infection in primates. *Science*, 1977, 195, 64-68.
- [5] ALEXANDER, E. & HENKART, P., The adherence of human Fc receptor-bearing lymphocytes to antigen-antibody complexes. — II. Morphologic alterations induced by the substrate. *J. exp. Med.*, 1976, 143, 329-347.
- [6] ALVORD, E. C., Acute disseminated encephalomyelitis and « allergic » neuroencephalopathies, in « Handbook of clinical Neurology » (P. J. Vin-ker & G. W. Bruyn), 9, (p. 500-571), North-Holland, Amsterdam, 1970.

- [7] ANDERSON, T. F., Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, 13, 130-134.
- [8] BACHI, T., Intramembrane structural differentiation in Sendai virus maturation. *Virology*, 1980, 105, 41-49.
- [9] BARINGER, J. R. & GRIFFITH, J. F., Experimental measles virus encephalitis. A light, phase, and fluorescence microscopic study. *Lab. Invest.*, 1970, 23, 335-346.
- [10] BAUBLIS, J. V. & PAYNE, F. E., Measles antigen and syncytium formation in brain cell cultures from subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1968, 129, 593-597.
- [11] BELLINI, W. J., TRUDGETT, A. & MCFARLIN, D. E., Purification of measles virus with preservation of infectivity and antigenicity. *J. gen. Virol.*, 1979, 43, 633-639.
- [12] BIBERFELD, P., Uropod formation in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, 1971, 66, 433-445.
- [13] BIBERFELD, P., BIBERFELD, G., PERLMANN, P. & HOLM, G., Cytological observations on the cytotoxic interaction between lymphocytes and antibody-coated monolayer cells. *Cell. Immunol.*, 1973, 7, 60-72.
- [14] BLAESE, R. M. & HOFSTRAND, H., Immunocompetence of patients with SSPE. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 494.
- [15] BLAESE, R. M., HOFSTRAND, H., KREBS, H. & SEVER, J. L., Evaluation of transfer factor in the therapy of SSPE. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 502.
- [16] BOUTEILLE, M., FONTAINE, C., VEDRENNE, C. & DELARUE, J., Sur un cas d'encéphalite subaiguë à inclusions. Étude anatomo-clinique et ultra-structurale. *Rev. neurol.*; 1965, 113, 454-458.
- [17] BOYSE, E. A., OLD, L. J. & LUELL, S., Antigenic properties of experimental leukemias. — II. Immunological studies *in vivo* with C57BL/6 radiation-induced leukemias. *J. nat. Cancer Inst.*, 1963, 31, 987-995.
- [18] BOYSE, E. A., STOCKERT, E. & OLD, L. J., Modification of the antigenic structure of the cell membrane by thymus-leukemia (TL) antibody. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1967, 58, 954-957.
- [19] BRATT, M. A. & GALLAHER, W. R., Preliminary analysis of the requirements for fusion from within and fusion from without by Newcastle disease virus. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1969, 64, 536-543.
- [20] BRITTON, S., PERLMANN, H. & PERLMANN, P., Thymus-dependent and thymus-independent effector functions of mouse lymphoid cells. Comparison of cytotoxicity and primary antibody formation *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 1973, 8, 420-434.
- [21] BROWN, G. & GREAVES, M. F., Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Europ. J. Immunol.*, 1974, 4, 302-308.
- [22] BURNET, F. M., Measles as an index of immunological function. *Lancet*, 1968, 2, 610-613.
- [23] BURNSTEIN, T., JENSEN, J. H. & WAKSMAN, B. H., The development of a neurotropic strain of measles virus in hamsters and mice. *J. infect. Dis.*, 1964, 114, 265-272.
- [24] BUSSELL, R. H., WATERS, D. J., SEALS, M. K. & ROBINSON, W. S., Measles, canine distemper and respiratory syncytial virions and nucleocapsids. A comparative study of their structure, polypeptide and nucleic acid composition. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1974, 160, 105-124.
- [25] BYINGTON, D. P. & BURNSTEIN, T., Measles encephalitis produced in suckling rats. *Exp. mol. Pathol.*, 1973, 19, 36-43.
- [26] BYINGTON, D. P. & JOHNSON, K. P., Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) agent in hamsters. — II. The neuropathology of acute and chronic infections. *Exp. mol. Pathol.*, 1973, 18, 345-356.

- [27] BYINGTON, D. P. & JOHNSON, K. P., Subacute sclerosing panencephalitis virus in immunosuppressed adult hamsters. *Lab. Invest.*, 1969, 32, 91-97.
- [28] BYINGTON, D. P., CASTRO, A. E. & BURNSTEIN, T., Adaptation to hamsters of neurotropic measles virus from subacute sclerosing panencephalitis. *Nature (Lond.)*, 1970, 225, 554-555.
- [29] CASCARDO, M. R. & KARZON, D. T., Measles virus giant cell inducing factor (fusion factor). *Virology*, 1965, 26, 311-325.
- [30] CHEN, T. T., WATANABE, I., ZEMAN, W. & MEALEY, J. Jr, Subacute sclerosing panencephalitis: propagation of measles virus from brain biopsy in tissue culture. *Science*, 1969, 163, 1193-1194.
- [31] CONNOLLY, J. H., ALLEN, I., HURWITZ, L. J. & MILLER, J. D., Measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet*, 1967, 1, 542-544.
- [32] DAWSON, J. R., Cellular inclusions in cerebral lesions of lethargic encephalitis. *Amer. J. Path.*, 1933, 9, 7-16.
- [33] DEBRUYN, P. P. H., Locomotion of blood cells in tissue cultures. *Anat. Rec.*, 1944, 89, 43-61.
- [34] DEMSEY, A., KAWKA, D. & STACKPOLE, C. W., Cell surface membrane organization revealed by freeze-drying. *J. Ultrastruct. Res.*, 1978, 62, 13-25.
- [35] DE PETRIS, S., Distribution and mobility of plasma membrane components on lymphocytes, in « Dynamic aspects of cell surface organization » (G. Poste & G. L. Nicholson), 3, (p. 643-728), North Holland, Amsterdam, 1977.
- [36] DICKLER, H. B., Lymphocyte receptors for immunoglobulin. *Advanc. Immunol.*, 1976, 24, 167-214.
- [37] DICKLER, H. B., ADKINSON, N. F. & TERRY, W. D., Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature (Lond.)*, 1974, 247, 213-214.
- [38] Doi, Y., SANPE, T., NAKAJIMA, M., OKAWA, S., KATOI, T., ITOH, H., SATO, T., OGUCHI, K., KUMANISHI, T. & TSUBAKI, T., Properties of a cytopathic agent isolated from a patient with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 1972, 25, 321-333.
- [39] DUBOIS-DALCQ, M., Pathology of measles virus infection of the nervous system: comparison with multiple sclerosis. *Int. Rev. exp. Path.*, 1979, 19, 101-135.
- [40] DUBOIS-DALCQ, M. & BARBOSA, L. H., Immunoperoxidase stain of measles antigen in tissue culture. *J. Virol.*, 1973, 12, 909-918.
- [41] DUBOIS-DALCQ, M. & REESE, T. S., Structural changes in the membrane of Vero cells infected with a Paramyxovirus. *J. Cell Biol.*, 1975, 67, 551-565.
- [42] DUBOIS-DALCQ, M. & RENTIER, B., Improvements in ultrastructural localization of intracellular and membrane components of neurotropic viruses (P. Brederoo & W. de Priester), *Electron Microscopy*, 1980, 2, 480-481.
- [43] DUBOIS-DALCQ, M. & RENTIER, B., Structural studies of the surface of virus-infected cells. *Progr. med. Virol.*, 1980, 26, 158-213.
- [44] DUBOIS-DALCQ, M., BARBOSA, L. H., HAMILTON, R. & SEVER, J. L., Comparison between productive and latent subacute sclerosing panencephalitis viral infection *in vitro*. An electron microscopic and immunoperoxidase study. *Lab. Invest.*, 1974, 30, 241-250.
- [45] DUBOIS-DALCQ, M., WORTHINGTON, K., GUTENSON, O. & BARBOSA, L. H., Immunoperoxidase labeling of subacute sclerosing panencephalitis virus in hamster acute encephalitis. *Lab. Invest.*, 1975, 32, 518-526.

- [46] DUBOIS-DALCQ, M., REESE, T. S., MURPHY, M. & FUCILLO, D., Defective bud formation in human cells chronically infected with subacute sclerosing panencephalitis virus. *J. Virol*, 1976, 19, 579-593.
- [47] DUBOIS-DALCQ, M., MCFARLAND, H. & MCFARLIN, D., Protein A-per-oxidase: a valuable tool for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, 25, 1201-1206.
- [48] EDIDIN, M. & WEISS, A., Antigen cap formation in cultured fibroblasts: a reflection of membrane fluidity and of cell motility. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1972, 69, 2456-2459.
- [49] EHRNST, A., WEINER, L. & NORRBY, E., Fluctuations and distribution measles virus antigens in chronically infected cells. *Nature (Lond.)*, 1974, 248, 691-693.
- [50] ENDERS, J. F. & PEEBLES, T. C., Propagation in tissue cultures of cyto-pathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. exp. Biol (N. Y.)*, 1954, 86, 277-286.
- [51] FAULKNER, G., DUBOIS-DALCQ, M., HOOGHE-PETERS, E. L., MCFARLAND, H. F. & LAZZAHINI, R. A., Defective interfering particles modulate VSV infection of dissociated neuron cultures. *Cell*, 1979, 17, 979-991.
- [52] FENGER, T. W. & HOWE, C, Isolation and characterization of erythrocyte receptor for measles virus. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1979, 162 299-303.
- [53] FERRARINI, M., MORETTA, L., ABRILE, R. & DURANTE, M. L., Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells. *Europ. J. Immunol*, 1975, 5, 70-72.
- [54] FRASER, K. B. & MARTIN, S. J., Measles virus and its biology. Academic Press, New York, 1978, 249 pages.
- [55] FUJINAMI, R. S. & OLDSTONE, M. B. A., Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature (Lond.)*, 1979, 279, 529-530.
- [56] GERSON, K. L. & HASLAM, R. H. A., Subtle immunologic abnormalities in four boys with subacute sclerosing panencephalitis. *New Engl. J. Med.*, 1971, 285, 78-82.
- [57] GIBBS, F. A., GIBBS, E. L., CARPENTER, P. R. & SERIES, H. W., Electroencephalographic abnormality in « uncomplicated » childhood diseases. *J. Amer. med. Ass.*, 1959, 171, 1050-1055.
- [58] GIBSON, P. E. & BELL, T. M., Persistent infection of measles virus in mouse brain cell cultures infected *in vivo*. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1972, 37, 45-53.
- [59] GILDEN, D. H., RORKE, L. B. & TANAKA, R., Acute SSPE. *Arch. Neurol*, 1975, 32, 644-646.
- [60] GRAVES, M. C, SILVER, S. M. & CHOPPIN, P. W., Measles virus polypeptide synthesis in infected cells. *Virology*, 1978, 86, 254-263.
- [61] GRIFFIN, D. E., MULLINIX, J., NAHAYAN, A. & JOHNSON, R. T., Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles in mice. *Infect. Immun.*, 1974, 9, 690-695.
- [62] HALL, W. W. & MARTIN, S. J., Purification and characterization of measles virus. *J. gen. Virol*, 1973, 19, 175-188.
- [63] HALL, W. W., KIESSLING, W. & ter MEULEN, V., Membrane proteins of subacute sclerosing panencephalitis and measles viruses. *Nature (Lond.)*, 1978, 272, 460-462.
- [64] HALL, W. W., LAMB, R. A. & CHOPPIN, P. W., Measles and subacute sclerosing panencephalitis virus proteins: lack of antibodies to the M protein in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1979, 76, 2047-2051.
- [65] HALL, W. W., MARTIN, S. J. & GOULD, E., Defective interfering particles produced during the replication of measles virus. *Med. Microbiol. Immunol*, 1974, 160, 155-164.

- [66] HANNINEN, P., ARSTILA, P., LANG, H., SALMI, A. & PANELIUS, M., Involvement of the central nervous system in acute uncomplicated measles virus infection. *J. clin. Microbiol*, 1980, 11, 610-613.
- [67] HARADA, M., PEARSON, G., PETTIGREW, H., REDMON, L. & ORR, T., Enhancement of normal lymphocyte cytotoxicity by sera with high antibody titers against H2 or virus-associated antigens. *Cancer Res.*, 1973, 33, 2886-2893.
- [68] HARADA, M., PEARSON, G., REDMON, L., WINTERS, E. & KASUGA, S., Antibody production and interaction with lymphoid cells in relation to tumor immunity in the Moloney sarcoma virus system. *J. Immunol*, 1975, 114, 1318-1322.
- [69] HARDWICK, J. M. & BUSSELL, R. H., Glycoproteins of measles virus under reducing and non-reducing conditions. *J. Virol*, 1978, 25, 687-692.
- [70] HARFAST, B., ANDERSSON, T., STEJSKAL, V. & PERLMANN, P., Interactions between human lymphocytes and paramyxovirus-infected cells: adsorption and cytotoxicity. *J. Immunol*, 1977, 118, 1132-1137.
- [71] HAYWOOD, A. M., Model membranes and Sendai virus: surface-surface interactions, in « Negative strand viruses » (B. W. J. Mahy & R. D. Barry), (p. 923-928), Academic Press, New York, 1975.
- [72] HERNDON, R. M., RENA-DESCALZI, L., GRIFFIN, D. E. & COYLE, P. K., Age dependence of viral expression: electron microscopic and immuno-peroxidase studies of measles virus replication in mice. *Lab. Invest.*, 1975, 33, 544-553.
- [73] HEUSER, J. W., REESE, T. S., DENNIS, M. J., YAK, Y., YAK, L. & EVANS, L., Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol*, 1979, 81, 275-300.
- [74] HOLMES, K. V. & CHOPPIN, P. W., On the role of the response of the cell membrane in determining virus virulence: contrasting effects of the paramyxovirus SV5 in two cell types. *J. exp. Med.*, 1966, 124, 501-520.
- [75] HOOGHE-PETERS, E. L., RENTIER, B. & DUBOIS-DALCQ, M., Electron microscopic study of measles virus infection. Unusual antibody-triggered antigen redistribution on giant cells. *J. Virol*, 1979, 29, 666-676.
- [76] HORTA-BARBOSA, L., FUCCILLO, D. A., SEVER, J. L. & ZEMAN, W., Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of measles virus from a brain biopsy. *Nature* (Lond.), 1969, 221, 974.
- [77] HORTA-BARBOSA, L., HAMILTON, R., WITTIG, B., FUCCILLO, D. A. & SEVER, J. L., Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of suppressed measles virus from lymph node biopsies. *Science*, 1971, 173, 840-841.
- [78] HOUFF, S. A., MADDEN, D. L. & SEVER, J. L., Subacute sclerosing panencephalitis in only one of identical twins. A seven year follow-up. *Arch. Neurol*, 1979, 36, 854-856.
- [79] HUANG, A. S. & BALTIMORE, D., Defective interfering particles and viral disease processes. *Nature* (Lond.), 1970, 226, 325-327.
- [80] IWASAKI, Y. & KOPROWSKI, H., Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. — I. Subacute sclerosing panencephalitis. *Lab. Invest.*, 1974, 31, 187-196.
- [81] JABBOUR, J. T., ROANE, J. A. & SEVER, J. L., Studies in delayed dermal hypersensitivity in patients with SSPE. *Neurology*, 1969, 19, 929-931.
- [82] JABBOUR, J. T., DUENAS, D. A., SEVER, J. L., KREBS, H. M. & HORTA-BARBOSA, L., Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). A report of the SSPE registry. *J. Amer. med. Ass.*, 1972, 220, 959-962.
- [83] JENIS, E. H., KNIESER, M. R., ROTHOUSE, P. A., JENSEN, G. E. & SCOTT, R. M., Subacute sclerosing panencephalitis. Immuno-ultra-structural localization of measles-virus antigen. *Arch. Path.*, 1973, 95, 81-89.

- [84] JOHNSON, K. P. & BYINGTON, D. P., Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) agent in hamsters. — I. Acute giant cell encephalitis in newborn animals. *Exp. mol Path.*, 1971, 15, 373-379.
- [85] JOHNSON, K. P., FELDMAN, E. G. & BYINGTON, D. P., Effect of neonatal thymectomy on experimental subacute sclerosing panencephalitis in adult hamsters. *Infect. Immun.*, 1975, 12, 1464-1469.
- [86] JOSEPH, B. S. & OLDSTONE, M. B. A., Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J. Immunol.*, 1974, 113, 1205-1209.
- [87] JOSEPH, B. S. & OLDSTONE, M. B. A., Immunologic injury in measles virus infection. — II. Suppression of immune injury through antigenic modulation. *J. exp. Med.*, 1975, 142, 864-876.
- [88] KACKELL, Y. M., GROB, P. J., KRETII, W. H., KILBER, R. K. & ter MEULEN, V., Transfer factor therapy in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Z. Neurol.*, 1975, 211, 39.
- [89] KATZ, M., RORKE, L. B., MASLAND, W. S., BARBANTI-BRODANO, G. & KOPROWSKI, H., Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of a virus encephalitogenic for ferrets. *J. infect. Dis.*, 1970, 121, 188-195.
- [90] KATZ, S. L., Measles, in « Pediatrics » (H. L. Barnett & A. H. Einhorn), (15^e edit.), (p. 729-737), Appleton-Century-Crofts, New York, 1972.
- [91] KLAJMAN, A., STERNBACH, M., RANNON, L., DRUCKER, M., GEMINDER, D. & SADAN, N., Impaired delayed hypersensitivity in subacute sclerosing panencephalitis. *Acta pediat. scand.*, 1973, 62, 523-526.
- [92] KNIGHT, P., DUFF, R. & RAPP, F., Latency of human measles virus in hamster cells. *J. Virol.*, 1972, 10, 995-1001.
- [93] KOPROWSKI, H., BARBANTI-BRODANO, G. & KATZ, M., Interaction between papova-like virus and paramyxovirus in human brain cells: a hypothesis. *Nature (Lond.)*, 1970, 225, 1045-1047.
- [94] KRETII, W. H., KACKELL, M. Y. & ter MEULEN, V., Demonstration of *in vivo* lymphocyte-mediated cytotoxicity against measles virus in SSPE. *J. Immunol.*, 1975, 114, 1042-1046.
- [95] KUMON, H., UNO, F., SABURI, Y. & TAWARA, J., A morphologically recognizable marker for scanning electron microscopy. — IV. Antibody-induced redistribution of influenza virus antigens on the cell surface. *J. electr. Micr.*, 1978, 27, 215-222.
- [96] LAMB, R. A., MAHY, W. I. & CHOPPIN, P. W., The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology*, 1976, 69, 116-131.
- [97] LAMPERT, P., JOSEPH, B. S. & OLDSTONE, M. B. A., Antibody-induced capping of measles virus antigens on plasma membrane studied by electron microscopy. *J. Virol.*, 1975, 15, 1248-1255.
- [98] LANDRIGAN, P. J. & WITTE, J. J., Neurologic disorders following live measles virus vaccination. *J. Amer. med. Ass.*, 1973, 223, 1459-1462.
- [99] LEHRICH, J. R., KATZ, M., RORKE, L. B., BARBANTI-BRODANO, G. & KOPROWSKI, H., Subacute sclerosing panencephalitis. Encephalitis in hamsters produced by viral agents isolated from human brain cells. *Arch. Neurol.*, 1970, 23, 97-102.
- [100] LENNETTE, E. H., Cellular immunity and SSPE. Summary of a conference, National Institutes of Health, Bethesda (Md.). *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 488-504.
- [101] LEWIS, W. H. & WEBSTER, L. T., Migration of lymphocytes in plasma cultures of human lymph nodes. *J. exp. Med.*, 1921, 33, 261.
- [102] LISCHNER, H. W., SHARMA, M. K. & GROOVER, W. D., Immunologic abnormalities in subacute sclerosing panencephalitis. *New Engl. J. Med.*, 1972, 286, 786.

- [103] LIVNI, E. KOTT, E., DANON, Y., KURITZKY, A. & JOSHUA, H., Cell-mediated immunity in subacute sclerosing panencephalitis. *Israel J. med. Sci.*, 1976, 12, 1183-1188.
- [104] LOOR, F., Structure and dynamics of the lymphocyte surface in relation to differentiation, recognition and activation. *Progr. Allergy*, 1977, 23, 1-153.
- [105] MCFARLAND, W. & SCHECHTER, G. P., The lymphocyte in immunological reactions *in vitro*: ultrastructural studies. *Blood*, 1970, 35, 683-688.
- [106] MCFARLIN, D. E., BELLINI, W. J., MINGIOLI, E. S., BEHAR, T. N. & TRUD-GETT, A., Monospecific antibody to the haemagglutinin of measles virus. *J. gen. Virol*, 1980, 48, 425-429.
- [107] MCSHARRY, J. J., COMPANS, R. W., LACKLAND, H. & CHOPPIN, P. W., Isolation and characterization of nonglycosylated membrane protein and a nucleocapsid complex from the paramyxovirus SV5. *Virology*, 1975, 78, 463-474.
- [108] MELNICK, J. L., Taxonomy of viruses. *Prog. med. Virol*, 1980, 26, 214-232.
- [109] MENNA, J. H., COLLINS, A. R. & FLANAGAN, T. D., Characterization of an *in vitro* persistent-state measles virus infection: establishment and viro-logical characterization of the BGM/MV cell line. *Infect. Immun.*, 1975, 11, 152-158.
- [110] MINAGAWA, T., Studies on the persistent infection with measles virus in HeLa cells. — I. Clonal analysis of cells of carrier cultures. *Jap. J. Microbiol.*, 1971, 15, 325-331.
- [111] MIZUTANI, H., GERSON, K. L. & HASLAM, R. H. A., Skin-test reactions in patients with SSPE. *New Engl J. Med.*, 1972, 286, 48.
- [112] MODLIN, J. F., JABBOUR, J. T., WITTE, J. J. & HALSEY, N. A., Epidemiologic studies of measles, measles vaccine and subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatrics*, 1977, 59, 505-512.
- [113] MORGAN, E. M. & RAPP, F., Measles virus and its associated diseases. *Bact. Rev.*, 1977, 41, 636-666.
- [114] MOULIAS, R. L., REINERT, P. & GOUST, J. M., Immunologic abnormalities in subacute sclerosing panencephalitis. *New Engl. J. Med.*, 1971, 285, 1090.
- [115] MOUNTCASTLE, W. E. & CHOPPIN, P. W., A comparison of the polypeptides of four measles virus strains. *Virology*, 1977, 78, 463-474.
- [116] MÜLLER, D., ter MEULEN, V., KATZ, M. & KOPROWSKI, H., Cytochemical evidence for the presence of two viral agents in subacute sclerosing panencephalitis. *Lab. Invest.*, 1971, 25, 337-342.
- [117] NELSON, D. L., BUNDY, B. M., WEST, T. D. & STROBER, W., The nature of the effector cells mediating mitogen-induced cellular cytotoxicity (MICC) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Cell. Immunol.*, 1976, 23, 89-98.
- [118] NELSON, P. G., Central nervous system synapses in culture. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1976, 40, 359-371.
- [119] NEVALAINEN, T. J., RIEKKINEN, P. J., RINNE, U. K., FREY, H. J. & ARSTILA, A. U., Electron microscopic and neurochemical studies on demyelination in subacute sclerosing panencephalitis. *Europ. J. Neurol.*, 1972, 7, 297-312.
- [120] NORRBY, E., A carrier cell line of measles virus in Lu-106. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1967, 20, 215-224.
- [121] OJALA, A., On changes in the cerebrospinal fluid during measles. *Ann. Med. int. Fenn.*, 1947, 36, 321-325.
- [122] OLD, L. J., STOCKERT, E., BOYSE, E. A. & KIM, J. H., Antigenic modulation. Loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon *in vitro*. *J. exp. Med.*, 1968, 127, 523-529.

- [123] OLDSTONE, M. B. A. & TISHON, A., Immunologic injury in measles virus infection. — IV. Antigenic modulation and abrogation of lymphocyte lysis of virus-infected cells. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 1978, 9, 55-62.
- [124] OLDSTONE, M. B. A., WELSH, R. M. & JOSEPH, B. S., Pathogenic mechanisms of tissue injury in persistent viral infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 256, 65-72.
- [125] OLDSTONE, M. B. A., FUJINAMI, R. S. & LAMPERT, P. W., Membrane and cytoplasmic changes in virus-infected cells induced by interactions of antiviral antibody with surface viral antigen. *Progr. med. Virol*, 1980, 26, 45-93.
- [126] PABST, H. F. & CUMMING, J. D. A., Simultaneous immunotherapy of two acute cases of SSPE. *Arch. Neurol*, 1975, 32, 503.
- [127] PATERSON, P. Y., The demyelinating diseases: clinical and experimental correlates, in « Immunological diseases », II, (2^e edit.) (M. Samter), (p. 1269-1299), Little, Brown & Co., Boston, 1971.
- [128] PAYNE, F. E. & BAUBLIS, J. V., Decreased reactivity of SSPE strains of measles virus with antibody. *J. infect. Dis.*, 1973, 127, 505-511.
- [129] PEACOCK, J. H., NELSON, P. G. & GOLDSTONE, M. W., Electrophysiologic study of cultured neurons dissociated from spinal cords and dorsal root ganglia of fetal mice. *Develop. Biol*, 1973, 30, 137-152.
- [130] PÉRIER, O., VANDERHAEGEN, J. J. & PELC, S., Subacute sclerosing leuco-encephalitis. *Acta neuropath.*, 1967, 8, 362-380.
- [131] PERIES, J. R. & CIANY, C., Activité hémagglutinante du virus morbillieux. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, 251, 280-281.
- [132] PEHLMANN, P. & HOLM, G., Cytotoxic effect of lymphoid cells. *Advanc. Immunol*, 1969, 11, 117-181.
- [133] PERLMANN, P., PERLMANN, H. & WIGZELL, H., Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *In vitro* induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. *Transplant. Rev.*, 1972, 13, 91-114.
- [134] PERRIN, L. H. & OLDSTONE, M. B. A., The formation and fate of virus antigen-antibody complexes. *J. Immunol*, 1977, 118, 316-322.
- [135] PETTE, H. & DÖRING, G., Ueber eine einheimische Panencephalomyelitis vom Charakter der Encephalitis japonica. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1939, 149, 7-44.
- [136] PHILLIPS, E. R. & PERDUE, J. F., The dynamics of antibody induced redistribution of viral envelope antigens in the plasma membranes of avian tumor virus-infected chick embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 1976, 20, 459-477.
- [137] POSTE, G., Mechanisms of virus-induced cell fusion. *Int. Rev. Cytol.*, 1972, 33, 187-252.
- [138] POSTE, G. & WATERSON, A. P., Cell fusion by Newcastle disease virus, in « Negative strand viruses » (B. W. J. Mahy & R. D. Barry), 2, (p. 905-922), Academic Press, New York, 1975.
- [139] PROSS, H. F. & BAINES, M. G., Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1977, 3, 75-85.
- [140] PURDHAM, D. R. & BATTY, P. F., A case of acute measles meningoencephalitis with virus isolation. *J. clin. Path.*, 1974, 27, 994-996.
- [141] RABINOVITCH, M. & DESTEPHANO, M. J., Macrophage spreading *in vitro*. — III. The effect of metabolic inhibitors, anesthetics and other drugs on spreading induced by subtilisin. *Exp. Cell Res.*, 1974, 88, 153-162.
- [142] RAINE, C. S., FELDMAN, L. A., SHEPPARD, R. D. & BORNSTEIN, M. B., Ultrastructure of measles virus in cultures of hamster cerebellum. *J. Virol*, 1969, 4, 169-181.

- [143] RAINE, C. S., FELDMAN, L. A., SHEPPARD, R. D. & BORNSTEIN, M. B., Ultrastructural study of long-term measles infection in cultures of hamster dorsal root ganglion. *J. Virol*, 1971, 8, 318-329.
- [144] RAINE, C. S., FELDMAN, L. A., SHEPPARD, R. D. & BORNSTEIN, M. B., Subacute sclerosing panencephalitis virus in cultures of organized nervous tissue. *Lab. Invest.*, 1973, 28, 627-640.
- [145] RAINE, C. S., BYINGTON, D. P., JOHNSON, K. P., Experimental subacute sclerosing panencephalitis in the hamster. Ultrastructure of the chronic disease. *Lab. Invest.*, 1974, 31, 355-368.
- [146] RAINE, C. S., FELDMAN, L. A., SHEPPARD, R. D., BARBOSA, L. H. & BORNSTEIN, M. B., SSPE virus. Observation on a neuroadapted and non-neuroadapted strain in organotypic central nervous system cultures. *Lab. Invest.*, 1974, 31, 42-53.
- [147] RAINE, C. S., BYINGTON, D. P. & JOHNSON, K. P., Subacute sclerosing panencephalitis in the hamster. Ultrastructure of the acute disease in newborns and weanlings. *Lab. Invest.*, 1975, 33, 108-116.
- [148] RAMMOHAN, K. W., MCFARLIN, D. E. & MCFARLAND, H. F., Chronic measles encephalitis in mice. *J. infect. Dis.*, 1980, 142, 608-613.
- [149] RAMMOHAN, K. W., GHEUENS, J., BELLINI, W. J., MCFARLAND, H. F. & MCFARLIN, D. E., Diversity in the *in vivo* effects of monoclonal antibodies to the measles virus hemagglutinin. *Fed. Proc.*, 1981 (Abstract).
- [150] RAMMOHAN, K. W., MCFARLAND, H. F. & MCFARLIN, D. E., Induction of subacute murine measles encephalitis by monoclonal antibody to virus hemagglutinin. *Nature* (Lond.), 1981 (sous presse).
- [151] RAMMOHAN, K. W., MCFARLAND, H. F. & MCFARLIN, D. E., Subacute murine encephalitis: the role of antibody in measles virus persistence *in vivo*. 33^e Meeting Annuel de l'Académie Américaine de Neurologie, Toronto, Canada, 1981 (Abstract).
- [152] RANSOM, B. R., NEALE, E., HENKART, M., BULLOCK, P. N. & NELSON, P. G., Mouse spinal cord in cell culture. — I. Morphology and intrinsic neuronal electrophysiological properties. *J. Neurophysiol*, 1977, 40, 1132-1150.
- [153] RENTIER, B. & DUBOIS-DALCQ, M., Structural basis of hemadsorbing sites during the formation of syncytia in measles-infected cells. *J. Cell Biol*, 1977, 75, 396.
- [154] RENTIER, B. & WALLEN, W. C., Structural study of interaction between K cells and measles virus-infected cells. 79^e Meeting Annuel de la Société Américaine de Microbiologie, Honolulu, Hawaii, 1979, Abstr. E(H)10, p. 79.
- [155] RENTIER, B. & WALLEN, W. C., Scanning and transmission electron microscopy study of antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity on measles virus-infected cells. *Infect. Immun.*, 1980, 30, 303-315.
- [156] RENTIER, B., HOOGHE-PETERS, E. L. & DUBOIS-DALCQ, M., Electron microscopic study of measles virus infection. Cell fusion and hemadsorption. *J. Virol*, 1978, 28, 567-577.
- [157] RENTIER, B., WALLEN, W. C. & DUBOIS-DALCQ, M., S. E. M. study of cell surface interactions in measles infection. 4^e Congrès international de Virologie, La Haye, 1978, Abstr., 24, p. 351.
- [158] RENTIER, B., CLAYSMITH, A. P., DUBOIS-DALCQ, M. & BELLINI, W. J., Selective and persistent measles virus infection of mouse neurons *in vitro*. 56th Meeting Annuel de l'Association Américaine des Neuro-pathologistes, New Orleans, 1980, Abstr., 147, p. 386.
- [159] RENTIER, B., CLAYSMITH, A. P., BELLINI, W. J. & DUBOIS-DALCQ, M., Chronic measles virus infection of mouse nerve cells *in vitro*, in « Replication of negative strand viruses » (D. H. L. Bishop & R.W. Company), Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1981 (sous presse).
- [160] RENTIER, B., RAMMOHAN, K. W., BELLINI, W. J. & MCFARLIN, D. E., Immunocytochemical study of measles-infected neurons with monoclonal antibodies against virus hemagglutinin. 5^e Congrès international de Virologie, Strasbourg, 1981, Abstr.

- [161] ROSEN, L., Hemagglutination and hemagglutination inhibition with measles virus. *Virology*, 1961, 13, 139-141.
- [162] ROSENSTREICH, D. L., SHEVACH, E., GREEN, I. & ROSENTHAL, A. S., The uropod-bearing lymphocyte of the guinea-pig. Evidence for thymic origin. *J. exp. Med.*, 1974, 135, 1037-1048.
- [163] ROZENBLATT, S., GORECKI, M., SHURE, H. & PRIVES, C. L., Characterization of measles virus-specific proteins synthesized *in vivo* and *in vitro* from acutely and persistently infected cells. *J. Virol.*, 1979, 29, 1099-1106.
- [164] RUSTIGIAN, R., Persistent infection of cells in culture by measles virus. — I. Development and characteristics of HeLa sublines persistently infected with complete virus. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 1792-1804.
- [165] RUTTER, G. & MANNWEILER, K., Antibody-induced redistribution of virus antigens on the surface of influenza virus-infected cells. *J. gen. Virol.*, 1976, 33, 321-332.
- [166] SCHEID, A. & CHOPPIN, P. W., Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology*, 1974, 57, 475-490.
- [167] SCHLUEDERBERG, A., CHAVANICIL, S., LIPMAN, M. B. & CARTER, C., Comparative molecular weight estimates of measles and subacute sclerosing panencephalitis virus structural polypeptides by simultaneous electrophoresis in acrylamide gel slabs. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1974, 58, 647-651.
- [168] SCHNEIDER, Y.-J., TULKENS, P., de DUVE, C. & TROUET, A., Fate of plasma membrane during endocytosis. — I. Uptake and processing of anti-plasma membrane and control immunoglobulins by cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 1979, 82, 449-465.
- [169] SCHREINER, G. F. & UNANUE, E. R., Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced by liquid-surface immunoglobulin interaction. *Advanc. Immunol.*, 1976, 24, 37-165.
- [170] SCHUMACHER, H. P., ALBRECHT, P. & TAURASO, N. M., The effect of altered immune reactivity on experimental measles encephalitis in rats. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1972, 37, 218-229.
- [171] SCORNIK, J. C., Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. — II. Early interactions between effector and target cells. *J. Immunol.*, 1974, 113, 1519-1526.
- [172] SCORNIK, J. C., COSENZA, H., LEE, W., KÖHLER, H. & ROWLEY, A., Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity. — I. Differentiation from antibody-independent cytotoxicity by « normal » IgG. *J. Immunol.*, 1974, 113, 1510-1518.
- [173] SELL, K. W. & AHMED, A., Humoral and cellular immune responses in patients with SPPE. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 495.
- [174] SELL, K. W., THURMAN, G. B. & AHMED, A., Plasma and spinal fluid blocking factor in SSPE. *New Engl. J. Med.*, 1973, 288, 215-220.
- [175] SHARMA, M. K., GKOVER, W. D., HUFF, D. S., BAIRD, W. & LISCHNER, H. W., Studies of immunologic competence in SSPE. *Clin. Res.*, 1971, 19, 730.
- [176] SHEPPARD, R. D., RAINE, C. S., BURNSTEIN, T., BORNSTEIN, M. B. & FIILDMAN, L. A., Cell-associated subacute sclerosing panencephalitis agent studied in organotypic central nervous system cultures: viral rescue attempts and morphology. *Infect. Immun.*, 1975, 12, 891-900.
- [177] SHIMIZU, K. & ISHIDA N., The smallest protein of Sendai virus: its candidate function of binding nucleocapsid to envelope. *Virology*, 1975, 67, 427-437.
- [178] STEELE, R. W., FUCCILLO, D. A., HENSEN, S. A., VINCENT, M. M. & BEL-LANTI, J. A., Specific inhibitory factors of cellular immunity in children with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Pediat.*, 1976, 88, 56-62.

- [179] STEINMAN, R. M., BRODIE, S. E. & COHN, Z. A., Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J. Cell Biol.*, 1976, 68, 665-687.
- [180] STOUT, R. D. & HERZENBERG, L. A., The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. — I. Detection of a subpopulation of murine T-lymphocytes bearing the Fc receptor. *J. exp. Med.*, 1975, 142, 611-621.
- [181] SWICK, H. M., BROOKS, W. H., ROSZMAN, T. L. & CALDWELL, D., A heat stable blocking factor in the plasma of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology*, 1976, 26, 84-88.
- [182] TELLEZ-NAGEL, I. & HARTER, D. H., Subacute sclerosing leukoencephalitis: ultrastructure of intranuclear and intracytoplasmic inclusions. *Science*, 1966, 154, 899-901. [183] ter MEULEN, V. & HALL, W. W., Slow virus infections of the nervous system: virological, immunological and pathogenetic considerations. *j. gen. Virol*, 1978, 41, 1-25.
- [184] ter MEULEN, V., ENDERS-RUCKLE, G., MÜLLER, D. & JOPPICH, G., Immuno-histological microscopical and neurochemical studies on encephalitides. — III. Subacute progressive panencephalitis. Virological and immunohistological studies. *Acta neuropath.*, 1969, 12, 244-259.
- [185] ter MEULEN, V., KACKELL, Y., MÜLLER, D., KATZ, M. & MYERMANN, R., Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis. *Lancet*, 1972, 2, 1172-1175.
- [186] ter MEULEN, V., KATZ, M., KACKELL, Y.-M., BARBANTI-BRODANO, G., KOPROWSKI, H. & LENNETTE, E. H., Subacute sclerosing panencephalitis: *in vitro* characterization of viruses isolated from brain cells in culture. *J. infect. Dis.*, 1972, 126, 11-17.
- [187] THORMAR, H., ARNESEN, K. & MEHTA, P. D., Encephalitis in ferrets caused by a non-productive strain of measles virus (D. R.) isolated from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. *J. infect. Dis.*, 1977, 136, 229-238.
- [188] TOGA, M., DUBOIS, D., BERNARD, M., TRIFIER, M. F., CESARINI, J. P. & CHOUX, R., Étude ultrastructurale de quatre cas de leuco-encéphalite sclérosante subaiguë. *Acta neuropath.*, 1969, 14, 1-13.
- [189] TOGA, M., PELLISSIER, J. F., BERARD, M. & HASSOUN, J., Un nouveau cas de leuco-encéphalite sclérosante subaiguë. Étude ultrastructurale. *Arch. Anal. path.*, 1972, 20, 33-40.
- [190] TRUDGETT, A., BELLINI, W. J., MINGIOLI, E. S. & MCFARLIN, D. E., Antibodies to the structural polypeptides of measles virus following acute infection and in SSPE. *Clin. exp. Immunol*, 1980, 39, 652-656.
- [191] TYRRELL, D. L. J. & NORRBY, E., Structural polypeptides of measles virus. *J. gen. Virol*, 1978, 39, 219-229.
- [192] TYRRELL, D. L. J. & EHRNST, A., Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *J. Cell Biol*, 1979, 81, 396-402.
- [193] TYRRELL, D. I. J., RAFTER, D. J., ORVELL, C. & NORRBY, E., Isolation and immunological characterization of the nucleocapsid and membrane proteins of measles virus. *J. gen. Virol*, 1980, 51, 307-315.
- [194] UEDA, S., OKUNO, Y., OKUNO, Y., HAMAMOTO, Y. & OHYA, H., Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): isolation of a defective variant of measles virus from brain biopsy obtained at autopsy. *Biken J.*, 1975, 18, 113-122.
- [195] UNANUE, E., AULT, K. A. & KARNOVSKY, M. J., Ligand-induced movement of lymphocyte surface macromolecules. — IV. Stimulation of cell mobility by anti-IgG and lack of relationship to capping. *J. exp. Med.*, 1974, 139, 295-312.
- [196] VALDIMARSSON, H., AGNARSDOTTIR, G. & LACHMANN, J., The treatment of SSPE with transfer factor. *Arch. Neurol*, 1975, 32, 503.
- [197] van BOGAERT, L., Une leuco-encéphalite sclérosante subaiguë. *J. neurol neurosurg. Psychiat.*, 1945, 8, 101-120.

- [198] van BOXEL, J. A. & ROSENSTREICH, D. L., Binding of aggregated gammaglobulin to activated T-lymphocytes in the guinea-pig. *J. exp. Med.*, 1974, 139, 295-312.
- [199] van BOXEL, J. A., STOBO, J. D., PAUL, W. E. & GREEN, I., Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: no requirement for thymus-derived lymphocytes. *Science*, 1972, 715, 194-196.
- [200] VANDVIK, B. & NORHBY, E., Oligoclonal IgG antibody response in the central nervous system to different measles virus antigens in subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1973, 70, 1060-1063.
- [201] VANDVIK, B., NORHBY, E., NORDAL, H. J. & DEGRE, M., Oligoclonal measles virus-specific IgG antibodies isolated from cerebrospinal fluids, brain extracts, and sera from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.*, 1976, 5, 979-993.
- [202] van HARREVELD, A., TRUBATCH, J. & STEINER, J., Rapid freezing and electron microscopy for the arrest of physiological processes. *J. Micr. (Oxford)*, 1974, 100, 189-198.
- [203] van POTTELSBERGHE, C., RAMMOHAN, K. W., MCFARLAND, H. F. & DUBOIS-DALCQ, M., Selective neuronal, dendritic and postsynaptic localization of viral antigen in measles-infected mice. *Lab. Invest.*, 1979, 40, 99-108.
- [204] VARSANO, I., DANON, Y., JABER, L., LIVNI, E., SOHAT, B., YAKIR, Y., SHNEYOUR, A. & TRAININ, N., Reconstitution of T-cell function in patients with subacute sclerosing panencephalitis treated with thymus humoral factor. *Israel J. med. Sci.*, 1976, 12, 1168-1175.
- [205] WALLEN, W. C., RENTIER, B. & TRAUB, R. G., Participation in antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity of Fc bearing T-lymphocytes. 79^e Meeting Annual de la Société Américaine de Microbiologie, Los Angeles, 1979, Abstr. E91, p. 69.
- [206] WANG, E., WOLF, B. A., LAMB, R. A., CHOPPIN, P. W. & GOLDBERG, A. R., The presence of actin in enveloped viruses. Cold Spring Harbor Conference on Cell Motility. *Cold Spr. Harb. Lab.*, 1976, 3, 589-590.
- [207] WATERS, D. T. & BUSSELL, R. H., Polypeptide composition of measles and canine distemper viruses. *Virology*, 1973, 55, 554-557.
- [208] WEAR, D. J. & RAPP, P., Latent measles virus infection of the hamster central nervous system. *J. Immunol*, 1971, 107, 1593-1598.
- [209] WECHSLER, S. L. & FIELDS, B. N., Differences between the intracellular polypeptides of measles and subacute sclerosing panencephalitis virus. *Nature (Lond.)*, 1978, 272, 458-460.
- [210] WECHSLER, S. L. & FIELDS, B. N., Intracellular synthesis of measles virus-specified polypeptides. *J. Virol*, 1978, 25, 285-297.
- [211] YAMAMOTO, T. & KOPROWSKI, H., A study on the influence of Papova-virus upon encephalitis caused by SSPE agent. *Acta neuropath.*, 1975, 31, 159-169.
- [212] YOSHIDA, T. O. & ANDERSON, B., Evidence for a receptor recognizing antigen-complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes. *Scand. J. Immunol*, 1972, 1, 401-408.
- [213] YUST, I., WUNDERLICH, J., MANN, D. L. & BUEL, D. M., Cytotoxicity mediated by human lymphocyte-dependent antibody in a rapid assay with adherent target cells. *J. Immunol*, 1973, 110, 1672-1681.