

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE**

**PRÉSENTÉ À**

**L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE**

**DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

**PAR**

**MYRIAM BRUNET**

**PATHOGÉNIE DE L'INFECTION CAUSÉE PAR LE VIRUS  
DE LA NÉCROSE THYMIQUE DÉPISTÉE  
À L'AIDE D'UNE TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE**

**MARS 1992**

**"Tous les hommes désirent naturellement savoir."**

**Aristote**

**PUBLICATION:**

ATHANASSIOUS, R., M. BRUNET et G. LUSSIER. 1991. Ultrastructural study of mouse thymic virus replication. Arch. Virol. (soumis pour publication).

**COMMUNICATIONS:**

BRUNET, M., T. ATHANASSIOUS, R. ALAIN et G. LUSSIER. Etudes ultra-structurales de l'infection par le virus de la nécrose thymique de la souris. 59e congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS), Sherbrooke, Canada, mai 1991.

ATHANASSIOUS, R., M. BRUNET, R. ALAIN et G. LUSSIER. Ultrastructural and protein G-gold complex studies of mouse thymic virus replication. Congrès annuel de la Société canadienne des microbiologistes, London, Ontario, juin 1991.

ATHANASSIOUS, R., M. BRUNET, R. ALAIN et G. LUSSIER. Ultrastructural and immunocytochemical study of mouse thymic virus replication. 23e congrès mondial de Médecine vétérinaire, Rio de Janeiro, août 1991.

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
SOMMAIRE.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	6
1. LE VIRUS DE LA NÉCROSE THYMIQUE.....	7
1.1 Historique.....	7
1.2 Classification du virus.....	8
1.3 Transmission du virus.....	9
1.4 Perturbations immunologiques induites par le VNT.....	9
2. IMMUNOHISTOCHIMIE.....	13
2.1 Historique.....	13
2.2 Principes de base de l'immunohistochimie .....	16
2.2.1 Fixation et traitement des tissus .....	17
2.3 Les systèmes de détection immunohistochimique.....	18
2.3.1 Système de détection streptavidine-biotine .....	20
2.3.2 Description des protéines .....	20
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
1. ANIMAUX.....	23
2. VIRUS .....	23
2.1 Origine.....	23
2.2 Préparation de la suspension virale .....	23
2.3 Titrage du virus.....	24
2.4 Recherche de contaminants dans la suspension virale par le test d'induction d'anticorps.....	24
3. PRODUCTION D'ANTICORPS.....	26
3.1 Antisérum.....	26
Groupe A: adjuvant de Freund .....	26
Groupe B: virus seul .....	27
Groupe C: adjuvant RIBI.....	27
3.2 Anticorps monoclonal.....	30
3.2.1 Immunisation des souris .....	30
3.2.2 Fusion cellulaire et production d'hybridomes.....	31
3.2.3 Détection des hybridomes sécréteurs par immunofluorescence indirecte.....	32
3.2.4 Classification et quantification des anticorps monoclonaux.....	33
3.2.4.1 Analyse de la classe des anticorps.....	33
3.2.4.2 Immunodiffusion double radiale.....	33

4. RECHERCHE D'ANTICORPS SPÉCIFIQUES PAR LA TECHNIQUE ELISA.....	34
5. PRÉPARATION DES TISSUS.....	35
5.1 Pour les analyses histologiques.....	35
5.2 Pour les analyses immunohistochimiques.....	36
5.2.1 Immunofluorescence indirecte.....	36
5.2.2 Immunoperoxydase indirecte .....	37
RÉSULTATS.....	38
1. ANALYSE DE LA SUSPENSION VIRALE.....	39
2. IMMUNISATION DES SOURIS .....	39
3. ANALYSE DES HYBRIDOMES SÉCRÉTEURS PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.....	42
4. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS.....	42
4.1 Isotypie et quantification des anticorps.....	42
5. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION CAUSÉE PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE THYMIQUE.....	47
5.1 Détection du VNT par immunofluorescence indirecte chez les souriceaux nouveau-nés dans différents organes.....	47
5.2 Détection du VNT par immunofluorescence indirecte chez les souris adultes dans différents organes.....	107
DISCUSSION.....	109
1. IMMUNISATION DES SOURIS.....	110
2. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION .....	112
2.1 Chez le souriceau nouveau-né.....	112
3. COMPARAISON DE L'ANTICORPS MONOCLONAL VS L'ANTISÉRUM DIRIGÉS CONTRE LE VNT.....	119
4. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION .....	120
4.1 Chez la souris adulte.....	120
5. EFFICACITÉ DES TECHNIQUES IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET MODE DE TRAITEMENT DES TISSUS.....	122
CONCLUSION.....	125
REMERCIEMENTS.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	129
ANNEXE I.....	140
ANNEXE II.....	142
ANNEXE III.....	144
ANNEXE IV.....	146

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : Protocoles d'immunisation des souris pour la production d'un antisérum dirigé contre le VNT.....p.28
- Tableau II** : Calendrier d'immunisation des souris utilisées pour la fusion cellulaire. ....p.30
- Tableau III** : Production d'antisérum polyclonal: titre anti-VNT des souris immunisées selon trois protocoles différents. ....p.40
- Tableau IV** : Titre d'anticorps chez les souris immunisées pour la fusion cellulaire. ....p.41
- Tableau V** : Clones sécréteurs et spécifiques au VNT.....p.43
- Tableau VI** : Isotypes et concentration des anticorps monoclonaux. ....p.46
- Tableau VII** : Détection du VNT dans différents organes des souriceaux nouveau-nés: immunofluorescence indirecte à l'aide de l'antisérum anti-VNT. ....p.48
- Tableau VIII** : Pathogénèse du VNT dans le thymus de souriceaux nouveau-nés. ....p.53
- Tableau IX** : Détection du VNT dans différents organes des souriceaux nouveau-nés: par immunofluorescence indirecte à l'aide de l'anticorps monoclonal 2D2-D11 .....p.67
- Tableau X** : Détection du VNT dans le thymus de souriceaux nouveau-nés par immunofluorescence indirecte: comparaison entre l'antisérum anti-VNT et l'anticorps monoclonal 2D2-D11.....p.79
- Tableau XI** : Détection du VNT dans différents organes des souris adultes: immunofluorescence indirecte à l'aide de l'aide de l'antisérum anti-VNT. ....p.108

**LISTE DES FIGURES**

- Figure 1** Fluorescence positive caractéristique des hybridomes sécréteurs (2D2-D11,2D2-E12) observée par I.F.I sur cellules thymiques fixées sur lames.....p.45
- Figure 2** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.49
- Figure 3** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 5 post-inoculation observée par I.P.I. ....p.51
- Figure 4** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 5 post-inoculation observée après coloration à l' H.E. ....p.54
- Figure 5** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 7 post-inoculation observée après coloration à l' H.E. ....p.56
- Figure 6** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.59
- Figure 7** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 7 post-inoculation observée par I.P.I. ....p.61

- Figure 8** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 14 post-inoculation observée après coloration à l' H.E. ....p.63
- Figure 9** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.65
- Figure 10** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 21 post-inoculation observée après coloration à l' H.E. ....p.68
- Figure 10** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 21 post-inoculation observée après coloration à l' H.E.(suite) ....p.70
- Figure 11** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 21 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.72
- Figure 12** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 56 post-inoculation observée par I.F.I.....p.75
- Figure 13** : Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 56 post-inoculation observée après coloration à l' H.E. ....p.77
- Figure 14** : Coupe de foie de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I.....p.80

- Figure 15** : Coupe de foie de souriceaux nouveau-nés au JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I..... p.82
- Figure 16** : Coupe de foie de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.84
- Figure 17** : Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.87
- Figure 18** : Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.89
- Figure 18** : Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I. (suite) .....p.91
- Figure 19** : Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 21 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.93
- Figure 20** : Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 56 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.95
- Figure 21** : Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés, au JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I. ....p.97

- Figure 22** : Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés,  
au JOUR 7 post-inoculation observée par  
I.F.I. ....p.99
- Figure 23** : Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés,  
au JOUR 14 post-inoculation observée par  
I.F.I. ....p.101
- Figure 24** : Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés,  
au JOUR 21 post-inoculation observée par  
I.F.I. ....p.103
- Figure 25** : Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés,  
au JOUR 56 post-inoculation observée par  
I.F.I. ....p.105

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Ac</b>	: anticorps
<b>ACF</b>	: adjuvant complet de Freund
<b>AEC</b>	: 3-amino-9-éthylcarbazole
<b>Ag</b>	: antigène
<b>AIF</b>	: adjuvant incomplet de Freund
<b>CMH</b>	: complexe majeur d'histocompatibilité
<b>ConA</b>	: concanavaline A
<b>DAB</b>	: 3-3'-tétrachlorure de diaminobenzidine
<b>DI50</b>	: dose infectieuse 50
<b>DMSO</b>	: diméthylsulfoxyde
<b>ELISA</b>	: "enzyme linked immunosorbent assay" ou dosage immunoenzymatique
<b>GVA</b>	: "glycerol-polyvinyl alcool"
<b>H.E.</b>	: hématoxyline-éosine
<b>HAT</b>	: hypoxanthine aminoptérine thymidine
<b>HBLV</b>	: "human B lymphotropic virus" ou virus humain lymphotrope B
<b>HHV-6</b>	: "human herpes virus-6" ou herpesvirus humain-6
<b>HIV-1</b>	: "human immunodeficiency virus -1" ou virus d'immunodéficience humaine-1
<b>HT</b>	: hypoxanthine thymidine
<b>I.F.I.</b>	: immunofluorescence indirecte
<b>I.P.I.</b>	: immunoperoxydase indirecte
<b>LDV</b>	: "lactic deshydrogenase virus" ou virus de la déshydrogénase lactique

<b>MAP-test</b>	:	"mouse antibody production test" ou test d'induction d'anticorps
<b>MEM</b>	:	"minimum essential medium"
<b>MPL</b>	:	"monophosphoryl lipid A"
<b>MVM</b>	:	"minute virus mouse" ou minivirus de la souris
<b>OPD</b>	:	O-phénylènediamine
<b>PAP</b>	:	peroxidase anti-peroxidase
<b>PBS</b>	:	"phosphate buffered saline" ou tampon saline phosphate
<b>PEG</b>	:	polyéthylène glycol
<b>PHA</b>	:	phytohémagglutinine
<b>SFB</b>	:	sérum foetal bovin
<b>SIDA</b>	:	syndrome d'immunodéficience acquise
<b>S.R.E.</b>	:	système réticulo-endothélial
<b>TDM</b>	:	trehalose dimycolate
<b>VNT</b>	:	virus de la nécrose thymique
<b>VTM</b>	:	virus de la tumeur mammaire

## **SOMMAIRE**

Cette étude a été entreprise dans le but d'étudier la pathogénie du virus de la nécrose thymique (VNT) chez un groupe de souriceaux nouveau-nés et un groupe de souris adultes, pendant une période de 56 jours à l'aide de l'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) comme technique immunohistochimique de dépistage de l'antigène viral (Ag). Des analyses en immunoperoxydase indirecte (I.P.I.) ont été utilisées à l'occasion, pour fin de comparaison avec les résultats d'I.F.I. Il a d'abord fallu produire un antisérum et un anticorps monoclonal dirigés contre le VNT. Le but de la production d'un anticorps monoclonal était de servir d'outil supplémentaire à l'antisérum anti-VNT pour dépister l'Ag viral dans les tissus, en utilisant les techniques immunohistochimiques. La production d'antisérum a été effectuée selon trois protocoles d'immunisation différents: par adjuvant de Freund, adjuvant Ribit et par injections répétées de virus. Des titres élevés en anticorps anti-VNT ont été obtenus principalement par immunisation répétées au VNT et par immunisation avec l'adjuvant RIBI. Quant au rendement obtenu par immunisation avec l'adjuvant de Freund, les titres obtenus en anticorps anti-VNT étaient les plus faibles. Par la suite deux anticorps monoclonaux ont été produits: le 2D2-D11 et le 2D2-E12; tous deux de classe IgG et de sous-classe Ig2a, ayant les mêmes concentrations en immunoglobulines et émettant une fluorescence caractéristique identique (en forme de "bâtonnet") nous suggérant ainsi qu'il s'agissait de deux clones semblables. Les expériences de détection de l'Ag viral se sont faites en parallèle, en présence de l'antisérum et de l'anticorps monoclonal 2D2-D11.

Le virus a été dépisté dans différents organes à des jours précis post-infection (i.e. aux jours 3, 5, 7, 14, 21, 56). L'Ac monoclonal 2D2-D11 n'a pu

dépister l'Ag viral qu'aux jours 5 et 7 post-infection uniquement dans le noyau des thymocytes. Ces résultats suggèrent que cet Ac monoclonal est dirigé contre une protéine virale spécifique, propre à la période de synthèse et de réplication du génome viral qui a lieu dans le noyau des thymocytes, tandis que l'antisérum a permis de détecter l'Ag viral dans tous les organes prélevés (thymus, rate, foie, glandes salivaires) indépendamment du cycle de l'infection virale.

La présence de l'Ag viral déterminée par une fluorescence nucléaire a été observée dans le noyau des thymocytes aux jours 5 et 7 post-infection et dans le noyau des hépatocytes au jour 7 post-infection. Le type de fluorescence identifiant la présence de l'Ag viral ailleurs dans les autres organes était cytoplasmique.

Quant aux analyses histopathologiques des tissus de souriceaux nouveau-nés infectés, c'est principalement au niveau du thymus que l'on a remarqué un endommagement sévère caractérisé par des lésions nécrotiques présentes surtout aux jours 5-7-14 et 21 post-infection. Par la suite, le thymus semble retrouver une architecture normale puisque l'observation de cinq thymus sur six prélevés au jour 56 post-infection, ne présentaient aucune nécrose.

Finalement, aucune présence de l'Ag viral et de changements morphologiques ou histologiques chez les souris adultes infectées n'ont été révélées.

## **INTRODUCTION**

Au cours des vingt-cinq dernières années, une amélioration considérable quant au contrôle de la qualité sanitaire des rongeurs de laboratoire s'est produit. Cependant, plusieurs infections virales demeurent encore présentes dans les colonies d'animaux utilisées en expérimentation. (Lussier, 1988c, 1989, 1991). Celles-ci engendrent très souvent des perturbations immunologiques chez l'animal infecté faussant les résultats attendus. D'ailleurs, la littérature rapporte plusieurs cas d'animaux pré-contaminés et non dépistés avant même le début des recherches (Riley *et al.*, 1960; Rowe et Capps, 1961; Parker *et al.*, 1965; Carthew et Verstraete, 1978; Pike, 1979; Lussier 1988c, 1989). Le virus de la nécrose thymique (VNT) est un exemple d'agent viral d'abord identifié comme un contaminant d'une souche de virus de la tumeur mammaire de la souris (Rowe et Capps, 1961).

Il est donc important que les animaux de laboratoire soient exempts de tout agent infectieux (virus, bactéries, parasites, etc.) pour mener à bien une expérience et obtenir des résultats reproductibles.

L'implication majeure du VNT est d'altérer la réponse immune puisqu'il s'attaque principalement au thymus des souris, d'où l'importance de diagnostiquer ce virus chez l'animal avant le début de l'expérimentation.

Jusqu'à ce jour, aucune culture cellulaire n'a permis la réplication du VNT *in vitro* (Cross *et al.*, 1979; Morse, 1987). On dispose toutefois, quoique peu nombreuses et limitées, de quelques méthodes pour diagnostiquer l'infection par le VNT.

Actuellement, la méthode de détection du virus la plus courante est le passage par injection intra-péritonéale (i.p.), chez des souriceaux nouveau-nés de moins de 24 heures, du matériel potentiellement contaminé. Des examens macroscopiques des thymus sont ensuite effectués de 10 à 14 jours suivant l'inoculation. Les animaux infectés présentent des lésions de nécrose au niveau du thymus. Celui-ci apparaissant petit, dur et opaque par rapport à un thymus sain. Cette méthode a le malheureux inconvénient d'être coûteuse et très longue. Quant aux souris adultes, bien qu'elles puissent être parfois des porteurs chroniques du VNT, elles ne démontrent aucune lésion du thymus, ni d'aucun autre organe (Morse, 1987).

Certaines méthodes sérologiques peuvent être utiles pour quantifier les anticorps anti-VNT, comme la technique ELISA (Cross *et al.*, 1979; Lussier *et al.*, 1988a, 1988b) et la fixation du complément (Cross *et al.*, 1979). Cependant, ces méthodes de détection s'avèrent utiles lorsque l'on teste uniquement des souris adultes et encore faut-il qu'elles aient subi une séro-conversion, parce qu'il a été démontré que plusieurs souris peuvent ne pas produire d'anticorps (Morse, 1987; St-Pierre *et al.*, 1987; Lussier *et al.*, 1988a).

Ce présent travail avait donc pour but de mettre au point une technique immunohistochimique, méthode qui soit suffisamment rapide, efficace, économique et applicable en microscopie photonique, pour diagnostiquer l'infection causée par le VNT, à la fois chez le souriceau et chez la souris adulte. Cette technique permettrait par conséquent, de suivre la pathogénie du VNT pendant une période déterminée chez le souriceau et la souris adulte infectés.

Les objectifs de ce projet sont donc: 1°) d'obtenir un antisérum spécifique au VNT, lequel servira dans les techniques immunohistochimiques; 2°) de produire un anticorps monoclonal spécifique au VNT, lequel servira également d'outil supplémentaire pour dépister le VNT; il sera alors possible de déterminer l'efficacité d'un tel anticorps, par rapport à un antisérum polyclonal pour la localisation de l'antigène viral; 3°) d'adapter et de mettre au point une technique immunohistochimique (par I.F.I. ou par I.P.I.) et finalement, 4°) de suivre la pathogénie du VNT au niveau d'organes précis sur une période déterminée, chez un groupe de nouveau-nés et chez un groupe de souris adultes.

Le plan de recherche proposé est le suivant: la pathogénie du VNT sera étudiée chez deux groupes de souris, soient le **groupe A** constitué de souriceaux nouveau-nés, âgés de 24 heures et le **groupe B** constitué de souris adultes femelles âgées de 4 à 6 semaines (18-20 g). Chaque groupe comportera des sous-groupes témoins non-inoculés et inoculés au VNT.

Des souris CD-1 du groupe A ont reçu une injection de 5 DI<sub>50</sub> du VNT et celles du groupe B ont reçu 50 DI<sub>50</sub> du VNT. À des périodes de temps déterminées, i.e. aux jours 3, 5, 7, 14, 21 et 56 post-infection, les souris des groupes témoins et infectés ont été sacrifiées et les organes suivants ont été prélevés: thymus, rate, foie et glandes salivaires. Des sections de ces organes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (H.E.) pour des études histologiques et des techniques immunohistochimiques (I.F.I. et/ou I.P.I.) ont été utilisées

pour suivre l'évolution du VNT à travers les tissus en permettant la localisation de l'antigène viral dans ceux-ci.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. LE VIRUS DE LA NÉCROSE THYMIQUE**

### **1.1 Historique**

C'est en 1961, au cours d'une étude portant sur la transmission du virus de la tumeur mammaire (VTM) chez la souris que Rowe et Capps découvrirent fortuitement le virus de la nécrose thymique. Après avoir inoculé une suspension de tumeurs mammaires, de tissus glandulaires et de contenus d'estomac (porteurs potentiels du VTM) à des souriceaux nouveau-nés, ils observèrent des lésions nécrotiques à l'examen histologique. Ils reprirent ces expériences et observèrent macroscopiquement la nécrose du thymus. Des études en microscopie électronique révélèrent la présence de particules virales et l'on désigna alors ce virus sous le nom de virus de la nécrose thymique (Rowe et Capps, 1961).

Par la suite, des études ont surtout porté sur l'action du VNT sur le thymus (Rowe et Capps, 1961; Cross, 1973). Lorsque le VNT est inoculé à un souriceau nouveau-né de moins de 24 heures, il entraîne une nécrose du thymus: celui-ci apparaît dur, opaque et plus petit qu'un thymus sain. Ceci entraîne une perte importante de lymphocytes dans lesquels on retrouve des inclusions nucléaires amorphiques, et où le noyau de ces thymocytes est altéré. Les premières lésions thymiques sont observées dès le jour 3 post-infection. Cependant, c'est au cours du septième jour que le titre viral est maximal, caractérisé par de grandes zones de débris nécrotiques. Toutefois, c'est entre le 10<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour que les lésions de nécrose sont maximales et celles-ci sont facilement identifiables macroscopiquement. Il semblerait toutefois qu'il y aurait une régénérescence du thymus dès la deuxième

semaine, accompagnée de la présence de lésions granulomateuses et la présence de cellules géantes. Ainsi, la morphologie du thymus redeviendrait normale, à l'exception des tissus cicatrisés, dès la sixième semaine suivant l'infection (Cross, 1973).

Le VNT provoque des lésions thymiques seulement chez le souriceau nouveau-né; chez la souris adulte il n'engendre qu'une infection chronique révélée parfois par un titre viral élevé au niveau des glandes salivaires (Cross, 1973).

## 1.2 Classification du virus

En 1973, le VNT fut classé dans la famille des *Herpesviridae*, suite aux observations faites par Parker et collaborateurs. Les particules virales ont une morphologie comparable à celle décrite pour les autres virus de la famille des herpesviridés (Smith, 1959; Morgan *et al.*, 1968; Stackpole, 1969; Cook et Stevens, 1970). Les particules virales intranucléaires mesurent environ 100 nm de diamètre, sont limitées par une simple membrane et possèdent parfois un nucléoïde complet. Les particules cytoplasmiques et intracellulaires possèdent une enveloppe externe à surface inégale et mesurent environ 135 nm de diamètre. Les nucléoïdes des particules prennent souvent un aspect rubané mesurant 74 x 45 nm de diamètre. De plus, le virus a la propriété d'être sensible à la chaleur et aux solvants organiques (Cross, 1973).

Des études ultrastructurales récentes du thymus infecté par le VNT ont démontré par coloration négative, des capsides vides de forme icosaédrique mesurant entre 95 et 110 nm de diamètre, ainsi que des capsides enveloppées sphériques mesurant 125 à 165 nm de diamètre (Athanasious

*et al.*, 1990). Néanmoins, très peu de choses sont connues sur la biologie moléculaire de ce virus et aucune étude approfondie jusqu'à ce jour n'a été rapportée sur le cycle de réplication du VNT.

### **1.3 Transmission du virus**

St-Pierre et collaborateurs en 1987 ont étudié le mode de transmission du VNT. Ils ont d'abord démontré que le VNT pouvait être transmis d'une souris infectée à une autre par contact direct probablement par la salive. Le virus persiste au niveau des glandes salivaires pendant toute la vie de l'animal. D'après leurs résultats, il faudrait toutefois un contact prolongé supérieur à 28 jours pour transmettre le virus d'un animal infecté à un autre, ce qui indique une faible transmissibilité du virus. Ils ont d'autre part démontré que le virus pouvait être transmis aux nouveau-nés par une mère infectée via le lait maternel ou par contact direct. Curieusement, aucun de ces souriceaux nouveau-nés infectés par la mère ne présentait de lésions au thymus à cause de la faible quantité de virus transmis.

Des essais de transmission verticale via la voie transplacentaire ont été effectués en inoculant du virus à des mères gestantes à des stades différents de gestation. Le virus n'a pu être isolé des foetus et aucune malformation congénitale ou de retard dans le développement de ces foetus n'a été observée (St-Pierre *et al.*, 1987).

### **1.4 Perturbations immunologiques induites par le VNT**

Le virus de la nécrose thymique apparaît comme un virus murin particulier. Plusieurs virus peuvent causer des atrophies thymiques, tel les

virus Coxsackie types B3 et B1 (Matteuci *et al.*, 1985), le rotavirus de la souris (Jacoby et Fox, 1984), le virus de la leucémie féline (Hardy, 1980) et le minivirus de la souris (MVM) (minute virus mouse) (Smith *et al.*, 1985). Lors de ces infections, les lymphocytes thymiques ne sont pas attaqués directement et le mécanisme qui entraîne une atrophie thymique implique la libération de corticostéroïdes (Ito *et al.*, 1985). Il existe quelques virus aptes à se répliquer dans les thymocytes et à les tuer. Ces virus sont le MVM (Smith *et al.*, 1985), le virus de la chorioméningite lymphocytaire (Lehman-Grube, 1982), le virus de la leucémie féline (Hardy, 1980) et le virus du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), ainsi que certains virus simiens (Desrosiers *et al.*, 1985).

Certains herpesvirus peuvent infecter les lymphocytes, comme c'est le cas du virus de la maladie de Marek, du virus Epstein-Barr, des herpès simiens (Desrosiers *et al.*, 1985). Ceux-ci causent la transformation et l'immortalisation des lymphocytes, avec latence (virus persistents) dans la sous-population de lymphocytes, plutôt que d'entraîner une destruction massive de lymphocytes. Le VNT apparaît unique en son genre parmi les virus d'animaux de laboratoire, puisqu'il a la particularité de détruire les lymphocytes T thymiques (Morse, 1987).

Toutefois, plusieurs virus de mammifères peuvent infecter et détruire les lymphocytes T comme par exemple, certains rétrovirus. Ces rétrovirus, connus pour infecter et détruire les lymphocytes T, incluent le virus humain lymphotrope type III lequel est impliqué dans le virus du SIDA ainsi que les virus homologues simiens (Desrosiers *et al.*, 1985).

Les souriceaux nouveau-nés de moins de 24 hres infectés par le VNT, développent une nécrose massive du thymus et il en résulte une perte importante de thymocytes (Rowe et Capps , 1961; Morse *et al.*, 1976; Cross *et al.*, 1979). Les cellules détruites durant cette infection sont les lymphocytes immatures (Rowe et Capps, 1961; Cross, 1973; Mosier *et al.*, 1977). La plupart des cellules détruites durant l'infection serait les lymphocytes T auxiliaires (Cohen *et al.*, 1975; Mosier *et al.*, 1977). Les expériences menées par l'équipe de Cohen et collaborateurs en 1975 ont démontré que l'activité de prolifération et de différenciation des cellules T dans la rate, induite *in vitro* par des mitogènes (PHA, ConA), était moindre chez les souriceaux infectés. Par contre, lorsque les cellules B de la rate étaient stimulées par un mitogène (LPS) *in vitro*, celles-ci proliféraient et se différenciaient normalement. On mesura *in vitro* la réponse en anticorps produits par les cellules B vis-à-vis un antigène thymo-indépendant, et celle-ci demeurerait inchangée. Cependant, face à un antigène thymo-dépendant, la réponse des cellules B en anticorps était diminuée.

Comme les lymphocytes T sont responsables de réponses immunes spécifiques, leur destruction par le VNT entraîne une immunosuppression sévère (Cohen *et al.*, 1975; Cross *et al.*, 1976). Des études complétées par l'équipe de Cross et collaborateurs en 1976 et celles de Wood et collaborateurs en 1981 ont déterminé que l'infection aiguë du VNT sur le système immunitaire engendrait un temps de rejet de greffe prolongé chez les souriceaux infectés.

Les nouveau-nés infectés ne sembleraient pas produire d'anticorps dirigés contre le VNT, ni même plus tard au cours de leur vie (Cross *et al.*, 1979). Quant aux souris adultes, une seule étude rapporte qu'une infection primaire au VNT entraîne parfois une séroconversion et une persistance du virus dans les glandes salivaires, sans toutefois ne présenter aucune nécrose du thymus (Cross *et al.*, 1979).

Des travaux récents en cytofluorométrie portant sur l'étude des sous-populations du thymus affectées par le VNT (Guignard *et al.*, 1989) démontrent, qu'en phase aiguë, ce sont les cellules CD4<sup>+</sup> qui sont les plus affectées, les cellules T auxiliaires aussi bien que les doubles positives. L'immunosuppression pourrait s'expliquer par la diminution relative des cellules T auxiliaires et l'augmentation relative des cellules T suppressives/ cytotoxiques. Cependant, cette immunosuppression serait temporaire, puisque les réponses immunologiques reviennent à la normale avec le rétablissement des pourcentages cellulaires du thymus.

Chez la souris inoculée à l'âge adulte, la production d'anticorps et l'activité lymphocytotoxique seraient normales chez les souris infectées (Guignard *et al.*, 1989).

L'équipe de Morse et Valinsky en 1989, ayant également menée des expériences similaires, émet avec réserve l'hypothèse que la molécule CD4 pourrait être le récepteur probable du virus de la nécrose thymique, comme c'est le cas pour le HIV-I. Cependant, à la lueur de ces résultats préliminaires, il est plutôt suggéré que ce sont les cellules CD4<sup>-</sup> qui seraient infectées par le VNT, mais survivraient toutefois à l'infection. Ces mêmes cellules pourraient

demeurer infectées et servir de réservoir pour l'infection chronique. Le type exact de cellules dans lequel le virus persisterait demeure toutefois inconnu.

Il existe dans la nature d'autres virus lymphotropiques ayant une affinité particulière pour les cellules CD4; un parallèle peut être établi entre le VNT et celui de l'herpesvirus humain-6 (HHV-6), aussi connu sous le nom de HBLV (Salahuddin *et al.*, 1986). Bien que ce virus HHV-6 fut originalement isolé de lymphocytes B, il a été récemment démontré que ce dernier présentait une activité cytolytique *in vitro* chez les lignées de cellules T lymphoblastoïdes, (Ablashi *et al.*, 1987). Il reste toutefois à démontrer la même activité cytolytique *in vivo*. Le VNT et le virus HHV-6 peuvent tous les deux déclencher une infection asymptomatique et peuvent se loger de façon chronique dans les glandes salivaires (Pietroboni *et al.*, 1988; Morse, 1991). Ces deux virus seraient donc les premiers membres de la famille des herpesvirus ayant une activité à caractère cytolytique pour les cellules T.

## **2. IMMUNOHISTOCHIMIE**

### **2.1 Historique**

La pratique de l'immunohistochimie prit naissance avec les travaux de Albert H. Coons et collaborateurs en 1941. Ils furent les premiers à marquer un anticorps à un colorant fluorescent, l'isocyanate de fluorescéine, pour détecter un antigène dans des coupes de tissus (Kaplan, 1950; Coons, 1942, 1961). Cette technique référait au principe des méthodes directes: un marquage de l'anticorps en réaction avec un antigène particulier. Cependant, cette méthode directe nécessitait d'une part, une quantité élevée d'anticorps (lequel devait être très spécifique à l'antigène) et une distribution élevée d'antigène dans

les coupes de tissus infectés. Il y avait également présence de plusieurs réactions non spécifiques. C'est alors qu'il y eut plusieurs développements (Coons *et al.*, 1955; Mellors, 1968; Müller-Eberhard, 1968) pour introduire une méthode indirecte plus sensible. Cette dernière utilisait comme principe de faire réagir un premier anticorps non marqué avec l'antigène, suivi d'un deuxième anticorps marqué qui reconnaît les portions Fc ou Fab de l'anticorps primaire. Ce principe des méthodes indirectes avait l'avantage de nécessiter une faible quantité d'anticorps (anticorps secondaire), lequel pouvait réagir avec plusieurs épitopes de l'anticorps primaire. Cette méthode était donc plus spécifique et plus sensible que la méthode directe. Puis on remplaça l'isocyanate de fluorescéine par l'isothiocyanate (Riggs *et al.*, 1958), encore utilisé aujourd'hui comme marqueur de choix, parce que la molécule peut facilement être conjuguée à l'anticorps. Celle-ci émet une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée à des longueurs d'ondes de 490 nm. Pour un double marquage, on peut utiliser le fluorochrome rhodamine émettant une fluorescence rouge à une longueur d'ondes de 530 nm avec l'isothiocyanate de fluorescéine.

L'immunofluorescence fut énormément développée et exploitée et, est encore fort utilisée aujourd'hui. Cependant, comme les lames ou préparations pour l'observation en fluorescence ne sont pas permanentes et que cette technique nécessite un appareillage spécifique, il fallait donc développer d'autres alternatives n'ayant pas ces contraintes mais permettant toujours le dépistage d'une réaction antigène-anticorps dans un tissu.

Ces nouvelles exigences amenèrent le développement d'une série de marqueurs enzymatiques, dont Nakane et Pierce en 1966 furent les pionniers.

Ce premier enzyme est la peroxydase, avantageusement utilisée, autant en microscopie photonique qu'électronique. Le principe est d'utiliser un donneur d'électrons comme le 3,3' tétrahydrochlorure de diaminobenzidine (DAB) qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, produit un précipité polymérique insoluble brunâtre (Graham *et al.*, 1965).

Une variété d'autres donneurs d'électrons peut être utilisée avec la peroxydase, comme les chromogènes: 4-chloro-1-naphtol et le 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) (Graham *et al.*, 1965) qui émettent par contre un précipité rougeâtre.

D'autres marqueurs enzymatiques furent développés, comme la phosphatase alcaline (Masson et Sammons, 1978) utilisée surtout avec des techniques indirectes. Celle-ci a l'avantage d'être absente des tissus animaux, ce qui n'engendre aucun problème résultant de la présence de peroxydase endogène. Il y a aussi la  $\beta$ -D-galactosidase (Bondi *et al.*, 1982), enzyme dérivé d'une bactérie (*E. coli*), ayant un pH différent de celui des enzymes de mammifères. Il est à noter que ces enzymes, couplés à un anticorps, produisent une réaction spécifique détectée par la présence d'un précipité coloré, lorsqu'il y a rencontre avec l'antigène.

Pour des techniques immunohistochimiques appliquées en microscopie électronique, les marqueurs à la ferritine (Singer et Shick, 1961) et à l'or colloïdal (Faulk et Taylor, 1971), ainsi que des marqueurs radioactifs comme  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  (Larsson et Schwartz, 1977), peuvent être également utilisés.

## 2.2 Principes de base de l'immunohistochimie

Les techniques immunohistochimiques sont devenues des outils précieux de plus en plus utilisés en recherche et en diagnostic pathologique, surtout depuis l'avènement des anticorps monoclonaux (Heyderman, 1979; Flens *et al.*, 1989; Gosling, 1990; Ward, 1990). Les avantages principaux de l'immunohistochimie sont d'être rapides, simples et spécifiques.

Le principe de base de l'immunohistochimie repose sur l'interaction spécifique entre un anticorps et un antigène dans le tissu. Le site de cette interaction Ag-Ac peut être localisé par l'utilisation d'un marqueur pouvant être détecté en microscopie photonique ou électronique. Les éléments nécessaires pour l'immunohistochimie sont donc constitués d'un système de détection, de la présence d'un antigène insoluble dans un tissu et d'un anticorps spécifique.

Les techniques immunohistochimiques diffèrent selon le marqueur utilisé et la façon dont celui-ci est employé pour localiser le site d'interaction Ag-Ac dans le tissu.

Les critères de réussite des systèmes de détection immunohistochimique visent: l'efficacité (i.e. le signal de la réaction Ag-Ac sans bruit de fond), la sensibilité (i.e. la quantité la plus faible d'Ag détecté par la technique immunohistochimique) et la spécificité (i.e. la détection de l'Ag cible) (Petrusz et Ordroneau, 1980).

### 2.2.1 Fixation et traitement des tissus

La fixation est un aspect important à considérer en immunohistochimie. Son but est d'immobiliser les antigènes dans le tissu et/ou de préserver l'intégrité structurale du tissu. Une fixation idéale devrait satisfaire les caractéristiques suivantes: 1) la morphologie doit être préservée; 2) l'antigène pour être localisé doit être accessible aux anticorps marqués aux enzymes; 3) la distribution antigénique doit demeurer la même avant et après la fixation (i.e. le fixateur ne doit pas produire une diffusion ou un réarrangement de la distribution antigénique) et 4) les procédures de fixation ne doivent pas causer une dénaturation de l'antigène (Farr et Nakane, 1981).

Cependant, certains de ces critères combinés ensemble peuvent être mutuellement incompatibles. Certains fixateurs qui maintiennent l'intégrité morphologique offrent en retour une perte partielle de l'antigénicité. À l'inverse, d'autres fixateurs qui facilitent la pénétration des anticorps marqués aux enzymes pour la localisation des antigènes et qui préservent l'antigénicité, ne conservent pas une morphologie adéquate des tissus. Il n'existe pas présentement de fixateur "idéal" ou "standard"; la fixation en immunohistochimie relève donc d'un compromis entre ces deux extrêmes.

Quant au traitement des tissus, ils peuvent être, soit fixés et enrobés à la paraffine ou congelés directement. Il faut prendre en considération que certains antigènes peuvent être dénaturés, d'abord par l'action du fixateur et aussi par l'enrobage des tissus à la paraffine où la température de celle-ci peut être trop élevée pour préserver certains épitopes antigéniques. Cependant, la morphologie est, dans la plupart des cas, très bien conservée.

Il apparaît parfois plus avantageux d'utiliser la technique de congélation, d'une part parce qu'elle permet une préservation acceptable des tissus, et d'autre part, parce qu'elle est suffisamment rapide (entre 10 et 20 secondes) pour éviter la formation de cristaux de glace dans les tissus. Les spécimens sont d'abord enrobés dans un milieu de montage (O.C.T.) adapté pour la congélation des tissus. Ils sont par la suite congelés dans un milieu intermédiaire (Fréon 22, isopentane ou propane-propylène) dans un bain d'azote liquide. Généralement, les petites pièces ( $\cong 0,5 \text{ cm}^3$ ) conservent une morphologie adéquate, cependant, pour des pièces à dimension plus grande, il peut y avoir un certain degré d'endommagement des tissus plus ou moins négligeable (Larsson, 1988).

### **2.3 Les systèmes de détection immunohistochimique**

Il existe deux types de systèmes de détection immunohistochimique: les méthodes directes et indirectes. Le principe des méthodes directes consiste à faire réagir l'anticorps conjugué à l'enzyme avec l'antigène. Cette méthode est utile lorsque l'antisérum est disponible en quantité suffisante et qu'il est très spécifique à l'antigène et surtout lorsque le tissu infecté contient une quantité très importante d'antigènes. Cette technique s'avère toutefois moins sensible que les méthodes indirectes.

Les méthodes indirectes quant à elles s'avèrent substantiellement plus sensibles, jusqu'à six et douze fois plus, parce qu'elles utilisent un deuxième anticorps marqué qui pourra reconnaître les portions Fc ou Fab de l'anticorps primaire.

Parmi ces méthodes indirectes, on retrouve les techniques dites "sandwich", parce qu'elles impliquent plusieurs séries de réaction de couplage enzyme-anticorps. Brièvement, on retrouve les techniques de peroxydase anti-peroxydase (PAP), (Sternberger et Cuculis, 1969) où le premier et le deuxième anticorps ne sont pas marqués, et le troisième réactif est un complexe immun de peroxydase anti-peroxydase. Le deuxième anticorps agit comme un "pont" entre le premier anticorps et le complexe anti-peroxydase, lesquels sont produits chez la même espèce que le premier anticorps.

Il existe aussi des méthodes double PAP (triple sandwich) (Mason *et al.*, 1969; Ordronneau et Lindström, 1981) où le principe est le même que celui du PAP, sauf qu'on ajoute un quatrième anticorps non marqué, couplé au complexe PAP. Cette dernière technique aurait l'avantage de nécessiter des dilutions plus élevées de l'anticorps, cependant elle est plus longue à effectuer, d'autant plus qu'elle nécessite plusieurs étapes de rinçage, lesquelles pourraient contribuer à perdre une partie des coupes des tissus.

Il existe plusieurs systèmes de détection indirecte, comme des méthodes basées sur le principe de la protéine A (Young *et al.*, 1984), les systèmes avidine-biotine (Guesdon *et al.*, 1979; Hsu *et al.*, 1981) et les systèmes de détection utilisant différents marqueurs (ferritine, or colloïdal, enzymes radioactifs), dont la description des techniques sera omise ici, débordant du cadre de ce projet.

### 2.3.1 Système de détection streptavidine-biotine

La méthode immunohistochimique streptavidine-biotine est de plus en plus fréquemment utilisée comme outil de recherche fondamentale en cancérologie, immunologie et virologie (Scopsi et Larsson, 1986; Matthews, 1987; Mason et Gatter, 1987; Shi et Itzkowitz, 1988; Flens *et al.*, 1989; Gosling, 1990).

### 2.3.2 Description des protéines

**La streptavidine** est une protéine isolée de *Streptomyces avidinii* (Chalet et Wolf, 1964), d'un P.M. de 60 000 dalton, similaire à l'albumine d'oeuf. Elle est constituée de quatre sous-unités ayant une forte affinité pour la biotine. L'absence de résidus oligosaccharidiques et le point isoélectrique neutre préviennent un attachement non spécifique.

**La biotine** est une protéine soluble dans l'eau, de 244 dalton de poids moléculaire, présente dans le jaune d'oeuf et dans une variété d'autres tissus animaux ou végétaux.

Ce système a la particularité d'avoir une constance d'affinité très élevée de la streptavidine pour la biotine ( $K_d = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$ ) (Chalet et Wolf, 1964). De plus ce système streptavidine-biotine élimine les liaisons inhérentes non spécifiques, comme ce peut être le cas avec l'avidine (Woods et Warnke, 1981). Il a été démontré que le système streptavidine-biotine possédait une sensibilité supérieure aux techniques conventionnelles d'avidine-biotine (méthode ABC) (Buckland, 1986; Zuo-Rong *et al.*, 1988).

La streptavidine a un point isoélectrique neutre, tandis que l'avidine possède un point isoélectrique de 10. Or, l'avidine sera chargée positivement, en présence de conditions physiologiques et pourrait induire des réactions non spécifiques d'attachement.

Puisque cet attachement non spécifique peut être la cause de l'interaction entre les chaînes de carbones et de lectines (protéines retrouvées dans certains tissus), l'absence de chaînes carbonées chez la streptavidine prévient de beaucoup les réactions non spécifiques et contribue à diminuer de façon appréciable le bruit de fond lorsque comparé au système avidine-biotine.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. ANIMAUX

Des souris CD-1, exemptes d'organismes pathogènes connus et provenant de la compagnie Charles River Ltée (St-Constant, Québec) ont été utilisées. Elles ont été gardées dans des cages de polycarbonate à couvercle filtrant et ont reçu de la nourriture commerciale (Purina, Lab Chow, St-Louis, Missouri, E.-U.) et de l'eau *ad libitum*. La pathogénie du virus a été étudiée chez deux groupes de souris, **le groupe A** constitué de souriceaux nouveau-nés âgés de 24 heures et **le groupe B** constitué de souris femelles adultes âgées de 4 à 6 semaines (18-20g). Chaque groupe comportait des sous-groupes contrôles (non-inoculés) et inoculés avec le VNT.

## 2. VIRUS

### 2.1 Origine

Le virus utilisé a été isolé dans notre laboratoire et est sérologiquement identique à la souche décrite par S.S. Cross (Lussier *et al.*, 1988a). Le cinquième passage a été utilisé pour la préparation de la suspension virale.

### 2.2 Préparation de la suspension virale

Les souriceaux nouveau-nés provenant de 40 portées ont été inoculés par voie intrapéritonéale (i.p.) avec 0,05 ml avec la suspension virale à l'aide d'une seringue de 1 ml et d'une aiguille #30 (Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey, E.-U.) Sept jours après l'inoculation, les souriceaux ont été sacrifiés à l'halotane (M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario). Les thymus infectés ont été recueillis stérilement et triturés dans le milieu MEM contenant de la gentamicine (10 µg/ml) (Gibco, Burlington, Ontario). Les cellules ont été

cellules ont été dissociées et leur concentration a été ajustée à  $80 \times 10^6$  thymocytes par ml. Dix pour cent de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri, E.-U.) a été ajouté au volume total, la suspension a été répartie en volume de 1 ml et congelée à  $-70^\circ\text{C}$ . Des prélèvements de cette suspension virale ont été testés pour un contrôle de la stérilité sur gélose sang et dans le thioglycolate.

### **2.3 Titrage du virus**

Le titrage du virus a été effectué sur des souriceaux et les calculs effectués selon la méthode de Kärber (Lépine, 1964) afin de déterminer la dose infectieuse causant une nécrose thymique dans 50% des cas ( $DI_{50}$ ). À partir d'une ampoule contenant la suspension originale du virus, une série de dilutions logarithmiques de  $10^0$  à  $10^{-6}$  a été effectuée. Pour chaque dilution, 0,05 ml de la suspension virale ont été inoculés par voie i.p. aux souriceaux de deux portées (environ 20 nouveau-nés de 24 heures). L'observation macroscopique de la nécrose du thymus a été utilisée pour quantifier le virus infectieux dans la suspension originale. Les thymus ont été examinés 14 jours après l'inoculation et évalués selon le barème de 0 (thymus normal) à 4+ (nécrose maximale où le thymus apparaît petit, dur et opaque).

### **2.4 Recherche de contaminants dans la suspension virale par le test d'induction d'anticorps (MAP-Test: Mouse Antibody Production Test)**

Pour s'assurer que les suspensions virales ne renfermaient pas de contaminants, ces dernières ont été soumises au test d'induction

d'anticorps (MAP-Test) (Collins et Parker, 1972). Trois souris sevrées, âgées de six semaines, ont été inoculées avec la suspension virale non diluée et trois autres avec la suspension diluée 1:10 dans du milieu MEM contenant 10 µg/ml de gentamicine. Le diluant a été inoculé à trois autres souris. Chaque souris a été anesthésiée à l'halotane, inoculée avec 0,45 ml par voie i.p. et 0,05 ml par voie intra-nasale et saignée 28 jours après l'inoculation par ponction cardiaque. Ces prélèvements sanguins ont été laissés à la température de la pièce pendant une heure puis le sérum a été séparé par centrifugation à 5000 g pendant cinq minutes à 4°C et congelé à -20°C jusqu'au moment des tests. Les techniques ELISA, d'inhibition de l'hémagglutination, de la fixation du complément et d'immunofluorescence ont été utilisées afin de détecter la présence, dans le sérum, d'anticorps dirigés contre les virus murins et mycoplasmes suivants: réovirus type 3, virus K, virus de l'encéphalomyélite de Theiler, virus du polyome, virus Sendai, virus de la pneumonie de la souris, virus de l'hépatite murine, adénovirus murin, minivirus de la souris, virus de la chorioméningite lymphocytaire, cytomégalovirus murin, virus de la fièvre coréenne, virus H-1 de Toolan et *Mycoplasma pulmonis* (Service de dépistage de pathologies des animaux de laboratoire, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec). Pour la détection du virus de la déshydrogénase lactique (LDV), trois souris sevrées, âgées de six semaines ont été inoculées avec 0,5 ml par voie i.p. et 0,03 ml par voie intra-crânienne de la suspension virale diluée 1:10 dans du PBS sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> à pH 7,2. Le LDV a été inoculé par voie i.p. (volume de 0,5 ml) à trois souris utilisées comme témoins positifs. Trois autres souris, utilisées comme témoins négatifs ont été inoculées par voie i.p. avec 0,5 ml de diluant. Trois jours après l'inoculation, les souris ont été saignées au niveau du sinus orbital veineux à

l'aide de capillaire non-hépariné. De nouveau, les prélèvements sanguins ont reposé à la température de la pièce et ont été centrifugés par la suite à 5000 g pendant cinq minutes à 4°C. Le niveau de déshydrogénase lactique dans le sérum des animaux infectés a été comparé avec celui des témoins négatifs et positifs à l'aide d'une trousse commerciale (Sigma Diagnostic, St-Louis, Missouri, E.-U.).

### **3. PRODUCTION D'ANTICORPS**

#### **3.1 Antisérums**

L'antisérum anti-VNT a été produit chez des souris femelles adultes âgées de six semaines, selon trois protocoles d'immunisation différents: les souris du groupe A ont reçu l'adjuvant de Freund (Difco, Michigan, É.-U.); celles du groupe B ont reçu le virus seul et celles du groupe C ont reçu l'adjuvant RIBI (Cedarlane Lab., Mississauga, Ont.) (Tableau I).

Ces protocoles d'immunisation ont été utilisés d'une part pour éprouver la valeur de l'adjuvant Ribi (breveté en 1981) qui, selon certaines sources, déclencherait la production de titres élevés d'anticorps (Ribi, 1985; Curry, 1987; Masihi *et al.*, 1988; Rudbach *et al.*, 1988; Kenney, 1989; Lise, 1989; Geerlig, 1989) et pour trouver le protocole le plus efficace qui soit pour la production massive d'un antisérum dirigé contre le VNT.

#### **Groupe A: adjuvant de Freund**

Une première injection de 0,5 ml [(i.e. de 0,25 ml de la suspension virale diluée (1:2) et de 0,25 ml d'adjuvant complet de Freund (ACF)] fut administrée i.p., suivie d'une deuxième injection i.p. de 0,5 ml [(0,25 ml de la

suspension virale diluée (1:2) et de 0,25 ml adjuvant Incomplet de Freund (AIF)] à deux semaines d'intervalle. Quatorze jours plus tard, une troisième dose de 0,5 ml de la suspension virale diluée (1:4) fut administrée par voie intrapéritonéale.

**Groupe B: virus seul**

Les souris ont reçu trois injections i.p. de 0,5 ml de la suspension virale diluée (1:4), à raison d'une injection à toutes les deux semaines.

**Groupe C: adjuvant RIBI**

L'immunisation des souris avec l'adjuvant RIBI s'est faite comme suit: une première injection de 0,2 ml i.p. fut administrée [( 0,1 ml de la suspension virale (1:2) et 0,1 ml d'adjuvant RIBI dilué dans 2% de solution saline)], suivie d'une dernière injection i.p. de 0,5 ml de la suspension virale diluée (1:4) deux semaines plus tard.

**TABLEAU I****Protocoles d'immunisation des souris pour la production  
d'un antiserum dirigé contre le VNT**

---

**GROUPE A: Immunisation par adjuvant de Freund**

1ère injection de 0,5 ml ACF <sup>a</sup> (0,25 ml virus dilué (1:2) + 0,25 ml ACF )

2ième injection de 0,5 ml AIF <sup>b</sup> (0,25 ml virus dilué (1:2) +0,25 ml AIF )

3ième injection de 0,5 ml virus dilué (1:4)

---

**GROUPE B: Immunisation avec virus seulement**

1ère injection de 0,5 ml virus dilué (1:4)

2ième injection de 0,5 ml virus dilué (1:4)

3ième injection de 0,5 ml virus dilué (1:4)

---

**GROUPE C: Immunisation par adjuvant RIBI**

1ère injection de 0,2 ml adjuvant RIBI (0,1 ml virus dilué (1:2)+0,1 ml adj.<sup>c</sup>RIBI)

2ième injection de 0,5 ml virus dilué (1:4)

---

a: adjuvant complet de Freund (ACF)

b: adjuvant incomplet de Freund (AIF)

c: adjuvant

## **3.2 Anticorps monoclonal**

### **3.2.1 Immunisation des souris**

Des souris adultes CD-1 âgées de six semaines ont été immunisées par injection i.p., à raison d'une première injection de 0,5 ml d'ACF [(0,25 ml de virus dilué (1:2) + 0,25 ml d'ACF)], suivi deux semaines plus tard, d'une deuxième injection de 0,5 ml d'AIF [(0,25 ml de virus dilué (1:2) + 0,25 ml d'AIF)] . Une troisième dose i.p. de 0,5 ml de virus dilué (1:4) fut administrée au 28e jour. Finalement, au 42e jour un dernier rappel de 100 µl de virus dilué (1:20) fut injecté par voie intra-veineuse, quatre jours précédant la fusion (Tableau II). Il est à noter que ce protocole d'immunisation a utilisé l'adjuvant de Freund en raison des procédures conventionnelles déjà utilisées en laboratoire.

## TABLEAU II

### Calendrier d'immunisation des souris utilisées pour la fusion cellulaire

JOUR	QUANTITÉ DE VIRUS INJECTÉ	VOIE D'ADMINISTRATION
1	0,5 ml ACF <sup>a,b</sup>	i.p.*
14	0,5 ml AIF <sup>c,d</sup>	i.p.
28	0,5 ml virus dilué (1:4)	i.p.
42	100 µl de virus dilué (1:20)	i.v.**
46	- fusion cellulaire	-

a: adjuvant complet de Freund (ACF)

b: 0,25 ml de virus dilué (1:2) + 0,25 ml d'ACF

c: adjuvant Incomplet de Freund (AIF)

d: 0,25 ml de virus dilué (1:2) + 0,25 ml d' AIF

\*: Injection intrapéritonéale (i.p.)

\*\* : injection intra-veineuse (i.v.)

### 3.2.2 Fusion cellulaire et production d'hybridomes

Les opérations suivantes ont été effectuées par le Service de production des hybridomes, dans le laboratoire du docteur J. Lecomte (Institut Armand-Frappier). Les lymphocytes spléniques des souris immunisées ont été mélangés à des cellules myélomateuses murines 653 dans le milieu de culture RPMI sans sérum (Gibco, Burlington, Ont.).

Les cellules ont été centrifugées cinq minutes à 1000 rpm et le culot a été resuspendu délicatement dans du milieu RPMI en présence de polyéthylène glycol (PEG) pendant environ 45 secondes. La solution de PEG fut ensuite retirée et le volume complété avec 10,0 ml du milieu de culture. Cette suspension fut centrifugée à nouveau et le culot resuspendu dans 10,0 ml de milieu RPMI puis incubé à 37°C pendant cinq minutes. Après centrifugation, les cellules furent resuspendues dans le milieu RPMI contenant 10% de sérum foetal bovin (SFB) et incubées 30 minutes à 37°C. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans du milieu sélectif d'hypoxanthine, aminoptérine, thymidine (HAT) contenant 10% SFB.

Une fois la fusion terminée, à une concentration optimale de  $4 \times 10^6$  cellules / ml, les cellules ont été réparties dans des plateaux de 96 puits pour culture de tissus à raison de 100  $\mu$ l / puits, et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 10% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture fut changé pour du milieu frais, environ à tous les deux jours.

Quatorze jours après la fusion, le surnageant de culture fut testé par la technique d'I.F.I. (voir détails plus loin dans le texte) afin d'évaluer les puits contenant les hybridomes sécréteurs d'immunoglobulines.

Les hybridomes des puits positifs ont été recloneés par dilution limite et au bout de quatorze jours, le milieu sélectif HAT a été changé pour le milieu sélectif hypoxanthine, thymidine (HT).

Après le clonage, les hybridomes ont de nouveau été testés au point de vue sécrétion d'anticorps et ceux qui semblaient stables ont été propagés dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> contenant du milieu RPMI afin de produire une culture cellulaire massive.

### 3.2.3 Détection des hybridomes sécréteurs par immunofluorescence indirecte

Les hybridomes sécréteurs ont été testés par I.F.I. où l'on avait préalablement fixé des cellules thymiques normales et des cellules infectées au VNT sur lame de microscope à 12 puits délimités (Flow Lab, Mississauga, Ont.).

La production de ces lames a d'abord nécessité dans un premier temps, le prélèvement au jour 7 de thymus de souriceaux infectés à la naissance par le VNT et de thymus de souriceaux normaux (non-inoculés). Ces thymus ont été récoltés dans une solution de PBS sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> et ont subi trois lavages subséquents au PBS pour se défaire des globules rouges. Ils ont été ensuite dissociés finement dans un pétri et cette solution a été resuspendue dans 40% de milieu RPMI en présence de glutamine, d'antibiotiques et de 50% de sérum de veau foetal et 10% de DMSO (Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri, E.-U.) . Le compte cellulaire était de 6 x 10<sup>6</sup> cellules par ml et le tout a été réparti en volume de 1 ml et congelé à l'azote liquide.

Dans un deuxième temps, au moment de la production des lames d'I.F.I., une aliquote fut rapidement décongelée à 37°C et centrifugée pendant dix minutes à 1600 rpm. Le culot fut resuspendu dans 4 ml de PBS sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> et dans 0,1% de paraformaldéhyde. La suspension de thymocytes normaux fut distribuée dans la rangée supérieure de la lame (servant de contrôle) et celle de thymocytes infectés au VNT dans la rangée inférieure, en volumes de 25 µl. Les lames furent ensuite asséchées sous la hotte laminaire, fixées à l'acétone pendant dix minutes, et conservées à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation.

### 3.2.4 Classification et quantification des anticorps monoclonaux

#### 3.2.4.1 *Analyse de la classe des anticorps*

Les classes et sous-classes ainsi que la chaîne légère des anticorps monoclonaux ont été déterminées en utilisant une trousse commerciale (Amersham , Oakville, Ont.) (Annexe I).

#### 3.2.4.2 *Immunodiffusion double radiale*

La quantification des anticorps monoclonaux s'est effectuée selon le test de Mancini en immunodiffusion radiale (Mancini *et al.*, 1965). Deux séries parallèles de puits ont été pratiquées sur un gel de 3 ml d'agarose dans lequel avait été introduit 10 µl d'IgG de chèvre anti-IgG de souris (Miles, Mississauga, Ont.) . Les standards, soit des IgG de souris, ont été déposés dans les puits supérieurs à raison de 10 µl/puits aux concentrations suivantes: 50 , 25 , 12,5 , 6,25 et 3,12 µg/ml. L'anticorps monoclonal provenant de surnageants de culture a été placé dans les puits inférieurs à raison de

10 µl/puits à différentes dilutions (1/2 ,1/4 ,1/8 ,1/16). Le tout a été incubé en chambre humide pendant 24 heures à la température de la pièce. Ils ont subi ensuite plusieurs rinçages au PBS, ils ont été pressés et séchés. Ils furent ensuite placés dans un bain colorant constitué de méthanol à 50%, de bleu de Coomassie 0,2% et d'acide trichloroacétique à 7,5%. Après décoloration à l'aide de méthanol 50% et d'acide acétique 7,5%, ils ont ensuite été séchés de nouveau. Le diamètre de la zone de précipitation a été évalué à l'aide d'un oculaire 8X à calibration millimétrique.

#### **4. RECHERCHE D'ANTICORPS SPÉCIFIQUES PAR LA TECHNIQUE ELISA**

Les plateaux à 96 puits en polystyrène (Flow Lab. Mississauga ,Ont.) ont été remplis de 100 µl d'antigène VNT ou témoin et incubés pour la nuit à 4°C. Les antigènes témoins ont été préparés à partir de thymus non infectés et les antigènes VNT produits à partir de thymus infectés de sept jours. Avant d'être déposées dans les plateaux, les suspensions d'antigènes ont été traitées aux ultrasons pendant dix secondes dans un bain de glace. Le lendemain, la suspension d'antigènes a été jetée et 200 µl de PBS contenant 1% v/v de Tween 20 (Sigma, St-Louis, Missouri, E.-U.) et 10% de SFB a été déposé dans chaque cupule et les plateaux ont été incubés pendant une heure à la température de la pièce. Les plateaux ont été vidés et les sérums à tester ont été dilués en série (1/40, 1/160, 1/640, etc.) à raison de 33 µl de chaque dilution dans un volume de 100 µl de PBS contenant 1% v/v de Tween 20 et 10% de SFB et déposés à la fois dans les cupules contenant les antigènes VNT ou témoins. Après une heure d'incubation à la température de la pièce, les plateaux ont été lavés trois fois avec du PBS-Tween 20 (0,1%) et

100 µl de protéine A marquée à la peroxydase de raifort (dilution 1:800) ont été ajoutés à chaque cupule. Les plateaux ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à la température de la pièce à la noirceur, lavés trois fois avec du PBS et 100 µl d'un tampon citrate (Annexe II) contenant 0.04% p/v d'O-phénylènediamine (OPD) et 0.04% de peroxyde d'hydrogène 30% ont été ajoutés à chaque cupule. Après une incubation de 30 minutes à la température de la pièce à la noirceur, la réaction a été arrêtée avec 100 µl de HCl IN. La densité optique fut lue à une longueur d'onde de 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Titertek Multiskan (Flow Lab , Mississauga, Ont.).

## **5. PRÉPARATION DES TISSUS**

### **5.1 Pour les analyses histologiques**

Les souris ont été sacrifiées par inhalation d'halotane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ont.) et les organes suivants ont été fixés dans une solution de formaline commerciale Perfix<sup>®</sup> (Fisher Diagnostic, Orangeburg, New York, E.-U.): le thymus, le foie, la rate et les glandes salivaires. Les organes ont ensuite été enrobés de paraffine et des coupes de tissus de 6 µ d'épaisseur ont été montées sur lames et colorées à l'hématoxyline-éosine pour des études histologiques (Annexe III).

### **5.2 Pour les analyses immunohistochimiques**

Pour les études immunohistochimiques, le thymus, la rate, le foie et les glandes salivaires ont été prélevés, déposés dans des "cryomolds" (bain de moulage, Miles, San Francisco, Californie, E.-U.) et montés immédiatement dans un milieu de montage commercial, ("O.C.T"., Miles, San Francisco,

Californie, E.-U.) pour être par la suite congelés dans un milieu intermédiaire de fréon liquide (dichlorodifluorométhane, Mecalab, Montréal, Qué.) dans un bain d'azote liquide. Les organes ont ainsi été congelés en moins de trente secondes. Des coupes de 5  $\mu$  furent ensuite effectuées au cryostat, montées sur lames et entreposées à -70°C jusqu'au moment de leur utilisation.

#### 5.2.1 Immunofluorescence indirecte

Les coupes de tissus de 5  $\mu$  congelées ont été fixées à l'acétone pendant dix minutes à 4°C, rincées trois fois pendant cinq minutes dans un tampon PBS sans Ca<sup>++</sup> ni Mg<sup>++</sup> (Gibco Lab., Burlington, Ont.) et incubées en présence de l'anticorps primaire (anticorps monoclonal ou antisérum) pendant 60 minutes à 37°C en chambre humide. Suite à cette incubation, les lames ont subi trois rinçages consécutifs au PBS et furent incubées pendant 60 minutes à 37°C en chambre humide avec le conjugué anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine (diluée 1:40) (Sigma, St-Louis, Missouri, E.-U.). Pour permettre une meilleure contre-coloration des lames, un colorant a été ajouté au conjugué à raison d'un volume de 100  $\mu$ l de Bleu d'Evans / ml de conjugué. Cette étape fut suivie d'un dernier rinçage au PBS avant le montage entre lames et lamelles avec une goutte de glycérine-phosphate (glycérol PBS 9:1). L'observation des lames s'est faite sous un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'un objectif de 50X à immersion dans l'eau. Les photographies ont été prises sur film Kodak de sensibilité 400 ASA.

#### 5.2.2 Immunoperoxydase indirecte

Les coupes de tissus de 5  $\mu$  congelées ont été fixées à l'acétone pendant dix minutes à 4°C et rincées trois fois dans du PBS. La technique

d'immunoperoxydase pratiquée utilise une trousse commerciale streptavidine-biotine ("Histostain Kit", Zymed Lab., San Francisco, Californie, E.-U.) avec légères modifications. Brièvement, une première étape suivant la fixation à l'acétone consiste à bloquer les sites non spécifiques avec le sérum bloquant (10% de sérum non immun de lapin ou de chèvre) pendant dix minutes à la température de la pièce. Un rinçage au PBS fut ensuite effectué suivi d'une incubation de soixante minutes avec l'échantillon (i.e. l'anticorps primaire: polyclonal ou monoclonal), à 37°C en chambre humide. Les lames furent ensuite rincées au PBS. Par la suite, un deuxième anticorps, un anti Ig G de souris biotinylé a été ajouté et incubé pendant quinze minutes à la température de la pièce. Puis, suivant un nouveau rinçage des lames au PBS, une incubation de dix minutes avec le conjugué enzyme (streptavidine-peroxydase) en chambre humide, à la température de la pièce, a suivi. Les lames furent ensuite lavées de nouveau avec du PBS. Finalement, la réaction a été révélée en présence du substrat chromogène : aminoéthylcarbazole (AEC) mélangé à une solution de 3% d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubé sept minutes en chambre humide, à la noirceur et à la température de la pièce. Les lames furent ensuite rincées à l'eau distillée et contre-colorées à l'hématoxyline de Harris pendant trois minutes. Un montage entre lames et lamelles avec une goutte de solution glycerol-polyvinyl alcool (GVA) fut ensuite effectué pour l'observation. Les photographies furent prises avec un microscope Leitz sur un film Kodak de 100 ASA avec filtre 80.

## **RÉSULTATS**

## **1. ANALYSE DE LA SUSPENSION VIRALE**

Des analyses de prélèvements de la suspension virale produite ont été testées en microscopie électronique et ont permis de confirmer la présence du VNT. De plus, la stérilité de cette suspension virale lorsque testée sur gélose sang et dans un milieu de thioglycolate s'est avérée respectée; aucune présence de contaminant n'a été trouvée. Quant à la recherche de contaminants dans la suspension virale par le test d'induction d'anticorps (MAP-test), aucun anticorps dirigé contre les virus et mycoplasmes murins testés (voir section 2.4) n'a été dépisté. Les suspensions virales produites étaient donc uniquement constituées du VNT.

## **2 .IMMUNISATION DES SOURIS**

Les titres en anticorps anti-VNT obtenus chez les souris immunisées pour la production de l'antisérum polyclonal (nécessaire pour les techniques immunohistochimiques) sont présentés au Tableau III. L'antisérum a été produit selon trois protocoles d'immunisation différents de façon à trouver la technique la plus efficace pour l'obtention des meilleurs titres en anticorps anti-VNT.

Le tableau IV rapporte les résultats obtenus avec les souris immunisées pour les fusions no.1 et no.2. Un échantillon de sang a été prélevé chez chaque souris et le titre indiqué est celui obtenu après la dernière injection. Ces titres ont été déterminés par la technique ELISA.

TABLEAU III

**Production d'antisérum polyclonal: titres anti-VNT des souris  
immunisées selon trois protocoles différents**

<b>GROUPE</b>	<b>A<sup>a</sup></b>	<b>B<sup>b</sup></b>	<b>C<sup>c</sup></b>
<b>ANIMAL</b>			
1	1/320	1/5120	1/1280
2	1/320	1/1280	1/1280
3	1/320	1/1280	1/1280
4	1/1280	1/1280	1/5120
5	1/1280	1/1280	1/1280
6	1/1280	1/1280	1/1280
7	1/1280	1/1280	1/320
8	1/320	1/1280	1/1280
<b>TITRE<sup>d</sup></b>	1/640	1/1522	1/1280

a: Immunisation avec adjuvant de Freund

b: Immunisation avec virus dilué

c: Immunisation avec adjuvant RIBI

d: Moyenne géométrique des titres

**TABLEAU IV**

**Titre d'anticorps obtenus chez les souris immunisées  
pour la fusion cellulaire**

---

<b>FUSION</b>		<b>TITRE</b>
Fusion n° 1	souris 1	1/320
	souris 2	1/1280
Fusion n° 2	souris 1	1/320

---

### **3. ANALYSE DES HYBRIDOMES SÉCRÉTEURS PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE**

Tous les surnageants d'hybridomes obtenus lors de deux fusions différentes ont été testés pour la présence d'anticorps spécifiques selon la technique d'immunofluorescence indirecte décrite à la section 3.2.3.

Le tableau V indique le nombre de clones sécréteurs obtenus lors des deux fusions. Bien que 75 clones aient été produits, seulement deux se sont avérés positifs contre le VNT. Une fluorescence caractéristique (en forme de "bâtonnet") de ces hybridomes est démontrée dans la figure 1.

### **4. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS**

#### **4.1 Isotypie et quantification des anticorps**

Les tests d'isotypie ont permis de déterminer que les anticorps monoclonaux 2D2-D11 et 2D2-E12 possédaient une chaîne légère de type kappa et une chaîne lourde de type gamma. Ils appartiennent tous deux à la classe d'immunoglobulines de type IgG et de sous-classes IgG2a.

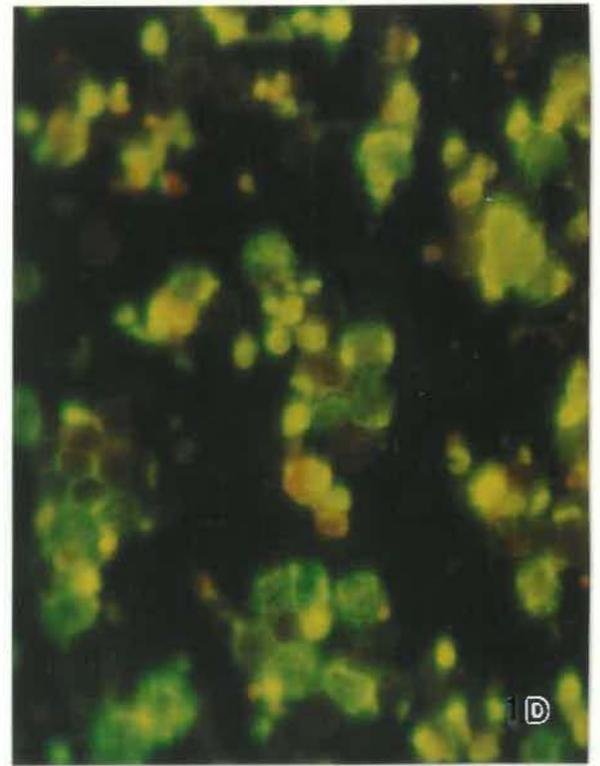
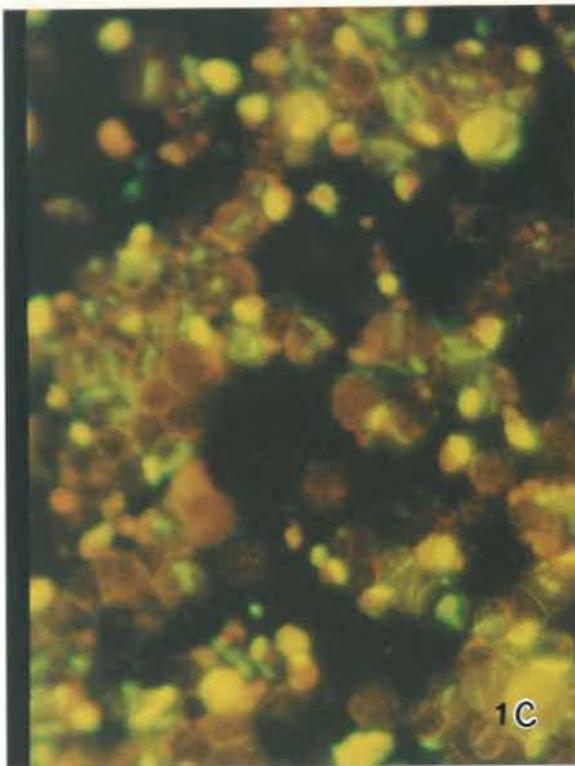
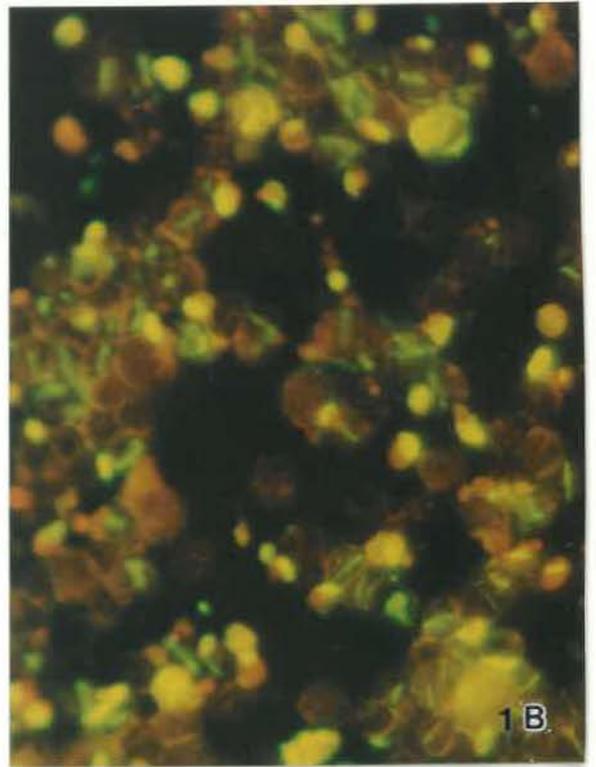
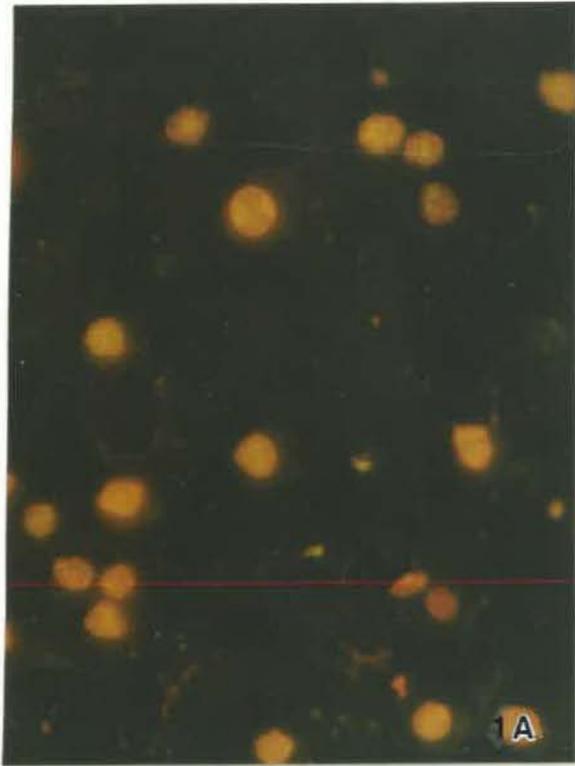
La quantification des anticorps effectuée par immunodiffusion radiale a donné des valeurs identiques de 54,3 µg/ml dans le cas des surnageants de culture provenant des hybridomes 2D2-D11 et 2D2-E12, suggérant qu'il s'agit de deux hybridomes semblables (Tableau VI).

**TABLEAU V**  
**Clones sécréteurs et spécifiques au VNT**

FUSION	NOMBRE DE CLONES	
	SÉCRÉTEURS	SPÉCIFIQUE AU VNT
n°1	45	2
n°2	30	0
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>2</b>

**FIGURE 1: Fluorescence positive caractéristique des hybridomes sécréteurs (2D2-D11, 2D2-E12) observée par I.F.I. sur cellules thymiques fixées sur lames à 12 puits.**

- A:** cellules thymiques non-infectées.(contrôle négatif)  
(X500)
- B:** cellules thymiques infectées au VNT en présence de l'hybridome 2D2-D11. (réaction positive: fluorescence en forme de "bâtonnet" )  
(X500)
- C:** cellules thymiques infectées au VNT en présence de l'hybridome 2D2-E12 (réaction positive : fluorescence en forme de "bâtonnet")  
(X500)
- D:** cellules thymiques infectées au VNT en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



**TABLEAU VI**  
**Isotypes et concentration des anticorps monoclonaux**

HYBRIDOME	ISOTYPE		CONCENTRATION ( $\mu\text{g/ml}$ )
	chaîne légère	chaîne lourde	
2D2-D11	Kappa	IgG <sub>2a</sub>	54,3
2D2-E12	Kappa	IgG <sub>2a</sub>	54,3

## 5. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION CAUSÉE PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE THYMIQUE

### 5.1 Détection du VNT par immunofluorescence Indirecte chez les souriceaux nouveau-nés dans différents organes

La pathogénie du VNT a été étudiée aux jours 3, 5, 7, 14, 21 et 56 post-infection. Le Tableau VII résume, en partie, les organes où a été dépisté l'Ag viral par immunofluorescence indirecte, à l'aide de l'antisérum dirigé contre le VNT.

**Thymus:** L'antigène viral (Ag) a été dépisté dans le thymus dès le cinquième jour post-infection (Figure 2). En présence de l'antisérum, la fluorescence est localisée principalement dans le noyau des thymocytes. Des résultats très similaires ont été obtenus avec l'anticorps monoclonal 2D2-D11 (Figure 2C). Les résultats des tests immunohistochimiques par la technique streptavidine-biotine sont démontrés à la Figure 3. Déjà, par observation macroscopique, une souris sur trois présente des lésions visibles (Tableau VIII), donnant un aspect blanchâtre et dur au thymus infecté. À l'examen histologique, on note une nécrose moyennement sévère au niveau de la médulla et la présence d'inclusions nucléaires dans les thymocytes (Figure 4).

Au jour 7 post-infection, toutes les souris infectées présentent des lésions visibles macroscopiquement (Tableau VIII). À l'examen histologique, on observe la présence de nombreux débris nécrotiques (Figure 5). Les

TABLEAU VII

Détection du VNT dans différents organes des souriceaux  
nouveau-nés: Immunofluorescence indirecte  
à l'aide de l'antisérum anti-VNT

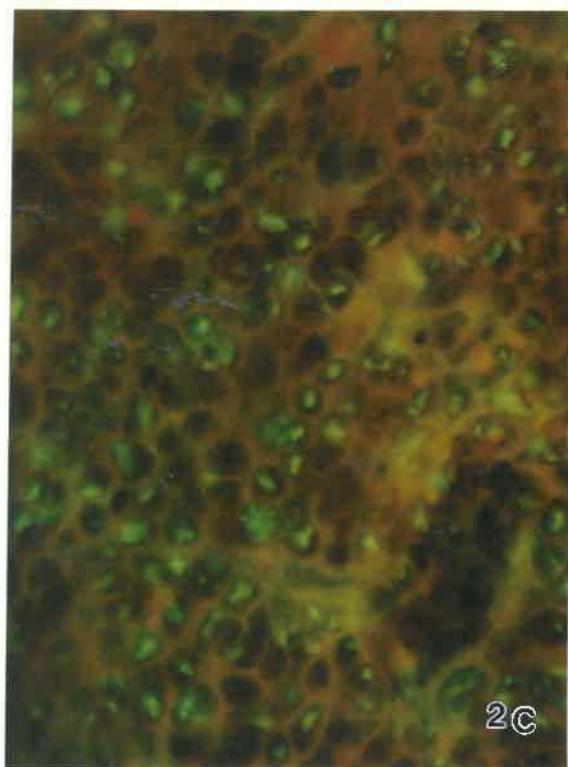
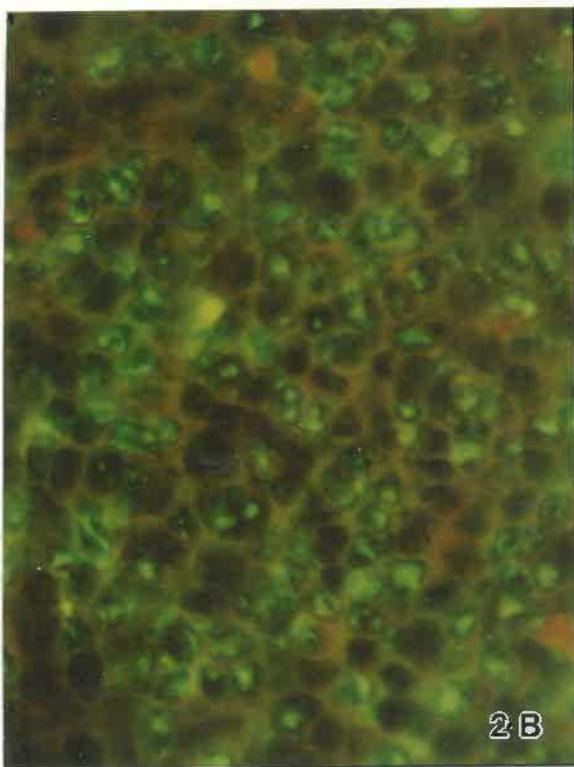
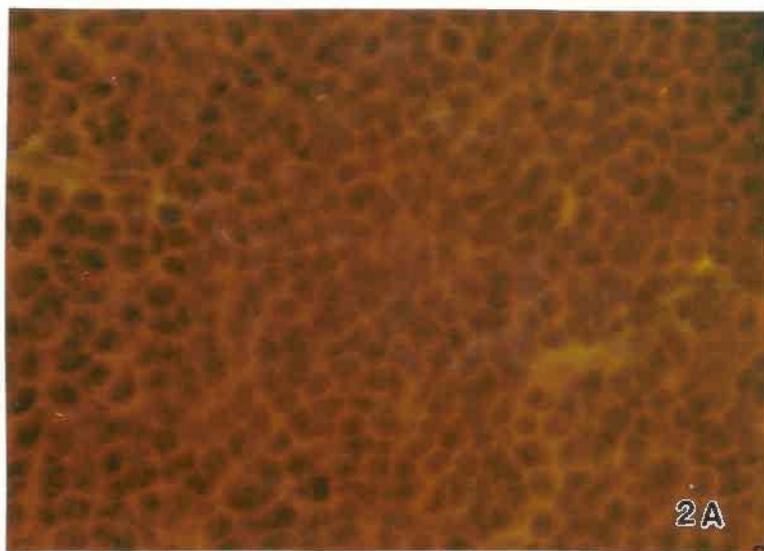
ORGANES	JOURS POST-INFECTION				
	5	7	14	21	56
Thymus	+++ <sup>a</sup>	++++	+++	+++	+
Foie	++	++	++	-	-
Rate	+	++	++++	++	+
Glandes salivaires	-	+	+++	(+) <sup>b</sup>	(+) <sup>b</sup>

a: Le nombre de cellules fluorescentes positives a été évalué de la façon suivante: - / aucune fluorescence à +, ++, +++, ++++ maximum de cellules fluorescentes.

b: Réaction faiblement positive.

**FIGURE 2:        Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au  
                          JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
  
- B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)
  
- C:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'anticorps monoclonal 2D2-D11  
(X500)



**FIGURE 3:      Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au  
JOUR 5 post-inoculation observée par I.P.I.**

- A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X400)
  
- B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT (réaction positive)  
(X400)
  
- C:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'anticorps monoclonal 2D2-D11 (réaction positive)  
(X400)

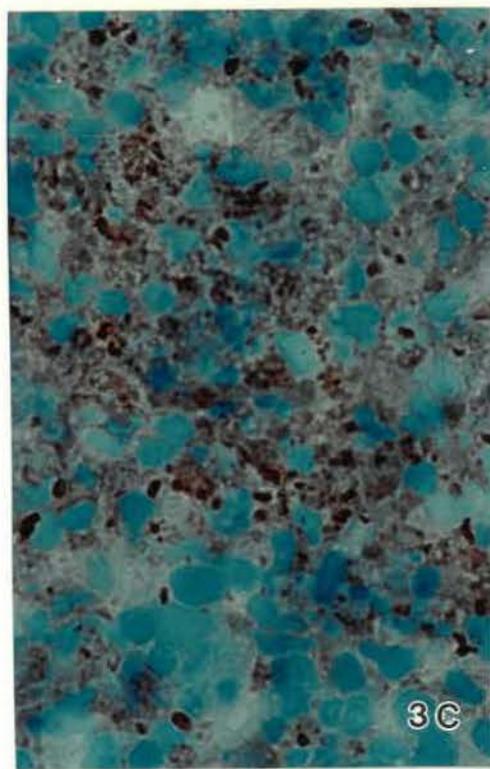
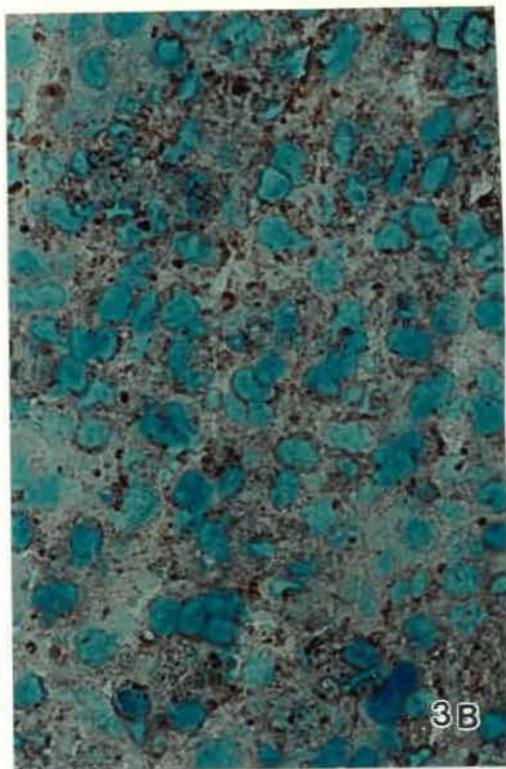
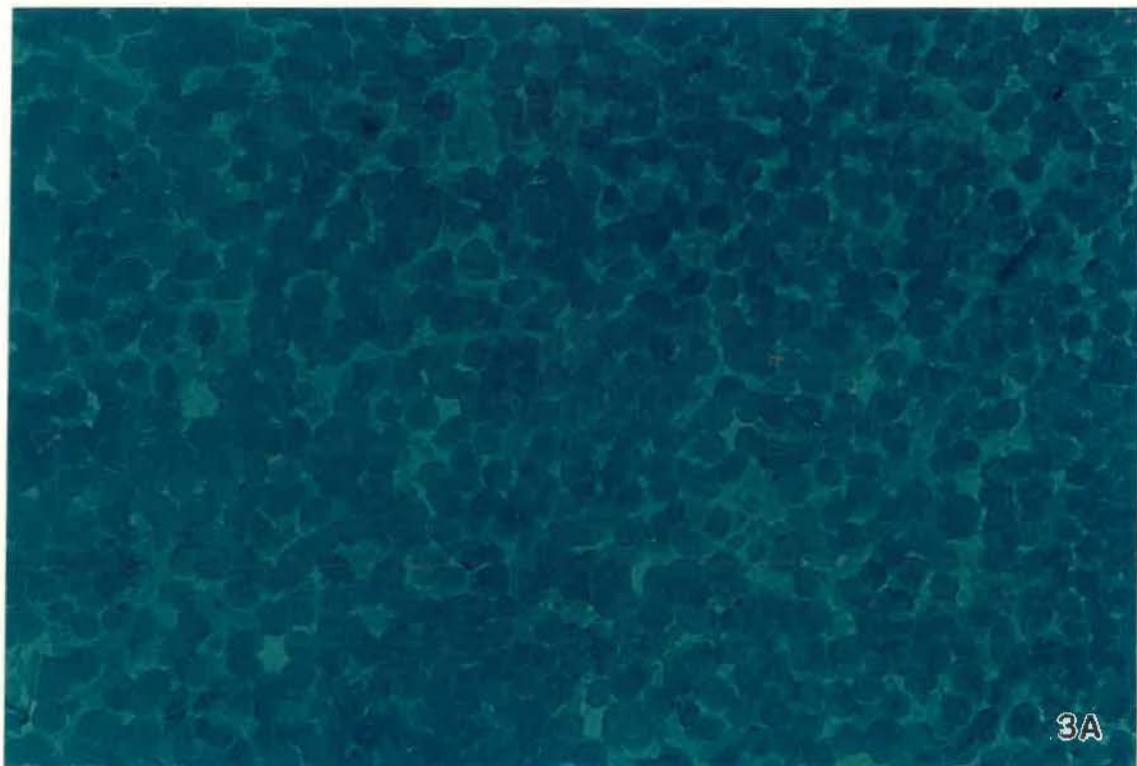


TABLEAU VIII

Pathogénèse du VNT dans le thymus de souriceaux nouveau-nés

		Nécrose du thymus et processus de régénération		
JOURS POST-INFECTION	Détection du VNT par I.F.I.	Nbre de lésions visibles n° positifs n° négatifs	HISTOLOGIE	
			Résultat <sup>a</sup>	Type
3	-	0/3	<sup>b</sup> 000	normale
5	+++	1/3	002	nécrose modérée
7	++++	3/3	444	nécrose très sévère
14	+++	3/3	433	nécrose sévère
21	+++	3/3	442	nécrose sévère
56	+	1/6	000001	lésions granulomateuses

a: La nécrose du thymus est évaluée en fonction du degré des lésions nécrotiques: 0 = normal à 4 = maximum de nécrose.

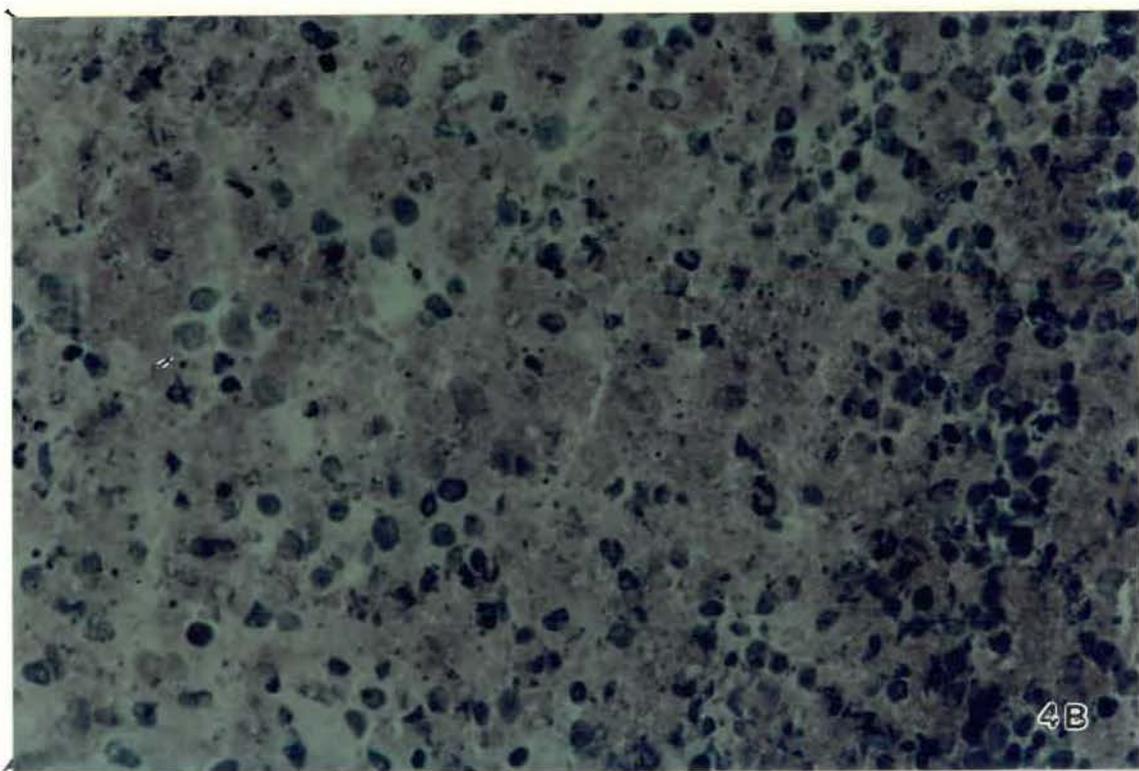
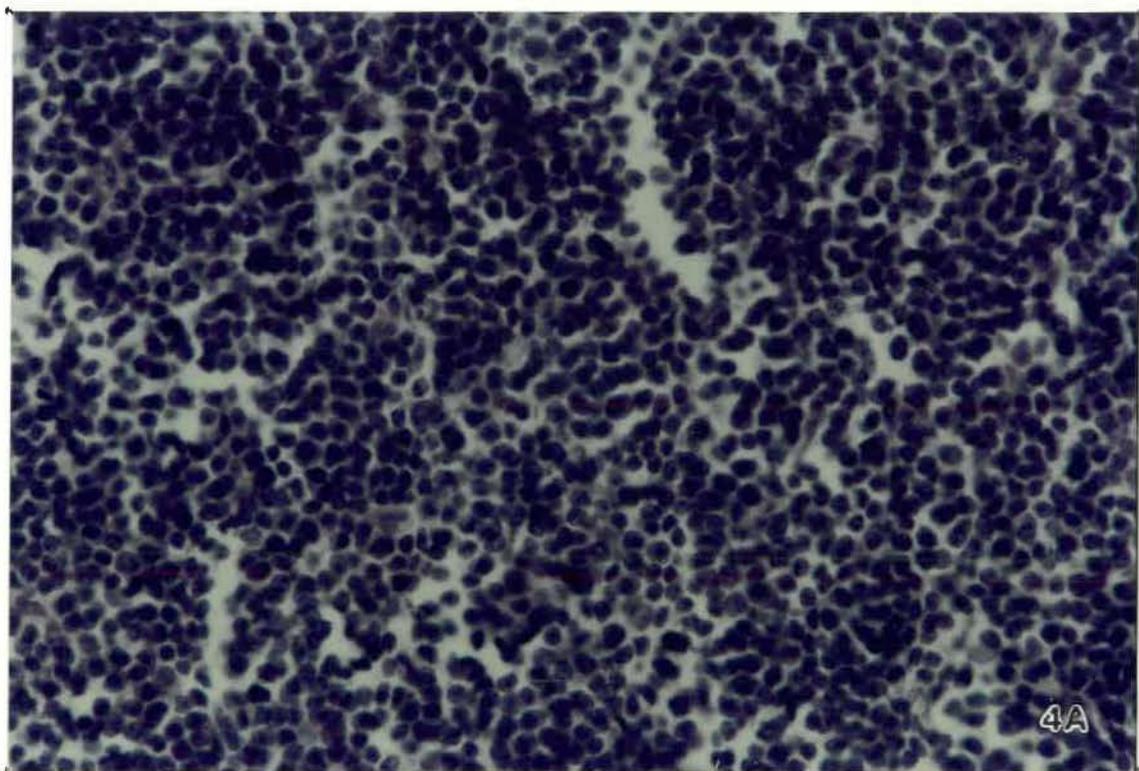
b: chacun de ces résultats d'histologie correspond au thymus prélevé de chaque animal.

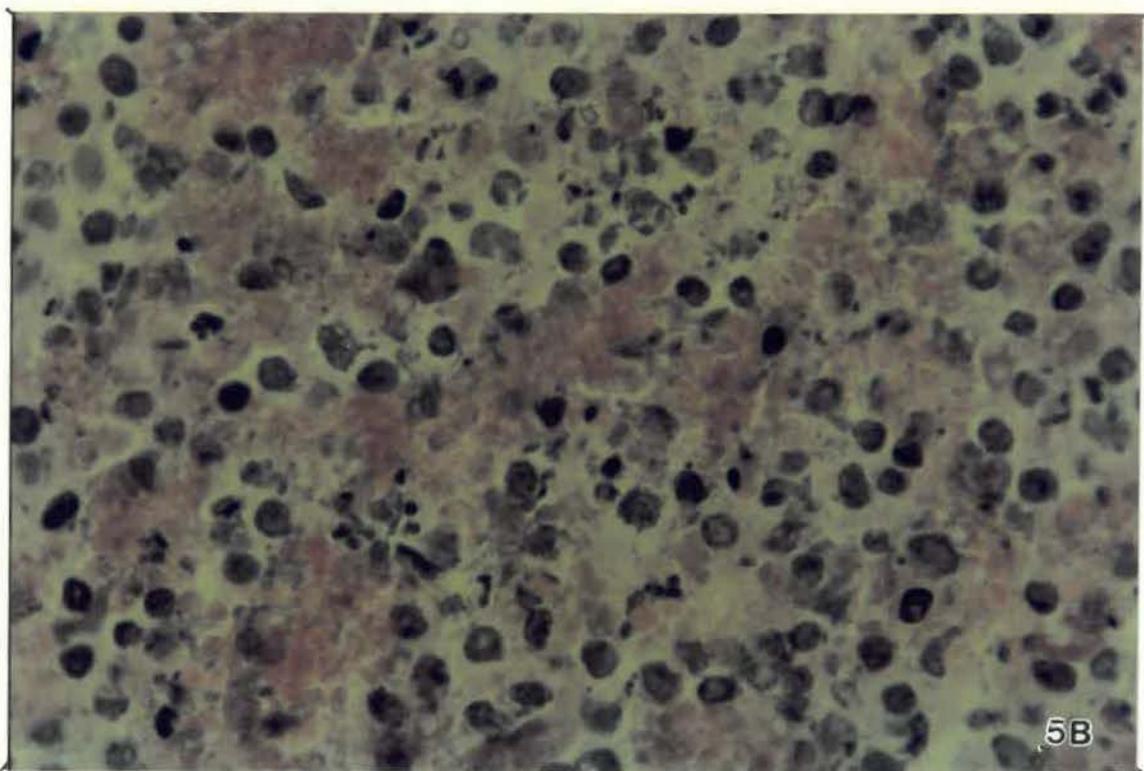
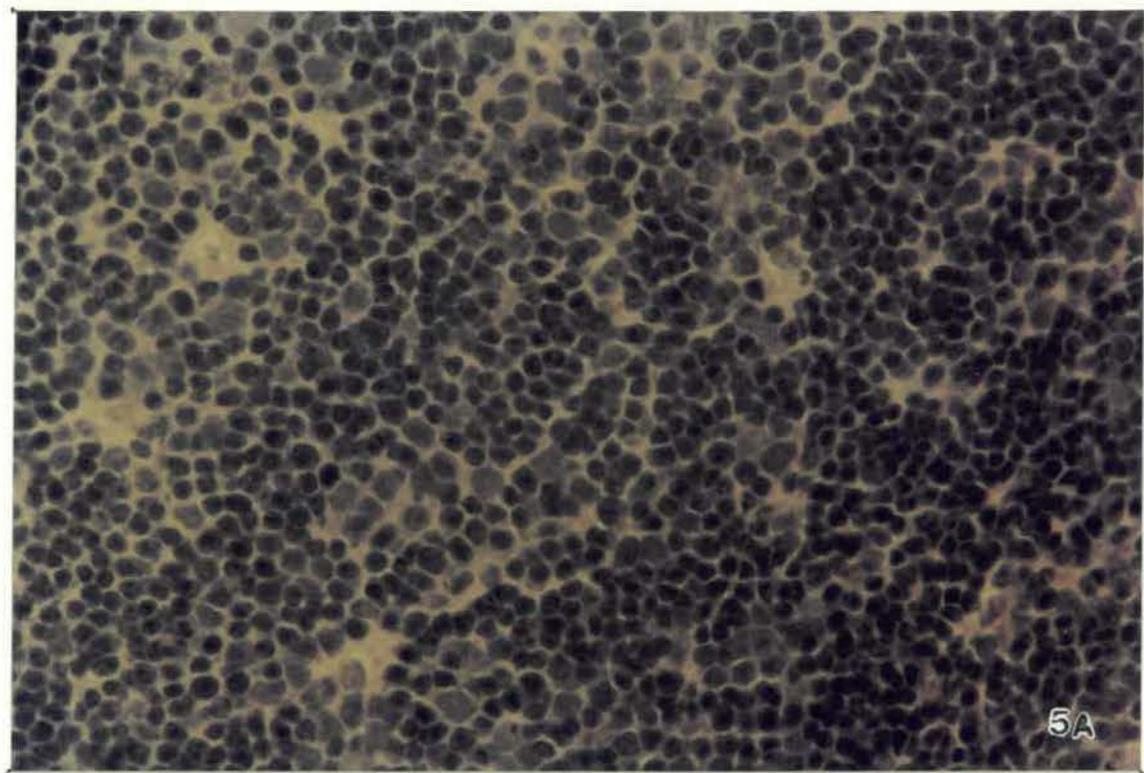
**FIGURE 4: Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au JOUR 5 post-Inoculation observée après coloration à l' H.E.**

**A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé)  
(X400)

**B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté  
(X400)

Nécrose moyennement sévère au niveau de la medulla et  
présence d'inclusions nucléaires dans les thymocytes





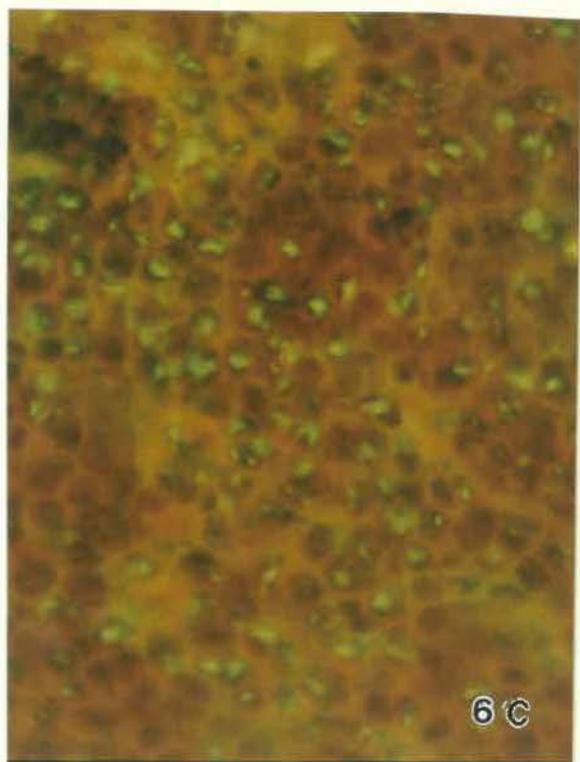
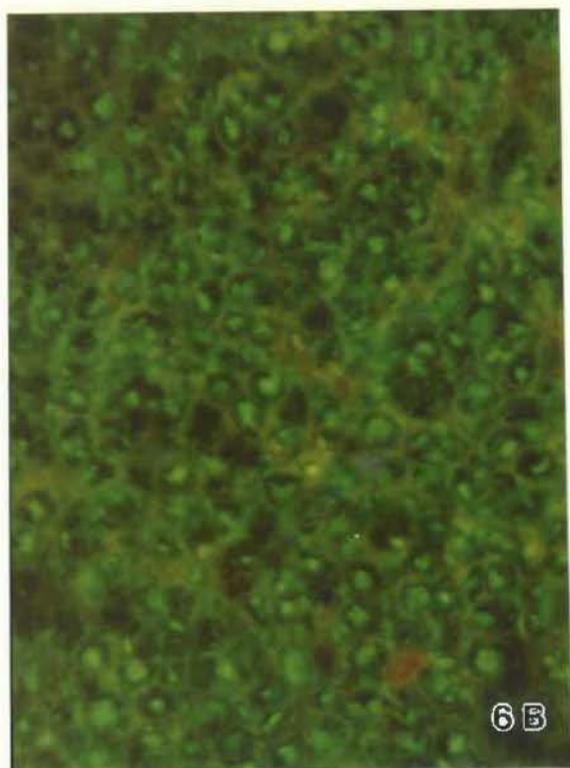
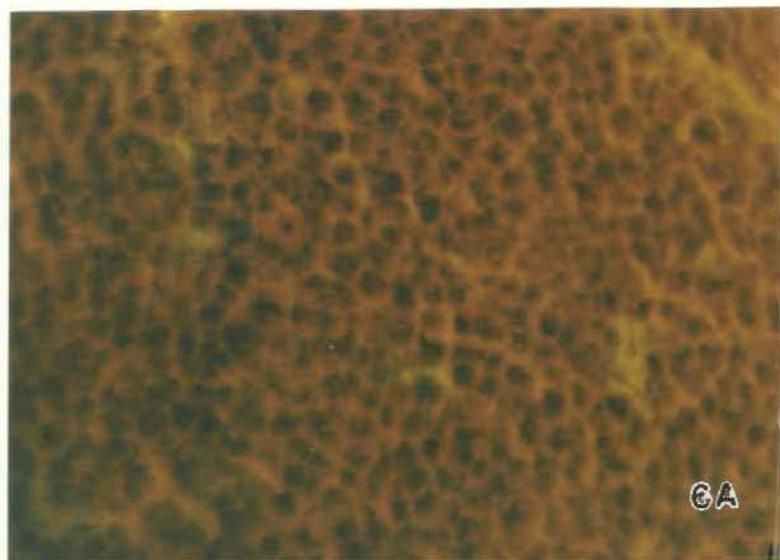
examens en I.F.I. révèlent une fluorescence spécifique de type intra-nucléaire visible tant en présence de l'antisérum que de l'anticorps monoclonal 2D2-D11 (Figure 6). Des résultats similaires sont obtenus avec la technique de streptavidine-biotine caractérisés par la présence d'inclusions nucléaires colorées en brun foncé (Figure 7).

La nécrose se poursuit au jour 14 post-infection où tous les animaux infectés présentent des lésions visibles macroscopiquement (Tableau VIII). La nécrose observée est toujours aussi sévère et la médullaire n'est plus qu'un amas de débris nécrotiques. La Figure 8 présente une coupe de thymus infecté où les lésions histologiques engendrées par le VNT sont évidentes: la section droite de la figure représente une région nécrosée caractérisée par la présence de débris nécrotiques, tandis que la section gauche de la figure présente une région de tissu thymique sain. La fluorescence observée est cependant différente (Figure 9); il s'agit d'une fluorescence cytoplasmique plutôt qu'intranucléaire. Cette fluorescence spécifique n'a pu être détectée qu'en présence de l'antisérum; aucune réaction positive n'a été observée en présence de l'anticorps monoclonal (Tableau IX).

Au jour 21, les trois souris infectées présentaient toutes des lésions visibles, mais à divers degrés (Tableau VIII). La nécrose observée était aussi sévère. Les Figures 10B-10D illustrent l'aspect histologique général du thymus au jour 21 post-infection; le lobe droit est complètement nécrosé dépourvu de thymocytes, par contre, le lobe gauche démontre un tissu thymique en régénérescence avec repopulation partielle des thymocytes (Figure 10C). La fluorescence observée au jour 21 dans la Figure 11 apparaît localisée dans le noyau et le cytoplasme. Cependant, il est plutôt difficile de

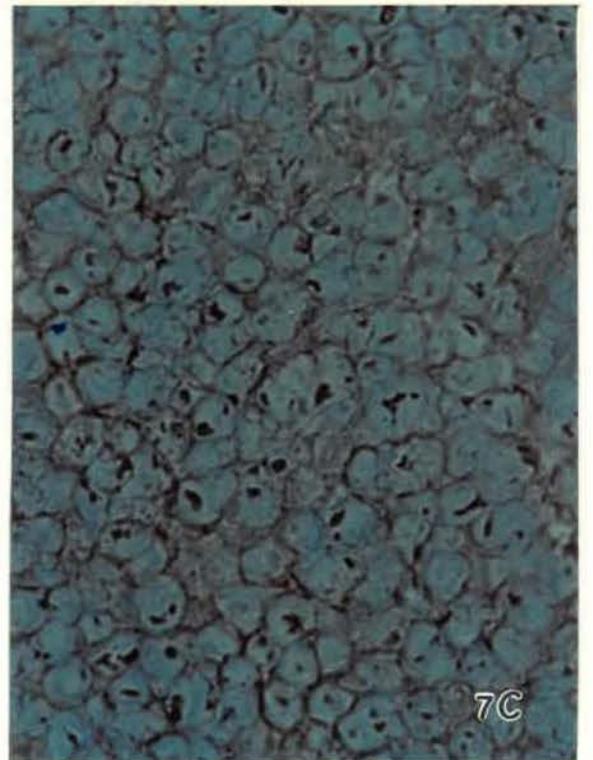
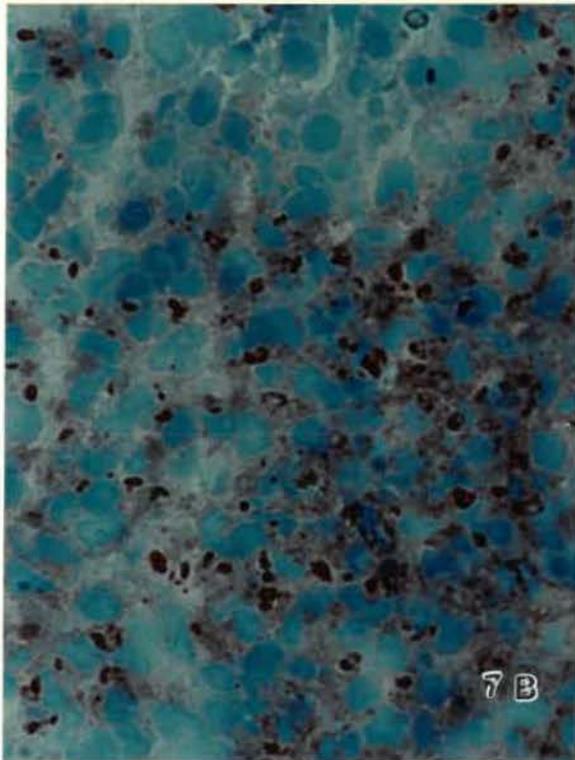
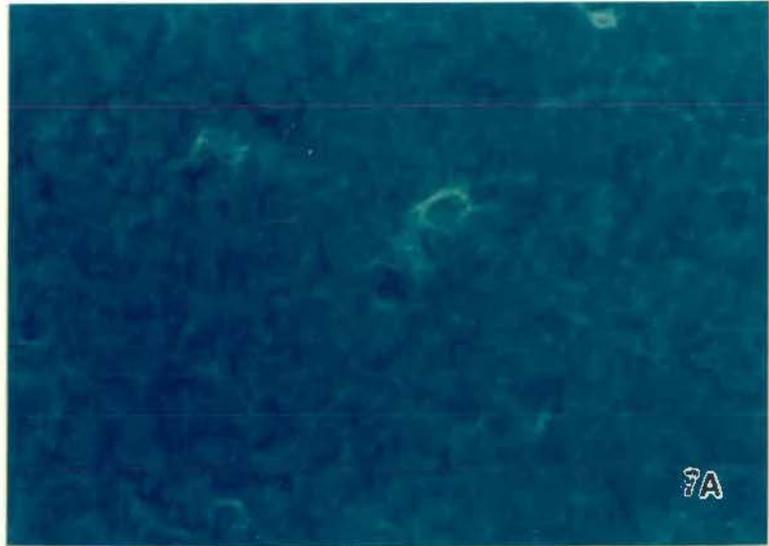
**FIGURE 6:        Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au  
                         JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I.**

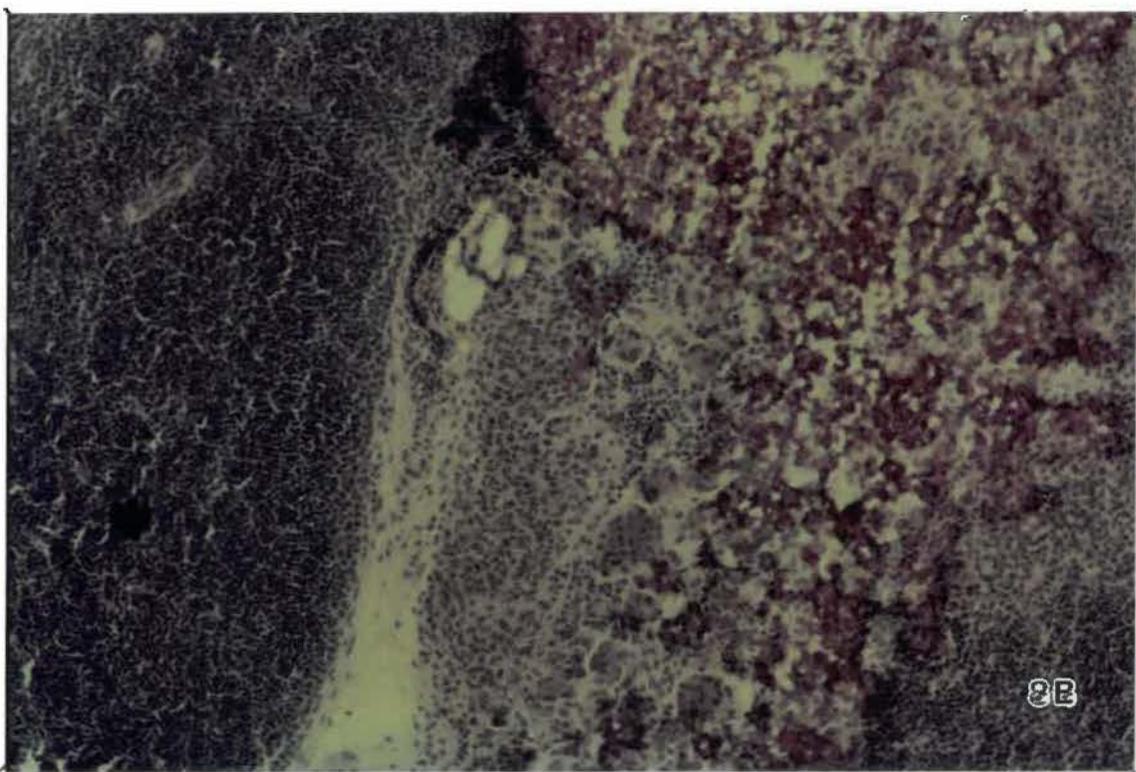
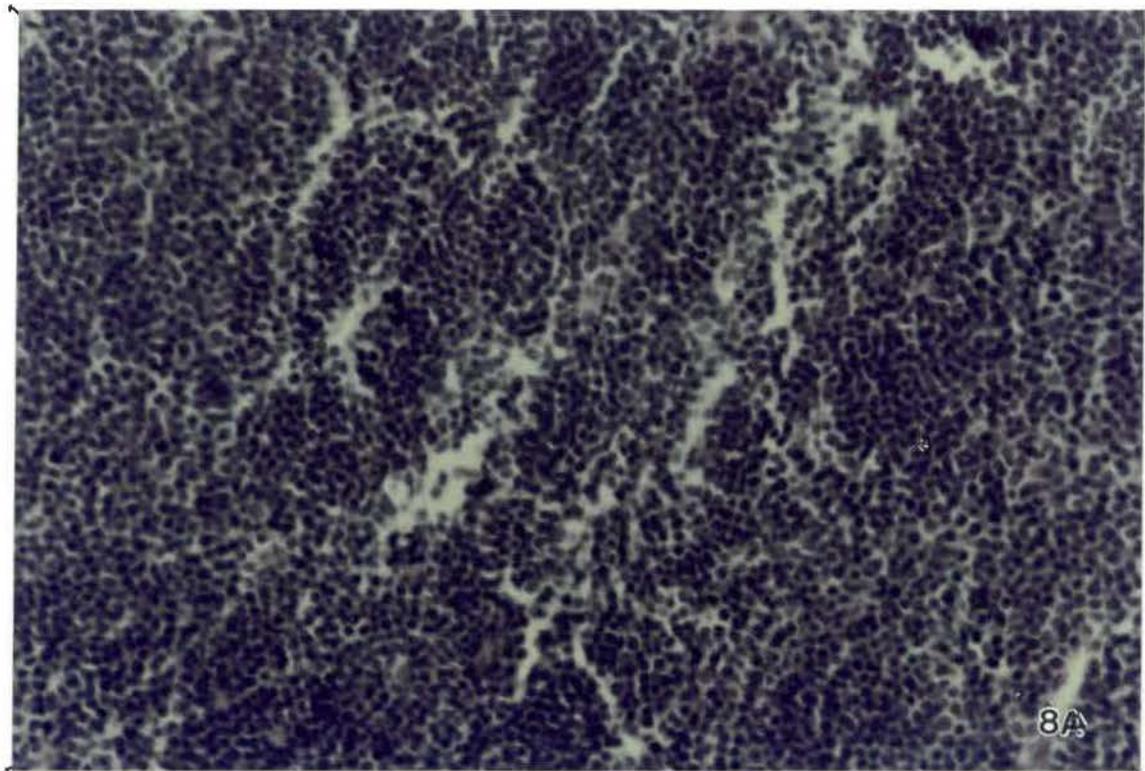
- A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
  
- B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)
  
- C:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'anticorps monoclonal 2D2-D11  
(X500)

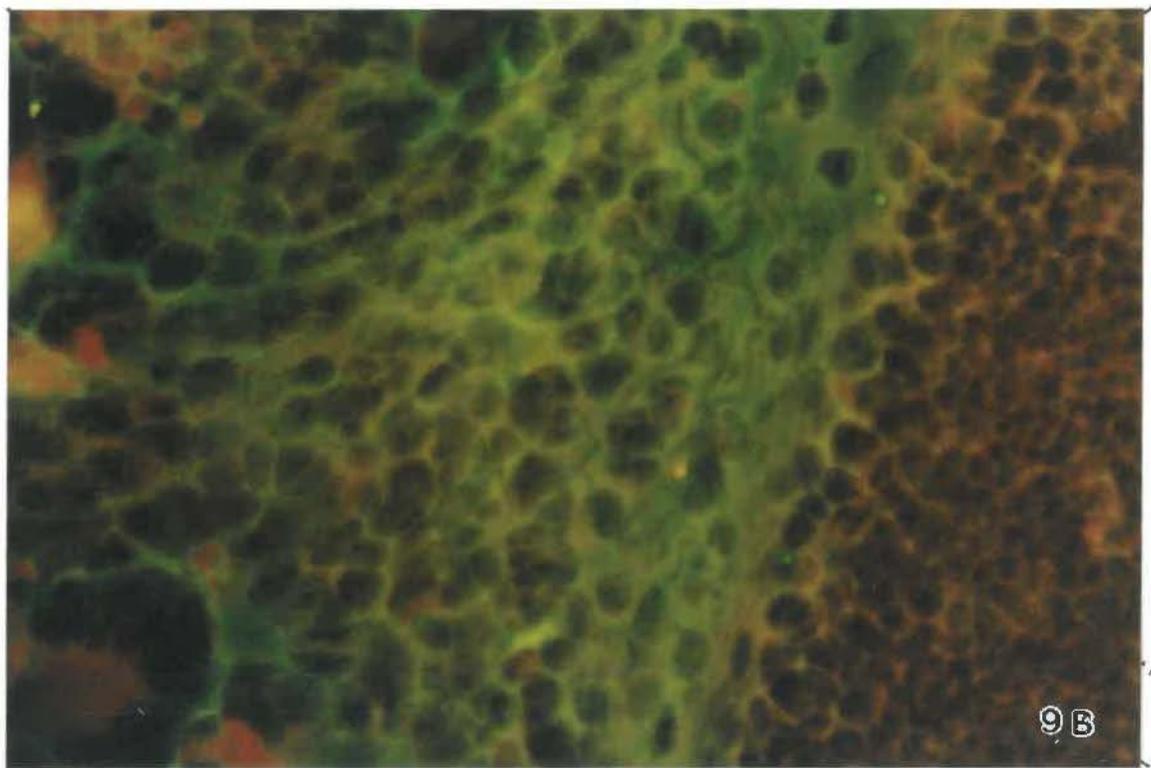
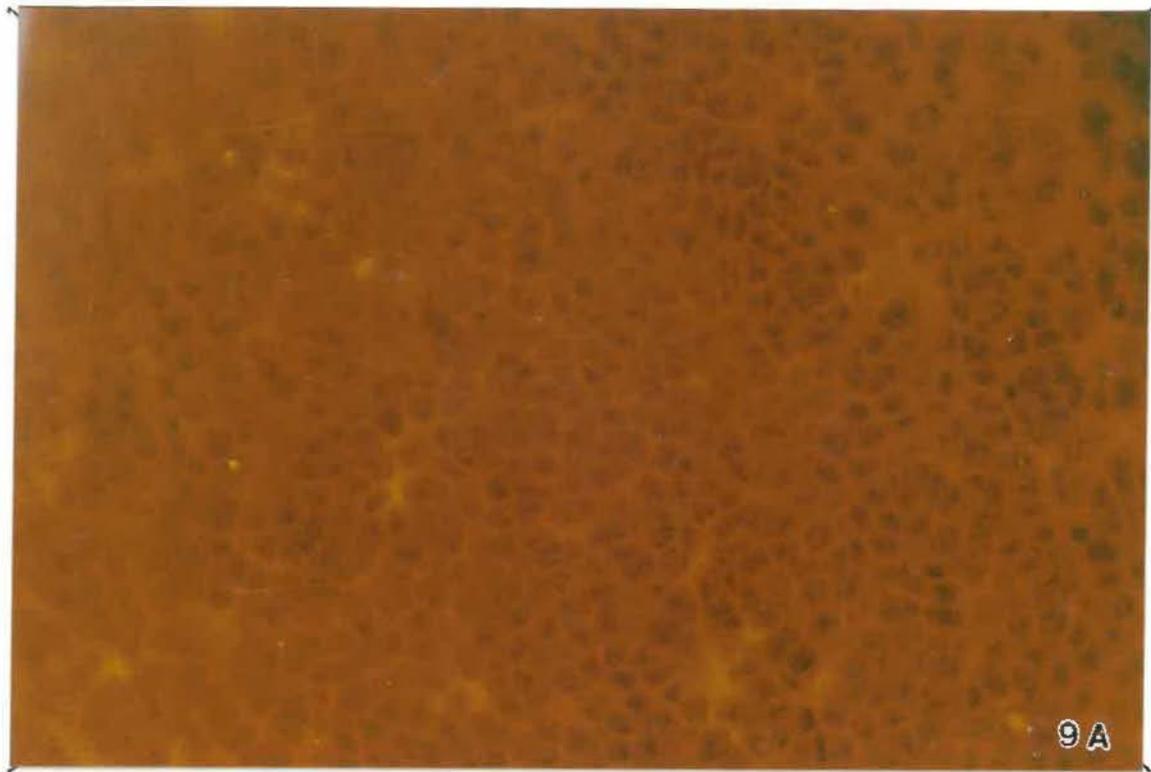


**FIGURE 7:        Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au  
JOUR 7 post-inoculation observée par I.P.I.**

- A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X400)
- B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X400)
- C:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'anticorps monoclonal 2D2-D11  
(X400)







9

0

0

9

0

0

9

**TABLEAU IX**

**Détection du VNT dans différents organes des souriceaux  
nouveau-nés: par immunofluorescence indirecte avec  
l'anticorps monoclonal 2D2-D11**

ORGANES	JOURS POST-INFECTION				
	5	7	14	21	56
Thymus	+++ <sup>a</sup>	++++	-	-	-
Foie	-	-	-	-	-
Rate	-	-	-	-	-
Glandes salivaires	-	-	-	-	-

a: Le nombre de cellules fluorescentes positives a été évalué de la façon suivante: - = aucune fluorescence , à ++++ (fluorescence maximale)

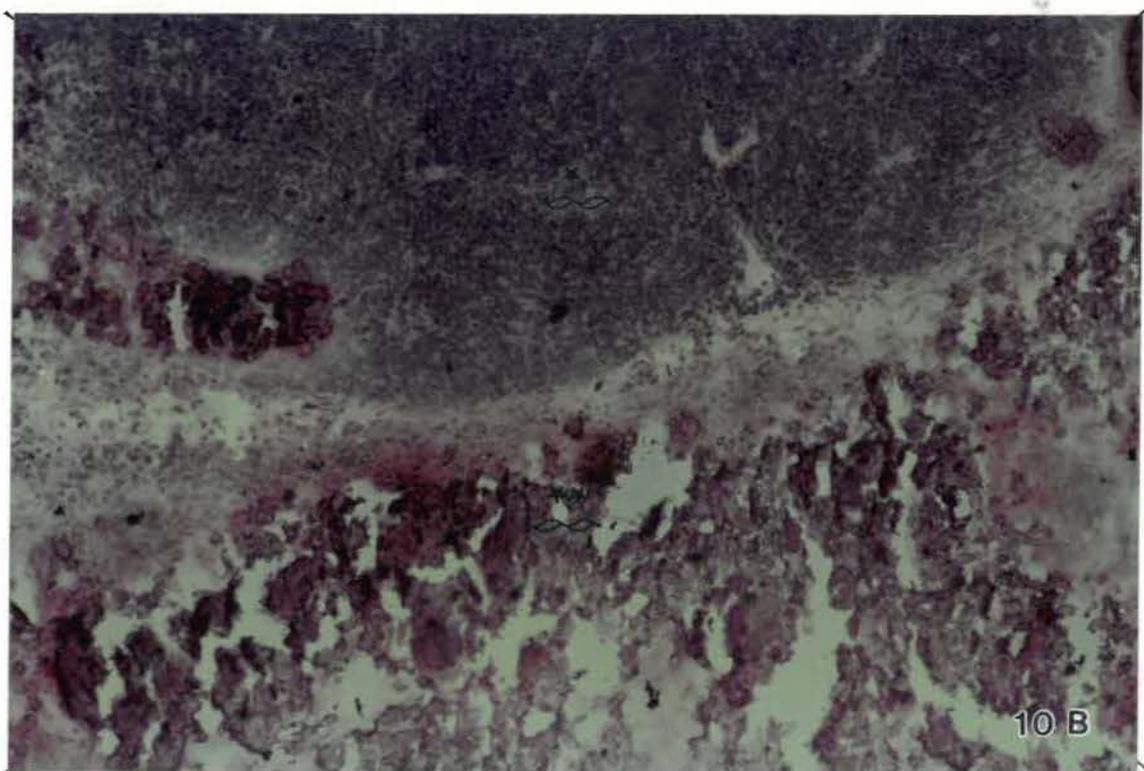
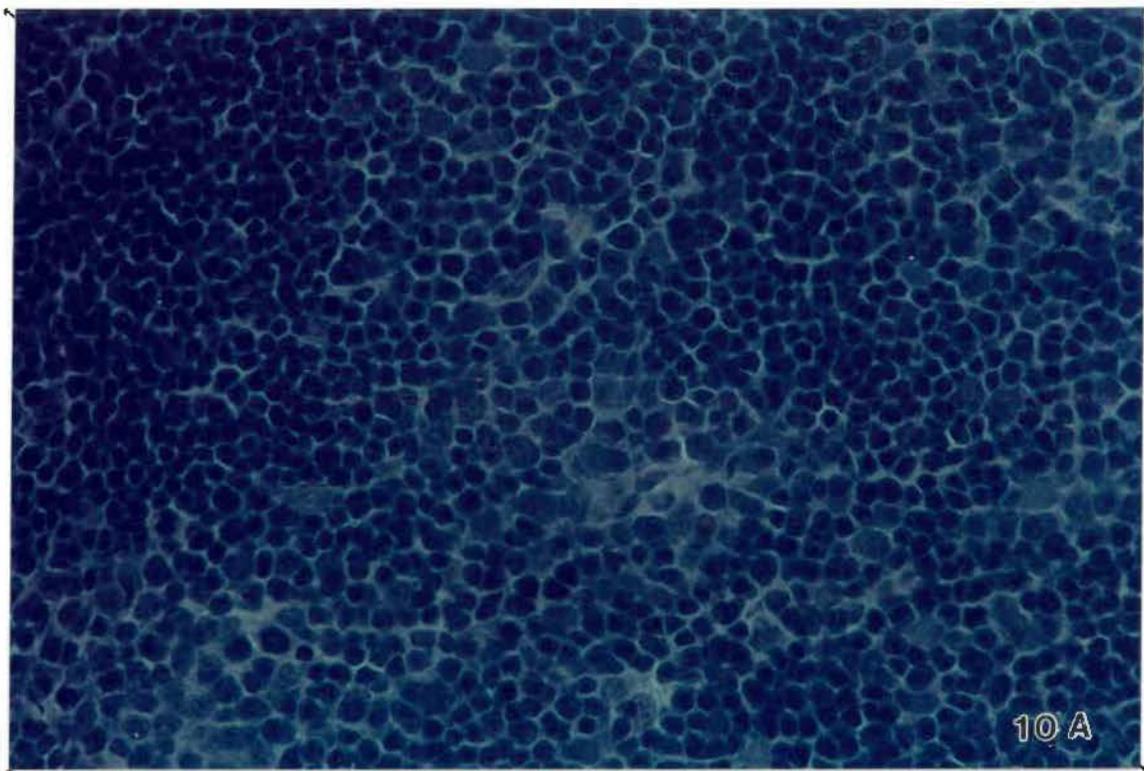
**FIGURE 10: Coupe de thymus de souris nouveaux-nés au JOUR 21 post-inoculation observée après coloration à l' H.E.**

**A:** thymus de souris nouveau-né témoin (non-inoculé)  
(H.E. X630)

**B:** thymus de souris nouveau-né infecté

\* région saine

\*\* région nécrosée  
(H.E. X100)



**FIGURE 10: Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au JOUR 21 post-inoculation observée après coloration à l' H.E (suite).**

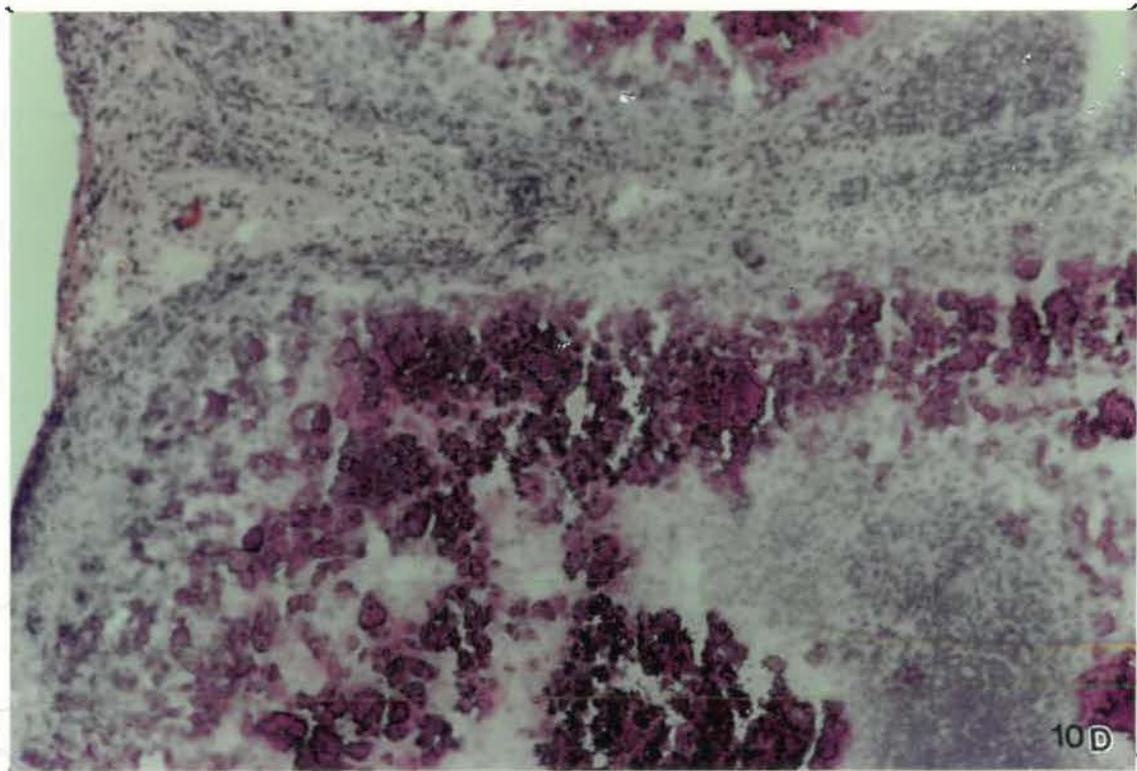
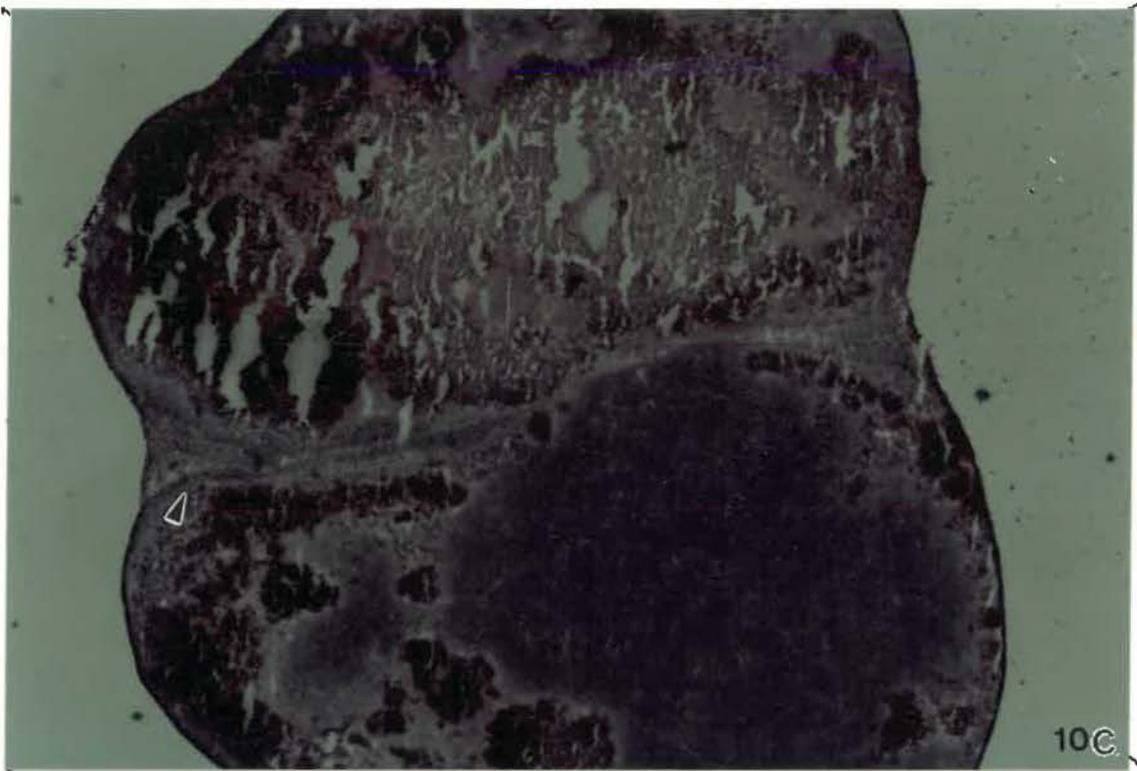
**C:** thymus de souriceau nouveau-né infecté

(▲ : région supérieure du lobe gauche)

Le lobe droit est complètement nécrosé, dépourvu de thymocytes; le lobe gauche démontre un tissu thymique en régénérescence avec repopulation partielle de thymocytes.

(H.E. X25)

**D:** agrandissement de la région supérieure du lobe gauche (zone ▲ de la figure 10C) d'un thymus de souriceau infecté (H.E. X100)





bien interpréter les résultats à cause de l'importance des débris nécrotiques où la fluorescence a tendance à s'attacher de façon non spécifique.

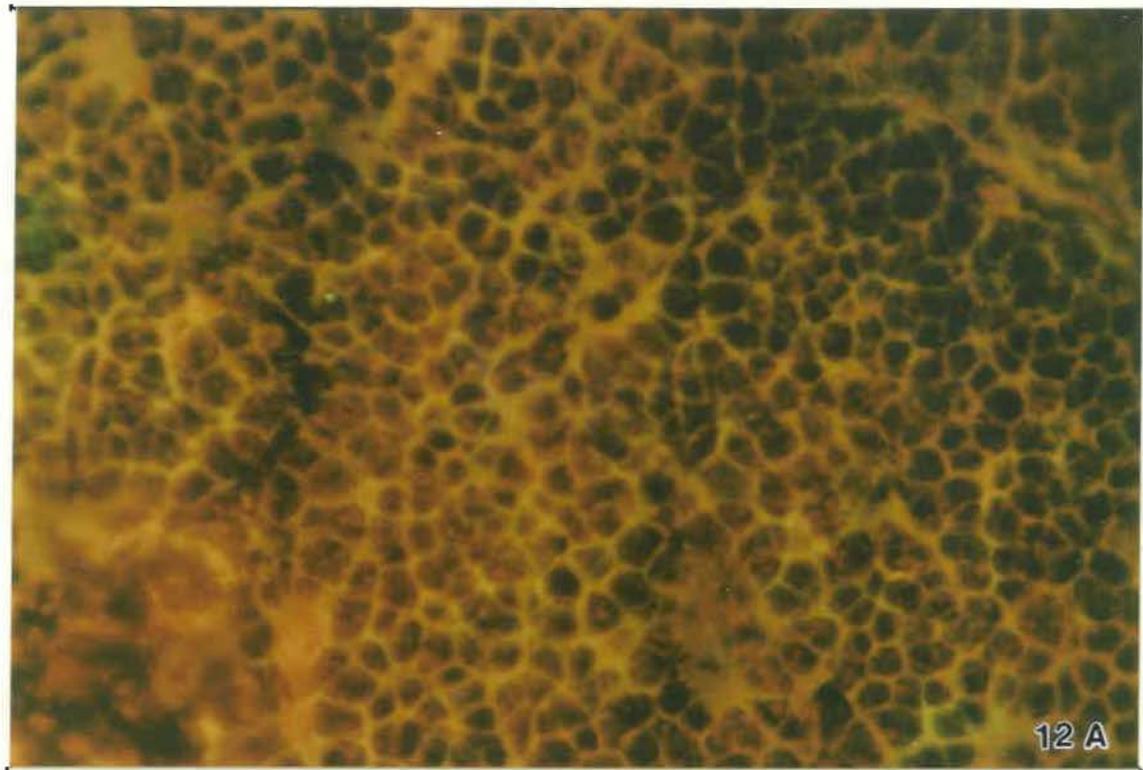
Au jour 56 post-infection, une seule souris des six autopsiées montre de très faibles lésions macroscopiques caractérisées par de petites taches blanchâtres sur le thymus (Tableau VIII). Le virus n'est dépisté qu'à certains endroits et la fluorescence est de type cytoplasmique, détectée uniquement qu'en présence de l'antisérum polyclonal (Figure 12). Du point de vue histologique, les thymus reprennent un aspect morphologique normal; il y a repopulation des thymocytes et aucun signe de nécrose n'est révélé, sinon que certains endroits montrent la présence de lésions granulomateuses (Figure 13).

En résumé, l'Ag viral a été dépisté à tous les jours de prélèvements, à différentes intensités toutefois, au niveau du thymus des souriceaux nouveau-nés et en présence de l'antisérum polyclonal. Quant à l'anticorps monoclonal, il n'a pu détecter le virus qu'aux jours 5 et 7 post-infection (Tableau IX). Le tableau X compare la détection du VNT en présence de l'antisérum polyclonal et de l'anticorps monoclonal.

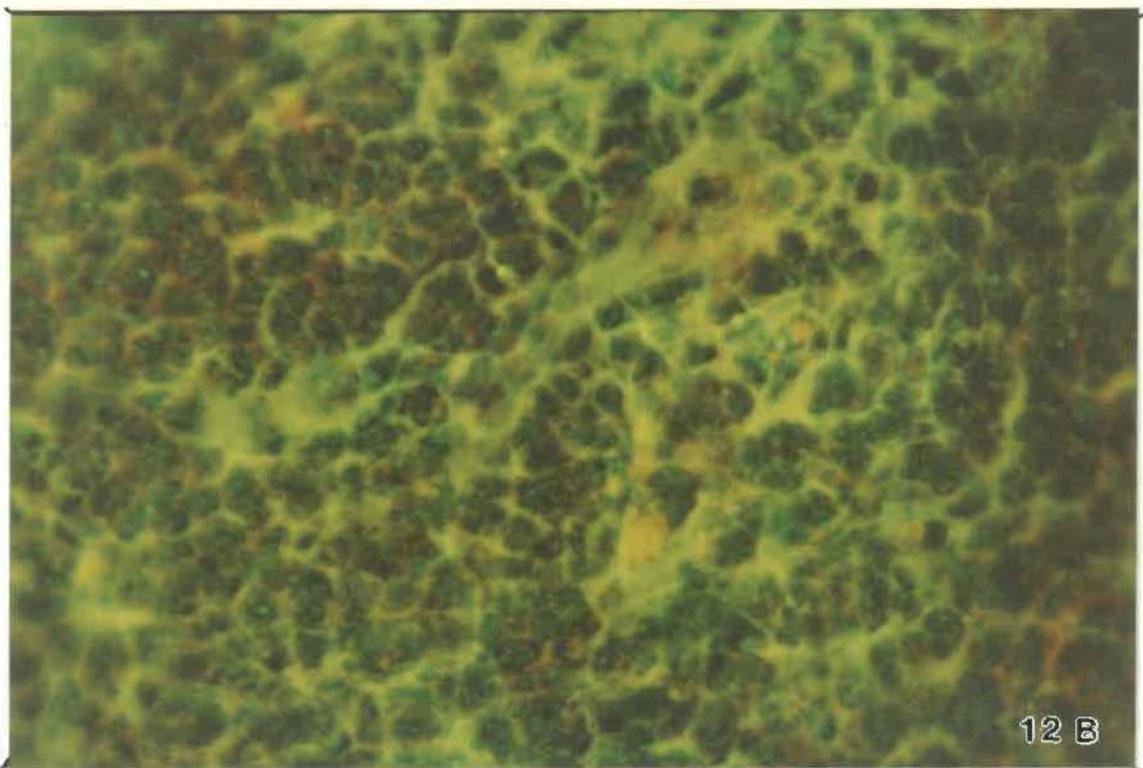
**Foie:** L'Ag viral est détecté dans le foie dès le jour 5 post-infection. La fluorescence est localisée surtout dans les cellules de Kupffer (Figure 14). Par contre, au jour 7, la fluorescence est retrouvée non seulement dans les cellules de Kupffer, mais aussi dans les noyaux des hépatocytes (Figure 15). Cependant, au jour 14 post-infection l'Ag n'est détecté que dans les cellules de Kupffer (Figure 16). Aucun Ag n'a été détecté aux jours 21 et 56 post-infection. Il est à noter que les réactions de détection positive avec l'Ag viral ne

**FIGURE 12: Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au JOUR 56 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



12 A



12 B

**FIGURE 13: Coupe de thymus de souriceaux nouveau-nés au JOUR 56 post-inoculation observée après coloration à l' H.E.**

**A:** thymus de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé)  
(H.E. X400)

**B:** thymus de souriceau nouveau-né infecté  
(H.E. X400)

Repopulation partielle de thymocytes et présence de certaines lésions granulomateuses. ◀

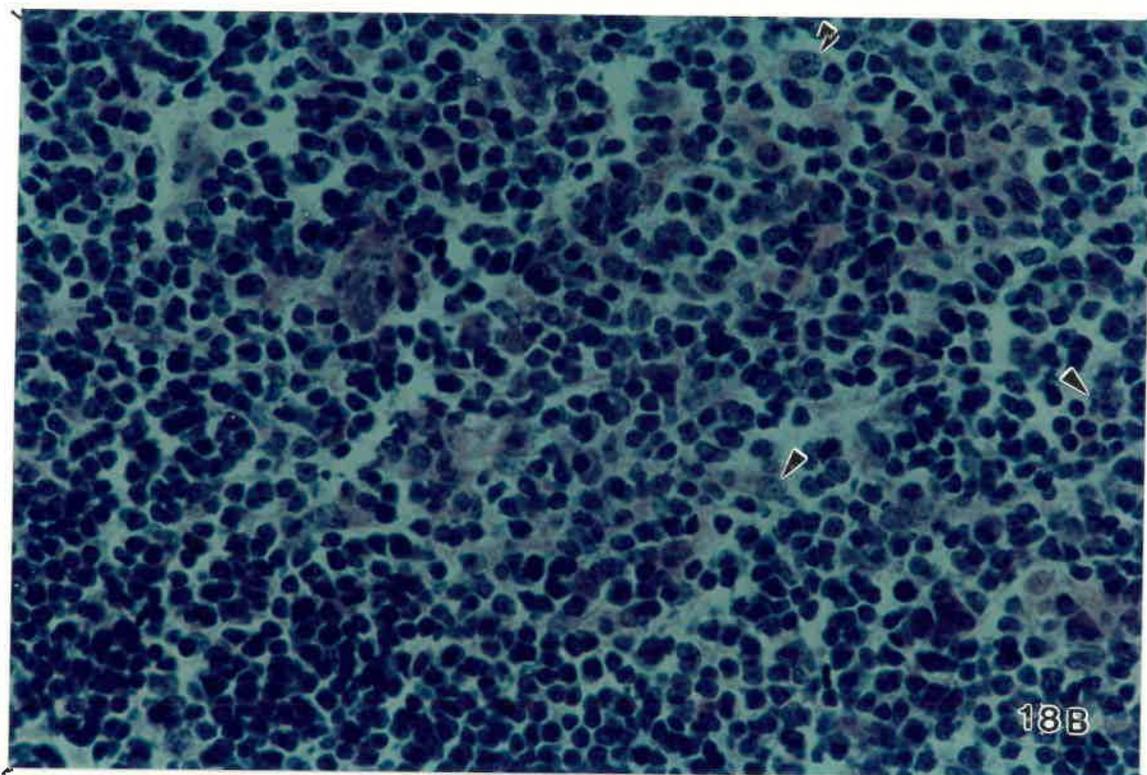
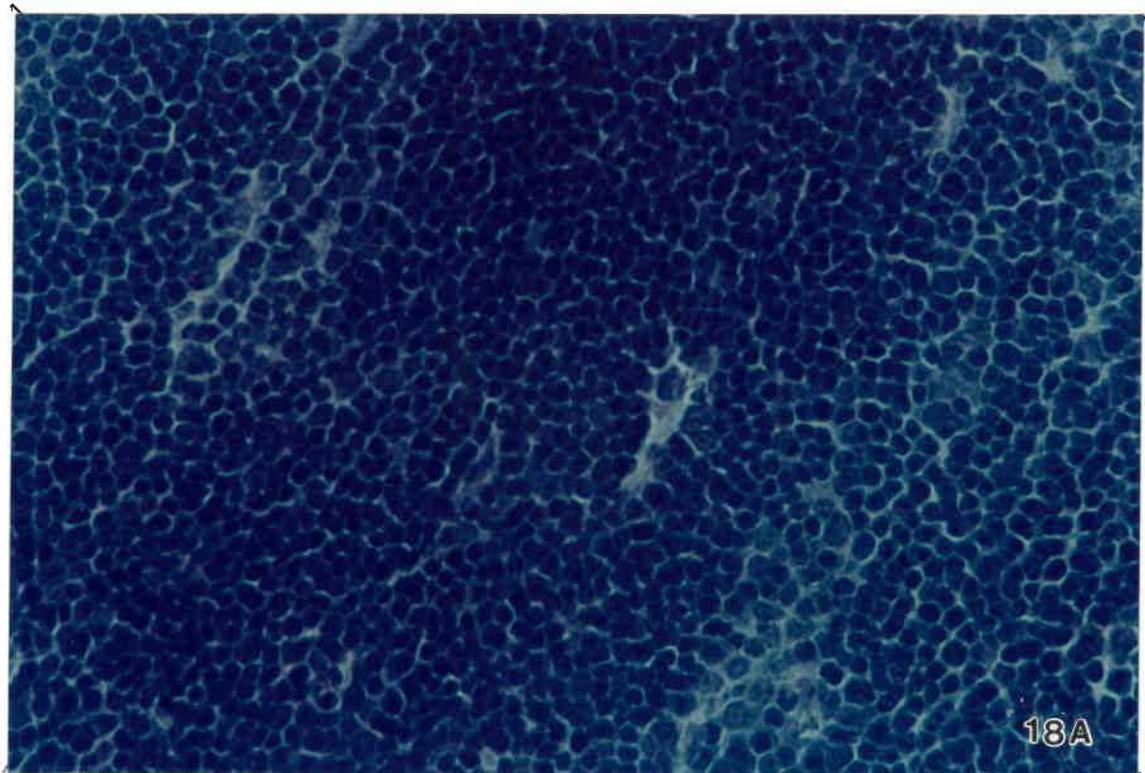


TABLEAU X

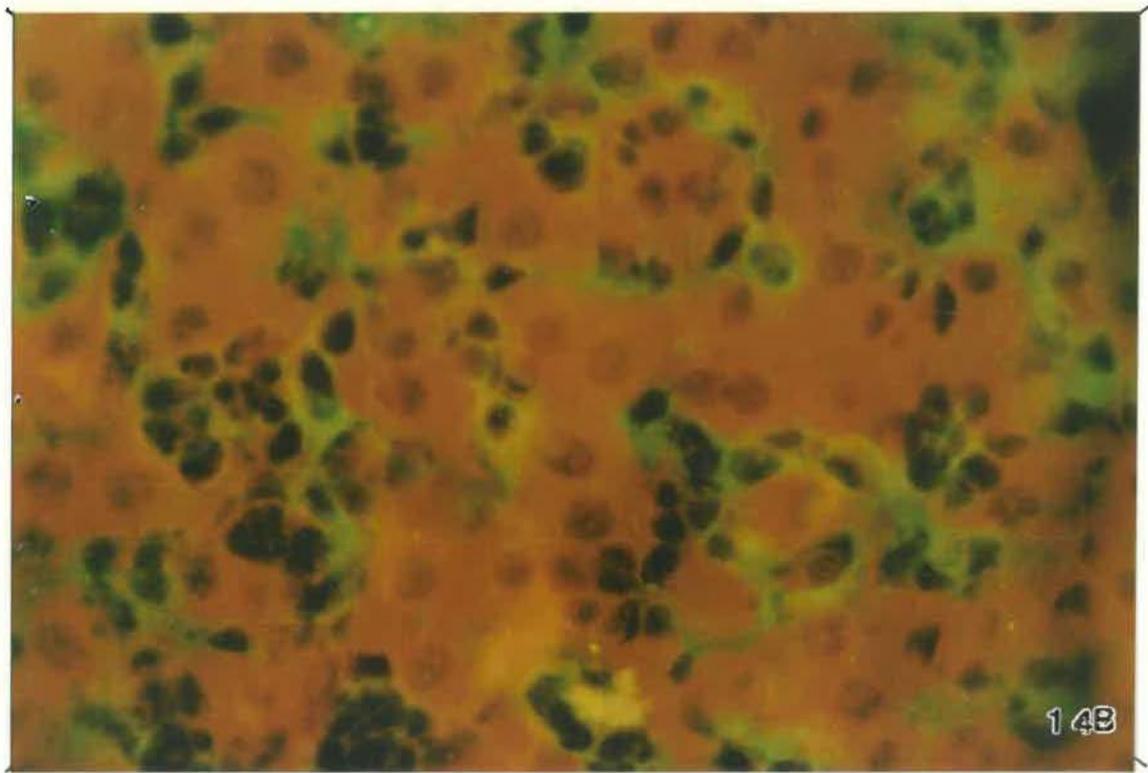
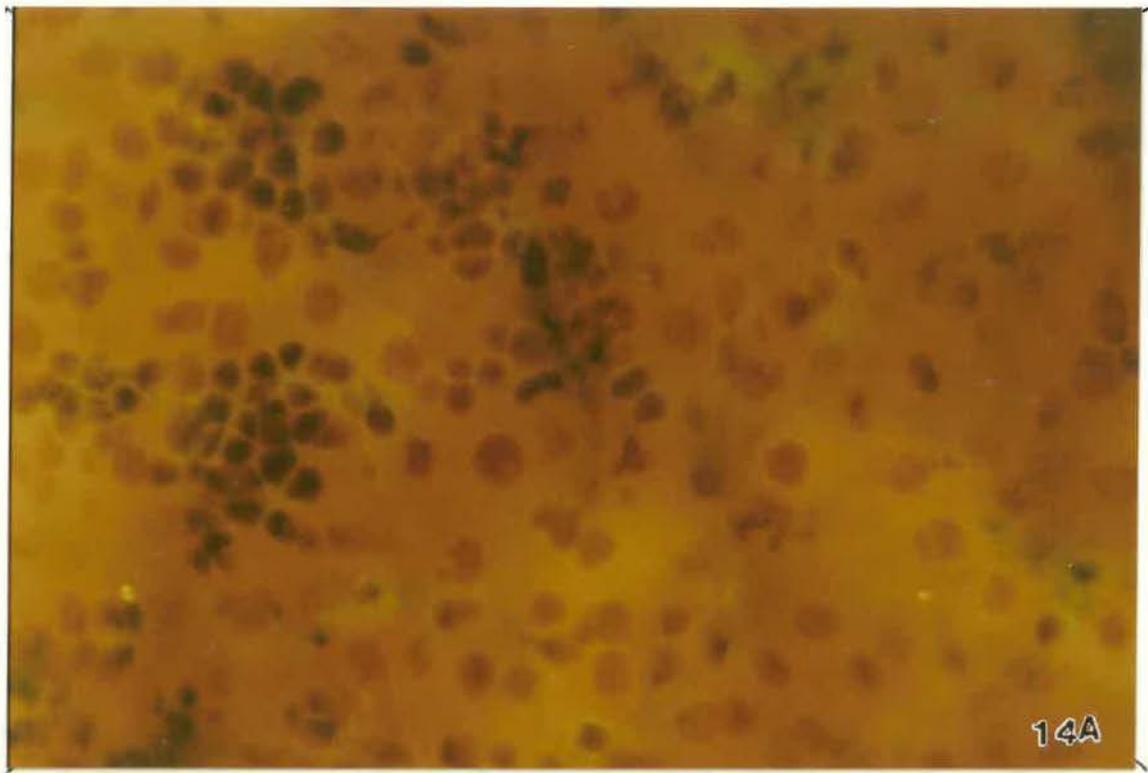
Détection du VNT dans le thymus de souriceaux nouveau-nés  
par immunofluorescence indirecte : comparaison entre l'antisérum  
anti-VNT et l'anticorps monoclonal 2D2-D11

Détection du VNT en présence de:		
Jours post-infection	Ac monoclonal 2D2-D11	Antisérum anti-VNT
5	+++ <sup>a</sup>	+++
7	++++	++++
14	-	+++
21	-	+++
56	-	+

a: Le nombre de cellules fluorescentes positives a été évalué de la façon suivante: - = aucune à ++++ maximum de cellules fluorescentes positives.

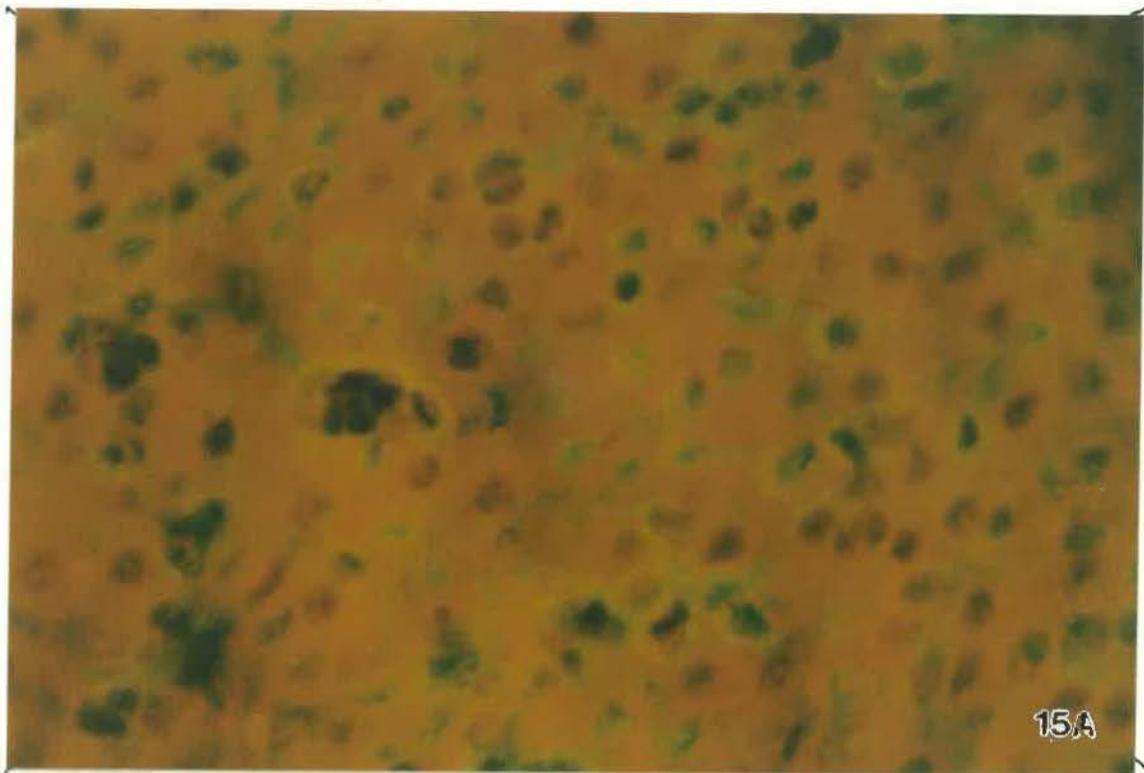
**FIGURE 14: Coupe de foie de souris nouveaux-nés au JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** foie de souris nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
  
- B:** foie de souris nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)

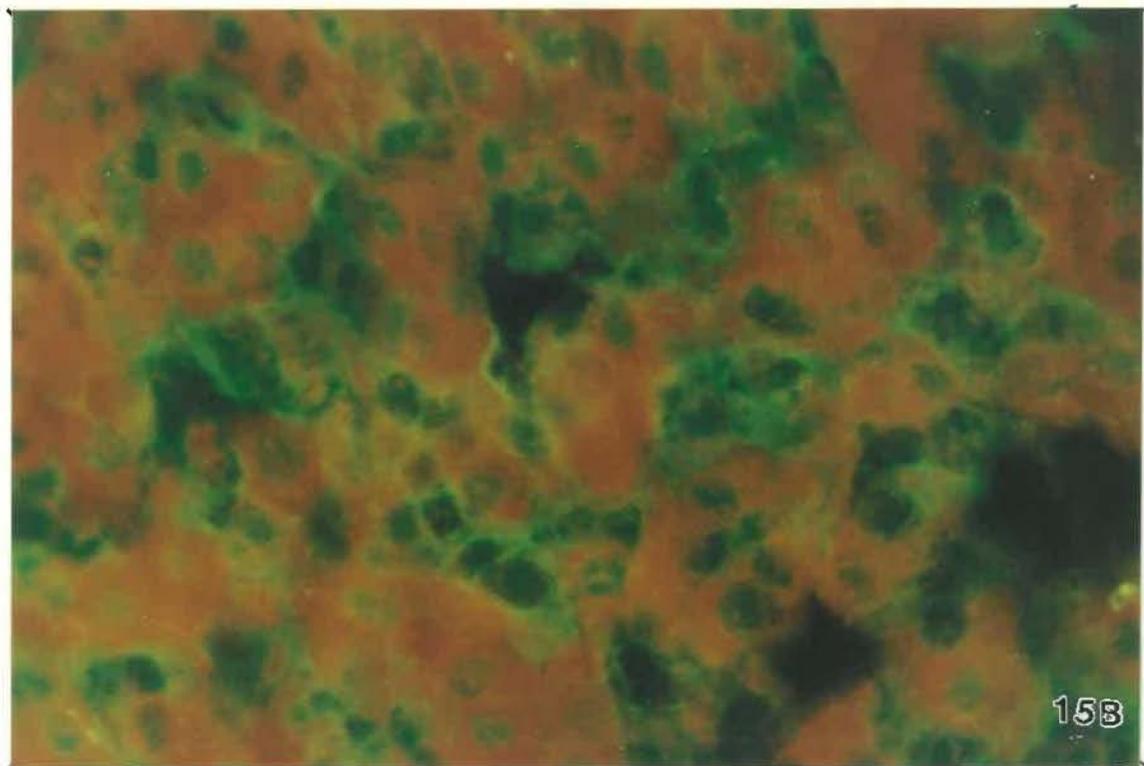


**FIGURE 15: Coupe de foie de souriceaux nouveau-nés au JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I.**

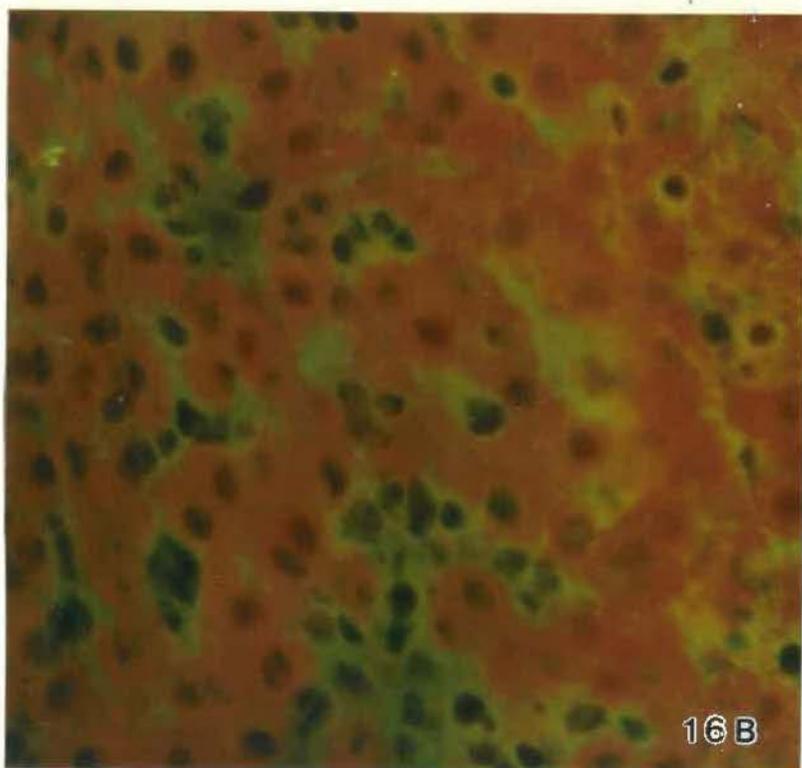
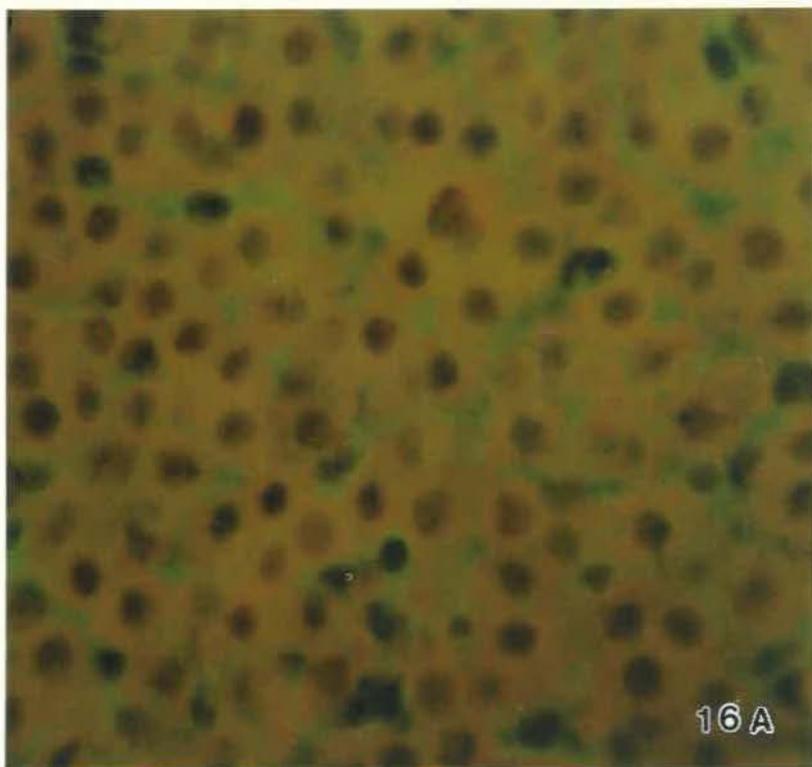
- A:** foie de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** foie de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



15A



15B



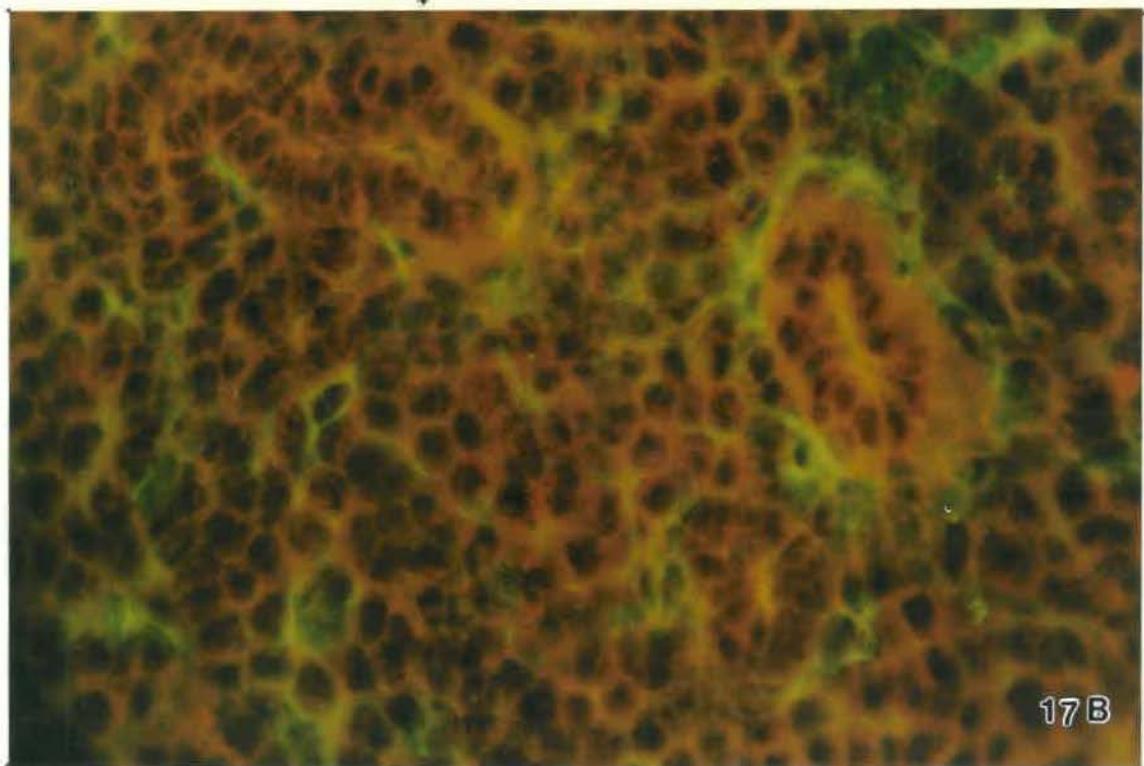
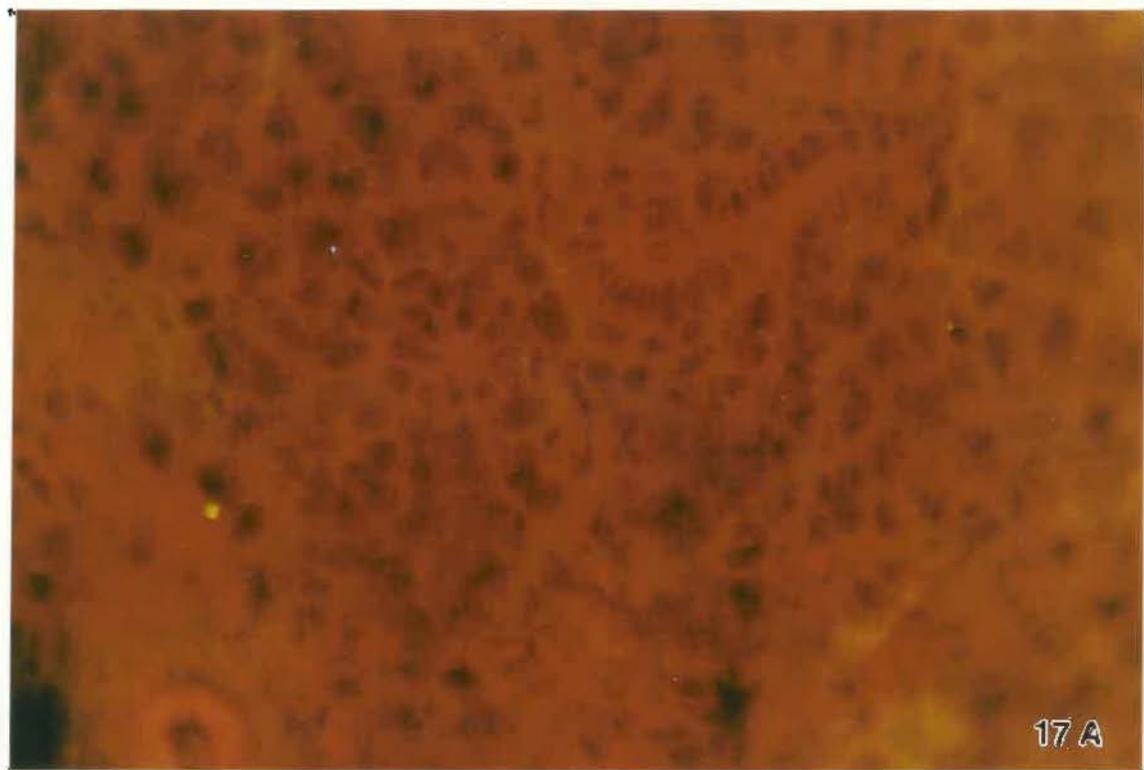
sont révélées qu'en présence de l'antisérum et qu'aucune fluorescence positive n'est observée en présence de l'anticorps monoclonal 2D2-D11 (Tableau IX). D'autre part, les études histologiques des foies des souriceaux infectés ne démontrent aucune anomalie morphologique.

**Glandes salivaires:** La présence de l'Ag viral est détectée dans les glandes salivaires dès le jour 7 post-infection. Cette fluorescence est de type cytoplasmique; elle est localisée au niveau des cellules épithéliales de la glande parotide (Figure 17). Au jour 14, la présence de virus est encore décelée au niveau des cellules épithéliales de la glande parotide (Figure 18B-18C) et de la glande sublinguale (Figure 18D). L'Ag viral n'est encore détecté qu'en présence de l'antisérum seulement. Quant aux jours 21 et 56 (Figures 19 et 20), les résultats obtenus nous permettent difficilement d'interpréter avec certitude la présence du virus étant donné la faible fluorescence et la morphologie initiale mal conservée. Toutefois, les examens histologiques de ces glandes salivaires ne démontrent aucune lésion.

**Rate:** L'Ag viral a été détecté à tous les jours de prélèvements et la fluorescence observée était toujours cytoplasmique (Tableau VII). La présence de l'Ag viral est identifiée dès le jour 5 post-infection (Figure 21) où la fluorescence cytoplasmique est émise au niveau des sinusoides spléniques dans la pulpe rouge, ainsi qu'au jour 7 post-infection (Figure 22). Cependant, c'est au jour 14 post-infection (Figure 23) que l'on observe une fluorescence maximale dans la pulpe rouge. Au jour 21 post-infection (Figure 24), l'Ag viral est maintenant visible au niveau du tissu lymphoïde de la pulpe blanche où il demeurera présent jusqu'au jour 56 post-infection (Figure 25).

**FIGURE 17: Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés au JOUR 7 post-Inoculation observée par I.F.I.**

- A:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



**FIGURE 18: Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT. (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT (canal sécréteur au niveau de la glande parotide).  
(X500)



**FIGURE 18: Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I. (suite).**

**C:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT. Tissu séreux au niveau de la glande parotide  
(X500)

**D:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT

\* tissu muqueux de la glande sublinguale

\*\* tissu séreux de la glande parotide  
(X500)



**FIGURE 19**      **Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés au JOUR 21 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
  
- B:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



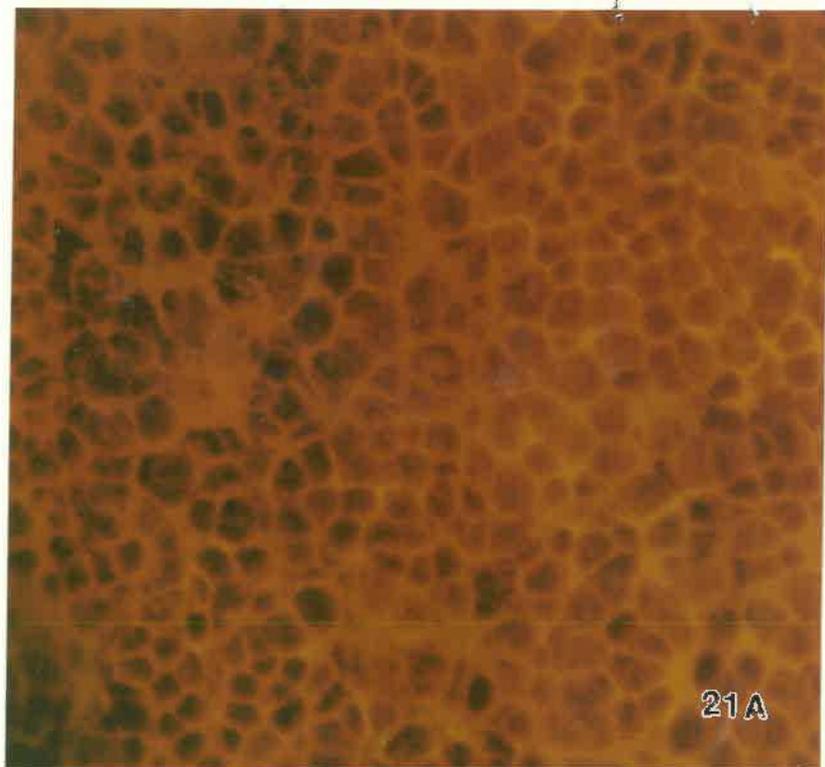
**FIGURE 20: Coupe de glandes salivaires de souriceaux nouveau-nés au JOUR 56 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** glandes salivaires de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)

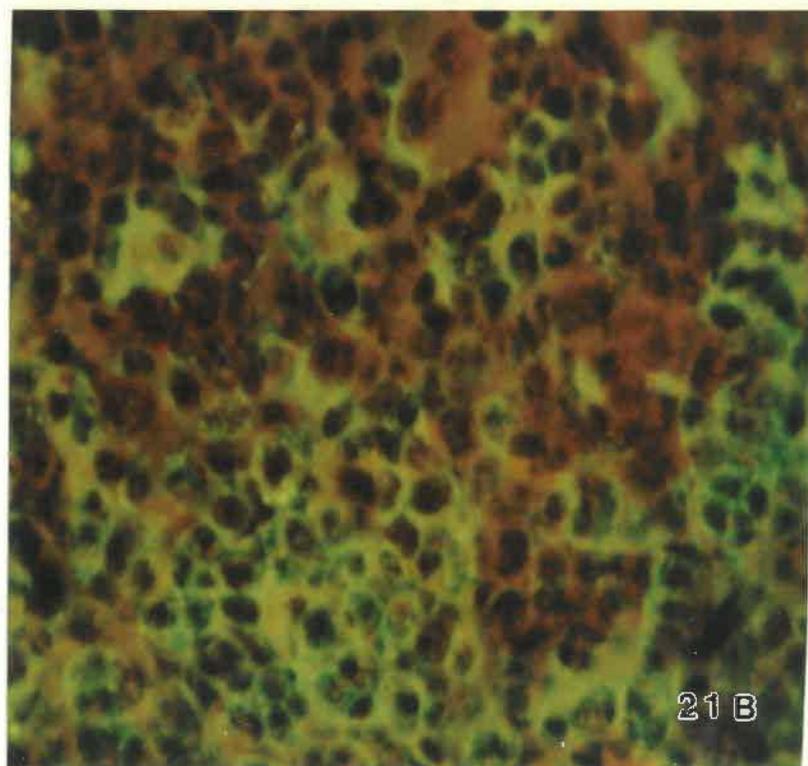


**FIGURE 21: Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés au JOUR 5 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** rate de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** rate de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



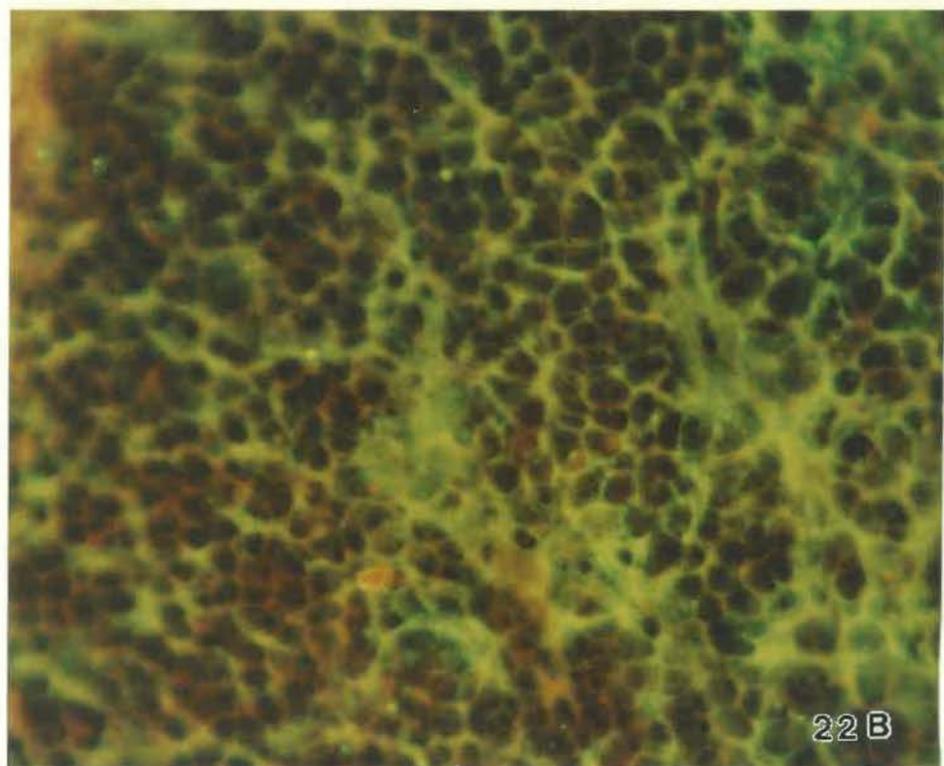
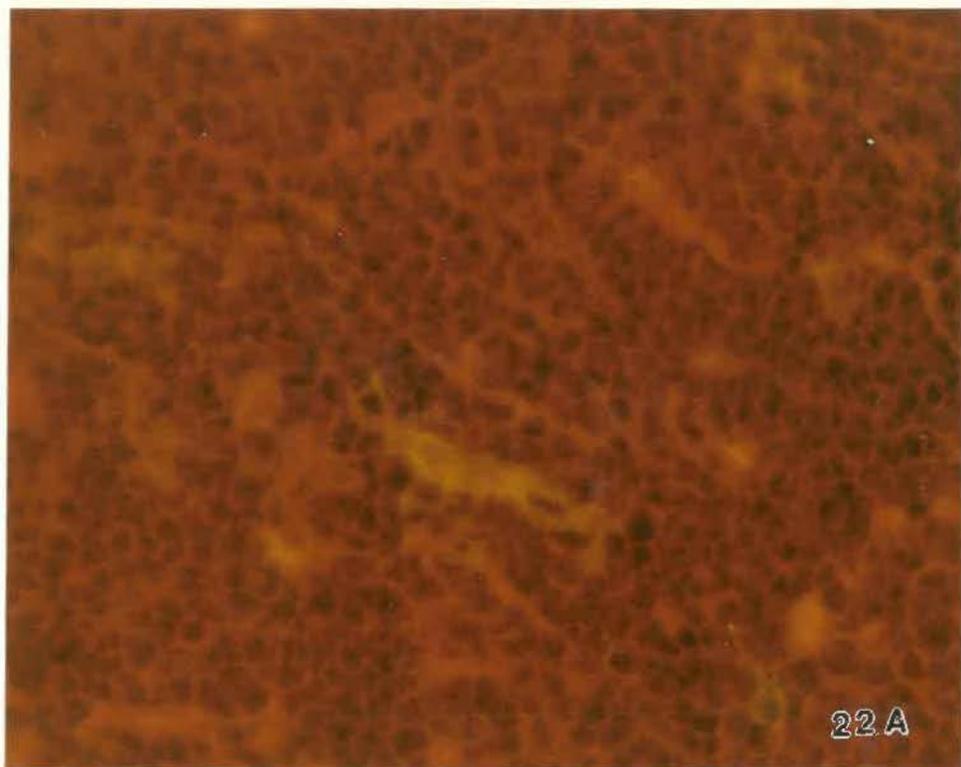
21A



21B

**FIGURE 22: Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés au JOUR 7 post-inoculation observée par I.F.I.**

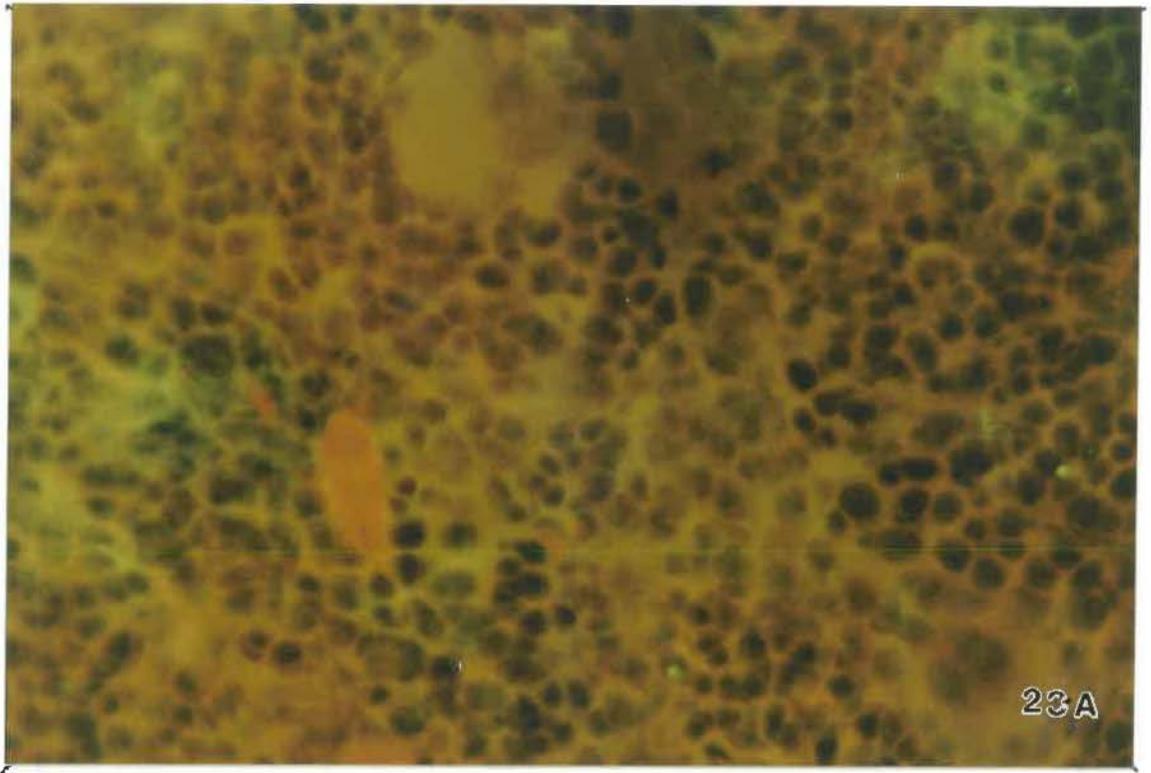
- A:** rate de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** rate de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)



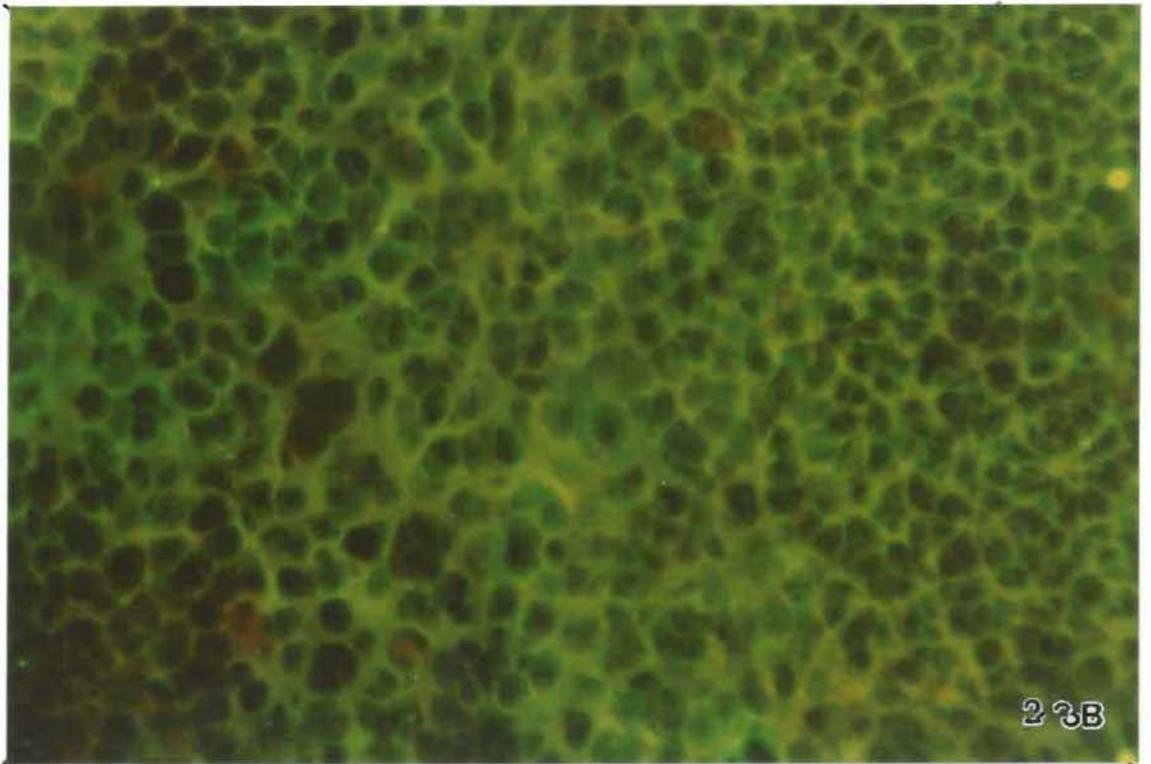
**FIGURE 23: Coupe de rate de souriceaux nouveau-nés au JOUR 14 post-inoculation observée par I.F.I.**

- A:** rate de souriceau nouveau-né témoin (non-inoculé) en présence de l'antisérum anti-VNT (contrôle négatif)  
(X500)
- B:** rate de souriceau nouveau-né infecté en présence de l'antisérum anti-VNT  
(X500)

9 0 0 0 9



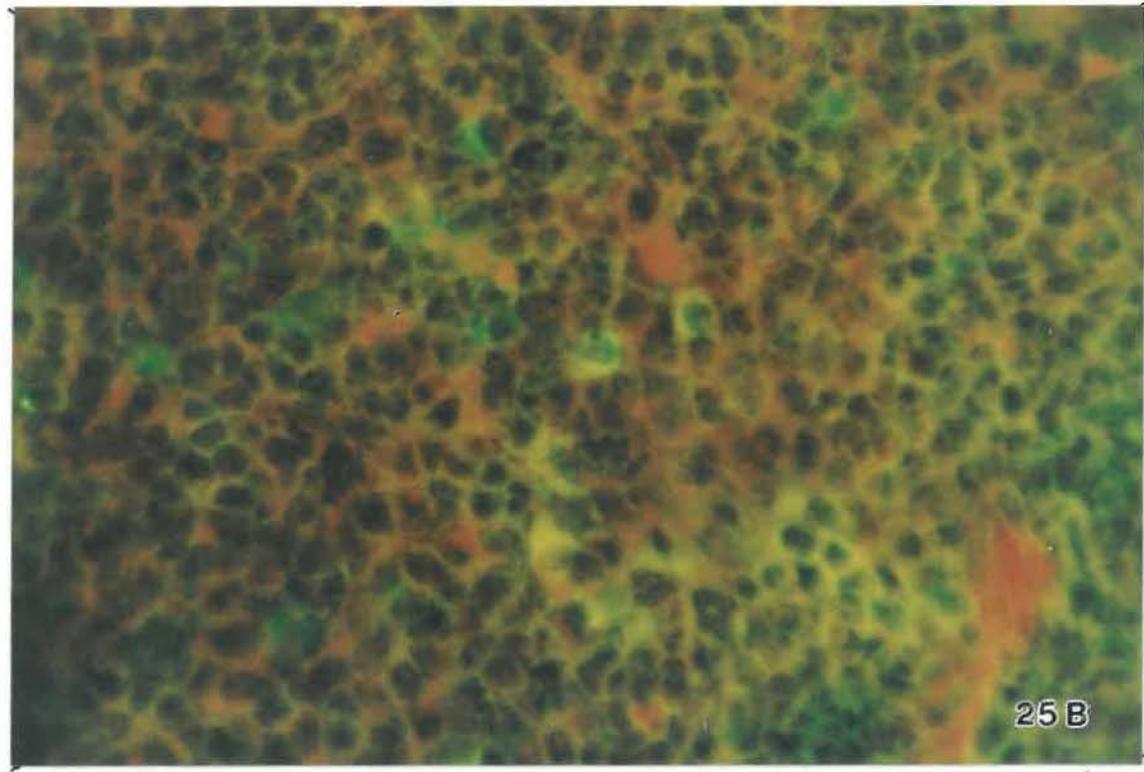
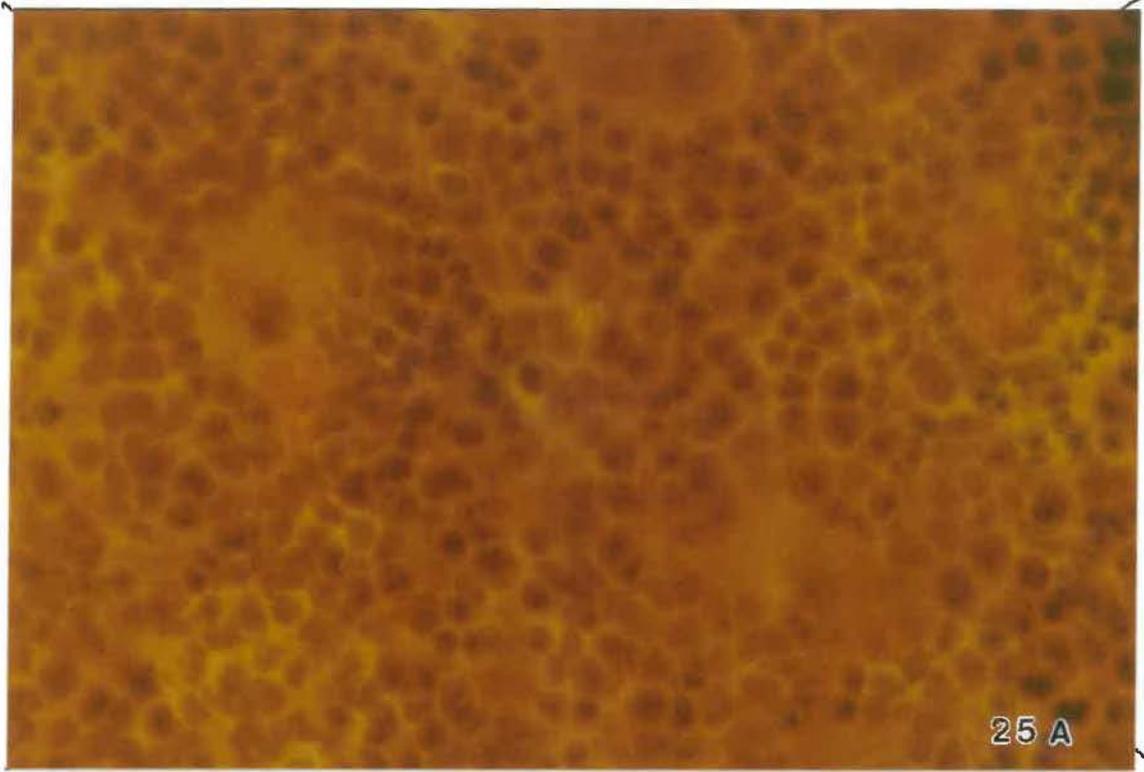
23A



23B



90009



## **5.2 Détection du VNT par immunofluorescence Indirecte chez les souris adultes dans différents organes**

Les observations faites en immunohistochimie chez les souris adultes infectées n'ont révélées aucune trace de virus au niveau des organes prélevés (i.e. thymus, foie, rate, glandes salivaires) tel que rapporté au Tableau XI. D'autre part, les examens histologiques ne présentaient aucune altération morphologique. Le VNT n'aurait donc aucun effet sur la morphologie des organes prélevés chez la souris adulte.

**TABLEAU XI**

**Détection du VNT dans différents organes des souris adultes:  
par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps  
monoclonal 2D2-D11**

<b>ORGANES</b>	<b>JOURS POST-INFECTION</b>				
	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>56</b>
Thymus	-	-	-	-	-
Foie	-	-	-	-	-
Rate	-	-	-	-	-
Glandes salivaires	-	-	-	-	-

## **DISCUSSION**

## 1. IMMUNISATION DES SOURIS

Trois protocoles d'immunisation différents ont été utilisés dans le but de produire un antisérum dirigé contre le VNT. Les résultats obtenus en anticorps anti-VNT selon le protocole d'immunisation par adjuvant de Freund donnent toutefois des titres peu élevés (Tableau III). Par contre, le deuxième groupe de souris immunisées, par rappel d'injections répétées de virus dilué donne des rendements très élevés où 87% des titres obtenus se situent à 1/1280. Tandis que le troisième groupe de souris immunisées avec l'adjuvant RIBI atteint des titres aussi satisfaisants que ceux obtenus sans adjuvant.

Ces résultats nous démontrent donc que l'immunisation par injections répétées du virus dilué est le moyen le plus efficace d'obtenir un rendement élevé en anticorps dirigés contre le VNT. Cependant, l'immunisation par adjuvant RIBI est intéressante du fait qu'elle nécessite peu d'antigène pour stimuler une réponse immune (0,6 ml au total de virus avec la méthode RIBI par rapport à 1,5 ml au total de virus avec la méthode d'injections répétées de virus).

Le système adjuvant RIBI est composé d'une variété d'immuno-stimulants non toxiques dans une émulsion de 2% huile dans l'eau (Ribi *et al.*, 1982); il est donc facile à administrer à l'animal contrairement à l'adjuvant de Freund qui est constitué de mycobactéries entières inactivées dans une émulsion à 50% d'eau et 50% d'huile (Freund, 1956).

De par des recherches en génie moléculaire et des techniques de fractionnement biochimiques et physicochimiques, Ribi et collaborateurs ont

réussi à mettre au point un adjuvant ayant l'avantage de diminuer, ou même d'éliminer les effets de toxicité et d'allergénicité rencontrés chez l'animal inoculé, tout en conservant les propriétés immunostimulantes de l'adjuvant (Ribi *et al.*, 1982, 1984, 1985, 1986).

L'adjuvant RIBI est composé, entre autres, de trehalose dimycolate (TDM) constituant purifié et modifié du bacille tuberculeux et de monophosphoryl lipid A (MPL), protéine modifiée isolée de bactéries Gram négatives (Azuma *et al.*, 1974; Ribi *et al.*, 1984; 1986). Ainsi, pour réduire les réactions locales au site d'injection, une émulsion non visqueuse d'une huile métabolisable dans l'eau est le meilleur procédé pour le transport de l'adjuvant.

L'émulsion huile dans eau agit probablement à travers ces trois fonctions: 1) l'huile sert à solubiliser le TDM et cette association facilite l'attachement de l'antigène aux particules d'huile; 2) l'huile induit un dépôt des immunostimulants et de l'antigène au site d'injection et 3) les antigènes solubles, puisqu'ils adhèrent aux gouttes d'huile, sont répartis plus largement.

Les antigènes sont ainsi plus facilement phagocytés par les macrophages et le processus de réponse immune est induit plus rapidement (Ulrich *et al.*, 1988; Rudbach *et al.*, 1988).

Aussi, l'immunisation par l'adjuvant RIBI pourrait remplacer celle de l'adjuvant de Freund puisque l'administration à l'animal est facilitée et aussi parce qu'il déclenche l'apparition de titres nettement plus satisfaisants qu'avec l'adjuvant de Freund, du moins concernant le VNT.

## 2. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION

### 2.1 Chez le souriceau nouveau-né

Le VNT déclenche l'apparition de lésions au niveau du thymus des souriceaux nouveau-nés infectés dès le jour 5 post-infection, qui se traduisent par la destruction des thymocytes au niveau des régions corticales et médullaires. La présence de l'Ag viral est confirmée par des tests immunohistochimiques où une fluorescence nucléaire est observée et par la présence d'inclusions nucléaires brunâtres spécifiques révélées par la méthode d'immuno-peroxydase indirecte streptavidine-biotine.

Des études en ultrastructure supportent nos observations (Athanasios *et al.*, 1990). Ils ont détecté la présence de particules virales et de structures filamenteuses caractéristiques présentes à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de ces cellules. L'atteinte du VNT porte non seulement sur les lymphocytes, mais aussi sur les cellules phagocytaires (macrophages) et les cellules réticulaires épithéliales. Ces dernières sont retrouvées dans la médulla et ont pour rôle de servir d'inducteur dans la différenciation des cellules souches en lymphocytes T.

Le virus circulerait à travers les voies sanguine et lymphatique, puisqu'il est dépisté au jour 5 post-infection au niveau du foie et de la rate du souriceau nouveau-né.

Il est reconnu que lorsqu'un antigène est introduit pour la première fois dans le système immunitaire d'un individu, une réponse immunitaire primaire est déclenchée principalement par les macrophages et autres cellules du

système réticulo-endothélial (S.R.E.) (Notkins *et al.*, 1970; Greene et Bach, 1979; Mims, 1982a; Lane et Harlon, 1988).

Les macrophages du S.R.E. sont retrouvés dans de nombreux organes, entre autres, les cellules microgliales du cerveau, les macrophages alvéolaires, spléniques et circulants, les cellules synoviales, les cellules de Kupffer du foie, les macrophages des ganglions lymphatiques et du mésangium rénal (Roitt *et al.*, 1985; Stites *et al.*, 1987). Il n'est donc pas étonnant d'identifier la présence de l'Ag viral au niveau du foie où une fluorescence spécifique est émise dans les cellules de Kupffer, en bordure des sinusoides et également au niveau des sinusoides spléniques de la pulpe rouge.

Au jour 7 post-infection, le virus est toujours présent dans le thymus et on retrouve des stades plus avancés de nécrose. La fluorescence est principalement nucléaire, autant en présence de l'anticorps monoclonal que de l'antisérum polyclonal.

Des observations intéressantes faites au jour 7 post-infection, en microscopie électronique (Athanasios *et al.*, 1990), rapportent la présence de granulation et la destruction des organelles cytoplasmiques comme le changement dans les structures des membranes mitochondriales ou l'augmentation de la vacuolisation de l'appareil de Golgi, en association avec la présence de particules virales. Ceci serait suivi d'une altération nucléaire et d'une destruction cellulaire.

Toutefois, au jour 7 post-infection, le foie répondrait à l'infection virale par une stimulation de l'activité des cellules de Kupffer, caractérisée par la

présence d'une fluorescence spécifique émise à ce niveau. D'autre part, certains noyaux des hépatocytes semblent fluorescents, sans toutefois ne présenter aucune inclusion nucléaire.

Ce phénomène pourrait peut-être s'expliquer selon un modèle d'interaction virus-macrophage proposé par Mims (1982b) où il précise que certains virus ou particules virales seraient captés par les cellules de Kupffer mais ne produiraient pas d'infection comme telle dans celles-ci. Ces particules virales seraient transférées de façon passive dans le noyau des cellules hépatiques adjacentes d'où elles seraient ensuite excrétées vers le cytoplasme pour être finalement libérées dans les conduits biliaires.

Il est à noter toutefois ici que malheureusement la morphologie du tissu hépatique (témoin et infecté) est plus ou moins bien conservée et ceci, en raison uniquement de la façon dont l'organe a été congelé. Les examens histologiques démontrent que la morphologie des tissus hépatiques provenant des souriceaux nouveau-nés normaux et infectés est normalement conservée.

L'Ag viral est retrouvé de nouveau au jour 7 post-infection, au niveau de la pulpe rouge de la rate et il a également atteint les glandes salivaires où une fluorescence cytoplasmique est émise au niveau des cellules épithéliales du tissu séreux de la glande parotide et au niveau de la lumière de certains canaux sécréteurs des glandes salivaires. A ce sujet, Mims (1982c) émet l'hypothèse que plusieurs virus dont le virus herpès simplex, le cytomégalo-virus, le virus de la rage chez la chauve-souris persistent au niveau de la salive dans les glandes salivaires. La surface des cellules infectées serait celle exposée vers la lumière des canaux des glandes salivaires. D'autre part,

Mims (1982c) mentionne que, tant et aussi longtemps que les Ag ou particules virales seraient maintenus au niveau de la surface ou de la lumière des canaux sécréteurs des glandes salivaires et, qu'il y aurait peu ou pas de destruction des cellules épithéliales, il n'y aurait aucune raison à ce que les lymphocytes ou les anticorps spécifiques soient stimulés et puissent atteindre le site d'infection et combattre celle-ci. Seuls les anticorps de type Ig A sécrétoire pourraient réagir avec les Ag viraux sur la surface des cellules infectées en empêchant la destruction de celles-ci. De cette façon, les Ig A sécrétoires, en réagissant avec certaines particules virales, les rendent non infectieuses sans pour autant agir à la source de l'infection virale (Mims, 1982c).

Ainsi, certaines particules virales du VNT pourraient demeurer présentes dans la lumière des canaux sécréteurs des glandes salivaires pour une longue période, tant et aussi longtemps qu'il n'y aurait pas de réplication virale ou de cycle infectieux dans les cellules épithéliales des glandes salivaires.

Au jour 14 post-infection se présente un aspect nouveau du thymus. Bien que celui-ci démontre toujours une nécrose aussi sévère, la fluorescence émise n'est plus nucléaire, mais plutôt extra-cellulaire sans doute à cause de la libération des particules virales à l'extérieur de la cellule thymique. En ce sens, il est intéressant de noter que le VNT semble suivre le mode de réplication des Herpesviridae (Knipe *et al.*, 1990).

On suppose que le virus, après s'être adsorbé par fusion de l'enveloppe virale à la membrane cytoplasmique des cellules thymiques, libère les

protéines du virion vers le noyau après décapsidation où aura lieu la synthèse et la réplication éventuelles de nouvelles protéines virales. C'est d'ailleurs à ce moment que l'on détecte une fluorescence intra-nucléaire dans le noyau des thymocytes aux jours 5 et 7 post-infection, ceci tant en présence de l'antisérum que de l'Ac monoclonal 2D2-D11.

Une fois l'assemblage et la maturation des virions terminés, ces derniers sont excrétés à l'extérieur du noyau des thymocytes dans l'espace extra-cellulaire et c'est à ce moment qu'une fluorescence extra-cellulaire est observée dans le thymus aux jours 14, 21 et 56. Celle-ci n'est d'ailleurs observée qu'en présence de l'antisérum polyclonal.

L'Ag viral n'est cependant plus détecté au niveau des noyaux des hépatocytes au jour 14 post-infection, il semble regagner les cellules de Kupffer où il sera d'ailleurs détecté pour la dernière fois. Quant à la rate, l'Ag viral y est toujours présent, en quantité toutefois plus considérable (en terme d'intensité de la fluorescence observée), au niveau de la pulpe rouge.

L'Ag viral persiste toujours dans les cellules épithéliales des tissus séreux et muqueux des glandes salivaires (Figure 17B-17D).

Etant donné que le VNT s'attaque principalement aux thymocytes et que ceux-ci sont reconnus pour être impliqués dans la régulation, la reconnaissance et la mémoire immune (Butcher et Weissman, 1984; Cantor, 1984), il en résulte des répercussions néfastes sur la réponse immune. Or, une destruction des thymocytes engendre également une perte de lymphocytes T auxiliaires confirmée par les expériences de Guignard et collaborateurs (1989) et Morse et Valinsky (1989).

Les cellules T auxiliaires sont impliquées dans la reconnaissance des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (Unanue, 1981; Notkins et Oldstone, 1984). Puisque ces mêmes CPA expriment, à leur surface, un complexe majeur d'histocompatibilité de classe II en association avec les récepteurs des cellules T auxiliaires (Rosenthal *et al.*, 1979; Notkins et Oldstone, 1984; Schwartz, 1985), ces dernières ne pourront remplir pleinement leur rôle actif de défense immunitaire, puisqu'elles sont détruites ou altérées, en partie dû à la nécrose massive du thymus. Ceci engendre d'une part, un ralentissement des mécanismes de défense immunitaire de l'animal infecté parce qu'il n'y a pas de collaboration facilitée entre les CPA et l'attachement des cellules T auxiliaires; cet attachement est requis pour la prolifération et la différenciation des cellules T (Unanue, 1981; Notkins et Oldstone, 1984). C'est pourquoi l'Ag viral peut persister beaucoup plus longtemps dans les tissus. D'ailleurs, nos résultats démontrent la présence de l'Ag viral sur une période étendue (56 jours, durée de nos observations) au niveau du thymus et de la rate; ces deux organes constitués, entre autres, de cellules T.

D'autre part, si les cellules T auxiliaires sont affectées, il y a risque d'une diminution ou blocage de la synthèse des interleukines (1L-2, 1L-4, 1L-5, 1L-6) nécessaires pour stimuler certaines réactions immunes (Lalande, 1991; Scott et Kaufmann, 1991; Trotta, 1991; Carding *et al.*, 1991; Campbell, 1991).

L'Ag viral est maintenant dépisté dans la pulpe blanche de la rate au jour 21 post-infection. Ce sont probablement les macrophages de la zone

marginale et des sinusoides de la pulpe rouge qui ont amené l'Ag viral aux follicules primaires de la pulpe blanche dans laquelle se produit une réponse en anticorps. Or, l'essentiel du tissu lymphoïde de la pulpe blanche se distribue autour d'une artériole centrale constituant la gaine lymphoïde péri-artérielle; celle-ci comporte une zone T et une zone B (Tizard, 1987).

De plus, il est reconnu que l'attachement des cellules T auxiliaires aux cellules B est requise pour une bonne réponse en anticorps. Ce facteur est important dans la régulation de la production d'anticorps puisque ce contact entre les cellules T auxiliaires et les cellules B engendre un stimulus qui conduit à la division des cellules B et à la production d'anticorps (Goodman et Sercarz, 1983; Weiss et Imboden, 1987; Lane et Harlon, 1988). Or, l'Ag viral demeure longtemps au niveau de la rate; il est d'ailleurs détecté au moins sur une période de 56 jours, ce qui nous porte à croire que la collaboration entre les cellules T auxiliaires et les cellules B soit fortement compromise et donc plus ou moins efficace dans le cas d'une telle infection par le VNT.

Finalement, au jour 56 post-infection, avec la régénération progressive des structures morphologiques du thymus, en accord également avec les observations de Wood et collaborateurs en 1981, qui ont observé une régénération du thymus dès la 6<sup>ème</sup> semaine; il y a repopulation partielle des thymocytes, si bien que ceux-ci pourront regagner lentement leur fonction immunitaire (production de cellules T auxiliaires, sécrétion d'interleukines, collaboration avec les cellules B productrices d'anticorps...) et contribuer ainsi à éliminer progressivement l'infection virale.

Aussi, une fluorescence de moindre importance a été observée au niveau de la rate (en terme du nombre de cellules fluorescentes) et également au niveau du thymus, au jour 56 post-infection. Ceci pourrait laisser sous-entendre un retour graduel et fonctionnel dans les mécanismes de défense immunitaire; un retour à la normale des réponses immunologiques avec le rétablissement des pourcentages cellulaires a d'ailleurs été déjà observé dans des expériences antécédentes (Guignard *et al.*, 1989; Morse et Valinsky, 1989).

Enfin, la présence de l'Ag viral encore localisé au niveau des glandes salivaires, au jour 56 post-infection, viendrait également confirmer ces mêmes observations faites par Cross en 1973 et Morse en 1987.

### **3. COMPARAISON DE L'ANTICORPS MONOCLONAL VS L'ANTISÉRUM DIRIGÉS CONTRE LE VNT**

Seule la fusion n° 1 nous a permis, après criblage et clonage, d'obtenir deux hybridomes sécréteurs d' anticorps monoclonaux dirigés contre le VNT. Ces anticorps, le 2D2-D11 et le 2D2-E12 sont tous deux de classe IgG et de sous-classe IgG2a, ayant également les mêmes concentrations en immunoglobulines. Comme ces deux anticorps étaient semblables, nous n'avons utilisé que le 2D2-D11 dans nos expériences.

En aucun cas, cet anticorps monoclonal 2D2-D11 n'a réagi avec l'Ag viral dans les organes autres que le thymus, bien que cet Ag ait été dépisté en présence de l'antisérum. Il faut noter cependant que la fluorescence observée en présence de l'antisérum dans tous les organes, sauf dans le thymus, était majoritairement cytoplasmique.

Cette observation nous suggère donc que l'anticorps monoclonal 2D2-D11 pourrait être dirigé contre une protéine virale spécifique au VNT. Celle-ci apparaîtrait à la période de réplication ou de la transcription du génome viral ayant lieu dans le noyau des cellules infectées puisque l'anticorps monoclonal 2D2-D11 ne réagit qu'aux jours 5 et 7 post-infection déterminé par une fluorescence nucléaire spécifique.

Dans ce sens, cet anticorps monoclonal pourrait s'avérer spécifique et représenter un outil immunologique intéressant. Il a également l'avantage de diminuer, de façon considérable, le bruit de fond non spécifique lorsqu'utilisé dans des techniques immunohistochimiques.

Cependant, l'antisérum anti-VNT demeure également aussi précieux, sinon plus pratique, du moins pour un tel projet de dépistage de l'Ag viral sur une période étendue puisqu'il permet de détecter la présence de l'Ag quelque soit l'organe où il serait localisé indépendamment du stade de l'infection virale. Il demeure donc avantageux d'utiliser un tel antisérum justement parce qu'il est polyclonal et donc constitué de plusieurs anticorps dirigés contre une variété d'épitopes antigéniques du VNT, ceci augmentant les chances de dépister la présence du virus.

#### **4. PATHOGÉNIE DE L'INFECTION**

##### **4.1 Chez la souris adulte**

Les tests immunohistochimiques entrepris pour dépister la présence de l'Ag viral chez la souris adulte infectée se sont avérés négatifs, autant en utilisant l'antisérum polyclonal que l'Ac monoclonal 2D2-D11. D'autre part, tel

que démontré par les travaux antérieurs de Cross en 1973, aucune aberration morphologique des tissus provenant des souris adultes infectées n'a été enregistrée. Ces résultats supportent le pouvoir peu infectieux du VNT chez les souris adultes, tel que rapporté par St-Pierre et collaborateurs (1987).

Chez la souris adulte infectée, le système immunitaire n'est pas perturbé, puisque le VNT ne produit pas de nécrose du thymus; les cellules T auxiliaires de même que les cellules B, sont pleinement fonctionnelles. D'ailleurs, des expériences antérieures (Guignard *et al.*, 1990; Morse et Valinsky, 1989) rapportent que les réponses humorales et cellulaires de la souris adulte infectée sont normales.

Nos résultats sont aussi en accord avec le principe que la pathogénèse soit strictement dépendante de l'âge de l'animal infecté (Cross, 1973; Morse, 1987).

Certains auteurs expliquent le tropisme du virus pour les thymocytes des souriceaux nouveau-nés par leur immaturité les rendant plus susceptibles à l'infection virale (Ceredig *et al.*, 1982; Butcher et Weissman, 1984). Morse (1987) émet plutôt l'hypothèse que la maturation des antigènes de surface pourrait jouer un rôle dans l'infection en servant de récepteurs au VNT. Ce phénomène a d'ailleurs été déjà démontré, entre autre pour le virus du SIDA (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984).

D'autre part, il a été démontré que l'augmentation de la susceptibilité des souriceaux nouveau-nés au virus herpès simplex correspondait à l'immaturité des macrophages. Il est possible que cette observation s'applique également au VNT (Johnson, 1964).

Contrairement aux observations de Cross en 1973, nous n'avons pas pu déceler la présence de l'Ag viral au niveau des glandes salivaires chez la souris adulte infectée. L'absence totale de réactions positives en immunohistochimie, demeure toutefois difficilement explicable. La dose administrée (50 DI<sub>50</sub>) aux souris adultes était peut-être insuffisante et les réactions de défense immunitaire pouvaient peut-être avoir lieu ailleurs que dans les organes prélevés. D'autre part, le sérum de ces souris adultes a été titré en ELISA pour la recherche d'anticorps anti-VNT et curieusement, aucune réaction positive n'a été enregistrée.

## **5. EFFICACITÉ DES TECHNIQUES IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET MODE DE TRAITEMENT DES TISSUS**

La technique d'I.F.I. s'est avérée beaucoup plus pratique que la technique d'immunoperoxydase indirecte (streptavidine-biotine) dans la réalisation de ce projet de recherche. La simplicité et la rapidité d'exécution de la technique d'I.F.I. font de celle-ci une méthode de diagnostic de l'infection virale du VNT fort appréciable.

Contrairement à l'I.F.I., la technique streptavidine-biotine comporte certains inconvénients; d'abord, elle implique plusieurs étapes séquentielles dans son traitement, elle est plus longue d'exécution, mais surtout plus coûteuse. A l'exception du thymus, la présence de bruit de fond non spécifique est beaucoup trop présente pour être prise en considération comme technique d'évaluation en immunohistochimie. La présence de biotine endogène dans certains tissus, les peroxydases endogènes (conjugué utilisé: streptavidine-biotine), le bloqueur et le temps de blocage, les temps et le nombre de

lavages, les tampons et les dilutions des antisérums ainsi que le temps d'incubation, pourraient peut-être expliquer les problèmes de bruit de fond non spécifique.

Cependant, l'inconvénient majeur de la technique d'I.F.I. est qu'on ne peut garder de façon permanente les lames. D'autre part, il y aurait lieu de produire un antisérum spécifique au VNT chez une autre espèce animale que la souris (bien que les tentatives chez le rat, le lapin et le cobaye se soient avérées sans succès), dans le but de réduire la présence de bruit de fond non spécifique.

Concernant le traitement des organes pour les techniques immunohistochimiques, leur congélation à l'isopentane en milieu intermédiaire d'azote liquide s'avère préférable au traitement par fixateurs et enrobage à la paraffine principalement en raison d'une meilleure préservation de l'antigénicité des tissus infectés et par sa rapidité. Il faut environ quatre jours de traitement avant la coupe d'organes au microtome par technique usuelle d'enrobage à la paraffine, contrairement à la technique de congélation, où tout peut s'effectuer dans la même journée, y compris la coupe d'organes au cryostat.

La morphologie de certains tissus était parfois endommagée dû au traitement par congélation (comme c'était le cas du foie aux jours 7 et 14 et des glandes salivaires aux jours 21 et 56 post-infection). Il s'avère très important de manipuler avec soin les organes pour ne pas les endommager initialement par l'utilisation des pinces à prélèvements, de les inclure immédiatement dans le milieu de montage et d'être suffisamment rapide pour les congeler dans les plus courts délais. D'autre part, une fois congelés, les

organes doivent être conservés à des températures très basses (-70°C) jusqu'au moment de leur coupe au cryostat.

Néanmoins, en utilisant en complément, ces mêmes tissus enrobés à la paraffine (ce traitement conservant très bien la morphologie), nous sommes donc en mesure d'effectuer des études comparatives du point de vue histologique.

En résumé, la technique d'I.F.I. s'est avérée très utile et pratique pour le diagnostic de l'infection virale, et pourrait s'ajouter comme technique supplémentaire de détection à celles déjà existantes.

Quant à l'I.P.I., bien qu'elle ait présentée des inconvénients majeurs dans ce projet, un raffinement et mise au point plus approfondis des techniques, présenteraient l'avantage de permettre une visualisation de la distribution de l'antigène parallèlement avec l'appréciation de la morphologie tissulaire. Ainsi, les mêmes spécimens pourraient servir à la pathologie et à l'immunohistochimie. De plus, il ne serait pas nécessaire d'avoir recours à un microscope à fluorescence (qui n'est pas toujours à la portée de tous les laboratoires) et des études rétrospectives seraient alors possibles.

## **CONCLUSION**

L'étude de la pathogénie du VNT a démontré que ce virus s'attaquait principalement aux souriceaux nouveau-nés en induisant des changements histologiques et morphologiques au niveau du thymus seulement. L'altération des thymus infectés entraîne une moins bonne efficacité des mécanismes de défense immunitaire confirmée par la persistance prolongée du virus dans les organes lymphoïdes, comme la rate et le foie. Les résultats confirment aussi la persistance de l'Ag viral au niveau de la lumière de certains canaux sécréteurs des glandes salivaires, ainsi qu'un retour progressif de la régénération des structures et composantes du thymus au bout d'environ 56 jours post-infection.

Quant aux souris adultes, elles ne sont pas apparues susceptibles au VNT, puisqu'aucun Ag viral n'a été révélé au niveau des organes prélevés.

La réalisation d'un premier anticorps monoclonal produit et dirigé contre une protéine virale spécifique du VNT, ouvre la porte à de nouvelles perspectives comme des études en immunocytofluorométrie, ou en immunohistochimie appliquée en microscopie électronique. Il demeure toutefois important d'orienter maintenant les études vers la biologie moléculaire afin de compléter les connaissances actuelles et ainsi de mieux comprendre la réplication virale du VNT.

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le docteur Gilles Lussier, qui a bien voulu accepter la direction de mes travaux et de la confiance qu'il a eu à mon égard.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à mesdames Claudette Lafrance, Pierrette Lessard et Ginette Godin, pour l'aide technique, les conseils et les encouragements prodigués tout le long de mes travaux.

J'aimerais également remercier l'équipe technique du Service de production des hybridomes du laboratoire du docteur Jacqueline Lecomte, ainsi que messieurs Marcel Desrosiers, Robert Alain et le docteur Raafat Athanassious pour leur collaboration.

Mes remerciements vont également à tout le personnel de la bibliothèque pour l'assistance et la disponibilité si généreusement offertes.

Merci à mes consoeurs et confrères étudiants pour l'encouragement, l'entraide et l'intérêt soutenus.

Je désire aussi remercier madame Lucie Summerside qui a bien voulu dactylographier ce manuscrit.

Enfin, je désire remercier le CRSNG pour le support financier qui m'a été accordé durant mes travaux.

## BIBLIOGRAPHIE

ABLASHI, D.V., S.Z. SALAHUDDIN, S.F. JOSEPHS, F. IMAM, P. LUSSO, R.C. GALLO, C. HUNG, J. LEMP et P.D. MARKHAM. 1987. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature* **329**: 207.

ATHANASSIOUS, R., R. ALAIN et G. LUSSIER. 1990. Electron microscopy of mouse thymic virus. *Arch. Virol.* **113**: 143-150.

AZUMA, J., E. RIBI, T.J. MEYER et B. ZBAR. 1974. Biologically active components from mycobacterial cell walls. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**: 95.

BONDI, A., G. CHEREGATTI, V. EUSEBI, E. FULCHERI et G. BUSSOLATI. 1982. The use of  $\beta$ -galactosidase as a tracer in immunohistochemistry. *Histochem.* **76**: 153-158.

BUCKLAND, R.M. 1986. Strong signals from streptavidin-biotin. *Nature* **320**: 557-558.

BUTCHER, E.C. et I.L. WEISSMAN. 1984. Lymphoid tissues and organs. p. 109-127. Dans: W.E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York.

CAMPBELL, I.L. 1991. Cytokines in viral diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, **4**: 486-491.

CANTOR, H. 1984. T lymphocytes. p.57-69. Dans: W.E. Paul (eds). *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York.

CARDING, S.R., A.C. HAYDAY et K. BOTOMLY. 1991. Cytokines in T-cell development. *Immunol. Today* **12**: 239-245.

CARTHEW, P. et A. VERSTRAETE. 1978. A serological survey of accredited breeding colonies in the United Kingdom for common rodent viruses. *Lab. Anim. Science* **12**: 29-32.

CEREDIG, R., A.L. GLASEBROOK et H.R. MacDONALD. 1982. Phenotypic and functional properties of murine thymocytes. *J. Exp. Med.* **155**: 358-379.

CHAIET, L. et F.S. WOLF. 1964. The properties of streptavidin: a biotin binding protein produced by *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**: 1-5.

COHEN, P.L., S.S. CROSS et D.E. MOSIER. 1975. Immunologic effects of neonatal infection with mouse thymic virus. *J. Immunol.* **115**: 706-710.

COLLINS, M.J. et J.C. PARKER. 1972. Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**: 1139-1143.

COOK, M.L. et J.G. STEVENS. 1970. Replication of varicella-zoster virus in cell culture: an ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* **32**: 334-350.

COONS, A.H., H.J. CREECH et R.N. JONES. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **47**: 200-202.

COONS, A.J., H.J. CREECH, R.N. JONES et E. BERLINER. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* **45**: 159-161.

COONS, A. H. et M.H. KAPLAN. 1950. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* **91**: 1-3.

COONS, A.H., E.H. LEDUC et J.M. CONNOLLY. 1955. Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* **102**: 49-60.

COONS, A.H. 1961. The beginnings of immunofluorescence. *J. Immunol.* **87**: 499-501.

CROSS, S.S. 1973. Development of bioassays and studies on the biology of mouse thymic virus. Ph.D. George Washington University, 78 pages.

CROSS, S.S., H.C. MORSE et R. ASOFSKY. 1976. Neonatal infection with mouse thymic virus. Differential effects on T cells mediating graft-versus-host reaction. *J. Immunol.* **117**: 635-638.

CROSS, S.S., J.C. PARKER, W.P. ROWE et M.L. ROBBINS. 1979. Biology of mouse thymic virus, a herpesvirus of mice, and the antigenic relationship to mouse cytomegalovirus. *Infect. Immun.* **26**: 1186-1195.

CURRY, R. 1987. A sensitive immunochemical assay for biologically active mouse gamma interferon. *J. Immunol. Methods* **104**: 137-142.

DALGLEISH, A.G., P.C.L. BEVERLEY, P.R. CLAPHAM, D.H. CRAWFORD, M.F. GREAVES et R.A. WEISS. 1984. The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767.

DESROSIERS, R.C., A. BAKKER et J. KAMINE. 1985. A region of the *Herpesvirus saimiri* genome required for oncogenicity. *Science* **228**: 184-187.

FARR, A.G. et P.K. NAKANE. 1981. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *J. Immunol. Methods* **47**: 129-144.

FAULK, W.P. et G.M. TAYLOR. 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **8**: 1081.

FLENS, M.J., P. VAN der VALK, T.M. TADEMA, A.C.L.M. HUYSMANS, E.K.J. RISSE, G.A. VAN TOL, J.L. CHRIS et M. MEIJER. 1989. The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology. *Cancer*. **12**: 2704-2711.

FREUND, J. 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Adv. Tuberc. Res.* **7**: 130-148.

GEERLIGS, H.J., W.J. WEIJER, G.W. WELLING et S. WELLINGWESTER. 1989. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising amino acid residues 9-21 of herpes simplex virus type I glycoprotein D. *J. Immunol. Methods* **124**: 95-102.

GOODMAN, J.W. et E.E. SERCARZ. 1983. The complexity of structures involved in T cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* **1**: 465-498.

GOSLING, J.P. 1990. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* **36**: 1408-1427.

GRAHAM, R.C., U. LUDHOLM et M.J. KARNOUSKY. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J. Histochem. Cytochem.* **13**: 150-152.

GREENE, M.I. et B.A. BACH. 1979. The physiological of immunity: differential regulatory contributions of peripheral and central lympho compartments. *Cell Immunol.* **45**: 446-451.

GUESDON, J.L., T. TERNYNCK et S. AVRAMEAS. 1979. The use of avidin-biotin in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1131-1139.

GUIGNARD, R., E. POTWOROWSKI, et G. LUSSIER. 1989. Mouse thymic virus-mediated immunosuppression: association with decreased helper T-cells and increased suppressor T cells. *Viral Immunol.* **2**: 215-220.

HARDY, W.D. 1980. Feline leukemia virus disease. p. 3-31. Dans: Jr. W. Hardy, M. Essex, A.J. McClelland (ed.), *Feline leukemia virus*. Elsevier/North-Holland, New York.

HEYDERMAN, E. 1979. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications methods and controls. *J. Clin. Pathol.* **32**: 971-978.

HIRSCH, M.S., B. ZISMAN et A.C. ALLISON. 1970. Macrophages and age-dependent resistance to herpes simplex virus in mice. *J. Immunol.* **104**: 1160-1165.

HSU, S.-M., L. RAINE et H. FANGER. 1981. A comparative study of peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* **75**: 734-738.

ITO, M., K. NISHIYAMA et S. HYODO. 1985. Weight reduction of thymus and depletion of lymphocytes of T-dependent areas in peripheral lymphoid tissues of mice infected with *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **49**: 812-818.

JACOBY, J.E. et J.G. FOX. 1984. Biology and disease of mice. p. 31-39. Dans: J.G. Fox, B.G. Cohen, F.M. Loew (ed.), *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press, New York.

JOHNSON, R.T. 1964. The pathogenesis of herpes virus encephalitis. II. A cellular basis for the development of resistance with age. *J. Exp. Med.* **120**: 359-374.

KAPLAN, M.H., A.H.COONS et H.W. DEANE. 1950. Localization of a antigen in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. *J. Exp. Med.* **91** : 15-17.

KENNEY, J.S., B.W. HUGES, M.P. MASADA et A.C. ALLISON. 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods* **121**: 157-166.

KLATZMANN, D., E. CHAMPAGNE, S. CHAMARET, J. GRUEST, D. GUETARD, T. HERCEND, J.-C. GLUCKMAN et L. MONTAGNIER. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**: 767-768.

KNIPE, D.M., R.M. CHANOCK, M.S. HIRSH, J.L. MELNICH, T.P. MONATH et B. ROIZMAN. 1990. p. 1787-1841. Herpesviridae: a brief introduction. Dans: *Fields Virology*, vol. 2. Raven Press (ed.), New York.

KRAMP, W.J., P. MEDEVECZKY, C. MULDER, H.C. HEINZE et J.L. SULLIVAN. 1985. Herpesvirus sylvilagus infects both B and T lymphocytes *in vivo*. *J. Virol.* **56**: 60-65.

LALANDE, F. 1991. Cytokines and interferons economical aspects and cost of health. *Med. Sci.* **7**: 715-718.

LANE, D. et E. HARLON. 1988. Antibody response. p. 37-47. Dans: Harlow (ed.) *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.

LARSSON, L.-I. et T.W. SCHWARTZ. 1977. Radioimmunocytochemistry - a novel immunocytochemical principle. *J. Histochem. Cytochem.* **25**: 1140.

- LARSSON, L.L. 1988. Tissue pretreatment II. p. 55-61. Dans: Immunocytochemistry theory and practice. CRC Press Inc., Florida.
- LEHMAN-GRUBE, F. 1982. Lymphocyte choriomeningitis virus. p. 231-266. Dans: H.L. Foster, J.D. Small, J.G. Fox (ed.) The Mouse in Biomedical Research. Volume II: Diseases. Academic Press, New York.
- LEPINE, P. 1964. Techniques de laboratoire en virologie humaine. p 164-169. Masson (ed.). Paris.
- LISE, L.D. 1989. Immunoadjuvants and analogs of immunomodulatory bacterial structures. *Curr. Opin. Immunol.* **2**: 269-274.
- LUSSIER, G., D. GUENETTE, W.R. SHEK et J.P. DESCOTEAUX. 1988a. Evaluation of mouse thymic virus antibody detection techniques. *Lab. Anim. Sci.* **38**: 577-579.
- LUSSIER, G., D. GUENETTE, W.R. SHEK et J.P. DESCOTEAUX. 1988b. Detection of mouse thymic virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet. Res.* **52**: 236-238.
- LUSSIER, G. 1988c. Potential detrimental effects of rodent viral infections on long-term experiments. *Vet. Res. Comm.* **12**: 199-217.
- LUSSIER, G. 1989. Les perturbations associées aux infections virales des rongeurs de laboratoire. *Sci. Tech. Anim. Lab.* **14**: 271-288.
- LUSSIER, G. 1991. Detection methods for the identification of rodent viral and mycoplasmal infections. *Lab. Anim. Science* **41**: 199-225.
- LUSSO, P., M. MALNATI, A. De MARIA, C. BALOTTA, S.E. De ROCCO, P.D. MARKHAM et R.C. GALLO. 1991. Productive infection of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. *J. Immunol.* **147**: 685-691.
- MANCINI, G., A.O. CARBONARA et J.F. HEREMANS. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**: 235-254.
- MASIHI, K.N., W. LANGE et M. OZEL. 1988. Biomedical applications of chromatographic fraction containing trehalose dimycolate in squalene emulsion. *J. Chromatogr.* **440**: 473-478.
- MASON, T.E., R.F. PHIFER, S.S. SPICER, R.A. SWALLOW et R.B. DRESKIN. 1969. An immunoglobulin enzyme bridge method for localizing tissue antigen. *J. Histochem. Cytochem.* **17**: 563.

MASON, D.Y. et K.C. GATTER. 1987. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J. Clin. Pathol.* **40**: 1042-1054.

MASSON, D.Y. et R.E. SAMMONS. 1978. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.* **31**: 454-462.

MATTEUCI, D., A. TONIOLO, et P.G. CONALDI. 1985. Systemic lymphoid atrophy in Coxsackievirus B3-infected mice: Effects of virus and immunopotentiating agents. *J. Inf. Dis.* **151**: 1100-1108.

MATTHEWS, J.B. 1987. Immunocytochemical methods: a technical overview. *J. Oral Pathol.* **16**: 189-195.

MELLORS, R.C. 1968. The application of labeled antibody technics in studying cell antigens. *Cancer Res.* **28**: 1372-1360.

MIMS, C.A. et J. GOULD. 1978. The role of macrophages in mice infected with murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **41**: 143-153.

MIMS, C.A. 1982a. The immune response to infection. p. 109-134. Dans: C.A. Mims (ed.) *The pathogenesis of infectious disease*. Academic Press Inc., New York.

MIMS, C.A. 1982b. The spread of microbes through the body: spread via the blood. p. 94-99. Dans: C.A. Mims (ed.) *The pathogenesis of infectious disease*. Academic Press Inc., New York.

MIMS, C.A. 1982c. Microbial presence in bodily sites inaccessible to the immune response. p. 144-147. In: C.A. Mims (ed.) *The pathogenesis of infectious disease*. Academic Press Inc., New York.

MORGAN, C., H.M. ROSE et B. MEDNIS. 1968. Electron microscopy of herpes simplex virus. *J. Virol.* **2**: 507-516.

MORSE, S.S., B. PRESCOTT, S.S. CROSS, P.W. STASHAK et P.J. BAKER. 1976. Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. V. Ontogeny of the factors influencing the magnitude of the plaque-forming cell response. *J. Immunol.* **116**: 279-287.

MORSE, S.S. 1987. Mouse thymic necrosis virus: a novel murine lymphotropic agent. *Lab. Anim. Sci.* **37**: 717-725.

MORSE, S.S. et J.E. VALINSKY. 1989. Mouse thymic virus (MTLV). A mammalian herpesvirus cytolytic for CD4<sup>+</sup>(L3T4<sup>+</sup>) T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**: 591-596.

- MORSE, S.S. 1991. Emerging viruses: defining the rules of viral traffic. *Perspect. Biol. Med.* **34**:387-409.
- MOSIER, D.E., B.J. MATHIESON et P.S. CAMPBELL. 1977. Ly phenotype and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. *J. Exp. Med.* **146**: 59-73.
- MÜLLER- EBERHARD, H.J.1968. The possible use of complement for the detection of cell surface antigens. *Cancer Res.* **28** : 1357-1360.
- NAKANE, P.K. et Jr G.B. PIERCE. 1966. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigen. *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 929-931.
- NOTKINS, A.L., S.E. MERGENHAGEN et R.J. HOWARD. 1970. Effect of virus infections on the function of the immune system. *Ann. Rev. Microbiol.* **24**: 525-538.
- NOTKINS, A.L. et M.B.A. OLDSTONE. 1984. p. 4-70. Early non-immune control. Dans: A.L. Notkins et M.B.A. Oldstone (eds.). *Concepts in viral pathogenesis*. Spring et Verlag Inc., New York.
- ORDRONNEAU, P. et P.B.-M. LINDSTRÖM. 1981. Four unlabeled antibody bridge techniques: a comparison. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 1397-1404.
- PARKER, J.C., R.W. TENNANT, T.G. WARD et W.P. ROWE. 1965. Virus studies with germ free mice. I. Preparation of serologic diagnostic reagents and survey of germ free and mono-contaminated mice for indigenous murine viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **34**: 371-380.
- PARKER, J.C., M.L. VERNON et S.S. CROSS. 1973. Classification of mouse thymic virus as a herpesvirus. *Infect. Immun.* **7**: 305-308.
- PETRUSZ, P. et P. ORDRONNEAU. 1980. Criteria for reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem. J.* **12**: 333-348.
- PIETROBONI, G.R., G.B. HARNETT, M.R. BUCENS et R.W. HONESS. 1988. Antibody to human herpesviruses 6 in saliva. *Lancet* **1**: 12059.
- PIKE, R.R. 1979. Laboratory-associated infections: incidence, facilities, causes, and prevention. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**: 41-66.
- RIBI, E., K. AMANO, J. CANTRELL, S. SCHWARTZMAN, R. PARKER et K. TAKAYAMA. 1982. Preparation and antitumor activity of nontoxic lipid A. *Cancer Immunol. Immunother.* **12**: 91.
- RIBI, E. 1984. Beneficial modification of the endotoxin molecule. *J. Biol. Modif.* **3**: 1.

RIBI, E. 1985. A new immunomodulator with potential clinical applications: monophosphonyl lipid A, a detoxified endotoxin. *Clin. Immunol. Newsletter* **6**: 33-36.

RIBI, E., J. CANTRELL, T. FELDNER, K. MYERS et J. PETERSON. 1986. Biological activities of monophosphoryl lipid A. Dans: L. Leire, B.F. Bonventre, J.A. Moulla, S.D. Silver et H.C. Wu (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.

RIGGS, J.L., R.J. SEIWALD, J.H. BURCKHALTER, C.M. DOWNS et T.G. METCALF. 1958. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am. J. Pathol.* **34**: 1081-1097.

RILEY, V., F. LILLY, E. HUERTO et D. BARDELL. 1960. Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms. *Science* **132**: 545-547.

ROITT, I., J. BROSTOFF et D. MALE. 1985. Cells involved in the immune response. p. 2.2 à 3.9. Dans: C.V. Mosby (ed.) Immunology, Grover Medical Ltd, London, England.

ROSENTHAL, M.F., S.Z. BEN-SASSON, T.F. TUCKER et J.W. UHR. 1979. Macrophage-lymphocyte interaction and antigen recognition. *Fed. Proc.* **34**: 1743-1745.

ROWE, W.P. et W.I. CAPPS. 1961. A new mouse virus causing necrosis of the thymus in newborn mice. *J. Exp. Med.* **11**: 831-844.

RUDBACH, J.A., J.L. CANTRELL et J.T. ULRICH. 1988. Molecularly engineered microbial immunostimulators. p. 443-454. In: A. Liss (ed.) Proceedings of UCLA Symposia on molecular and cellular biology. A. Liss, New York.

SALAHUDDIN, S.Z., D.V. ABLASHI, P.D. MARKHAM, S.F. JOSEPHS, S. STURZENEGGER, M. KAPLAN, G. HALLIGAN, P. BIBERFIELD, F. WONG-STAAAL, B. KRAMARSKY et R.C. GALLO. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lympho-proliferative disorders. *Science* **234**: 596-601.

SCHWARTZ, R.H. 1985. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol.* **3**: 237-261.

SCOPSI, L. et L.L. LARSSON. 1986. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry, a comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. *Histochem.* **84**: 221-230.

SCOTT, P. et S. KAUFMANN. 1991. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol. Today* **12**: 346-348.

- SELGRADE, M.K. et J.E. OSBORN. 1974. Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infect. Immun.* **10**: 1383-1390.
- SHI, Z.R. et S.H. ITZKOWITZ. 1988. A comparison of three immunoperoxidase technique for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **36**: 317-322.
- SINGER, S.J. et A.I. SHICK. 1961. The properties of specific stains for electron microscopy prepared by conjugation of antibody with ferritin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 519-537.
- SMITH, A.L., R.O. JACOBY, P.J. TATTERSALL, D.F. WINOGRAD et E.A. JOHNSON. 1985. Comparative pathogenesis of the prototype [MVM(p)] and immunosuppressive [MVM(i)] strains of murine parvovirus in suckling mice. *Lab. Anim. Sci.* **35**: 525.
- SMITH, K.A. 1988. The interleukine 2 receptor. *Adv. Immunol.* **42**: 165-179.
- SMITH, M.G. 1959. The salivary gland viruses of man and animals (cytomegalovirus inclusion disease). *Progr. Med. Virol.* **2**: 171-202.
- ST-PIERRE, Y., E. POTWOROWSKI et G. LUSSIER. 1987. Transmission of mouse thymic virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 1173-1176.
- STACKPOLE, C.W. 1969. Herpes type virus of the frog renal adenocarcinoma. *J. Virol.* **4**: 75-93.
- STERNBERGER, L.A. et J.J. CUCULIS. 1969. Method for enzymatic intensification of the immunocytochemical reaction without use of labeled antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **17**: 190-194.
- STERNBERGER, L.A., Jr P.H. HARDY, J.J. CUCULIS et H.G. MEYER. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horse-radish peroxidase-anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 315-333.
- STITES, D.P., J.D. STOBO et J.V. WELLS. 1987. Phagocytic cells chemotaxis and effectors functions of macrophages and granulocytes. Dans: Appleton et Lange. Basic and clinical immunology. Prentice-Hall, Connecticut.
- SUFFIN, S.C., K.B. MUCK, J.C. YOUNG, K. LEWIN, et D.D. PORTER. 1979. Improvements of the glucose oxidase isoenzyme technic: use of tetrazolium whose formazan is stable without heavy metal chelation. *Am. J. Clin. Pathol.* **71**: 492.

TIZARD, I. 1987. The structure of the immune system. p. 47-66. Dans: W.B. Saunders (ed.) Veterinary immunology and introduction. W.B. Saunders Company, Philadelphie.

TROTTA, P.P. 1991. Cytokines-an overview. Am. J. Reprod. Immunol. **25**:137-141.

UNANUE, E.R. 1981. The regulatory role of macrophage in antigenic stimulation. II. Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv. Immunol. **31**: 1-136.

WARD, J.M. 1990. Applications of immunohistochemistry in rodent tumor pathology. Exp. Pathol. **10**: 301-312.

WEISS, A. et B. IMBODEN. 1987. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. Adv. Immunol. **41**: 1-38.

WOOD, B.A., W. DUTZ et S.S. CROSS. 1981. Neonatal infection with mouse thymic virus: spleen and lymph node necrosis. J. Gen. Virol. **57**: 139-147.

WOODS, G.S. et R. WARNKE. 1981. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissue and its relevance to biotin-avidin detection system. J. Histochem. Cytochem. **29** :1196-1204.

YOUNG, W.W., Y. TAMURA, D.M. WOLOCK et J.W. FOX. 1984. Staphylococcal protein A binding for the Fab fragments of mouse monoclonal antibodies. J. Immunol. **133**: 3163-3166.

ZUO-RONG, S., S.H. ITZKOWITZ et Y.S. KIM. 1988. A comparison of three immunoperoxidase techniques for antigen detection in colorectal tissues. J. Histochem. Cytochem. **36**: 317-322.

**ANNEXE I**

### **Coloration à l'hématoxyline-éosine**

- . Tremper les lames dans trois bains successifs de toluène, 5 minutes chacun;
- . Puis tremper les lames dans trois bains successifs d'alcool (100%,95%,95%) 5 minutes chacun;
- . Laisser ensuite les lames tremper dans un bain d'eau, pendant 10 minutes;
- . Tremper les lames, pendant 8 minutes, dans un bain d'hématoxyline de Harris;
- . Retremper de nouveau les lames dans un bain d'eau, pendant 10 minutes;
- . Tremper ensuite, quelques secondes, dans un bain d'alcool, suivi d'un nouveau bain d'eau, pendant 10 minutes;
- . Tremper les lames dans la solution d'éosine, pendant 3 minutes;
- . Rincer les lames sous l'eau et faire suivre les trempages dans des bains d'alcool progressifs à 70%, 95%, 100%, 100%, 100%, pour ensuite reposer les lames dans deux bains successifs de toluène;
- . Monter entre lames et lamelles pour observations.

**ANNEXE II**

**Tampon citrate pH 5,0**

Acide acétique anhydre 10 g

Phosphate de sodium dibasique anhydre ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 14 g

Dissoudre dans 900 ml d'eau distillée

Ajuster le pH à 5,0

Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

**ANNEXE III**

**Technique d'immunodiffusion pour déterminer l'isotype  
d'après une trousse commerciale ©Amersham International, UK**

- . Pour chaque hybridome testé, mettre un bâtonnet par contenant;
  - . Diluer l'hybridome (1:50) dans du tampon TBS-Tween;
  - . Incuber l'hybridome avec le bâtonnet, 15 minutes à la température de la pièce, sous légère agitation;
- (Diluer l'Ac anti-souris\* marqué à la peroxydase pendant l'incubation (1:500) dans du tampon TBS-Tween).
- . Après l'incubation, rincer ensuite le bâtonnet en égouttant la solution d'hybridome et laver le bâtonnet en ajoutant 5 ml de tampon TBS-Tween au contenant.
  - . Incuber 5 minutes sous agitation.
  - . Eliminer la solution et répéter le rinçage au TBS-Tween;
  - . Ajouter 3 ml d'Ac anti-souris\* marqué à la peroxydase au contenant et fermer hermétiquement;
  - . Incuber 15 minutes à la température de la pièce, sous légère agitation.
- (Préparer la solution substrat pendant cette incubation: diluer 1 tablette de 4 chloro-1-naphtol dans 10 ml de méthanol froid (2-8°C). Ajouter 1 goutte de solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) à 50 ml de TBS. Mélanger ces solutions **SEULEMENT** avant l'utilisation).
- . Egoutter la solution du tube une fois l'incubation terminée et rincer 2 fois au TBS-Tween;
  - . Incuber 5 minutes sous agitation et enlever la solution. Répéter un 2ième lavage;
  - . Ajouter 3 ml de solution substrat au contenant et fermer hermétiquement;
  - . Incuber 15 minutes à la température de la pièce, sous agitation.
  - . Enlever cette solution et rincer le bâtonnet avec 5 ml avec de l'**EAU DISTILLEE**, deux fois.
  - . Enlever le bâtonnet et le faire sécher à l'air.
  - . Faire les lectures.

**ANNEXE IV**

**ULTRASTRUCTURAL STUDY  
OF MOUSE THYMIC VIRUS REPLICATION**

**R. ATHANASSIOUS, M. BRUNET, and G. LUSSIER  
CENTRE DE RECHERCHE EN VIROLOGIE, INSTITUT ARMAND-FRAPPIER,  
LAVAL, QUÉBEC, CANADA**

**CORRESPONDING AUTHOR:  
Dr. Gilles Lussier DVM, Ph.D.  
Virology Research Center  
Institut Armand-Frappier,  
P.O. Box 100  
Laval, Qc, Canada  
H7N 4Z3**

**ABSTRACT**

Thymuses of mice infected with mouse thymic virus (MTV), a herpesvirus, were examined for general ultrastructure. At the earliest sign of infection detected 5 days post-inoculation, lymphocytes, epithelial and phagocytic (macrophages) reticular cells were affected. Viral particles and filamentous structures were present in both the nucleus and cytoplasm of these cells. The selective effect of MTV on lymphocyte subpopulations was also evident. At more severe stages of cellular necrosis, 6 and 7 days post-infection, cytoplasmic granulation and loss in definition of cytoplasmic organelles became apparent. This was followed by nuclear degradation and aggregation of cells. Involvement of thymic cells other than lymphocytes had not previously been described.

## INTRODUCTION

Mouse thymic virus (MTV) is a naturally occurring enzootic virus of laboratory and wild mice inducing a nonfatal disease in newborns characterized by extensive necrosis of the thymus with maximum lesions occurring between 7 to 14 days after infection (6, 16, 17). Although morphological and serological characteristics of MTV have been described (1, 6, 10, 16, 17), not very much attention has been paid to its effect on thymic cells; emphasis has been placed on the structure of the virus itself rather than on the infected cells (1, 16). Furthermore it has recently been shown that only a selected population of lymphocytes was affected (8, 14). Epithelial cells were thought to be resistant, although it was suggested that macrophages may be a secondary site of attack (13). In the present study closer attention has been paid to the degree of the damage and the cell types affected.

## MATERIALS AND METHODS

**Virus:** Stock virus was prepared as previously described (11). MTV has been isolated in our laboratory and shown to be serologically identical to the original strain characterized by Cross *et al.* (6, 11).

**Animals:** Newborn CD-1 mice (i.e. less than 1 day old) were inoculated intraperitoneally with approximately  $10^3$  ID<sub>50</sub> of the virus. Animals were sacrificed everyday from day 1 to day 7 and days 9, 14, 17, and 21 after infection and the thymus processed for ultrastructural study.

**General Ultrastructure:** Tissues were fixed overnight at 4°C in a mixture of 2% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), followed by three 1 h washes with the same buffer containing 3% sucrose (1). Post-fixation was carried out with 1% osmium tetroxide prepared with the washing buffer. Tissues were dehydrated in a series of ethanol and embedded in low viscosity Spurr resin. Ultrathin sections, prepared with a LKB Ultratome III, were collected on 200-mesh, coated copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined with a Phillips EM 300 electron microscope at 80 kV.

## RESULTS

Neither lesions nor viral particles were detected in the thymus up to day 4 post-infection. Mild lesions became apparent on the fifth day post-infection in a limited number of cells in both cortical and medullary regions of thymus. Nuclear degradation in lymphocytes as well as in epithelial and phagocytic reticular cells was observed (Figs. 1, 5, 6 and 9). Capsids with electron-lucent and electron-dense cores were also present in the cytoplasm and nuclei of these cells (Figs. 1, 5 and 6). By day 6 the number of infected cells had increased and cellular breakdown was apparent (Figs. 2 and 7). This resulted in the release of viral particles into the surrounding structures (Fig. 3). The nuclei of lymphocytes were at a more advanced stage of degradation (Fig. 2). Cellular organelles also showed signs of disorganization: vacuolation of Golgi apparatus (Fig. 2) and change in structure of mitochondrial membranes (Fig. 3). Granulation of cytoplasm was also apparent (Fig. 3). Although reticular cells showed disturbance of cell structure, damage was less pronounced (Fig. 7). At this stage viral particles were observed in the nuclei of lymphocytes and in the cytoplasm of both lymphocytes and reticular cells (Figs. 3 and 7).

At day 7 post-infection severe necrosis was observed. In some areas this was manifested by disruption of lymphocytes; this included destruction of membranes, nuclear aggregation, and presence of undefined cytoplasmic organelles. In other areas, the number of lymphocytes was reduced and viral particles were present in the remaining broken cells. A certain number of lymphocytes appeared resistant to the infection and remained unaffected. Damage to epithelial reticular cells was less intense (Fig 8), while phagocytic reticular cells were markedly damaged (Fig 10). Affected epithelial reticular cells contained filaments in both the nucleus and cytoplasm; viral particles were often found in association with these filaments (Fig 10).

Peak necrosis was found to correspond to maximum viral production (Figs 4 and 8). After day 9 post-infection necrotic lesions were still observed but viral particles were no longer detectable.

## DISCUSSION

MTV induces necrosis in the thymus of neonatal mice (6, 17). Histology and pathogenesis of the infection in newborn mice have shown that the destruction of thymic lymphocytes is a special feature of this virus (6, 12, 17). Our study supports these findings. At the earliest sign of infection lymphocytes in both medullary and cortical regions of the thymus appear structurally altered. Viral particles and filamentous structures are present in both the nucleus and cytoplasm of these cells, and nuclear breakdown is evident. Although the majority of lymphocytes are affected some remained unaltered. This selective effect on lymphocyte sub-populations supports earlier reports showing that functionally most of the cells affected are thought to be helper T lymphocytes (4, 8, 14 ).

In addition to lymphocytes, epithelial reticular and phagocytic reticular (macrophages) cells are also affected. Nevertheless, the number of lymphocytes affected and the rate of lymphocyte breakdown far exceeds that of the other cells. Prior to this study, no cell types other than lymphocytes have been shown to be affected by MTV; although Morse (13) did suggest that macrophage may act as a secondary cell type in which MTV can persist in absence of lymphocytes. The early damage induced by MTV in the reticular cells is similar to that seen in lymphocytes; i.e. presence of viral filamentous structures and nuclear breakdown.

Extensive thymic necrosis occurs only when infant mice are infected with MTV; in adult mice primary infection with MTV leads to chronic salivary gland infection without apparent infection of the thymus (6, 17). This apparent age-related sensitivity of thymic cells is attributed to the acquirement of resistance with maturity of lymphocytes and macrophages. In the first case, it is postulated that alteration of lymphocyte surface

antigens with age confers resistance of mature lymphocytes to MTV infection (2, 15). The latter, while also based on maturity, correlates immaturity of macrophages to susceptibility of newborn mice to MTV infection. This was extrapolated from the findings that increase resistance of newborn mice to herpes simplex virus is due to maturity of macrophage function (9). The present study shows the susceptibility of both lymphocytes and macrophages of neonatal mice to MTV infection.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The work was supported by NESERC Grant A3314 and FCAR Grant OS-006.

## REFERENCES

1. Athanassious R, Alain R, Lussier G (1990) Electron microscopy of mouse thymic virus. *Arch Virol* 113: 143-150.
2. Butcher EC, Weissman IL (1984) Lymphoid tissues and organs. In Paul WE ed. *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, NY. pp 109-127.
3. Ceredig R, Glasebrook AL, Macdonald HR (1982) Phenotypic and functional properties of murine thymocytes (I.). *J Exp Med* 155: 358-379.
4. Cohen PL, Cross SS, Mosier DE (1975) Immunologic effects of neonatal infection with mouse thymic virus. *J Immunol*. 115: 706-710.
5. Cross SS, Morse III HC, Asofsky R (1976) Neonatal infection with mouse thymic virus. Differential effects on T cells mediating the graft-versus-host reaction. *J Immunol* 17: 635-638.
6. Cross SS, Parker JC, Rowe WP (1979) Biology of mouse thymic virus, a herpesvirus of mice, and the antigenic relationship to mouse cytomegalovirus. *Infect Immun* 26: 1186-1195.
7. Fracca G, Parks VR (1973) A routine technique for doublestaining ultrathin sections using uranyl and lead salts. *J Cell Biol* 25: 151-161.
8. Guignard R, Potworowsky E, Lussier G (1989) Thymic virus-mediated immunosuppression associated with decreased helper T cells and increased suppressor T cells. *Viral Immunol* 2: 215-220.
9. Johnson RT (1964) The pathogenesis of herpes virus encephalitis. II. A cellular basis for the development of resistance with age. *J Exp Med* 120: 359-374.
10. Lussier G, Guénette D, Shek WR, Descôteaux JP (1988a) Evaluation of mouse thymic virus antibody detection techniques. *Lab Anim Sci* 38: 577-579.
11. Lussier G, Guénette D, Shek WR, Descôteaux JP (1988b) Detection of antibodies to mouse thymic virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* 52:236-238.
12. Morse SS (1987) Mouse thymic necrosis virus: A novel murine lymphotropic agent. *Lab Anim Sci* 37: 717-725.
13. Morse SS (1988) Mouse thymic virus (MTLV; Murid herpesvirus 3) infection in athymic nude mice: evidence for a T lymphocyte requirement. *Virology* 163:255-258.
14. Morse SS, Valinsky JE (1989) Mouse thymic virus (MTLV) a mammalian herpesvirus cytolytic for CD<sup>+</sup> (L3T4<sup>+</sup>) T lymphocytes. *J Exp Med* 169: 591-596.

15. Mosier DE, Mathieson BJ, Campbell PS (1977) Ly phenotype and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. *J Exp Med* 146: 59-73.
16. Parker J, Vernon ML, Cross SS (1973) Classification of mouse thymic virus as a herpesvirus. *Infect Immun* 7: 305-308.
17. Rowe WP, Capps WI (1961) A new mouse virus causing necrosis of the thymus in newborn mice. *J Exp Med* 113: 831-844.

## LEGENDS

## Figs. 1-4.

Ultrastructure of lymphocytes at different stages of MTV infection.

Bar: 1 $\mu$ m.

**Fig. 1.** Day-5 post-infection. Note filament (F) formation in nucleus and presence of capsids (arrows), with electron translucent and electron dense cores in association with filaments.

**Figs. 2 and 3.** Day-6 post-infection. Lymphocyte are at more advanced stages of degradation. Note nuclear breakdown (Figs. 2 and 3), vacuolation of Golgi apparatus (G) (Fig. 2) and changes in structure of mitochondrial membranes (M) (Fig. 3). These ultrastructural changes are associated with the presence of viral particles in the nucleus and cytoplasm. (Fig. 2). In addition, intra- and extracellular viral particles can be observed (Fig. 3).

**Fig. 4.** Day-7 post-infection. Note the large number of viral particles within the lymphocyte. Viral particles with electron dense cores are present in the cytoplasm. An extracellular, enveloped viral particle (double arrows) is also seen.

## Figs 5 - 8.

Ultrastructure of reticular epithelial cells at different stages of MTV infection.

Bar: 1 $\mu$ m Inset Bar: 100nm.

**Figs. 5 and 6.** Day-5 post-infection. **Fig. 5.** Nucleus containing naked capsids with electron translucent and electron dense cores. **Inset.** Details of viral particles. **Fig. 6.** Note the presence of capsids (arrows) with electron dense core in cytoplasm and filaments (F) in the nucleus.

**Fig. 7.** Day-6 post-infection. Disturbance in cellular structure of reticular epithelial cell. Note distortion of nuclear membranes and viral particles in the cytoplasm. **Inset.** Higher magnification of viral particles.

**Fig. 8.** Day-7 post-infection. Note the number of viral particles in the cytoplasm. Filaments are present in both the nucleus and cytoplasm. **Inset.** Higher magnification of viral particles.

