

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN PRODUCTIVITÉ AQUATIQUE

PAR
SERGE CORBEIL
B.Sc. en biologie

RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE INDUITE PAR LE
VIRUS DE LA NÉCROSE PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE (VNPI)
CHEZ LA TRUITE MOUCHETÉE (SALVELINUS FONTINALIS L.),
ET CARACTÉRISATION DE L'IMMUNOGLOBULINE PRODUITE

NOVEMBRE 1991



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

Dans cette étude visant à mieux connaître l'immunité humorale de la truite mouchetée (Salvelinus fontinalis), nous avons évalué l'influence de deux paramètres, soit l'injection du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) et le temps d'incubation, sur la production d'anticorps spécifiques. De plus, cette étude nous a permis de caractériser les IgM produites.

Nous avons injecté une solution d'adjuvant de Freund à un premier groupe de truites mouchetées adultes, porteuses du VNPI et maintenues à 8°C. Nous avons injecté une solution composée d'adjuvant de Freund et de VNPI à un second groupe de truites également porteuses et maintenues à 13°C. Nous n'avons pas détecté d'anticorps spécifique au VNPI, chez les truites injectées à l'adjuvant, bien que ces dernières fussent porteuses du virus. Ce constat semble indiquer que ces truites auraient développé une tolérance immunitaire contre le VNPI. Par contre, nous avons détecté de forts taux d'anticorps spécifiques dans le second groupe. Ceci laisse supposer que le protocole d'injection d'adjuvant et de VNPI, provoquerait le surpassement du ou des mécanismes de tolérance pour permettre l'expression de la réponse immunitaire.

L'application des techniques de séroneutralisation, de chromatographie d'exclusion et d'électrophorèse, nous a permis de constater que les anticorps produits chez la truite mouchetée sont

probablement des IgM d'un poids moléculaire d'environ 669 000 daltons.

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr. Denis Larrivée qui a accepté de superviser mes travaux et qui m'a judicieusement conseillé tout au long de ma maîtrise.

En second lieu, je tiens à remercier mon co-directeur, le Dr. Laurent Berthiaume qui m'a donné l'opportunité d'effectuer une partie de ma recherche dans son laboratoire, et qui a su me conseiller et répondre à mes questions en tout temps.

Je tiens également à remercier Mlle Linda Bouchard et Mme Micheline Chénard, qui à de nombreuses reprises, m'ont apporté leur aide et assistance lors des expérimentations de laboratoire, et ce, avec gentillesse et intérêt.

De plus, j'aimerais remercier Mlle Hélène Bélanger pour ses conseils concernant l'utilisation des logiciels MacIntosh et pour son encouragement lors de la rédaction de mon mémoire.

Egalement, merci à Mlle Donna Jackson pour son aide lors de la correction de ce document.

Pour conclure, je remercie les directions de l'UQAC et de l'Institut Armand-Frappier, ainsi que tout ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

	page
Page présentation	i
Résumé	ii
Remerciements	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations.....	xii
Chap. 1 <u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u>	1
Chap. 2 <u>REVUE DE LA LITTERATURE</u>	4
2.1 <u>Introduction</u>	5
2.2 <u>Immunologie des poissons</u>	6
2.3 <u>Généralités sur le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI)</u>	33
Chap. 3 <u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	37
3.1 <u>Production et purification virale</u>	38
3.1.1 Culture cellulaire.....	38
3.1.2 Infection virale.....	39
3.1.3 Purification virale.....	39
3.1.4 Coloration négative.....	40
3.1.5 Détermination du titre viral.....	41

3.2 <u>Installations piscicoles</u>	41
3.2.1 Provenance des truites mouchetées porteuses	41
3.2.2 Disposition des bassins d'élevage et apport d'eau.....	42
3.2.3 Alimentation des poissons, qualité et température de l'eau	42
3.3 <u>Injection des poissons avec le VNPI VR-299 visant la production d'anticorps</u>	43
3.3.1 Détermination de l'état de porteur.....	43
3.3.2 Immunoélectromicroscopie.....	45
3.3.3 Méthode d'injection.....	45
3.3.4 Echantillonnage.....	46
3.3.5 Dissection et prélèvement du sérum et des organes.....	46
3.3.6 Titrage viral.....	47
3.3.7 Séroneutralisation.....	47
3.3.8 Microscopie électronique (coloration négative).....	48
3.4 <u>Purification de l'IgM</u>	49
3.4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium	49
3.4.2 Chromatographie d'exclusion	50
3.5 <u>Caractérisation de l'IgM</u>	51
3.5.1 Electrophorèse	51
Chap. 4 <u>RÉSULTATS</u>	53
4.1 <u>Caractérisation de la préparation virale d'injection</u>	54
4.1.1 Densité	54
4.1.2 Intégrité et homogénéité du VNPI	54
4.1.3 Titre de la suspension virale	54

4.2 <u>Caractérisation des truites mouchetées</u>	56
4.2.1 Recherche de VNPI chez les truites	56
4.2.1.1 Chez les truites non injectées au VNPI	56
4.2.1.2 Chez les truites injectées à l'adjuvant et au VNPI	61
4.2.2 Recherche d'anticorps neutralisants chez les truites ..	61
4.2.2.1 Chez les truites non injectées au VNPI	61
4.2.2.2 Chez les truites injectées à l'adjuvant et au VNPI	63
4.2.3 Mesure du poids corporel des truites	63
4.3 <u>Analyses statistiques des résultats</u>	64
4.4 <u>Caractérisation des immunoglobulines</u>	66
4.4.1 Purification des immunoglobulines	66
4.4.2 Recherche d'une activité neutralisante	67
4.4.3 Détermination du poids moléculaire	72
Chap. 5 <u>DISCUSSION</u>	74
5.1 <u>Influence du type d'injection et du temps sur la production d'anticorps chez les truites mouchetées porteuses du VNPI</u>	75
5.1.1 Inhibition non spécifique du VNPI par les sérum des truites témoins du groupe 6.....	75
5.1.2 Pouvoir neutralisant des sérum des truites porteuses non injectées et des truites expérimentales..	76
5.1.3 Influence de la température sur le titre viral, le titre en anticorps et le poids corporel.....	79
5.1.4 Production d'anticorps chez les différents groupes de truites	80
5.1.5 Degré de relation entre le titre viral, le titre en anticorps et le poids corporel.....	83

5.2 <u>Caractérisation de l'anticorps</u>	84
5.2.1 Chromatographie d'exclusion	84
5.2.2 Détermination du poids moléculaire par électrophorèse	85
5.3 <u>Prospectives</u>	86
Chap. 6 <u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	88
6.1 <u>Conclusion</u>	89
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1. Virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) purifié	55
Figure 2. Immunoélectromicroscopie effectuée sur les homogénats de truites porteuses du VNPI.....	58
Figure 3. Tracé chromatographique du sérum dialysé des truites expérimentales (groupe 5).....	68
Figure 4. Tracé chromatographique du sérum dialysé des truites témoins (Alléghanys, groupe 6).....	69
Figure 5. Détermination du poids moléculaire de la protéine majeure du sérum dialysé de truites (groupe 5) à partir du tracé référence établi avec des marqueurs de poids moléculaire connu.....	70
Figure 6. Migrations électrophorétiques des sérums de truites expérimentales et témoins.....	73

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1. Provenance et traitements des différents groupes expérimentaux de truites mouchetées.....	57
Tableau 2. Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel déterminés chez les truites non injectées et chez les truites témoins.....	59
Tableau 3. Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel déterminés à la 5 ^{ième} et 8 ^{ième} semaine chez les truites injectées à l'adjuvant et maintenues à 8°C	60
Tableau 4. Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel déterminés à la 5 ^{ième} et 8 ^{ième} semaine chez les truites injectées au VNPI et maintenues à 13°C.....	62
Tableau 5. Titres neutralisants des sérum dialysés expérimentaux (truites injectées avec le VNPI et sacrifiées après 8 semaines), des sérum témoins (truites non injectées avec le VNPI) et des fractions de l'éluat chromatographique.....	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μL = microlitre

mL =millilitre

nm = nanomètre

cm = centimètre

μg = microgramme

g = gramme

g = unité de la force gravitationnelle

$^{\circ}\text{C}$ = degré Celcius

U = unité

M = molaire

Ig = immunoglobuline

mA = milliampère

D.O. = densité optique

p/v = poids/volume

r.p.m. = rotation par minute

DICT = Dose infectieuse en culture de tissue

VNPI = Virus de la nécrose pancréatique infectieuse

ATCC = American Types Culture Collection

RTG-2 = Rainbow Trout Gonad

FHM = Fat Head Minnow

HEPES = "N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid"

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

MEM-E = Minimum Essential Medium Earle (Médium Minimum de Earle)

NTE = NaCl-Tris-EDTA

PBS = Phosphate Buffer Saline (Solution Saline Phosphatée)

CHAPITRE 1
INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Parmi les aspects de l'immunité chez les vertébrés poïkilotermes, l'influence de la température du milieu ambiant sur l'expression immunitaire, a attiré l'attention de plusieurs chercheurs dès le début du siècle. Ces premiers investigateurs s'intéressaient surtout aux problèmes immunopathologiques car il leur paraissait évident que les températures saisonnières influaient sur la fréquence des maladies de poisson ayant ainsi un impact négatif considérable au niveau économique (Cisar et Fryer, 1974). L'immunisation fut alors considérée comme un moyen possible de contrôle des maladies. A la même époque, les travaux fondamentaux concernant les mécanismes de formation des anticorps chez les poissons et leur nature, prenaient un intérêt considérable pour les études phylogénétiques (Dorson, 1982). Ces études générèrent une meilleure connaissance des paramètres environnementaux influençant la réponse immunitaire chez le poisson. Cependant, les mécanismes qui entrent en jeu pour moduler la production d'anticorps demeurent peu clairs (Avtalion *et al.*, 1976). Et pourtant, autant pour développer les techniques d'identification phylogénétique que pour bien comprendre le rôle des immunoglobulines dans le maintien de la santé chez les poissons, il est absolument indispensable de bien comprendre ces mécanismes. A cet égard, de nombreuses études portant sur la réponse immunitaire à médiation humorale face à des agents pathogènes et sur la nature

des anticorps, ont été réalisées chez des espèces comme la carpe (Cyprinus carpio), le saumon de l'atlantique (Salmo salar) et la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude ne fut entreprise afin de caractériser les anticorps de la truite mouchetée (Salvelinus fontinalis), espèce indigène au Québec et qui fait l'objet d'une nouvelle législation visant à accroître sa commercialisation.

Cette étude s'insère donc dans le cadre d'une recherche fondamentale sur l'immunologie de la truite mouchetée. Son premier objectif est de mesurer le degré d'influence de deux paramètres, soit l'injection virale et le temps d'incubation, sur la production d'anticorps spécifique, sur le titre viral retrouvé dans les tissus ainsi que sur le poids des truites. De plus, nous avons développé des techniques de production, de purification et de caractérisation d'anticorps spécifiques au virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI). Ces techniques visent à déterminer la nature et le poids moléculaire des IgM spécifiques chez la truite mouchetée. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons maintenu dans des conditions d'élevage expérimental, quatre groupes de truites et les avons soumises aux deux paramètres précités, de façon variable selon le groupe. Nous avons subséquemment évalué la réponse immunitaire des truites de chaque groupe, face à ces facteurs à l'aide de tests statistiques appropriés.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Introduction

Chez les animaux, l'immunité est un important mécanisme physiologique conférant une protection contre les infections et une préservation de l'homéostasie (Ingram, 1980). Depuis l'avènement de cette science qu'est l'immunologie, les mammifères et les oiseaux furent les principaux objets des travaux visant à élucider les différents mécanismes du système immunitaire. Cependant, très tôt, certains ont recherché dans les classes de vertébrés plus "primitifs", les manifestations ancestrales de la réponse immunitaire. On a su ainsi, dès le début du siècle, que les poissons étaient capables de répondre à l'introduction de substances étrangères, c'est-à-dire les antigènes, par une synthèse d'anticorps capables de réagir spécifiquement avec ces antigènes, ce qui est déjà une des caractéristiques essentielles de la réponse immunitaire (Dorson, 1984). Depuis cette époque, les connaissances en immunologie du poisson ont progressé, plus particulièrement depuis les deux dernières décennies. Il est ainsi admis que les poissons possèdent un système immunitaire qui peut s'exprimer de deux façons. En premier lieu, il existe une immunité non spécifique ou immunité naturelle qui est un mécanisme de défense inné et qui rend l'hôte résistant à l'infection par l'action immédiate de cellules ou protéines non spécifiques tels les macrophages et l'interféron (Ingram, 1980). En second lieu, il y a l'immunité acquise et spécifique qui s'affiche par la réponse humorale caractérisée par la production d'immunoglobulines et par la réponse

cellulaire connue par les phénomènes de rejet de greffe (Dorson, 1984).

Dans cette revue de littérature, nous examinerons les mécanismes du système immunitaire chez les poissons et plus particulièrement chez les téléostéens et la production des anticorps les comparant aux mécanismes de défense des mammifères; ceci nous permettra de mettre en évidence les relations phylogénétiques dans la résistance contre les agents pathogènes. De plus, nous présenterons les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de base du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI), virus que nous avons utilisé pour générer les anticorps spécifiques.

2.2 Immunologie des poissons

Immunité à médiation humorale

Structure des immunoglobulines

Tous les vertébrés soumis à une stimulation immunogénique ont la capacité de produire des anticorps circulants; les espèces de poissons dérivant des classes Chondrichthyes et Ostéichthyes n'y font pas exception (Dorson, 1972). Les poissons cartilagineux et osseux sont connus pour produire une classe d'immunoglobuline qui, au niveau structurel, s'apparente à l'IgM des mammifères, que l'on considère comme la plus primitive des cinq classes produites chez ce phylum (Kobayashi *et al.*, 1981 et 1984). A l'encontre de l'IgM des mammifères qui est pentamérique, celle des téléostéens apparaît être une

glycoprotéine tétramérique de haut poids moléculaire d'environ 700 000 daltons, composée de quatre sous-unités chacune comprenant deux chaînes lourdes de type μ (mu) et deux chaînes légères de type encore indéterminé. Cette molécule possède un coefficient de sédimentation de 16 S (Dorson, 1972a et 1974; Corbel, 1975; Lobb et Clem, 1981 et 1981b; Kobayashi *et al.*, 1981). De plus, on remarque que certaines espèces de poissons semblent posséder des immunoglobulines de faible poids moléculaire ressemblant à des monomères ou à des dimères (Lobb et Clem, 1981a, b et c; Rosenshein *et al.*, 1986). Isbell et Pauley (1983) stipulent que ces types différents d'immunoglobulines se distinguent sur la base de leur mobilité électrophorétique, de leurs caractéristiques d'élution sur colonne chromatographique et de leur taille. Des études effectuées sur des poissons appartenant à la superclasse des Agnathes, plus particulièrement sur les lamproies (Litman, 1976) et sur les dipneustes appartenant à la classe des Ostéichthyes, démontrent que d'autres classes d'immunoglobulines existent (Dorson, 1974). Chez la lamproie, l'immunoglobuline en question serait un monomère composé de deux chaînes lourdes et de deux légères. La différence fondamentale que présente cette immunoglobuline est l'absence de ponts disulfures interchaînes qui seraient remplacés par des liaisons non-covalentes. Chez les dipneustes, il s'agit d'une immunoglobuline classifiée N, d'un poids moléculaire de 120 000 daltons, possédant une chaîne lourde d'un poids moléculaire déjà retrouvé chez les oiseaux. L'approche expérimentale classe les immunoglobulines de poissons en deux types

soit les immunoglobulines à poids moléculaire élevé et les immunoglobulines à faible poids moléculaire. De plus, les chercheurs précisent que les deux types ne sont pas des produits métaboliques l'un de l'autre, mais sont plutôt le produit de gènes séparés, ou encore sont issus des événements de la différenciation transcriptionnelle ou post-traductionnelle (Lobb et Clem, 1981a; Tatner et Manning, 1983a).

Chaîne J

Il est désormais admis que le polypeptide additionnel nommé chaîne J, identifié chez plusieurs mammifères ainsi que chez les oiseaux et les amphibiens, est une sous-unité essentielle des immunoglobulines polymériques (Kobayashi *et al.*, 1981). Cette chaîne J joue un rôle dans les mécanismes de la polymérisation intracellulaire des immunoglobulines polymériques telles l'IgM et l'IgA (Lobb et Clem, 1981a). Chez les poissons, cette chaîne n'a été détectée que chez le requin et le poisson chat. Il reste encore à préciser si elle diffère par ses propriétés physico-chimique de celles des vertébrés supérieurs (Kobayashi *et al.*, 1981; Isbell et Pauley, 1983).

Hétérogénéité structurelle des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines

On a mis en évidence l'existence d'une diversité structurelle chez les immunoglobulines de poisson, notamment en ce qui concerne les variations dans les ponts disulfures des unités tétramériques et également dans la taille des chaînes lourdes (Harvarstein *et al.*, 1988). Dans une autre étude (Tomonaga *et al.*, 1985), on a démontré l'hétérogénéité dans les poids moléculaires des chaînes légères chez deux espèces de poisson cartilagineux. Cependant, on ignore toujours si les deux formes distinctes de chaînes légères telles la kappa et la lambda des vertébrés supérieurs existent chez les poissons. Pour leur part, Rosenshein *et al.* (1986) affirment que les immunoglobulines des poissons de toute la sous-classe des Elasmobranches démontrent un fort degré de conservatisme évolutif illustré par le manque de diversité structurale des chaînes lourdes et légères. Selon Vilain *et al.* (1984), la variation retrouvée dans les poids moléculaires de la chaîne lourde des immunoglobulines d'une espèce à l'autre serait en partie due à la glycosylation.

Spécificité des immunoglobulines

La réponse immunitaire des vertébrés supérieurs est caractérisée par sa capacité à produire des anticorps spécifiques pour un vaste champ de déterminants antigéniques que certains estiment de l'ordre de 10^6 à 10^7 . Cette énorme diversité serait issue de la recombinaison

de différents ensembles de gènes (nommés V,D,C et J) lors de la différenciation cellulaire, constituant ainsi des séquences géniques définitives codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères. De plus, des variations additionnelles peuvent survenir, telles des mutations somatiques et des fluctuations au niveau des sites recombinants (Clem et Leslie, 1982; Wetzel et Charlemagne, 1985). A ce jour, la différence observée entre les vertébrés primitifs et les vertébrés supérieurs dans le mode d'expression de leur répertoire de gènes V,D,C et J, semble refléter un important contraste dans l'organisation germinale et/ou dans les mécanismes de réarrangement somatique de leurs segments géniques respectifs (Desvaux *et al.*, 1987). En ce qui a trait à la capacité des poissons à faire face à une diversité de déterminants antigéniques, les auteurs ne s'accordent pas. Certains affirment qu'à l'instar des mammifères, les poissons possèdent un large éventail de sites combinatoires chez leurs anticorps. Ceci impliquerait que les mécanismes générant les divers sites de combinaison apparaissent tôt dans la phylogénèse (Clem et Leslie, 1982). D'autres stipulent que les vertébrés inférieurs possèdent un répertoire d'anticorps beaucoup moins hétérogène que celui des mammifères et que les mécanismes somatiques sont moins efficaces. A cet effet, Wetzel et Charlemagne (1985) précisent que le cycle cellulaire, probablement plus lent chez les poissons que chez les mammifères, ne donne pas suffisamment de temps pour que la sélection de clones de lymphocytes d'une affinité plus grande s'effectue. Soumis à cette limitation, les vertébrés inférieurs peuvent

avoir développé durant l'évolution un petit répertoire d'affinité en immunoglobulines. De leur côté, Harvarstein *et al.* (1988) suggèrent qu'une diversité existe et varie selon le rang évolutif de l'espèce donnée.

Durée de vie des anticorps

Des études ont démontré que la demi-vie biologique des anticorps chez la truite et la carpe était approximativement de sept jours. Il est suggéré que la persistance du taux d'anticorps est provoqué par une stimulation continue impliquant une rétention à long terme d'antigènes dans les organes lymphoïdes, sous la forme de complexes immuns antigène-anticorps (Lamers *et al.*, 1984). Dorson (1972) précise qu'il est permis de penser qu'une température basse entraîne une persistance accrue des anticorps.

Immunoglobulines du mucus

On reconnaît que le mucus du poisson confère une protection à l'animal agissant comme barrière physique contre l'invasion des pathogènes du milieu environnant. Il appert que des immunoglobulines s'y trouvent également et que ces dernières contribuent à la neutralisation de divers micro-organismes. Ces immunoglobulines proviendraient soit d'une synthèse locale de cellules encore non identifiées ou soit du sérum par des mécanismes de transport actif (Ourth, 1980; Lobb et Clem, 1981; Fletcher, 1981).

Évolution des immunoglobulines

Dans l'évolution des immunoglobulines, la classe IgM présente un conservatisme phylogénétique inhabituel eu égard à sa conformation, à sa structure, à sa composition en hydrate de carbone et à son processus ontogénique (Frommel *et al.*, 1971). Selon Litman (1976), trois modèles majeurs de l'évolution structurelle des immunoglobulines peuvent être présentés:

1-Les espèces dérivant des primitifs Ostracoderms possèdent une forme déterminée d'anticorps partageant un nombre de traits structuraux communs avec l'immunoglobuline G des vertébrés supérieurs, mais divergeant encore par cette absence de ponts disulfures interchaînes;

2-Les espèces dérivant des Placoderms (exception faite de la lignée des Sarcoptérigiens), possèdent une seule classe d'Ig ressemblant à l'IgM des mammifères;

3-Les vertébrés dérivant des Placoderms qui partagent des ancêtres communs avec les Sarcoptérigiens (incluant les amphibiens, les reptiles, les aviaires et les mammifères), possèdent en plus de l'IgM une autre classe d'immunoglobuline.

Selon Shelton et Smith (1970), l'implication des configurations pentamériques, tétramériques, dimériques et monomériques des macroglobulines en regard de leur développement phylogénétique n'est pas clair; cependant, il apparaît ne pas y avoir de relation entre le nombre de sous-unités dans la molécule et la position phylogénétique de l'animal qui la produit.

Immunité à médiation cellulaire

Les travaux se rapportant à l'immunité cellulaire démontrent que les téléostéens présentent plusieurs de ces mécanismes retrouvés chez les mammifères, tels l'hypersensibilité retardée, la cytotoxicité envers les cellules infectées ou transformées, les rejets de greffe et la fonction assistante (DeKinkelin *et al.*, 1985).

Types de lymphocytes

Une étude relative à la présence de lymphocytes chez les poissons a effectivement révélé leur existence (Ellis, 1977). Néanmoins, l'incertitude est demeurée quant à l'existence de plus d'un type de lymphocytes. Dans leurs travaux respectifs, DeLuca *et al.* (1983) ainsi que Clem *et al.* (1984) ont précisé à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-immunoglobulines de poisson, qu'il était possible de mettre en évidence au moins deux types de lymphocytes, les cellules T et les cellules B. Il semblerait, entre autres, qu'une température basse *in vitro* ait un effet inhibiteur plus fort sur la réponse mitogénique des

cellules T que des cellules B. Ces lymphocytes B responsables de la production d'anticorps, détiendraient d'après Irwin *et al.* (1986) un répertoire variable concernant la spécificité des anticorps selon les organes lymphoïdes les abritant. Ceci soulève des questions quant aux rôles des divers organes lymphoïdes chez les poissons.

Mémoire cellulaire

La mémoire immunitaire chez les téléostéens, face à divers antigènes, a été démontrée et quantifiée (Lamers *et al.*, 1984). On note que cette mémoire est distinctement plus faible et moins générale que chez les mammifères; ces derniers pouvant en effet présenter une réponse jusqu'à cinquante fois plus forte que chez les poissons (Desvaux et Charlemagne, 1981). A cet effet, Du Pasquier (1982) précise que les mécanismes de diversification somatique opérant lors de l'ontogénie des lymphocytes, se produisent également chez les vertébrés inférieurs mais qu'ils sont influencés par des facteurs externes au système immunitaire tel que par les propriétés du cycle cellulaire. Selon l'auteur, ces influences pourraient réduire l'effet des mécanismes de diversification des lymphocytes et ainsi réduire le répertoire en anticorps.

Cytotoxicité

De récents résultats ont démontré que des lymphocytes alloréactifs de carpe peuvent lyser spécifiquement une cellule cible

allogénique. Ceci est un autre exemple d'analogie fonctionnelle aux cellules T des mammifères (Caspi et Avtalion, 1984).

Phagocytose et localisation des antigènes

Diverses expérimentations portant sur l'injection d'antigènes solubles et particulaires chez les poissons ont permis de constater que la rate, le rein, les macrophages localisés dans l'atrium, ainsi que les branchies, sont aptes à capturer des antigènes (Ellis *et al.*, 1976; Secombes et Manning, 1980; Chilmonczik, 1980). Dans le cas d'un antigène bactérien ingéré, il a été observé que l'antigène était capté par pinocytose par des cellules épithéliales de l'intestin postérieur et que cela s'accompagnait d'un afflux de cellules lymphoïdes dans cette région (Davina *et al.*, 1982). Secombes *et al.* (1982) précisent que l'ingestion de certains antigènes ne s'effectue que lorsque ces derniers se présentent sous forme de complexes immuns antigène-anticorps.

Mécanismes de l'immunité

Un modèle d'immunomodulation chez les poissons est suggéré par Anderson *et al.* (1984). Selon eux, la réponse immunitaire est composée de deux systèmes. Le premier, nommé système afférent, reçoit, traite et relaie les informations, en l'occurrence les antigènes, vers la deuxième composante qu'est le système efférent. Ce dernier effectue la production de macrophages activés, d'effecteurs, de

lymphocytes activés et d'anticorps. Ces derniers ont pour fonction d'éliminer les particules étrangères et les antigènes solubles de l'organisme. Le système efférent contrôlerait non seulement la quantité mais aussi la durée des effecteurs.

Organes lymphoïdes

Les principaux organes lymphoïdes des téléostéens sont le thymus, le rein (plus particulièrement le rein antérieur), la rate et les tissus lymphoïdes associés au tube digestif. Il n'y a pas chez les poissons d'équivalent anatomique des ganglions lymphatiques ni de la moelle osseuse des mammifères (Dorson, 1984).

Aspects morphologiques et ontogéniques

Le thymus

Le thymus des téléostéens est formé de deux organes oblongs situés dans l'épithélium des chambres branchiales à l'insertion de l'opercule sur la boîte crânienne. Cet organe se compose essentiellement de lymphocytes (les thymocytes), de lymphoblastes, ainsi que de tissu conjonctif (Dorson, 1984). La structure du thymus inclut deux zones distinctes que l'on pourrait comparer au complexe cortex-medulla des mammifères. Cependant, il semble que chez les poissons, le tissu thymique soit moins différencié que chez les mammifères (Mughal et Manning, 1986). Les cellules lymphoïdes les

plus externes du thymus ne sont séparées du milieu extérieur que par une couche de cellules représentant la capsule épithéliale. De surcroît, cette capsule a probablement une importance dans la relation existant entre les tissus thymiques et l'environnement externe, tel la pénétration des antigènes (Chilmonczik, 1985; Dorson, 1984). Grace et Manning (1980) affirment que, chez les téléostéens, le thymus est le premier organe à apparaître, suivi de près par le rein antérieur et en dernier lieu par la rate. Néanmoins, ces trois organes présentent un poids relatif maximum (pourcentage du poids corporel) à deux mois d'âge; ceci reflète leur importance durant ce stade précoce du cycle de vie de la truite (Tatner et Manning, 1983). Une hypothèse (Ellis, 1977), soutient que le thymus des poissons est précocement envahi par des cellules souches exogènes, qui dès lors s'y différencient en lymphocytes. Une autre hypothèse suggère que tous les lymphocytes de poisson croissent dans le thymus par une transformation directe des cellules épithéliales (Grace et Manning, 1980). Selon Tatner et Manning (1983), le nombre de thymocytes décroît avec l'âge. Également, il fut remarqué que la vaste majorité des cellules meurent dans le thymus ou encore émigrent vers les organes lymphoïdes périphériques. En fait, il est possible que la glande thymique serve à maintenir une proportion relativement constante de lymphocytes dans ces organes périphériques. Grace et Manning (1980) ont également démontré que le thymus et le rein ont une fonction lymphoïdique avant le stade de l'alimentation externe. De plus, une étude de Tatner et Adams (1987) a mis en évidence des réponses différentes chez des

poissons thymectomisés et témoins. On a fait l'hypothèse que ces différences proviennent de la présence de cellules suppressives ou assistantes dans le thymus.

Le rein

Le rein antérieur, qui est une composante primordiale du système immunitaire, est composé d'un réseau dense de sinus vasculaires (Dorson, 1984). En plus d'être un site majeur de production de cellules érythroïdes, lymphoïdes, myéloïdes et de mélano-macrophages, il trappe des antigènes et ses cellules lymphoïdes sécrètent des anticorps. On a également isolé de cet organe des effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire, tels les cellules cytotoxiques non-spécifiques (Bayne, 1986). Grace et Manning (1980) stipulent que le rein chez le poisson est la source post-embryonnaire de cellules hématopoïétiques. Ces dernières y sont présentes avant même la différenciation lymphoïdique dans le thymus. Le rein est ainsi l'organe lymphoïde majeur du système immunitaire du poisson. On considère d'ailleurs cet organe comme l'homologue de la moelle osseuse chez les vertébrés supérieurs (Zapata, 1979; Grace et Manning, 1980; Irwin, 1986; Anderson *et al.*, 1986).

La rate

La rate consiste en une pulpe rouge faite de sinus sanguins et d'ellipsoïdes contenant des lymphocytes et des macrophages. De plus,

il faut ajouter la présence de mélano-macrophages dans tout l'organe (Secombes et Manning, 1980). L'excision de la rate chez la carpe (Bayne, 1986) n'ayant pas provoqué de dépression de la réponse humorale, amène l'auteur à conclure que le rein antérieur est apte à compléter toutes les phases de la réponse immunitaire indépendamment des autres organes lymphoïdes. Cependant, lors d'une étude portant sur l'ontogénie et l'immunocytochimie des lymphocytes de poisson cartilagineux, Tomonaga *et al.* (1985) ont précisé que la rate est le principal site de production d'immunoglobulines, car ces cellules y apparaissent en premier et demeurent en concentration plus élevée que dans les autres organes.

Tissus lymphoïdes associés à l'intestin

Les poissons présentent également des cellules lymphoïdes dans la muqueuse intestinale (Dorson, 1984). Des découvertes indiquent que ces tissus ayant la possibilité de produire des immunoglobulines, se développent précocement chez les poissons cartilagineux (Tomonaga *et al.*, 1985). Hart *et al.* (1986) affirment que les cellules précurseurs des tissus associés à l'intestin apparaissent après la différenciation du thymus et l'apparition des cellules lymphoïdes du rein. Leur apparition coïncide également avec la différenciation de la rate. Il est encore impossible selon les auteurs, se basant sur des études histologiques, de préciser de quels organes ou cellules originent les tissus lymphoïdes associés à l'intestin.

Immunomaturation

Il appert que le développement des organes lymphoïdes débute rapidement chez l'alevin de salmonidés et que ce phénomène est accompagné de la capacité de démontrer une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale. Il semblerait que cette habileté à répondre à différents antigènes se développe de façon séquentielle (Tatner, 1986). Par contre, on note qu'une exposition trop précoce aux antigènes thymodépendants peut résulter en une tolérance immunitaire ou en une suppression de la synthèse d'anticorps (Mughal et Manning, 1986). Certaines évidences démontrent que ce n'est pas l'âge mais plutôt le poids qui détermine la maturité immunitaire. On suggère également que les différentes capacités immunitaires sont fonction de l'atteinte d'un certain nombre critique de cellules immunocompétentes (Tatner, 1986; Mughal et Manning, 1986). A cet effet, Dorson en 1974 a démontré de façon claire que des alevins de truites arc-en-ciel de moins de un gramme possédaient une compétence immunitaire. Tatner et Manning (1983a) sont parvenus aux mêmes conclusions par la démonstration d'un rejet d'allogreffe dès le quatorzième jour post-éclosion (14°C), effectué chez des alevins de la même espèce.

Médiateurs immunologiques

Caspi et Avtalion (1984) ont démontré l'existence de médiateurs solubles chez la carpe, dont l'activité est similaire à l'interleukine 1

et 2 des mammifères. Ces molécules chez le poisson jouent probablement un nombre important de rôle dans l'initiation et/ou la régulation de la réponse immunitaire, directement à travers l'action des lymphocytes ou via l'activation d'autres médiateurs (Sigel *et al.*, 1986).

Immunosuppression

Nombreuses sont les études expérimentales qui ont démontré que les poissons sont susceptibles de voir leur capacité immunitaire affectée par des composés biologiques, chimiques et par des facteurs environnementaux (DeKinkelin *et al.*, 1988).

Les hormones

En effet, des études ont permis de mettre en évidence les effets immunosuppresseurs des hormones présentes chez les poissons téléostéens, tels les corticostéroïdes (cortisol) et la prostaglandine (Wechsler *et al.*, 1986; Wolski *et al.*, 1986). Des quantités excessives de ces hormones (période de fraie, migration, etc.) induiraient une diminution de la production cellulaire des organes lymphoïdes, ce qui aurait pour effet de diminuer la production d'anticorps (Chilmonczik, 1985).

L'influence du stress

L'influence du stress sur la réponse immunitaire des poissons a fait l'objet d'une revue (Ellis, 1981), qui met en évidence le peu d'information que nous possédons à ce sujet. Cependant, comme le stress entraîne une nette augmentation du taux de cortisol plasmatique, nous pouvons suggérer que le stress induit chez le poisson les effets caractéristiques des corticostéroïdes tel que discuté précédemment (DeKinkelin, 1988).

L'influence de la température

Les poissons étant des poïkilotermes, possèdent une physiologie qui doit répondre aux conditions physico-chimiques du milieu hydrique environnant. La température est un facteur de modulation très significatif de la réponse immunitaire (DeKinkelin, 1985). On constate que la cinétique de l'immunité à médiation humorale et cellulaire est lente à basse température, alors qu'une réponse plus forte est obtenue à la température physiologique optimale pour une espèce donnée (Mughal et Manning, 1985). Ce phénomène d'inhibition de la réponse immunitaire par des températures basses a soulevé plusieurs interrogations. Plus particulièrement, à quel stade de la formation des anticorps, la température a-t-elle le plus d'effet? Plusieurs hypothèses ont été élaborées afin d'apporter quelques réponses à cette interrogation. A cet égard, l'unanimité ne règne pas au sein de la communauté scientifique. Certains auteurs affirment que le stade

primaire de la réponse incluant la phagocytose et la métabolisation de l'antigène, n'est pas inhibé significativement. Par contre, le deuxième stade, qui consiste en la synthèse et au relargage dans la circulation des anticorps est affecté par la température. Par conséquent, il est possible aux animaux d'acquérir une immunité à basse température, mais cette dernière ne se manifeste pas avant que la température ambiante ne s'accroisse (Avtalion *et al.*, 1976). Une hypothèse contraire stipule qu'il peut se produire une synthèse et un relargage des anticorps à température froide dans le cas où le poisson est exposé à l'antigène à température élevée (citée par Avtalion *et al.*, 1973). Une autre hypothèse établit que la première phase thermodépendante relève de l'interaction des cellules B et T. Le mécanisme serait bloqué soit par le blocage de la fonction T assistante ou soit par l'accroissement de l'activité T suppresseur (Mughal et Manning, 1985). On croit que la phase subséquente de multiplication et de différenciation des lymphocytes B est indépendante de la température (Ellis, 1982). Le second stade de sensibilité à la température serait la synthèse et le relargage des anticorps des cellules plasmatiques (Rijkers *et al.*, 1980).

Les facteurs saisonniers

On rapporte que, outre la température, la photopériode variant avec les saisons pourrait influer sur la modulation de l'expression immunitaire des poissons (Nakanishi, 1986). On relève que la

photopériode affecte les cycles hormonaux et que la lumière est un synchronisateur important de l'activité physiologique.

Immunostimulateurs

Il a été possible, dans le cadre d'une étude (Kitao et Yoshida, 1986) sur la vaccination des poissons, de restaurer les mécanismes immunitaires des truites arc-en-ciel qui étaient immunosuppressées par des antibiotiques. Cette expérience fut réalisée par l'application d'un immunostimulateur, soit le peptide FK-565. Les auteurs de l'étude précisent que l'utilisation du FK-565 pourrait prévenir les maladies bactériennes rencontrées fréquemment dans les piscicultures.

La tolérance

Le phénomène de la tolérance, qui est bien connu chez les mammifères, fut également observé chez les poissons. Différents travaux précisent que les antigènes viraux rencontrés à un stade précoce de l'alevinage, vont induire une infection qui persistera pendant plusieurs années chez les survivants. On suggère ici une tolérance immunitaire par laquelle l'antigène étranger est reconnu comme faisant partie intégrante de l'organisme par le système immunitaire néonatal (Wolf et Quimby, 1969; Bootland *et al.*, 1986). Selon Avtalion *et al.* (1981), la tolérance chez le poisson n'est pas due à un simple blocage temporaire des lymphocytes B tel qu'observé chez les mammifères, mais plutôt à différents mécanismes capables de

perdurer. Les lymphocytes T assistants y auraient un rôle prépondérant.

Etat de porteur

L'état de porteur se caractérise par la présence de l'agent viral dans les tissus du poisson (rein, rate, caecum pylorique etc.) sans que l'animal ne présente de signes cliniques de la maladie (Yu *et al.*, 1982), ni que sa vie ne soit significativement compromise (Knott et Munro, 1986). La base physiologique de ce phénomène est encore inconnue. Par contre il semblerait, selon Reno *et al.* (1978), qu'un degré de tolérance du système à médiation cellulaire, permettrait la réplication du virus à la limite de la production de la maladie. Pour sa part, Yamamoto (1975a) affirme que le déclin dans le temps de l'état de porteur et du taux de virus dans les tissus, apparaît être le résultat d'un accroissement d'anticorps circulants. A ce sujet, Reno *et al.* (1978) affirment que les anticorps circulants ne préviennent pas la réplication intracellulaire du virus de la nécrose pancréatique infectieuse mais restreignent sa dispersion extracellulaire. A ce jour, quelques expérimentations ont été effectuées sur les truites mouchetées et arc-en-ciel, afin de connaître leur réaction face à une infection par le VNPI sérotype VR-299. Yamamoto (1975) stipule que chez la truite mouchetée l'état porteur issu d'une épidémie demeure pour une longue période et possiblement pour le reste de la vie de l'animal. De l'avis de Dorson (1981), les truites mouchetées sont de piètres productrices d'anticorps neutralisants et peuvent être

immunogénétiquement tolérantes. De cette même étude, l'auteur relate qu'un taux très faible ou inexistant d'anticorps neutralisants fut trouvé parmi une population de truites mouchetées comprenant 69% de porteurs. En se basant sur leur propre étude, Swanson et Gillespie (1982) affirment également que les truites mouchetées porteuses sont incapables de produire un fort niveau d'anticorps neutralisants face au VNPI. Il fut également observé que la truite arc-en-ciel est une meilleure productrice d'anticorps et que de ce fait, devient moins fréquemment porteuse (Dorson, 1981). A ce sujet, Reno *et al.* (1978) affirment que la réponse immunitaire provoquée par le VNPI chez la truite arc-en-ciel, serait une combinaison de mécanismes incluant une réponse à médiation cellulaire et la production d'interféron ou d'autres antagonistes à la réplication virale. Ces mécanismes seraient impliqués dans la suppression de la maladie et l'élimination du virus infectieux. Selon ces mêmes auteurs, il n'existerait pas de corrélation entre le titre d'anticorps sériques et la quantité virale retrouvée dans les organes du poisson. Ces résultats contrastent avec d'autres provenant d'études qui montrent une relation inverse entre le titre viral et le taux d'anticorps.

Mécanismes de défense non spécifiques ou immunité naturelle

Parmi les composants du sérum, plusieurs molécules présentent, sous certaines conditions, des réactions face à des agents étrangers. Lorsque ces antigènes entrent en contact avec le sang, plusieurs

composants du sérum autres que les immunoglobulines peuvent interagir. Ces molécules, dont l'activité couvre un vaste spectre de déterminants antigéniques, exhibent également une hétérogénéité dans leurs propriétés physico-chimiques et biologiques et sont fréquemment appelées anticorps naturels (Ingram, 1980). L'immunité naturelle chez les poissons comporte des effecteurs humoraux, cellulaires et tissulaires. Ces effecteurs jouent non seulement un rôle important dans les mécanismes de défense du poisson adulte, mais également durant les premiers stades du développement. En effet, le poisson est presque entièrement dépendant d'une immunité non spécifique durant la période d'alevinage avant la maturation de son système immunitaire (Manning *et al.*, 1982). Les principaux effecteurs humoraux sont le complément, l'interféron, les macrophages, les phagocytes et les substances sériques à propriétés agglutinantes, hémolysantes, précipitantes ou neutralisantes.

Le système complément

La présence d'un antigène dans le système sanguin provoque ordinairement une réaction en chaîne de molécules nommées complément. Activé par le couplage antigène-anticorps, le système complément effectue une réaction séquentielle de ses composants qui vont ultimement endommager la membrane cellulaire de l'intrus et causer sa lyse (Corbel, 1975). A ce jour, on ne connaît à peu près rien du mode d'activation du système complément chez les poissons. Il est très complexe et est composé d'au moins vingt protéines différentes

dont onze ont déjà été isolées et caractérisées. Tous les composants sont divisés en sous-unités dont certaines contiennent un site réactif pour les anticorps avec lesquels elles se lient. Certains de ces composants sont inactivés à des températures bien inférieures auxquelles les anticorps sont détruits, ce qui démontre leur nature bien différente des immunoglobulines (Corbel, 1975). Le système complément présente quelques propriétés spécifiques tels que l'indifférence face à l'immunisation, son niveau de concentration constant *in vivo*, sa capacité d'accroître la phagocytose, ses possibilités de neutralisation virale, d'inactivation d'endotoxines, d'opsonisation, de cytotoxicité, d'adhérence immunitaire et d'hypersensibilité (Corbel, 1975).

L'interféron

L'interféron est une protéine cellulaire dont la synthèse est induite par une variété de micro-organismes et de substances antigéniques tels les acides nucléiques et les endotoxines bactériennes. Son principal rôle biologique est d'interférer avec la réplication et la croissance virale sans cependant affecter les virus eux-mêmes. La protéine agit en bloquant le ARN dans le processus de la traduction et ainsi fait obstruction à la réplication virale (Ingram, 1980). D'après le même auteur, on attribue à l'interféron du poisson une fonction importante avec le concours d'immunoglobulines dans la résistance aux infections microbiennes. Il supplérait dans certains cas au système de défense principal (production d'anticorps) qui serait

lent à s'exprimer. De plus, la production d'interféron permet à l'animal de réagir contre les invasions de pathogènes lorsque la réponse immunitaire est affaiblie par l'abaissement de la température. Une étude a démontré que les poissons sont aptes à produire plus d'un type d'interféron, et ce, dépendamment du type d'inducteur et du type de cellule stimulée (Rijkers, 1982). La similarité moléculaire de l'interféron des vertébrés supérieurs et des poissons, tend à accréditer l'hypothèse qui stipule que ce système de défense non spécifique est un mécanisme très ancien de protection antivirale chez les poissons.

Les macrophages

Ces cellules sont présentes dans plusieurs tissus, notamment dans les cellules libres des mésentères, dans les cellules ellipsoïdales de la rate, dans le rein et dans d'autres tissus selon les espèces (Ellis, 1982). D'autres études menées sur ces cellules phagocytaires (Ellis, 1977a; Secombes, 1986) ont établi que les macrophages sont impliqués dans des mécanismes immunitaires spécifiques dont: le retrait d'excès d'antigènes, ce qui a pour effet de prévenir la paralysie immunitaire; la capture de l'antigène et la séquence de processus menant à la formation d'anticorps; la production de facteurs rehaussant la sensibilité des lymphocytes; la production de facteurs facilitant la coopération entre les lymphocytes T et B; la production de facteurs de défense non spécifiques tels l'interféron et le complément; la démonstration d'une chimiotactilité

à plusieurs agents; la réponse à des facteurs libérés par les lymphocytes et les lymphokines, qui résulte en des changements fonctionnels et morphologiques, entre autres au niveau de l'activité métabolique et cytotoxique.

Les transferrines

Les transferrines sont des glycoprotéines globulaires sans groupe hème qui possèdent des affinités de liaison avec l'ion ferrique. Ces molécules jouent un rôle de transporteur de l'ion ferrique jusqu'au site de synthèse de l'hémoglobine. Leur rôle dans les mécanismes de défense s'explique par leur capacité, lorsqu'elles sont non complètement saturées, de chélater les ions ferriques endogènes disponibles et nécessaires au métabolisme des organismes pathogènes. L'augmentation du nombre de transferrines dans le plasma sanguin lors d'une infection peut donc favoriser la compétitivité pour l'utilisation des ressources face à l'intrus (Ingram, 1980).

Les précipitines

Les précipitines sont des protéines alpha-globulines d'un poids moléculaire de 170 000 daltons. Elles existent sous forme de monomères et de polymères. La concentration de ces molécules retrouvées dans le sérum des poissons, varie selon le sexe, l'état de santé de l'animal et de la saison en cours. Les précipitines réagissent

particulièrement avec l'amylopectine et avec certains composés d'acide gras (Alexander, 1980; Alexander et Shakarchi, 1986).

Les lysozymes

Elles sont des enzymes mucolytiques d'origine leucocytaire qui présentent des propriétés antibiotiques. Ces enzymes se retrouvent dans les sécrétions (mucus), dans le sang et dans plusieurs tissus. Elles possèdent des fonctions antivirales et antibactériennes telle la capacité de dégrader les parois cellulaires constituées de mucopolysaccharides. Leur action affecte également diverses autres structures membranaires de pathogènes (Ingram, 1980; Ourth, 1980; Rijkers, 1982).

Les agglutinines

Les agglutinines sont des molécules de faible poids moléculaire ayant une activité agglutinante ou neutralisante (Dorson, 1981). Elles ont été détectées chez toutes les classes de poissons. Leur activité est principalement dirigée sur les hydrates de carbone à la surface des membranes cellulaires des pathogènes. Rijkers (1982) stipule que les agglutinines se distinguent des immunoglobulines par les caractéristiques suivantes: elles sont composées de sous-unités identiques, donc il n'existe pas de différence entre les chaînes lourdes et légères; il n'y a pas de ponts disulfures interchaînes, la molécule

est liée par des liaisons non covalentes; il n'y a pas d'hétérogénéité dans la composition en acide aminé des sous-unités.

La chitinase

Chez les poissons téléostéens, cette enzyme fut détectée dans les tissus lymphocytaires (sauf dans le thymus). De fortes activités de chitinase furent enregistrées au niveau de la rate, du plasma et de la lymphe. Sa principale action s'effectue sur la chitine et la chitodextrine. Cette enzyme aurait un rôle de protection lors d'infection par les champignons et par des parasites invertébrés (Ingram, 1980).

Le mucus

Le mucus sécrété sur la surface externe du corps du poisson est également considéré comme une immunité naturelle puisqu'il peut jouer un rôle de prévention contre l'entrée des parasites, champignons virus et bactéries. Il agit en tant que barrière physique et chimique. En fait, le niveau de sécrétion de mucus reflète, partiellement, le degré de résistance initiale à des invasions potentielles d'agents infectieux (Ingram, 1980).

2.3 Généralité sur le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI)

Origine de la maladie

C'est dans l'Est du Canada que fut décrite pour la première fois une maladie affectant les alevins de truites mouchetées (*Salvelinus fontinalis*) (McGonigle, 1940). En 1954, aux Etats-Unis, Wood et al. (1955) la décrivirent à nouveau sous le nom de nécrose pancréatique infectieuse (NPI). Il semble aujourd'hui qu'il s'agissait de la même maladie.

Isolement de l'agent étiologique

En 1960, Wolf et al. parvinrent pour la première fois à isoler l'agent étiologique sur une culture primaire de cellules de poisson, à partir d'homogénats de jeunes truites mouchetées malades. Plusieurs mois après, ils purent s'assurer qu'il s'agissait d'une maladie d'origine virale, soit le virus de la nécrose pancréatique infectieuse, grâce au développement d'une lignée cellulaire eurythermique de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), les cellules RTG-2 (Wolf et Quimby, 1962).

Morphologie et ultrastructure

Le VNPI est un virus non enveloppé de symétrie cubique icosaédrique. Son diamètre varie de 57 à 74 nm selon les auteurs (Moss et Gravell, 1969; Wolf et Quimby, 1971; Kelly et Loh, 1972). Sa capsidé est composée de 180 sous-unités structurales partagées en 92 unités morphologiques constituant la surface du virion, réparties en 80 hexamères et 12 pentamères (Cohen et Scherrer, 1972).

Sérotypes

Les différents travaux portant sur le nombre réel de sérotypes du VNPI ne sont pas concordants. Certains auteurs reconnaissent l'existence de sept sérotypes différents, trois provenant du continent nord-américain et quatre d'Europe. Par contre, d'autres chercheurs, à l'aide de tests portant sur la cinétique de neutralisation du virus en présence d'excès d'anticorps, ont révélé l'existence de seulement trois sérotypes majeurs représentés par les souches VR-299 (d'Amérique du nord), Ab et Sp (d'Europe). D'autres auteurs arrivent aux mêmes résultats à l'aide de tests de séroneutralisation croisés (Okamoto et al., 1983).

Caractéristiques biophysiques

Plusieurs auteurs ont démontré la densité du VNPI par l'utilisation de gradient de chlorure de césium. Elle se révèle être de $1,33 \text{ g/cm}^3$ (Dobos, 1976; MacDonald et Yamamoto, 1977). Le virion possède un coefficient de sédimentation de 435 S et un poids moléculaire de 55×10^6 daltons (Dobos *et al.*, 1977).

Protéines structurales du virus

Dobos *et al.* (1977) ainsi que Person et MacDonald (1983) ont mis en évidence trois protéines structurales chez le VNPI: les VP1, VP2 et VP3. La protéine VP1 possède un poids moléculaire de 105 000 daltons, compose 4% du virion et semble être associée à l'ARN viral. La protéine VP2 possède un poids moléculaire de 54 000 daltons et représente 62% de la particule. Les anticorps neutralisants sont dirigés contre la VP2. La dernière protéine la VP3 est un polypeptide interne au virion et représente 28% de ce dernier. Son poids moléculaire est de 31 000 daltons.

Génome viral

Le génome viral du VNPI est un ARN bicaténaire bisegmenté. Les deux segments sont de dimensions différentes avec des poids moléculaires de $2,5 \times 10^6$ et de $2,3 \times 10^6$ daltons (Dobos, 1976; MacDonald et Yamamoto, 1977).

Propriétés biologiques in vitro

Lignées cellulaires sensibles

Le VNPI se réplique sur presque toutes les lignées cellulaires de poisson. La lignée de cellule de poisson RTG-2 (Rainbow Trout Gonad) est en mesure de répliquer tous les sérotypes connus (Wolf et Quimby, 1962; Wolf et Mann, 1980).

Température de réplication

La température optimale de réplication du VNPI se situe entre 18 et 24°C. Les auteurs précisent que la synthèse virale est inhibée à 40°C sur des cellules RTG-2, ainsi que la multiplication cellulaire (Malsberger et Cerini, 1965).

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

3.1 Production et purification virale

3.1.1 Culture cellulaire

Les cellules de poisson BF-2 CCL-91 (Caudal trunk, Bluegill fry, Lepomis macrochirus) provenant de l'ATCC (American Types Culture Collection, Rockville, Maryland, USA), furent utilisées pour la production du VNPI. Dans un premier temps, les cellules sont ensemencées à une concentration de 100 000 par mL dans des flacons de culture (Corning, Richmond Hill, Ont., Canada) ayant une surface de contact de 150 cm². A la confluence des cellules, ces dernières sont repiquées dans des *roller cells* (bouteilles roulantes) possédant 490 cm² de surface (Corning) à une concentration de 150 000 par mL. La température d'ensemencement est de 20°C. Le milieu de culture employé pour la culture des cellules est le 199 Hank's 50% et le MEM-E 50% (Minimum Essential Medium, Base saline de Earle) (Gibco, Long Island, New-York, USA). On ajoute au milieu 5% de sérum de foetus de veau (Gibco) pour permettre la croissance cellulaire. Les antibiotiques nystatin (1000 U/mL) et gentamicine 50 µg/mL (Gibco) sont également ajoutés afin d'éviter le développement de pathogènes indésirables. En dernier lieu, 1% de glutamine (Gibco) est additionné au milieu. La trypsine TRL1X + EDTA 0,04% (Gibco) est utilisée lors du repiquage des cultures cellulaires. Il s'agit de rincer deux fois le flacon à la trypsine et de laisser agir quelques minutes la dernière solution de trypsine rajoutée.

3.1.2 Infection virale

Lorsque les cellules des *roller cells* sont à confluence, on vidange le milieu de culture et on ajoute un inoculum de deux mL de VNPI VR-299 d'un titre de $10^{5,5}$ DICT₅₀/mL. Une période d'une heure à la température de la pièce est nécessaire à l'adsorption des particules virales par les cellules. Par la suite, 30 mL de milieu de culture par *roller cells* sont rajoutés plus 1% de tampon HEPES ("N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid"). On observe les effets cytopathiques 24 à 48 heures plus tard.

3.1.3 Purification virale

Nous avons effectué deux cycles de gels et dégels des *roller cells* contenant des cellules infectées afin de décoller ces dernières des parois et de favoriser la libération des particules virales. On récupère la solution et effectue une centrifugation à 9000 r.p.m. pendant une heure à 4°C. On récupère le culot et le surnageant. On effectue sur le culot, deux extractions au Fréon (2 mL de tampon NTE [NaCl 0,1M, Tris 0,05 M, EDTA 0,001M] + 2 mL de Fréon) et on centrifuge (Sorvall) à 2000 r.p.m. pendant 10 minutes. On resuspend le culot formé dans un volume minimum de tampon NTE. La suspension est passée aux ultrasons à deux reprises pendant une minute et déposée sur une solution de chlorure de césium 34% (p/v) (34 g de chlorure de césium sont dissous dans 100 mL de tampon Tris 0,02 M) (Marshall et Inglis, 1986). Le surnageant récupéré après la

centrifugation initiale à 9000 r.p.m., est centrifugé à nouveau (25 000 r.p.m. pendant 2 heures à 4°C) (Beckman, rotor SW-27) afin d'envoyer au culot les particules virales encore présentes dans la solution. Le culot est ensuite récupéré dans deux mL de tampon NTE et la solution est passée à deux reprises aux ultrasons pendant une minute. Cette solution est déposée sur un gradient de chlorure de césium 34% (p/v). Lorsque l'échantillon est prêt on ultracentrifuge (Beckman, model L3-50, Palo Alto, California, USA, rotor SW-41) à 35 000 r.p.m. pendant 15 heures à 4°C. On procède ensuite au fractionnement des gradients à l'aide du fractionneur automatique (microfractionator, Gilson, model FC-80K). Après avoir déterminé l'indice de réfraction au réfractomètre (Bellingham and Stanley Limited, London, England) on effectue l'observation au microscope électronique des fractions correspondant à la densité du VNPI qui est de 1,33 g/cm³ (Dobos, 1976). Toutes les fractions qui sont trouvées positives sont cumulées et centrifugées (rotor SW-27) à 26 000 r.p.m. pendant deux heures à 4°C dans du tampon PBS. Le culot est ensuite récupéré et resuspendu dans deux mL de tampon PBS. A cette étape le virus est prêt à être inoculé.

3.1.4 Coloration négative

Cette technique permettant l'observation de matériel au microscope électronique consiste à placer l'échantillon sur une grille de cuivre de 200 "mesh" recouverte d'une double couche de formvar et de carbone. Après une quinzaine de seconde, la grille est asséchée

avec un papier buvard et mise en contact avec une goutte d'acide phosphotungstique (3%, pH 6,0) pendant une quinzaine de seconde avant d'être asséchée de nouveau.

3.1.5 Détermination du titre viral

Nous avons préparé des dilutions décimales dans du milieu de maintien, de la solution virale à titrer. On vidange le milieu et ensemence 25 µL de chaque dilution dans quatre cupules et on rajoute 100 µL de milieu de maintien comprenant des cellules RTG-2 (Rainbow trout gonad, ATCC) à une concentration de 100 000 par mL. Quelques cupules sont conservées comme témoins cellulaires. L'incubation se fait à 20°C. La lecture des plateaux se fait à tous les jours et l'on note le nombre de cupules où il y a une dégénérescence des cellules. Lorsque les effets cytopathiques cessent de progresser (les cellules des cupules qui possèdent une dilution plus faible demeurent intactes), on évalue le titre infectieux par la méthode de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980).

3.2 Installations piscicoles

3.2.1 Provenance des truites mouchetées porteuses

Quatre-vingt truites mouchetées (Salvelinus fontinalis) adultes (porteuses du VNPI) d'un poids variant entre 75 et 100 g furent

obtenues de la pisciculture Aquaculture Manicouagan-Saguenay (La Baie).

3.2.2 Disposition des bassins d'élevage et apport d'eau

Les 40 plus gros spécimens choisis pour former le groupe expérimental ont été installés dans un aquarium rectangulaire contenant un volume d'eau de 480 litres. Il s'agit d'un système en circuit fermé par lequel l'eau du bassin est filtrée à travers un filtre de charbon activé et retournée au bassin principal à l'aide d'une pompe électrique. Pour ce qui est des 40 truites témoins, elles furent maintenues dans un système ouvert, c'est à dire dans un bassin d'un volume d'eau de 200 litres possédant une entrée et une sortie d'eau qui est de ce fait non recyclée. L'apport d'eau se fait directement de l'aqueduc de la ville de Chicoutimi, et subit une filtration au charbon activé. Elle possède un débit de 100 litres à l'heure. L'eau est initialement retenue dans un bassin de même volume, pour permettre son réchauffement et l'évaporation du chlore résiduel, avant de progresser dans le bassin abritant les poissons.

3.2.3 Alimentation des poissons, qualité et température de l'eau

Les truites étaient nourries à satiété une fois par jour avec de la moulée flottante (Aquaculture Ziegler, quality feed pellets, Gardners, P.A.). L'excédent de nourriture était récupéré afin d'éviter

la dégradation de cette dernière pouvant accroître les taux de composés azotés dissous dans l'eau. Ces ions, NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- ainsi que l' O_2 , étaient régulièrement testés (Spectrokit reagent system, Bausch and Lomb) afin de s'assurer d'une qualité d'eau optimale à la croissance des poissons. Il est à noter que la température de l'eau était maintenue constante à 12°C plus ou moins $0,5^\circ\text{C}$ à l'aide d'un système de réfrigération automatique (Bendix-Westinghouse). En ce qui concerne le bassin des témoins, l'eau étant froide à l'origine, fut réchauffée par deux chauffe-eau d'aquarium de 200 volts (Ebo-Jager, Germany) ainsi la température fut maintenue entre 9 et 10°C pendant les huit semaines que dura l'expérimentation. La même technique d'alimentation et de contrôle de la qualité de l'eau fut appliquée.

3.3 Injection des poissons avec le VNPI VR-299 visant la production d'anticorps

3.3.1 Détermination de l'état de porteur

Cette détermination fut faite par la technique de dépistage viral qui consiste à prélever à partir de soixante truites de la pisciculture, les organes suivants: le rein (partie antérieure, médiane et postérieure); une branchie; la rate et le caecum pylorique. Ces organes furent prélevés dans le rapport de volume relatif 3:1:1:1. Les prélèvements furent regroupés par lot de cinq. Les échantillons furent traités dans les 48 heures suivant le prélèvement et conservés sur glace pendant ce délai. Les tissus ont été pesés et

homogénéisés (homogénéisateur Sorvall omni-mixer, Ivan Sorvall, inc., Norwalk, Conn., USA) dans un volume de 10 mL de tampon PBS. Après le broyage chaque extrait est dilué à une concentration de 20%. Les extraits sont ensuite centrifugés à 2500 g pendant 15 minutes à 4°C (International centrifuge, International Equipment Co. Boston, Mass., USA). Le surnageant est récupéré et ramené à une concentration de 2%. Cette solution est alors filtrée aseptiquement à l'aide d'une seringue (Becton Dickinson and company Rutherford, New Jersey, USA) et d'un filtre millipore 0,45 µm (millipore corp., Bedford, MA., USA). L'analyse se poursuit par le dépôt dans les puits des microplateaux à 24 puits (Flow Laboratories Inc., Mc Clean, Virginia, USA) de 1 mL de milieu de culture (Hank's-MEM-E) contenant 1% de glutamine, 10% de sérum de foetus de veau et des antibiotiques (nystatin, gentamicine). Deux puits par échantillon sont mis en culture et ce pour les deux lignées cellulaires RTG-2 et FHM (Fat Head Minnow, ATCC) à une concentration de 100 000 cellules par mL. Nous ajoutons par la suite 0,1 mL d'échantillon filtré à chacune des cultures. Pour chaque échantillon analysé, des témoins négatifs sont préparés. Ces témoins sont constitués de cultures cellulaires auxquelles on ajoute du tampon PBS stérile en contre partie de l'échantillon. Les cultures sont incubées dans une étuve à 15°C et sont examinées à toutes les 24 à 48 heures suivant l'inoculation afin de vérifier l'apparition d'effets cytopathiques. Un échantillon est considéré négatif si aucun effet cytopathique n'est apparu durant les 14 à 21 jours qui suivent l'inoculation.

3.3.2 Immunoélectromicroscopie

Cette technique consiste à mettre en présence 30 µg de solution virale avec 30 µg de solution d'antisérum de lapin anti-VNPI VR-299. On centrifuge le tout par "airfuge" pendant 5 minutes sur une grille de cuivre 200 "mesh" recouverte d'une double couche de formvar et de carbone. On fixe à l'acide phosphotungstique à 3% pendant 15 secondes, on assèche et on examine au microscope électronique (Philips EM 200 et EM 300, Philips, Eindhoven, Hollande) à une tension de 80 kV.

3.3.3 Méthode d'injection

Au temps zéro, une première vaccination fut effectuée. Les quarante poissons expérimentaux furent injectés intrapéritonéalement avec une dose de 0,1 mL d'une solution comprenant 0,05 mL de solution virale $105,1 \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$ et de 0,05 mL d'adjuvant de Freund. Après deux semaines, une deuxième injection fut pratiquée comprenant le même titre viral plus 0,05 mL d'adjuvant incomplet de Freund. Les quarante poissons témoins reçurent deux injections à des temps identiques; cependant la solution virale fut remplacée par 0,05 mL de tampon NTE à pH 7,8.

3.3.4 Echantillonnage

Cinq semaines après la première injection, 10 poissons de chaque lot (expérimental et témoin) furent échantillonnés pour en prélever le sérum et les organes. A la huitième semaine, tous les poissons restant des deux bassins respectifs furent sacrifiés à leur tour. On observa plusieurs mortalités chez les témoins et une seule chez les expérimentaux tout au long de l'expérimentation.

3.3.5 Dissection et prélèvement du sérum et des organes

Afin de faciliter l'intervention, le poisson est assommé, ce qui le rend inerte. N'étant pas mort, le cœur bat toujours, rendant possible l'extraction du sang. A l'aide d'une paire de ciseaux, on découpe la partie ventrale du poisson de l'anus à la tête. Ensuite on procède à l'injection intracardiaque de 0,1 mL d'une solution d'héparine diluée à 1% (eau bidistillée) à l'aide d'une seringue de 1 mL munie d'une aiguille #21 G 1/4 (Becton Dickinson and company Rutherford, New Jersey, USA). Après avoir laissé circuler le sang quelques secondes, on sectionne la queue au niveau de la nageoire adipeuse et on laisse égoutter le sang (sortant directement de la veine caudale) dans un tube stérile hépariné. Lorsque le flot s'estompe, on procède en second lieu à une ponction cardiaque afin d'optimiser la quantité de sang extrait. Cette deuxième intervention s'effectue à l'aide d'une seringue de 5 mL munie d'une aiguille 23 G 1/2 que l'on enfonce dans un ventricule. Le sang récolté est ensuite centrifugé à 3000 g

pendant 35 minutes à 4°C (Sorvall RC-2B, Ivan Sorvall inc., Newton, Conn., USA). Le surnageant est alors recueilli et congelé à -20°C. En ce qui concerne les organes (rein, rate, caecum et branchie), une portion de chacun est coupée aux ciseaux et au scalpel puis déposée dans un contenant et conservée sur glace.

3.3.6 Titrage viral

La méthode employée pour évaluer le titre viral des organes de chaque poisson est la même que celle décrite dans la section 3.3.1. Le titre, déterminé par les effets cytopathiques, est alors calculé par la méthode de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980).

3.3.7 Séroneutralisation

Afin d'évaluer le taux d'anticorps produit chez les truites, on dilue le sérum à 50% dans du milieu de maintien jusqu'à la dilution 1/2048. Quatre cupules par dilution sont prévues à cet effet sur les plateaux à 96 puits (Flow Laboratories inc., Mc Clean, Virginia, USA). Les cupules de la dernière colonne du plateau, sont conservées afin d'y déposer 30 µL de sérum pur en tant que témoin de culture cellulaire versus sérum. A toutes les cupules ayant reçues du sérum (sauf la colonne témoin), on rajoute 30 µL de solution virale VR-299 (100 DICT₅₀/mL). A la colonne témoin on ajoute 30 µL de milieu de maintien. On agite légèrement le plateau puis on incube une heure à la température de la pièce. A toutes les cupules on ajoute 100 µL

d'une suspension cellulaire FHM titrée à 150 000 cellules par mL dans du milieu de maintien. Des manipulations identiques s'effectuent avec du sérum de poisson exempt de virus VR-299 (sérum récolté chez 10 truites mouchetées exemptes de VNPI à la pisciculture des Alléghanys Saint-Philémon, Comté de Bellechasse). Dans un deuxième temps, on renouvelle le test avec du sérum exempt de particules virales en ajoutant du virus de sérotype SP afin de s'assurer de la spécificité des sérum testés. On incube à 20°C pendant huit jours et on observe les résultats après les 3 ième, 6 ième et 8 ième jours. L'observation consiste à dénombrer le nombre de cupules où les effets cytopathiques ne se manifestent pas. On évalue les cultures témoins et le titre du virus qui doit se situer entre 30 et 300 DICT₅₀/mL pour être valide (c.f. calcul du 100 doses, Payment et Pavilanis, 1980). On détermine le titre d'anticorps neutralisants en appliquant la formule de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980).

3.3.8 Microscopie électronique (technique de coloration négative)

L'observation du virus en microscopie électronique fut pratiquée à différentes étapes de l'expérimentation, notamment après la purification du virus à inoculer et après chacun des passages en culture cellulaire des homogénats d'organes des truites témoins et expérimentales. Ceci avait pour but l'obtention de preuves complémentaires visuelles de la présence du VNPI. La technique

consiste en un dépôt sur une grille de cuivre (200 "mesh") de 50 μL de la solution virale, puis à une centrifugation pendant 5 minutes sur "airfuge", à un lavage à l'eau distillée, à un assèchement par un papier buvard puis à la coloration négative du matériel en déposant une goutte d'acide phosphotungstique (3%) pendant 15 secondes sur la grille. On assèche de nouveau et on observe au microscope électronique.

3.4 Purification de l'IgM

3.4.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

Au sérum récupéré, on ajoute 50% (p/v) de sulfate d'ammonium (cette concentration est suffisamment élevée pour permettre au sulfate d'ammonium de briser les liaisons entre les groupements polaires des protéines et les molécules d'eau et d'induire la précipitation des protéines (Cramer, 1964)) et on centrifuge (Sorvall) à 13 000 g pendant 10 minutes à 4°C afin de précipiter les immunoglobulines. Le précipité est solubilisé dans du tampon PBS (pH 7,5, 0,05 M) et à nouveau la solution d'immunoglobuline est précipitée en ajoutant 50% (p/v) de sulfate d'ammonium puis centrifugée de façon identique. Par la suite ce précipité est solubilisé dans 1 mL de tampon PBS et dialysé à l'aide d'un sac à dialyse excluant les poids moléculaires inférieurs à 10 000 daltons. La solution dans le sac à dialyse contenant les IgM est ensuite appliquée sur une colonne chromatographique.

3.4.2 Chromatographie d'exclusion

A cette étape, 0,4 mL de solution enrichie en IgM sont placés sur une colonne (77 cm X 2 cm) de sépharose 4B équilibré dans du tampon PBS 0,05 M à pH 7,5 (Pharmacia LKB biotechnology AB, Uppsala, Suède). La solution éluante est le tampon PBS et la vitesse d'élution est de 20 mL à l'heure. Des fractions de 2 ou 3 mL (selon l'expérience) sont prélevées à l'aide d'un collecteur de fraction automatique (microfractionator, model FC-40 de Gilson). Une pompe péristaltique (Schlauchpumpe peristaltic pump, Desalga Heidelberg) contrôle le débit d'élution de la colonne. Une lecture à 280 nm au spectrophotomètre (spectronic 2000, Bausch & Lomb) permet d'évaluer la concentration protéinique de chacune des fractions récoltées. La quantité de protéine s'établie par une lecture à 280 nm en référence à une courbe standard établie avec des concentrations connues d'albumine de boeuf. La colonne chromatographique fut calibrée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire connu tels le bleu dextran (poids moléculaire de 2 000 000 daltons), la thyroglobuline (poids moléculaire de 669 000 daltons), la bêta-amylase (poids moléculaire de 200 000 daltons) et une IgM de mouton (poids moléculaire de 900 000 daltons) (Sigma kit, #MW-GF-1000).

3.5 Caractérisation de l'IgM

3.5.1 Electrophorèse

Afin de déterminer précisément le poids moléculaire des IgM récoltées par la chromatographie d'exclusion, des migrations électrophorétiques furent pratiquées sur différentes fractions obtenues (64, 112, 125, 135, 150, 175 et 180 mL) ainsi qu'avec les sérums dialysés (non séparés sur colonne) des groupes expérimentaux, témoins et témoins non porteurs. Le gel d'acrylamide est préparé à partir de solutions de 6% et 8% d'acrylamide bis acrylamide en tampon tris-borate 0,05 M à pH 8,9. Le front de migration est marqué par une solution de bleu de bromophénol. De plus, 50 µL de chaque échantillon sont déposés au dessus du gel et l'électrophorèse se fait sur un système Ortec (model 4200, An EG et G, cie) (4100 pulsed constant Power Supply, Ortec) à 300 et 450 volts. Des marqueurs de poids moléculaire connu sont également utilisés pour l'électrophorèse, il s'agit de l'albumine (poids moléculaire de 25 000 daltons) et des marqueurs utilisés pour la chromatographie. Un autre système électrophorétique (LKB, 2117 multiphor II constant power supply) fut également utilisé pour déterminer le poids moléculaire des IgM. Le gel est préparé à partir d'une solution de 8% d'acrylamide bisacrylamide en tampon tris-borate 0,05 M à pH 8,9. Dix µL de chaque échantillon sont déposés au haut du gel. La migration s'effectue à 550 volts, à 50 mA et à 35 watts. Les marqueurs utilisés sont l'anhydrase carbonique (29 000

daltons), l'albumine de boeuf (66 000 daltons), l'alcool déhydrogénase (150 000 daltons), la bêta-amylase (200 000 daltons), l'apoferritine (443 000 daltons), la thyroglobuline (669 000 daltons) et l'IgM de mouton (900 000 daltons). La technique d'électrophorèse permet de déterminer le poids moléculaire des protéines car il existe une relation linéaire entre la distance de migration des protéines à travers le gel et le poids moléculaire des protéines en question. En utilisant des marqueurs de poids moléculaire connu, on peut tracer une courbe de référence et ainsi déterminer le poids moléculaire de la protéine inconnue après avoir mesuré sa distance de migration (Allen et al., 1984).

CHAPITRE 4
RÉSULTATS

4.1 Caractérisation de la préparation virale d'injection

4.1.1 Densité du VNPI

Après purification par centrifugation différentielle et concentration sur gradient de chlorure de césium, les différentes fractions de la suspension virale ont été examinées au microscope électronique. C'est à la densité de $1,33 \text{ g/cm}^3$ qu'on a observé la plus forte concentration de particules virales. Ces résultats concordent avec les données de la littérature.

4.1.2 Intégrité et homogénéité du VNPI

Les particules virales observées en microscopie électronique se sont avérées être de forme hexagonale et posséder un diamètre d'environ 65 nm, correspondant ainsi au VNPI (Figure 1). La majorité des particules sont vides, tel que mis en évidence par la pénétration de l'acide phosphotungstique. Malgré ce fait, la structure des virions semble bien conservée. Nous avons également noté que la suspension virale contenait une certaine quantité de débris cellulaires.

4.1.3 Titre de la solution virale

La fraction de la solution virale servant à immuniser les spécimens, possédait un titre de $10^{3,55} \text{ DICT50/mL}$.

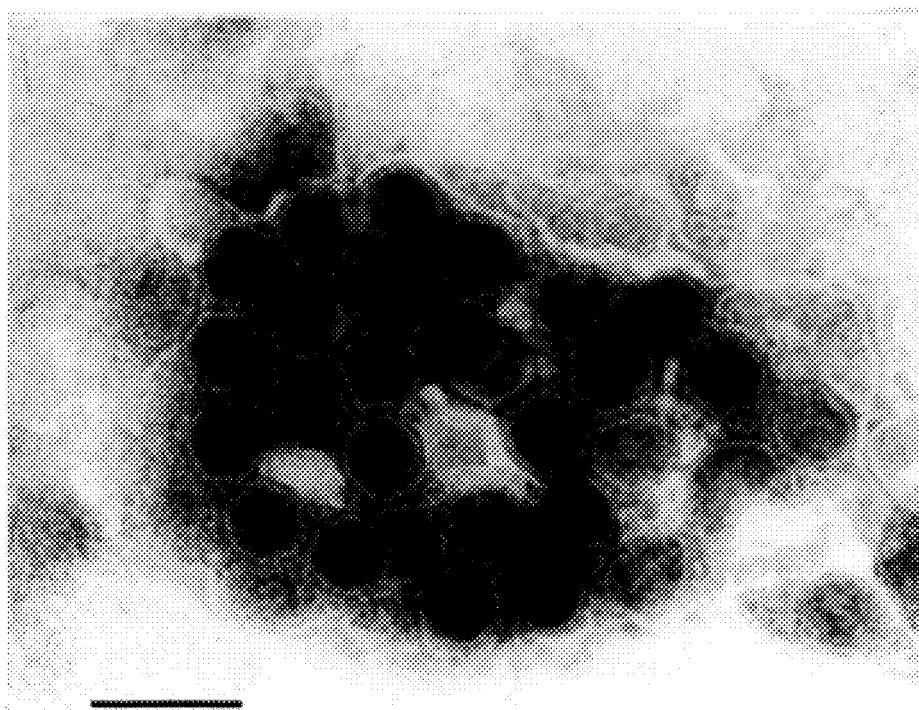


Figure 1 Virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) purifié. Le trait représente 100 nm.

4.2 Caractérisation des truites mouchetées

4.2.1 Recherche de VNPI chez les truites

4.2.1.1 Chez les truites non injectées au VNPI

Nous avons recherché le VNPI chez les truites non injectées avec le virus, soit celles appartenant aux groupes 1, 2, 3 et 6 (Tableau 1). Nous avons isolé le VNPI sur culture de cellules RTG-2 seulement à partir des homogénats de truites en provenance de la pisciculture Saguenay-Manicouagan (groupes 1, 2 et 3). L'isolement du VNPI fut signalé par la manifestation d'effets cytopathiques sur le feuillet cellulaire. Une immunoélectromicroscopie effectuée à partir des cupules où l'on notait des effets cytopathiques, nous a permis de mettre en évidence le sérotype VR-299 (Figure 2). Ces deux tests nous prouvent hors de tout doute que les truites étaient porteuses du virus. Les dix truites du groupe 1 sont positives et présentent des titres viraux s'échelonnant entre 10^3 et $10^{4,4}$ DICT_{50/g} d'organe (Tableau 2). Les six poissons du groupe 2 sont également positifs avec des titres viraux variant entre $10^{3,14}$ et $10^{4,34}$ DICT_{50/g} d'organe (Tableau 3). Le groupe 3 qui est également composé de six truites, les présente toutes positives, leur titre viral s'étendant de 10^3 à $10^{4,4}$ DICT_{50/g} d'organe (Tableau 3). Les mêmes tests de détection virale effectués sur les dix truites de la pisciculture des Alléghanys (groupe 6), ont démontré que ces dernières sont exemptes de VNPI (Tableau 2).

Tableau 1 Provenance et traitements des différents groupes expérimentaux de truites mouchetées

PROVENANCE	GROUPES	TRAITEMENTS
Saguenay- Manicouagan	1	Truites non injectées, sacrifiées au temps 0.
Saguenay- Manicouagan	2	Truites injectées à l'adjuvant, maintenues à 8°C et sacrifiées au temps 5 semaines.
Saguenay- Manicouagan	3	Truites injectées à l'adjuvant, maintenues à 13°C et sacrifiées au temps 8 semaines.
Saguenay- Manicouagan	4	Truites injectées à l'adjuvant + VNPI, maintenues à 8°C et sacrifiées au temps 5 semaines.
Saguenay- Manicouagan	5	Truites injectées à l'adjuvant + VNPI, maintenues à 13°C et sacrifiées au temps 8 semaines.
Alléghanys	6	Truites non injectées, sacrifiées au temps 0.

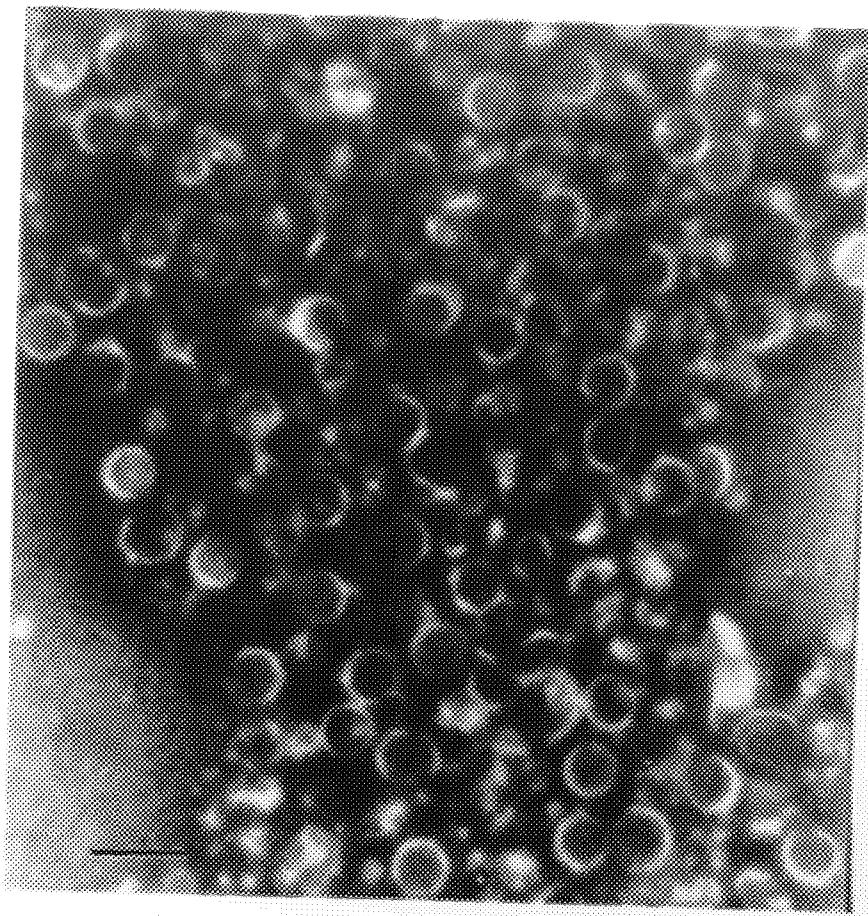


Figure 2 Immunoélectromicroscopie effectuée sur les homogénats de truites porteuses du VNPI. Le trait représente 100 nm.

Tableau 2 : Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel, déterminés chez les truites non injectées et chez les truites témoins

Groupe 1 ou truites non injectées				Groupe 6 ou truites témoins Alléghanys				
Truite#	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Poids corporel (g)	Truite #	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Poids corporel (g)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Titre en anticorps contre le VNPI SP
1	$10^{3,14}$	0	n.d.*	1	0	280	1:80	1:56
2	$10^{3,44}$	0	n.d.	2	0	370	1:20	1:24
3	$10^{3,14}$	0	n.d.	3	0	340		
4	$10^{3,00}$	0	n.d.	4	0	290		
5	$10^{3,59}$	1:20	n.d.	5	0	320		
6	$10^{3,00}$	0	n.d.	6	0	300		
7	$10^{4,40}$	1:128	n.d.	7	0	340		
8	$10^{3,00}$	0	n.d.	8	0	290		
9	$10^{3,14}$	0	n.d.	9	0	300		
10	$10^{3,00}$	0	n.d.	10	0	330		

*n.d. = non déterminé

Tableau 3 : Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel, déterminés à la 5^{ième} et 8^{ième} semaine chez les truites injectées à l'adjuvant et maintenues à 8°C

Groupe 2 : Injection adjuvant, 8°C, 5 semaines				Groupe 3 : Injection adjuvant, 8°C, 8 semaines			
Truite #	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Poids corporel (g)	Truite #	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Poids corporel (g)
1	10 ^{3,22}	0	217	1	10 ^{3,00}	0	92
2	10 ^{3,14}	0	222	2	10 ^{4,40}	0	97
3	10 ^{3,14}	1:112	237	3	10 ^{3,00}	0	172
4	10 ^{3,14}	0	182	4	10 ^{3,00}	0	97
5	10 ^{3,67}	0	149	5	10 ^{3,00}	0	119
6	10 ^{4,34}	0	179	6	10 ^{3,97}	0	111

4.2.1.2 Chez les truites injectées a l'adjuvant et au VNPI

Nous avons également recherché la présence de VNPI chez les truites des groupes 4 et 5, injectées avec ce virus. Pour le groupe 4, les truites sont toutes positives (9/9) avec des titres viraux variant entre $10^{3,22}$ et $10^{4,4}$ DICT₅₀/g d'organe (Tableau 4). Les vingt-cinq truites testées chez le groupe 5 sont également positives (25/25) et présentent des titres viraux allant de $10^{3,14}$ à $10^{4,4}$ DICT₅₀/g d'organe (Tableau 4). On constate que les titres viraux que présentent les truites de ces deux groupes ayant été injectés avec du VNPI, s'avèrent être du même ordre de grandeur que ceux retrouvés chez les truites n'ayant pas été injectées avec du VNPI (groupes 1, 2 et 3, Tableaux 2 et 3).

4.2.2 Recherche d'anticorps neutralisants chez les truites

4.2.2.1 Chez les truites non injectées au VNPI

Nous avons recherché la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum des truites non injectées avec le VNPI, soit les truites des groupes 1, 2, 3 et 6. Le test de séroneutralisation effectué sur le sérum des dix truites du groupe 1, a révélé que seulement deux truites sur dix présentent des anticorps avec des titres de 1:20 et 1:128. Les huit autres truites ne possèdent pas d'anticorps (Tableau 2). Dans le groupe 2, chez cinq truites sur six

Tableau 4 : Titre viral (VNPI VR-299), titre en anticorps et poids corporel, déterminés à la 5^{ème} et 8^{ème} semaine chez les truites injectées au VNPI et maintenues à 13°C

Groupe 4 : Injection VNPI, 13°C, 5 semaines				Groupe 5 : Injection VNPI, 13°C, 8 semaines			
Truite#	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Poids corporel (g)	Truite #	Titre viral (DICT 50/g d'organe)	Titre en anticorps contre le VNPI VR-299	Poids corporel (g)
1	10 ⁴ ,40	1:28	234	1	10 ³ ,37	1:224	700
2	10 ³ ,22	1:28	250	2	10 ³ ,14	1:384	205
3	10 ⁴ ,40	1:96	393	3	10 ⁴ ,40	1:3072	457
4	10 ³ ,37	1:48	163	4	10 ⁴ ,27	1:448	687
5	10 ³ ,37	0	173	5	n.d.	1:512	468
6	10 ³ ,22	0	197	6	10 ³ ,00	1:56	163
7	10 ³ ,37	1:20	187	7	10 ³ ,37	0	261
8	10 ³ ,22	1:28	297	8	10 ³ ,22	1:112	302
9	10 ³ ,37	0	177	9	10 ³ ,00	1:2048	475
10	n.d.*	n.d.	162	10	10 ³ ,59	1:160	305
				11	n.d.	1:220	260
				12	10 ³ ,22	1:32	369
				13	10 ³ ,97	0	317
				14	10 ³ ,52	0	269
				15	10 ³ ,52	0	417
				16	10 ³ ,82	1:40	385
				17	10 ³ ,14	1:860	469
				18	10 ⁴ ,40	1:112	497
				19	10 ³ ,44	1:112	275
				20	10 ³ ,00	1:56	387
				21	10 ⁴ ,40	1:256	324
				22	10 ⁴ ,04	1:112	432
				23	10 ³ ,00	n.d.	285
				24	10 ³ ,00	n.d.	257
				25	10 ³ ,22	n.d.	259
				26	10 ³ ,97	1:24	185
				27	10 ³ ,14	n.d.	354

*n.d.=non déterminé

on ne peut détecter d'anticorps, alors que la sixième possède un titre de 1:112. Pour leur part, toutes les truites du groupe 3 (6/6) démontrent une absence de titre en anticorps. Le sérum des truites du groupe 6 (Alléghanys) n'a présenté qu'un faible potentiel neutralisant sur les sérotypes VR-299 et SP 1:80, 1:20 et 1:56, 1:24 respectivement (Tableau 2).

4.2.2.2 Chez les truites injectées à l'adjuvant et au VNPI

Dans le groupe 4, sept truites sur dix (7/10) possèdent des titres variant entre 1:20 et 1:96. Chez les trois autres, on ne peut détecter d'anticorps neutralisant (Tableau 4). Pour ce qui est des truites du groupe 5, dix-neuf (19/23) possèdent des titres en anticorps allant de 1:32 à 1:3072. Chez les quatre autres, on ne peut détecter d'anticorps neutralisant (Tableau 4). A prime abord, les truites du groupe 5 semblent posséder des titres en anticorps supérieurs aux truites du groupe 4. De plus, on note que les truites de ces groupes (4 et 5) ont des titres plus élevés que ceux des truites non injectées des groupes 1, 2, 3 et 6 (Tableaux 2 et 3).

4.2.3 Mesure du poids corporel des truites

Comme complément d'information, nous avons mesuré le poids des poissons au moment du sacrifice. Il est à préciser que nous avons effectué la comparaison du poids des truites entre les groupes ayant été maintenus dans les mêmes bassins d'élevage mais ayant

été sacrifiés à des temps différents (groupes 2 vs 3 et 4 vs 5). Ceci avait pour but d'évaluer une éventuelle modification de poids dans le temps pour un même groupe. On observe que les truites du groupe 2 (truites sacrifiées à la 5 ième semaine après injection) possèdent un poids moyen de $197,6 \pm 33,1$ g qui est supérieur au poids moyen des truites du groupe 3 qui est de $114,6 \pm 29,5$ g (truites sacrifiées à la 8 ième semaine après injection). On note ici une diminution de poids dans le temps malgré le fait que la température soit demeurée constante à 8°C (Tableau 3). D'autre part, le poids moyen des truites du groupe 4 (truites injectées avec le VNPI et sacrifiées après 5 semaines) qui est de $223,3 \pm 73,8$ g, est sensiblement inférieur au poids moyen des truites du groupe 5 (truites injectées avec le VNPI et sacrifiées après 8 semaines) d'une valeur de $361,6 \pm 133,3$ g. Ainsi nous observons à la température de 13°C un accroissement du poids moyen des truites entre la 5 ième et la 8 ième semaine (Tableau 4).

4.3 Analyses statistiques des résultats

L'utilisation du programme informatique SPSS-X nous a permis d'effectuer trois tests statistiques (test-t, test de régression et le test de Spearman) sur les données récoltées sur les truites des six groupes précédemment cités. Le test-t fut appliqué sur les moyennes des variables suivantes: poids corporel vs poids corporel; titre viral vs titre viral; titre en anticorps vs titre en anticorps, et ce, distinctement entre les groupes 2 et 3 puis entre les groupes 4

et 5. La valeur limite pour chaque test est de 0,05. Ce test démontre que la moyenne des taux d'anticorps du groupe 5 est significativement plus grande que celle du groupe 4 (valeur de probabilité $p = 0,030$). On observe la même tendance pour les poids moyens des mêmes groupes ($p = 0,008$). Cependant, pour ces deux groupes, on ne note pas de différence significative dans leur titre viral respectif ($p = 0,572$). La moyenne des poids du groupe 2 est également significativement supérieure à la moyenne des poids du groupe 3 ($p = 0,001$). On constate aussi l'absence de différence significative entre les titres viraux de ces deux groupes ($p = 0,84$). Pour ce qui est du titre en anticorps, le calcul fut impossible à réaliser étant donné que l'ensemble des résultats ne possède pas de variance. Concernant les titres en anticorps du groupe 1 ou truites non injectées, on note une valeur de probabilité significative ($p = 0,03$) lors de sa comparaison au groupe 5 et des valeurs de probabilité non significatives ($p = 0,36$, $p = 0,46$, $p = 0,34$) face aux groupes 2 et 3 et 4 respectivement. Il n'existe aucune différence significative concernant les titres viraux entre ces mêmes groupes.

Le test de régression multiple fut appliqué entre les trois variables poids corporel, titre viral et titre en anticorps, de chacun des quatre groupes afin de déterminer si une variable avait une influence sur une autre. Une seule corrélation fut trouvée positive, soit dans le groupe 4 qui présentait un R-multiple de 0,858 (1 équivaut à une corrélation parfaite) pour les variables titre viral vs

titre en anticorps. Le test non paramétrique de corrélation de rang de Spearman ($rs = 0,7$, valeur critique = 0,55, alpha = 0,05) confirme ces résultats.

4.4 Caractérisation des immunoglobulines

4.4.1 Purification des immunoglobulines

Les lectures faites sur les diverses fractions récoltées après passage sur colonne chromatographique de 0,4 mL du sérum dialysé (concentration protéinique de 3,15 g/L) des truites du groupe 5 (truites injectées avec le VNPI et sacrifiées après 8 semaines), nous permettent d'établir un tracé (Figure 3) et d'y observer un pic protéinique se situant entre le 100 ième et le 160 ième mL d'élution. Un second pic plus restreint en hauteur et en étendue, se présente au 185 ième mL de la solution éluante. Le tracé élaboré à partir de 0,4 mL du sérum dialysé (concentration protéinique de 3,16 g/L) provenant des poissons Alléghanys (Figure 4), possède également deux pics protéiniques principaux, qui présentent, selon l'évaluation de la densité optique (D.O.), une plus forte concentration. Etant donné que les immunoglobulines sont de grosses protéines rapidement éluées, il est possible qu'elles puissent être retrouvées dans le premier pic majeur de chaque sérum. Les truites du groupe 5 ayant été injectées avec le VNPI, pourraient donc présenter dans ce pic protéinique des immunoglobulines spécifiques au VNPI. Le passage sur colonne des marqueurs de poids moléculaire

connu nous a permis d'établir un tracé de référence ayant pour axes le logarithme des poids moléculaires en fonction du volume d'élution (Figure 5). Etant donné que pour le sérum dialysé des truites expérimentales (groupe 5), le pic protéinique principal se situe entre le 100 ième et le 160 ième mL d'élution, il nous est impossible d'attribuer un poids moléculaire précis aux protéines présentes. Cependant, en faisant référence au tracé de la figure 5, nous pouvons délimiter une valeur de poids moléculaire qui se situerait environ entre 300 000 et 1 000 000 daltons. Il est à noter que cette grande variation des résultats est en partie due au degré d'imprécision inhérent à la technique de chromatographie d'exclusion pouvant aller jusqu'à 25% du poids moléculaire (Marshall et Inglis, 1986).

4.4.2 Recherche d'une activité neutralisante

Une épreuve de séroneutralisation fut pratiquée avec le sérum dialysé expérimental (groupe 5) et le sérum témoin (groupe 6 ou Alléghanys), ainsi qu'avec les différentes fractions issues de la séparation chromatographique, notamment celles présentant une forte absorbance (pics protéiniques). Ce test avait pour but de mesurer l'activité en anticorps de chaque sérum. Un fort titre neutralisant fut observé pour le sérum expérimental (1:512), alors que le sérum témoin possède un titre plus faible (1:80) (Tableau 5). Il est à noter qu'aucune fraction (de l'éluat chromatographique) testée ne démontra un titre neutralisant (Tableau 5).

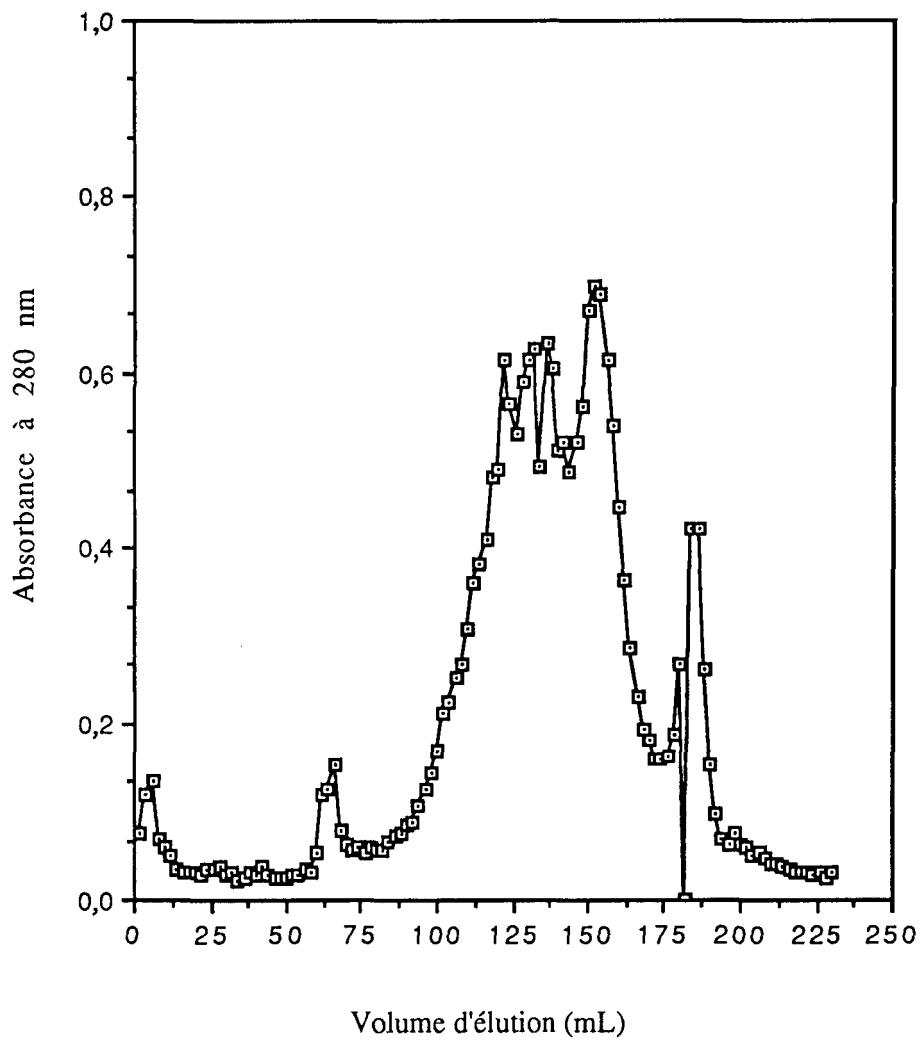


Figure 3 **Tracé chromatographique du sérum dialysé des truites expérimentales (groupe 5)**

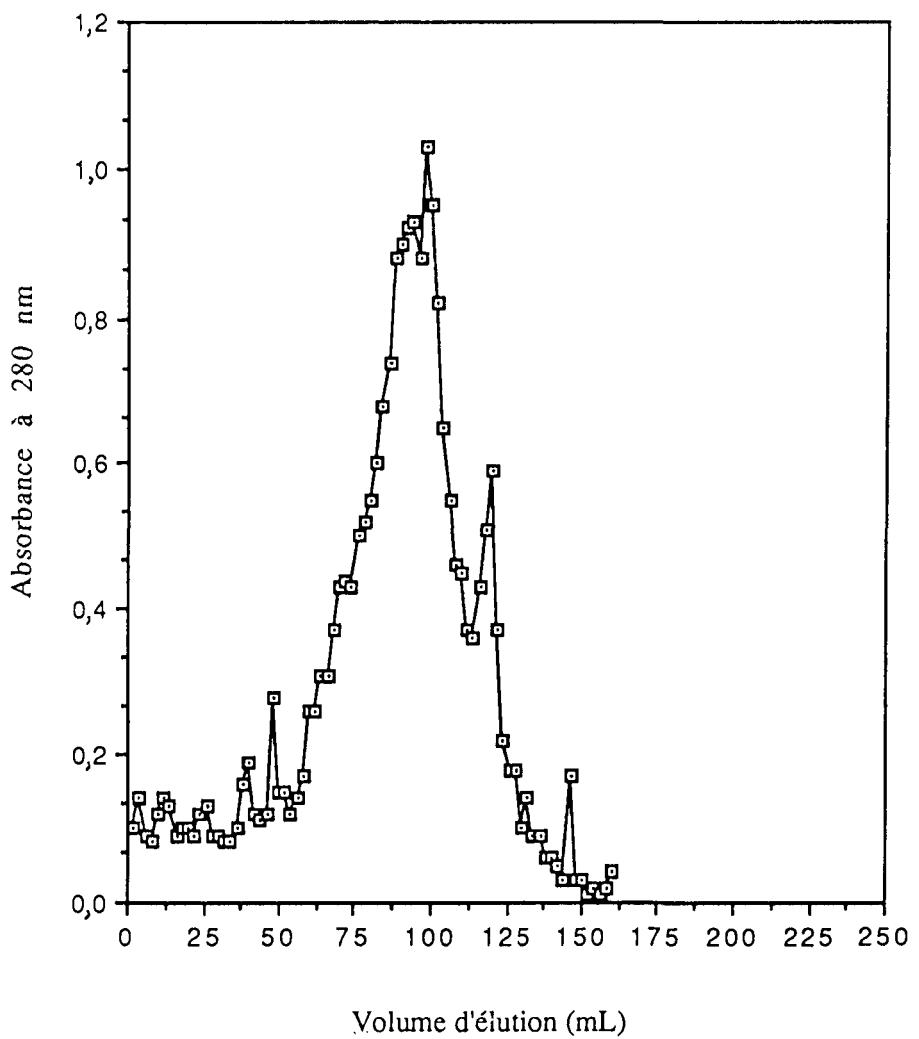


Figure 4 Tracé chromatographique du sérum dialysé des truites témoins (Alléghanys, groupe 6)

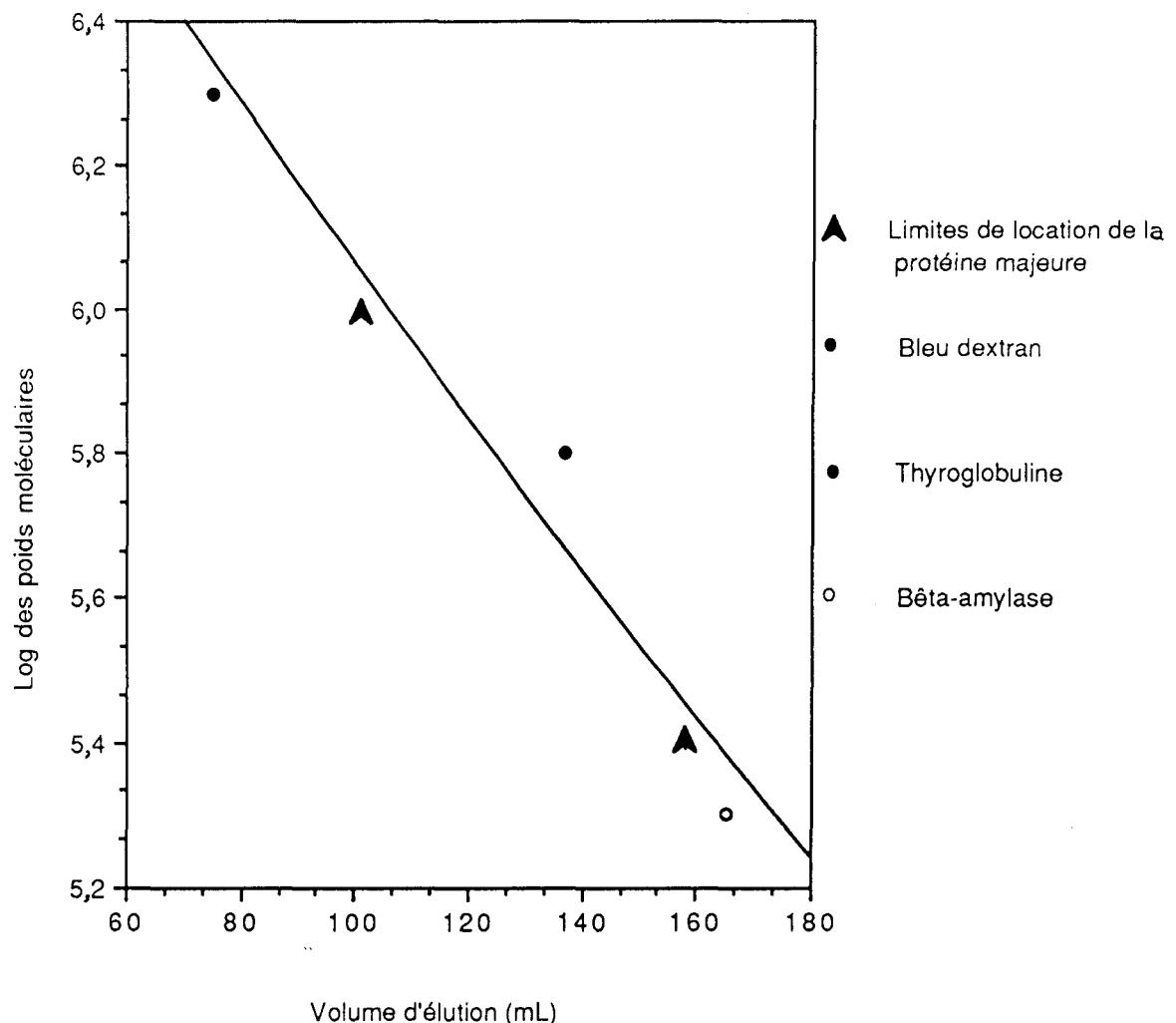


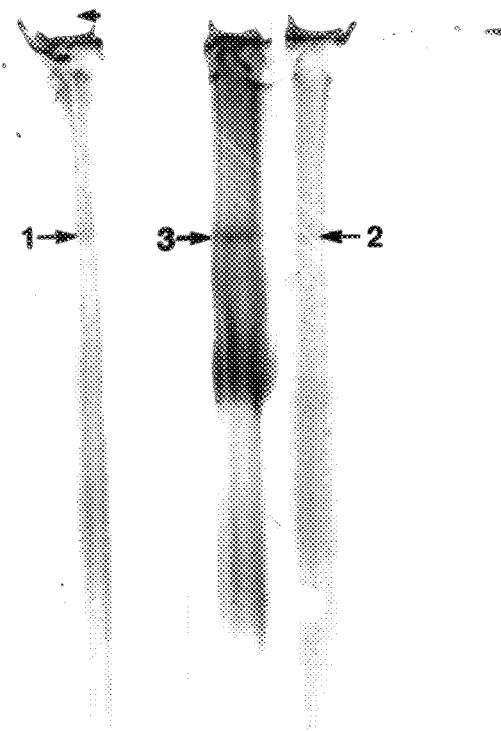
Figure 5 Détermination du poids moléculaire de la protéine majeure du sérum dialisé de truites (groupe 5) à partir du tracé référence établi avec des marqueurs de poids moléculaire connu.

Tableau 5 Titres neutralisants des sérums dialysés expérimentaux (truites injectées avec le VNPI et sacrifiées après 8 semaines), des sérums témoins (truites non injectées avec le VNPI) et des fractions de l'éluat chromatographique.

Sérums		Fractions chromatographiques (mL)						
Exp.	Tém.	64	112	125	135	150	175	180
1:51	1:80	0	0	0	0	0	0	0

4.4.3 Détermination du poids moléculaire

N'ayant pu obtenir des bandes clairement identifiables lors de la migration électrophorétique de la majorité des marqueurs de poids moléculaire connu, il nous a été impossible d'établir un tracé de référence à partir de ces derniers. Cependant, la migration électrophorétique des sérums de truites expérimentales (Figure 6 [1]) et témoins (Figure 6 [2]), met en évidence des bandes protéiniques qui correspondent à celle du marqueur thyroglobuline (Figure 6 [3]). Ce marqueur possède un poids moléculaire de 669 000 daltons. Il est à noter que nous n'avons observé aucune migration protéinique chez les fractions qui correspondent aux pics issus de la chromatographie d'exclusion.



- 1-Bande du sérum expérimental
2-Bande du sérum témoin
3-Bande du marqueur thyroglobuline
(poids moléculaire 669 kDa)

Figure 6 Migrations électrophorétiques des sérums de truites expérimentales et témoins.

CHAPITRE 5
DISCUSSION

5.1 Influence du type d'injection et du temps d'incubation sur la production d'anticorps chez les truites mouchetées porteuses du VNPI

5.1.1 Inhibition non spécifique des sérum des truites témoins (groupe 6).

Le faible pouvoir neutralisant affiché par les sérum témoins face aux sérotypes VR-299 et SP (Tableau 2), nous indique que ces truites n'auraient pas été exposées au VNPI et donc ne possèderaient pas d'anticorps spécifiques contre ce pathogène. Cependant, les deux pools de sérum, chaque pool contenait le sérum de cinq truites, présentent des titres de 1:80 et 1:20 contre la souche VR-299 et des titres de 1:56 et 1:24 contre la souche SP. Etant donné que ces truites témoins proviennent d'une pisciculture certifiée exempte de VNPI et que nos analyses de dépistage n'ont pas révélé de virus dans les organes de ces poissons, nous concluons que nous sommes fort probablement en présence d'un phénomène d'inhibition non spécifique. A ce sujet, Vestergard Jorgensen (1973) précise que l'activité de neutralisation virale du sérum de truite, peut être en partie due aux anticorps naturels qui ont une faible spécificité mais une forte avidité. On entend par spécificité, que les sites de combinaison des anticorps sont dirigés contre les déterminants d'un antigène particulier et ne sont pas complémentaires de ceux portés par un autre antigène. L'avidité désigne la capacité d'un antisérum à exercer une fonction de neutralisation (Roitt *et al.*, 1985). D'autre part, Dixon

(1987), dans une étude sur l'inhibition du VNPI à partir d'extraits de tissus de truites arc-en-ciel, affirme qu'un matériel inhibiteur non spécifique accroît la résistance des alevins en fonction de leur âge. L'auteur précise que le mécanisme décrit pourrait être mécanique. L'inhibiteur, en adhérant au virus, empêcherait ce dernier de s'adsorber à la surface des cellules. Dans un autre type d'étude, Dorson *et al.* (1975) précisent que le VNPI perd de sa pathogénicité après avoir effectué des passages successifs sur des cultures cellulaires. Le virus ferait l'acquisition d'une sensibilité à un facteur neutralisant présent dans le sérum de truite exemptes de virus. Nos tests de séroneutralisation n'ont pas révélé une telle sensibilité pour les souches VR-299 et SP malgré le fait que les virus expérimentaux utilisés furent obtenus à partir de plusieurs passages sur des cultures cellulaires. Cette différence dans les résultats peut provenir de la non reproductibilité du cadre expérimental, tel que le nombre exact de passages sur cultures cellulaires et le type de cellules utilisées. Néanmoins, ces résultats nous permettent de soulever une question sur l'inter relation possible entre les phénomènes d'inhibition non spécifique du sérum de truite et la perte de pathogénicité des souches virales.

5.1.2 Pouvoir neutralisant du sérum des truites porteuses non injectées et des truites expérimentales

Des dix sérums de truites porteuses de VNPI qui n'ont pas reçu d'injection sous aucune forme (groupe 1), seulement deux ont affiché

des titres en anticorps selon le test de séroneutralisation (Tableau 2). De surcroît, ces titres sont relativement faibles, n'atteignant respectivement que 1:20 et 1:128. Les huit autres sérums se sont révélés négatifs quant à la présence en anticorps spécifiques au VNPI. Ceci nous porte à croire que malgré la présence de forts titres de VNPI chez ces truites (Tableau 2), celles-ci ne produisent pas ou peu d'anticorps pour contrer le développement de ce pathogène viral. Ayant obtenu les mêmes types de résultats dans une expérience similaire, Yamamoto (1974) conclu que le manque de production d'anticorps chez la truite mouchetée porteuse de VNPI, peut indiquer que les survivantes d'une infection récente en milieu naturel deviennent tolérantes. La tolérance se définit comme un état de non réponse du système immunitaire lorsque mis en présence d'un antigène normalement immunogène.

Les forts titres en anticorps que nous avons obtenus avec les truites porteuses injectées au VNPI (groupes 4 et 5, Tableau 4), infirment cette hypothèse de tolérance et également celle amenée par Wolf et Quimby (1969) précisant que l'antigène viral serait reconnu comme faisant partie du "soi" par le système immunitaire. Bien que porteuses du VNPI au même titre que les truites non injectées, les truites injectées ont reconnu ce virus comme une entité antigénique et immunogène, c'est-à-dire étrangère et engendrant une réponse immunitaire. Pour sa part, Dorson (1982) affirme que si la présence d'anticorps signifie à coup sûr une mise en contact passée du virus

pour ce poisson, leur absence ne peut être considérée comme une garantie absolue du phénomène contraire. Nos résultats concordent avec cette affirmation puisque le test de séroneutralisation ne permet pas la détection d'anticorps chez huit poissons non injectés sur dix (groupe 1) qui sont néanmoins porteurs du virus.

Les raisons de la diminution de la production d'anticorps dans le temps demeurent inconnues à ce jour. Depuis quelques années, des chercheurs ont présenté différents mécanismes (délétion clonale, avortement clonal, blocage des récepteurs, suppression active, régulation anti-idiotypique) pouvant expliquer l'induction de tolérance des lymphocytes B chez les mammifères. Metcalf *et al.* (1979), précisent que le mécanisme de blocage des récepteurs des lymphocytes B, implique qu'une faible réponse peut résulter de la saturation de la surface des récepteurs par l'antigène, et que sous des conditions appropriées, elle peut être réversible. Scott *et al.*, (1979) affirment que la procédure d'injection des antigènes et d'adjuvant peut engendrer le surpassement des mécanismes de blocage, et ainsi permettre la réalisation de la réponse spécifique. Ce mécanisme de blocage des récepteurs des lymphocytes B fut élaboré à partir d'études réalisées chez les mammifères, mais pourrait éventuellement se produire chez des vertébrés inférieurs comme la truite mouchetée, qui dans ce cas est porteuse du virus et qui subit subséquemment une injection d'une solution d'adjuvant et de VNPI.

En ce qui concerne les truites expérimentales des groupes 2 et 3 (injectées à l'adjuvant), on remarque qu'elles ne présentent pas de titre en anticorps spécifiques (Tableau 3). Le phénomène est compréhensible puisque ces truites n'ont pas été injectées avec du VNPI. Le titre de 1:112 observé dans le groupe des truites prélevées à 5 semaines post-inoculation (groupe 2), peut s'expliquer par la persistance d'anticorps issus de l'infection antérieure en milieu naturel. A cet effet, Ahne et Thomsem (1986) stipulent que la truite arc-en-ciel porteuse, possède des anticorps aussi bien que des virus pendant une période pouvant aller jusqu'à 15 mois. Il est donc possible que ceci explique ce que nous observons chez la truite mouchetée.

Les truites des groupes 4 et 5 (injectées avec du VNPI), présentent des titres plus élevés en anticorps (Tableau 4). De plus, les truites prélevées en fin d'expérience, à 8 semaines après injection (groupe 5), possèdent les titres les plus forts; ceci est probablement dû à la période d'incubation plus longue permettant l'accumulation des anticorps. Selon Dorson (1982), les anticorps apparaissent tôt après l'infection, environ à la troisième semaine.

5.1.3 Influence de la température sur le titre viral, le titre en anticorps et le poids corporel.

Le faible nombre d'échantillons analysés, ainsi que l'absence de groupes expérimentaux composés de truites injectées au VNPI et

élevées à 8°C, ainsi que de truites injectées à l'adjuvant et élevées à 13°C, ne nous permirent pas d'effectuer un test d'analyse de variance (ANOVA). Ce test statistique aurait été en mesure de nous préciser quels facteurs contrôlés, dans notre système expérimental, soit la température, le temps et le type d'injection reçue, ont une influence marquée sur les variables mesurées que sont le poids corporel, le titre viral et le titre en anticorps. Cependant, les résultats nous suggèrent fortement que la faible température de 8°C est responsable de l'absence d'augmentation de poids des truites mouchetées puisque ces dernières subissent un ralentissement de leur activité métabolique lorsque la température est basse (Scott et Crossman, 1974). Selon Carlander (1969), la température optimale de croissance chez la truite mouchetée se situerait entre 12 et 13°C.

5.1.4 Production d'anticorps chez les différents groupes de truites.

Comme chez les vertébrés supérieurs, les poissons, lorsque soumis à une stimulation antigénique, présentent une production d'anticorps qui varie dans le temps. L'atteinte d'un maximum de production d'anticorps se situerait entre 8 et 12 semaines selon certains auteurs (Dorson, 1982). Bien que limitée à 8 semaines, notre expérimentation nous a permis de constater que le titre moyen d'anticorps, produit chez les truites sacrifiées 8 semaines après injection avec du VNPI, est significativement supérieur à celui des truites sacrifiées 5 semaines après injection. D'ailleurs, les forts

titres obtenus ne concordent pas avec les affirmations de Dorson (1981) et de Swanson et Gillespie (1982) selon lesquelles les truites mouchetées sont de piètres productrices d'anticorps neutralisants. Dans son étude Dorson avait démontré l'absence ou des taux très faibles d'anticorps chez une population de truites mouchetées comprenant 69% de porteurs du VNPI.

Selon nos résultats, nous pouvons affirmer que le facteur temps joue un rôle important dans la production d'anticorps chez la truite mouchetée. Cependant, nous ne connaissons pas précisément le temps de production maximale puisque nous n'avons pas de données obtenues ultérieurement à la huitième semaine après injection. La moyenne des poids est également supérieure chez ces truites de 8 semaines puisqu'elles se sont alimentées sur une période de temps plus longue. A l'encontre des deux autres variables, le titre viral moyen ne présente pas de diminution ni d'augmentation significative entre 5 et 8 semaines après injection. Cette observation soulève encore une fois une interrogation sur le rôle de la réponse humorale dans le contrôle de la multiplication et de la dispersion du virus. Deux hypothèses seraient plausibles pour expliquer cette observation. Si une augmentation du nombre d'anticorps devait entraîner une diminution du nombre de particules virales, il est possible, après 8 semaines, que cette diminution ne soit pas encore survenue. Il est encore possible que le nombre de virus dans le cytoplasme des cellules des organes cibles ne diminue pas dû à une transmission directe du virus d'une

cellule à l'autre, ce qui rendrait impossible leur neutralisation par les anticorps. L'évaluation du titre viral du sérum sanguin et l'analyse de la cinétique de ce titre comparativement au titre en anticorps nous auraient permis de répondre partiellement à cette question. En effet, la diminution des particules virales dans le sang aurait pu être corrélée avec l'augmentation d'anticorps circulants. L'hypothèse d'une tolérance de l'immunité cellulaire pourrait également expliquer la conservation de l'intégrité du virus dans les organes. Dans certaines infections virales, chez les mammifères, les cellules k-tueuses reconnaissent et détruisent les cellules infectées. Cette reconnaissance serait due à la présence de protéines de la capsid virale dans la membrane cellulaire (Roitt *et al.*, 1985). Il semblerait que le VNPI n'induise pas ce genre de modification de la membrane cellulaire, ce qui aurait pour effet de rendre plus ardue la détection des cellules infectées par le VNPI par le système immunitaire. On constate que les truites injectées à l'adjuvant de Freund et maintenues à 8°C (groupes 2 et 3), ont subi une perte de poids entre la cinquième et la huitième semaine. Selon nous, le faible taux d'alimentation explique cette observation. Il n'y a également pas eu de modulation dans le titre viral. Ces résultats correspondent aux affirmations selon lesquelles la truite mouchetée peut demeurer porteuse de façon permanente.

5.1.5 Degré de relation entre le titre viral, le titre en anticorps et le poids corporel.

Le groupe de neuf truites injectées avec le VNPI (13°C) et sacrifiées à 5 semaines après injection (groupe 4), est le seul à présenter une corrélation positive. En effet, le résultat statistique nous indique qu'il existe une relation ($rs = 0,7$) entre le titre d'anticorps chez les truites et le titre viral retrouvé dans les organes. On retrouve effectivement chez les vertébrés une relation entre ces deux composantes (Roitt *et al.*, 1985), du moins jusqu'à ce qu'une tolérance immunitaire surviennent due à une trop forte dose d'antigènes injectés. Cependant, le même test nous indique que cette relation ($rs = 0,3$) est beaucoup plus faible chez le groupe de truites sacrifiées à 8 semaines après injection (groupe 5). Il est possible que cette plus faible relation biologique du nombre de virus versus le nombre en anticorps retrouvée chez ces 22 truites traitées, soit due à leur hétérogénéité génétique. Ce dernier groupe pourrait être composé d'un plus grand nombre de truites susceptibles à présenter une tolérance immunitaire pour un titre viral donné, alors que ce même titre viral serait insuffisant pour déclencher une tolérance chez les autres truites du même groupe. Il est également possible que les 3 semaines séparant les groupes de truites sacrifiées à 5 et 8 semaines après l'injection avec le VNPI, aient été suffisantes pour permettre une multiplication virale permettant le déclanchement d'un phénomène de tolérance immunitaire chez les truites du dernier groupe.

5.2 Caractérisation de l'anticorps

5.2.1 Chromatographie d'exclusion.

Le pic majeur observé à la figure 3 (entre les 100 ième et 160 ième mL d'élution) contiendrait, selon nous, la portion des gammaglobulines du sérum des truites expérimentales, dont font partie les IgM recherchées. De par leur poids moléculaire élevé, ces molécules sont éluées rapidement et sortent de la colonne avant les autres protéines ayant un poids moléculaire plus faible. Les deux petits pics présents au début du tracé, pourraient être dus à des fluctuations dans le bruit de fond, plutôt qu'à deux types de protéines de poids moléculaire très élevé. Aucune activité en anticorps ne fut mesurée dans les fractions de l'eluat chromatographique, incluant les pics de forte absorbance (Tableau 5). Considérant que l'activité est présente dans le sérum dialysé expérimental avant son passage dans la colonne, il est possible que les anticorps aient été inactivés ou endommagés lors de la séparation chromatographique. Nous devons cependant préciser que le pH de 7,5 et la température de 20°C étaient adéquats à la conservation de l'intégrité des protéines. Ces facteurs ne seraient donc pas responsables du phénomène. L'adsorption de molécules non spécifiques aux anticorps semble également peu probable pour expliquer l'inhibition de ces derniers. Nous serions donc portés à croire que le phénomène de dilution par la solution éluante empêcherait de détecter l'activité en anticorps des fractions

contenant les IgM. Il est également possible que la position des IgM spécifiques ne corresponde pas à l'un des pics observables.

On observe une similarité dans la forme du tracé d'élution du sérum expérimental (groupe 5, Figure 3) et du tracé du sérum témoin (groupe 6, Figure 4). En conservant l'hypothèse que les IgM se retrouvent dans ces fractions d'éluat (pic principal), on y retrouverait notamment des anticorps non spécifiques au VNPI et dirigés contre d'autres déterminants antigéniques. Les truites de la pisciculture des Alléghanys (groupe 6) sont en fait susceptibles d'être mises en présence de divers types de pathogènes ou corps étrangers possédant une immunogénicité. Les deux tracés chromatographiques (Figure 3 et 4) présentent également un pic d'absorption de plus faible amplitude aux environs des 120 ième (Figure 4) et 185 ième (Figure 3) mL d'élution. On pourrait croire dans ce cas qu'il s'agisse d'une protéine sérique de plus faible poids moléculaire ou de dimères d'IgM scindés. N'ayant pas de confirmation d'activité en anticorps par la technique de séroneutralisation, cette affirmation demeure au niveau de l'hypothèse.

5.2.2 Détermination du poids moléculaire par électrophorèse.

Les migrations électrophorétiques (Figure 6) mettent en évidence, pour les sérum dialysés expérimentaux (groupe 5) et témoins (groupe 6), deux bandes protéiniques identifiables (bandes 1 et 2). En

référence au marqueur utilisé, ces protéines ont migré à une distance correspondant à une molécule d'un poids moléculaire d'environ 669 000 daltons (Figure 6). Il est à préciser que les bandes 1 et 2 des sérum expérimentaux et témoins respectivement ont migré à la même distance. Il est possible qu'une migration plus longue dans le temps, eût permis de séparer les deux variants d'anticorps. Dans le cas contraire, ceci suggérerait que la méthode employée ne permet pas une résolution suffisante pour différencier les anticorps spécifiques au VNPI des anticorps non spécifiques, ces deux types d'anticorps devant théoriquement se distinguer dans leur composition en acide aminés de la région hypervariable. Nous avons constaté à l'aide de la coloration du gel électrophorétique à l'acide périodique de Schiff (Figure 6), que les protéines des bandes en question contiennent des portions glycosidiques, ce qui tend à suggérer que nous sommes bien en présence d'IgM qui sont des glycoprotéines (Frommel *et al.*, 1971).

5.3 Prospectives

Les études relatives à la susceptibilité des alevins de truites mouchetées (Falqueyret, 1986, Lapierre *et al.*, 1986) et de la truite arc-en-ciel (Frantsi et Savan, 1971; Dorson et Torch, 1981) face au VNPI, ont révélé que la température et l'âge physiologique du poisson étaient deux facteurs impliqués dans ce phénomène. Ces auteurs précisent que d'autres facteurs pourraient également jouer un rôle dans la capacité de l'alevin à résister à l'infection à partir d'un

certain âge. La maturation du système immunitaire fut un des facteurs cités. L'étude du développement du système immunitaire chez la truite mouchetée peut s'effectuer via la mise en évidence de l'activité ou de la présence de molécules, de cellules ou de facteurs tributaires de ce système. La détection d'anticorps circulants est un moyen de tester le fonctionnement du système immunitaire chez le poisson et fut d'ailleurs utilisé par Dorson (1974) pour évaluer l'âge d'immunocompétence des alevins de truites arc-en-ciel. La caractérisation des anticorps de la truite mouchetée adulte que nous avons tenté de réaliser dans cette étude pourrait ainsi servir au développement d'outils de diagnostic pour reconnaître la maturité immunitaire chez les alevins de la même espèce. La détermination précise du stade d'immunocompétence des alevins est essentielle à des fins de vaccination précoce contre les maladies affligeant les jeunes poissons. Ces mêmes outils de diagnostic pourraient également permettre d'effectuer le dépistage de divers types de pathogènes chez les poissons en permettant une intervention rapide afin d'enrayer la propagation de l'agent infectieux. Un contrôle sanitaire adéquat aurait pour effet d'accroître la production piscicole des producteurs.

CHAPITRE 6
CONCLUSION GÉNÉRALE

6.1 Conclusion

L'étude immunologique effectuée sur la truite mouchetée, nous a permis de mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur la production d'anticorps de cette espèce de poisson. Les résultats ont été obtenus à partir d'une mesure des poids corporels et d'analyses virologiques et immunologiques (titre viral dans les viscères et titre en anticorps du sérum) chez des truites mouchetées porteuses du VNPI (5 groupes) et chez des truites exemptes de virus (1 groupe). A l'aide de tests statistiques, nous avons pu déterminer que certains facteurs avaient une influence marquée sur la production d'anticorps spécifiques. Les truites maintenues à 13°C pendant 8 semaines qui ont été injectées au VNPI, ont de toute évidence été dans les conditions les plus favorables à la production d'anticorps spécifiques.

De plus, la mise au point de techniques biochimiques telles que la chromatographie d'exclusion, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, nous a permis de tenter de caractériser les anticorps produits chez la truite. Ces anticorps s'avèreraient être des immunoglobulines de type IgM d'un poids moléculaire d'environ 669 000 daltons. Ce résultat concorde avec ceux de la littérature issus d'études sur les anticorps des salmonidés.

Sur le plan pratique, le développement des techniques de caractérisation et l'information obtenue sur l'IgM de la truite

mouchetée, pourra permettre d'étudier plus à fond le développement du système immunitaire chez l'alevin de cette espèce afin notamment de déterminer l'âge de la maturité immunologique. Ceci permettrait de vacciner les poissons contre des maladies d'origine microbienne, au moment opportun. Dans la même ligne de pensée, ces connaissances pourraient également être utilisées pour la fabrication de trousse de diagnostic qui permettraient de dépister divers agents pathogènes, notamment le VNPI en milieu naturel et en élevage intensif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahne, W. et I. Thomsem. 1986. Infectious Pancreatic Necrosis: Detection of virus and antibodies in rainbow trout IPNV-carrier (*Salmo gairdneri*). *J. Vet. Med.* **33**:552-554.
- Alexander, J.B. 1980. Precipitins in the serum of the atlantic salmon. *Dev. Comp. Immunol.* **4**:641-651.
- Alexander, J.B. et A.L. Shakarchi. 1986. Further studies on the alpha-precipitins of the atlantic salmon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:69-74.
- Allen, R.C., C.A. Saravis et H.R. Maurer. 1984. Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins: selected techniques. Allen R.C. (ed.) Walter de Gruyter, Berlin, pp. 255.
- Anderson, D.P., W.B. Van Muiswinkel et B.S. Roberson. 1984. Effects of chemically induced immune modulation on infectious diseases of fish. *Prog. Clin. Biol. Res.* **161**:187-211.
- Anderson, D.P., O.W. Dixon et E.F. Lizzio. 1986. Immunization and culture of rainbow trout organ sections in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:203-211.
- Avtalion, R.R., E. Weiss et T. Moale. 1976. Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrates, p. 227-237. Dans J.J. Marchalonis (ed.) Comparative immunology. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Avtalion, R.R., A. Wishkovsky et D. Katz. 1981. Regulatory effect of temperature on specific suppression and enhancement of the humoral response in fish, p. 113-121. Dans M.J. Manning (ed.) Phylogeny of immunological memory. Elsevier/north Holland, Amsterdam.

- Avtalion, R.R., A. Wojdani, Z. Malik, R. Shahrabani et M. Ducziminer. 1973. Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **61**:1-35.
- Bayne, C.J. 1986. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:141-151.
- Bootland, L.M., P. Dobos et R.M.W. Stevenson. 1986. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: a model challenge protocol for IPN immunization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:365-372.
- Carlander, K.D. 1969. *Handbook of freshwater fishery biology*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 752.
- Caspi, R. et R.R. Avtalion. 1984. Evidence for the existence of an IL-2 like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish. *Dev. Comp. Immunol.* **8**:125-129.
- Chilmonczik, S. 1980. Some aspects of trout gill structure in relation of Egtved virus infection and defence mechanisms, p. 18-22. Dans W. Ahne (ed.) *Fish Diseases*. Springer Verlag, Berlin.
- Chilmonczik, S. 1985. Evolution of the thymus in rainbow trout, p. 285-292. Dans M.J. Manning et M.F. Tatner (ed.) *Fish Immunology*. Academic Press, London.
- Cisar, J.O. et J.L. Fryer. 1974. Characterization of anti-Aeromonas salmonicida antibodies from Coho salmon. *Infection and immunity* **93**:236-243.
- Clem, L.W. et G.A. Leslie. 1982. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XV. Idiotypic analysis of shark antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* **6**:463-472.

- Clem, L.W., E. Faulman, N.W. Miller, C. Ellsaesser, C.J. Lobb et M.A. Cuchens. 1984. Temperature mediated processes in teleost immunity: Differential effects of in vitro and in vivo temperature on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **8**:313-322.
- Cohen, J. et R. Scherrer. 1972. Structure de la capsid du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) de la truite. *CR Acad. Sci. [D] (Paris)* **274**:1222-1225.
- Corbel, M.J. 1975. The immune response in fish: A review. *J. Fish Biol.* **7**:539-563.
- Cramer, R. 1964. Purification of animal viruses, p. 146-166. Dans R.J.C. Harris (ed.) *Techniques in experimental virology*. Academic Press, London.
- Davina, J.H., H.K. Parmentier et P.M. Timmermans. 1982. Effect of oral administration of vibrio bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2**:157-166.
- DeKinkelin, P. 1988. Maladies des poissons. Aspects étiopathologiques et possibilités d'intervention. *Bull. Fr. Piscic.* **320**:190-197.
- DeKinkelin, P., C. Michel et P. Ghittino. 1985. *Précis de pathologie des poissons*. Institut National de Recherche Agronomique, Office Internationale des Epizooties, Diffusion Lavoisier, Paris, pp. 348.
- DeLuca D., M. Wilson et G.W. Warr. 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, Salmo gairdneri, defined with monoclonal antibodies to IgM. *J. Immunol.* **13**:546-551.
- Desvaux F.X. et J. Charlemagne. 1981. The goldfish immune response: characterization of the humoral response to particulate antigens. *Immunology* **15**:755-762.

- Desvaux F.X., M. Cossarini-Dunier, S. Chilmonczyk et J. Charlemagne. 1987. Antibody diversity in trout obtained by gynogenesis or self-fertilization. Comparative analysis of the heavy chain spectrotypes. *Dev. Comp. Immunol.* **11**:577-584.
- Dixon, P.F. 1987. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus infectivity by extracts of rainbow trout, (*Salmo gairdneri* Richardson), tissue. *J. Fish Dis.* **10**:371-378.
- Dobos, P. 1976. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Res.* **3**:1903-1924.
- Dobos, P., R. Hallett, D.T.C. Kells, O. Sorensen et D. Rowe. 1977. Biophysical studies of IPNV. *J. Virol.* **22**:150-159.
- Dorson, M. 1972. La réponse immunitaire chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*); quelques caractéristiques des immunoglobulines produites lors d'une réaction primaire. *Ann. Rech. Vet.* **3**:93-107.
- Dorson, M. 1972a. Some characteristics of antibodies in the primary immune response of rainbow trout. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **30**:129-140.
- Dorson, M. 1974. Production d'anticorps précipitants anti-dinitrophénol chez les alevins de truites arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) immunisés à l'âge d'un mois. *CR Acad. Sci. [D] (Paris)* **278**:3151-3152.
- Dorson, M. 1981. Role and characterization of fish antibody. *Dev. Biol. Stand.* **49**:307-319.
- Dorson, M. 1982. Nécrose pancréatique infectieuse des salmonidés: état des connaissances concernant le virus et les possibilités de lutte contre la maladie. *Bull. Fr. Piscic.* **285**:195-209.

- Dorson, M. 1984. Immunologie appliquée des poissons. Symposium sur la vaccination des poissons. Office Int. Epizoot. Bull. **7**:41-81.
- Dorson, M. et C. Torch. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, (*Salmo gairdneri Richardson*), caused by an European strain of infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish Dis. **4**:213-221.
- Dorson, M., P. DeKinkelin et C. Torch. 1975. Virus de la nécrose pancréatique infectieuse: acquisition de la sensibilité au facteur neutralisant du sérum de truite après passages successifs en culture cellulaire. CR Acad. Sci. [D] (Paris) **281**:1435-1438.
- Du Pasquier, L. 1982. Antibody diversity in lower vertebrates - why is it so restricted? Nature **296**:311-313.
- Ellis, A.E. 1977. The leucocytes of fish: A review. J. Fish Biol. **11**:453-491.
- Ellis, A.E. 1977a. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity, p. 225-231. Dans J.B. Solomon et J.D. Horton (ed.) Developmental immunobiology. Elsevier/north Holland, Amsterdam.
- Ellis, A.E. 1981. Stress and modulation of defence mechanisms in fish, p. 147-169. Dans A.D. Pickering (ed.) Stress and Fish. Academic Press, London.
- Ellis, A.E. 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates, p. 1-23. Dans R.J. Roberts (ed.) Microbial Diseases of Fish. Academic Press, London.

- Ellis, A.E., A.L.S. Munro et R.J. Roberts. 1976. Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa L.*). *J. Fish Biol.* **10**:67-78.
- Falqueyret, J.P. 1986. Pathogénie de l'infection par le virus de la nécrose pancréatique infectieuse chez l'alevin de la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*). Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval, pp. 158.
- Fletcher, T.C. 1981. Non antibody molecules and the defence mechanisms of fish, p. 171-184. Dans A.D. Pickering (ed.) *Stress and Fish*. Academic Press. London.
- Frantsi, C. et M. Savan. 1971. Infectious pancreatic necrosis virus. Temperature and age factors in mortality. *J. Wildl. Dis.* **7**:249-255.
- Frommel, D., G.W. Litman, J. Finstad et R.A. Good. 1971. The immunoglobulins of the horned shark, (*Heterodontus francisci*). Purification, characterization and structural requirement for antibody activity. *J. Immunol.* **106**:1234-1243.
- Grace, M.F. et M.J. Manning. 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, (*Salmo gairdneri Rich.*) 1836. *Dev. Comp. Immunol.* **4**:255-264.
- Hart, S., A.B. Wrathmell et J.E. Harris. 1986. Ontogeny of gut-associated lymphoid tissue (GALT) in the dogfish (*Scyliorhinus canicula L.*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:107-117.

- Harvarstein, S., P.M. Aasjord, S. Ness et C. Endresen. 1988. Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Comp. Immunol.* **12**:773-785.
- Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. *J. Fish Biol.* **16**:23-60.
- Irwin, M.J. et S.L. Kaatari. 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:39-45.
- Isbell, G.L. et G.B. Pauley. 1983. Characterization of immunoglobulins from the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*) produced against a naturally occurring bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Comp. Immunol.* **7**:473-482.
- Kelly, R.K. et P.C. Loh. 1972. Electron microscopical and biochemical characterization of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **10**:824-834.
- Kitao, T. et Y. Yoshida. 1986. Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:287-296.
- Knott, R.M. et A.L.S. Munro. 1986. The persistence of infectious pancreatic necrosis virus in atlantic salmon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:359-364.
- Kobayashi, K., A. Hara, K. Takano et H. Hirai. 1981. Studies on subunit components of IgM from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Mol. Immunol.* **19**:95-103.
- Kobayashi, K., S. Tomonaga et T. Kajii. 1984. A second class of Ig other than IgM present in the serum of cartilaginous fish, the skate (*Raja kenojei*), isolation and characterization. *Mol. Immunol.* **21**:397-404.

- Lamers, C.H.J., M.J.H. De Haas et W.B. Van Muiswinkel. 1984. Humoral response and memory formation in carp after injection of Aeromonas hydrophila bacterin. J. Zool. London **91**:65-75.
- Lapierre, J., D. Larrivée et L. Berthiaume. 1986. Influence of water temperature and fish age on mortality in Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Aquaculture **59**:81-92.
- Litman, G.W. 1976. Physical properties of immunoglobulins of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals, p. 239-275. Dans J.J. Marchalonis (ed.) Comparative Immunology. Blackwell Scientific, Oxford.
- Lobb, C.J. et L.W. Clem. 1981. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead, Archosargus probatocephalus. Dev. Comp. Immunol. **5**:587-596.
- Lobb, C.J. et L.W. Clem. 1981a. The metabolic relationships of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus, and bile. J. Immunol. **127**:1525-1529.
- Lobb, C.J. et L.W. Clem. 1981b. Phylogeny of immunoglobulin structure and function-X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, Archosargus probatocephalus. Dev. Comp. Immunol. **5**:271-282.
- Lobb, C.J. et L.W. Clem. 1981c. Phylogeny of immunoglobulin structure and function-XII. Secretory immunoglobulins in the bile of marine teleost Archosargus probatocephalus. Mol. Immunol. **18**:615-619.
- MacDonald, R.D. et T. Yamamoto. 1977. The structure of infectious pancreatic necrosis virus. J. Gen. Virol. **34**:235-247.

- Malsberger, R.G. et C.P. Cerini. 1965. Multiplication of IPNV. Ann. N.Y. Acad. Sci. **126**:320-327.
- Manning, M.J., M.F. Grace et C.J. Secombes. 1982. Developmental aspects of immunity and tolerance in fish, p. 31-46. Dans R.J. Roberts (ed.) Microbial Diseases of Fish. Academic Press, London.
- Marshall, R.C. et A.S. Inglis. 1986. Protein oligomer composition, preparation of monomers and constituent chains, p. 1-66. Dans A. Darbre (ed.) Practical protein chemistry. A Wiley-Interscience Publication, Chichester.
- McGonigle, R.H. 1940. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. Trans. Am. Fish Soc. **70**:297-303.
- Metcalf, E.S., A.F. Schrater et N. Klinman. 1979. Murine models of tolerance induction in developing and mature B cells. Immunol. Rev. **43**:143-183.
- Moss, L.H. et M. Gravell. 1969. Ultrastructure and sequential development of IPNV. J. Virol. **3**:52-58.
- Mughal, M.S. et M.J. Manning. 1985. Antibody responses of young carp (*Cyprinus carpio*) and grey mullet (*Chelon labrosus*), immunised with soluble antigen by various routes, p. 313-325. Dans M.J. Manning et M.F. Tatner (ed.) Fish immunology. Academic Press, London.
- Mughal, M.S. et M.J. Manning. 1986. The immune system of juvenile thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus risso*): antibody responses to soluble protein antigens. J. Fish Biol. **29**:177-186.

- Nakanishi, T. 1986. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, Sebasticus marmoratus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:213-221.
- Okamoto, N., T. Sano, R.P. Hedrick et J.L. Fryer. 1983. Concentration and purification of eel virus European (EVE). *Fish Pathol.* **16**:75-83.
- Ourth, D. 1980. Secretory Ig, lysozymes and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* **4**:65-74.
- Payment, P. et V. Pavilanis. 1980. Techniques virologiques. *Les Presses de l'Universite du Quebec*, pp. 200.
- Person, R.H. et R.D. MacDonald. 1983. A protein is bound (covalently ?) to the ends IPNV genomic RNA, p. 129-133. Dans R.W. Compansand et D.H.L. Bishop (ed.) *Double stranded RNA virus*. Elsevier Science, New York.
- Reno, P.W., S. Darley et M. Savan. 1978. IPN: experimental induction of carrier state in trout. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**:1451-1456.
- Rijkers, G.T. 1982. Non-lymphoid defence mechanisms in fish. *Dev. Comp. Immunol.* **6**:1-13.
- Rijkers, G.T., E.M.H. Frederix-Wolters et W.B. Van Muiswinkel. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* **41**:91-97.
- Roitt, I., J. Brostoff et D. Male. 1985. *Immunologie fondamentale et appliquée*. MEDSI, 6 avenue Lesueur, Paris, pp. 279.

- Rosenshein, I.L., S.F. Schluter et J.J. Marchalonis. 1986. Conservation among the immunoglobulins of carcharhinine sharks and phylogenetic conservation of variable region determinants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:13-20.
- Scott, W.B. et E.J. Crossman. 1974. Poissons d'eau douce du Canada. Approvisionnements et services du Canada, Ottawa. Bulletin 184, Office des recherches sur les pêcheries du Canada, Environnement Canada, pp. 1026.
- Scott, D.W., M. Venkataraman et J.J. Jandinski. 1979. Multiple pathways of B lymphocyte tolerance. *Immunol. Rev.* **43**:241-280.
- Secombes, C.J. 1986. Immunological activation of rainbow trout macrophages induced in vitro by sperm autoantibodies and factors derived from testis sensitised leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:193-203.
- Secombes, C.J. et M.J. Manning. 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localisation in the carp (*Cyprinus carpio L.*). *J. Fish Dis.* **3**:399-412.
- Secombes, C.J., M.J. Manning et A.E. Ellis. 1982. Localization of immune complexes and heat-aggregated immunoglobulin in the carp (*Cyprinus carpio L.*). *Immunology* **47**:101-105.
- Shelton, E. et M. Smith. 1970. The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: A tetrameric macroglobulin. *J. Mol. Biol.* **54**:615-617.
- Sigel, M.M., B.A. Hamby et E.M. Huggins. 1986. Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1 like factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:47-58.

- Swanson, R.N. et J.H. Gillespie. 1982. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood and blood components of experimentally infected trout. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* **39**:225-228.
- Tatner, M.F. 1986. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:93-105.
- Tatner, M.F. et A. Adams. 1987. An analysis of the primary and secondary antibody response in intact and thymectomized rainbow trout, to human gamma globulin and Aeromonas salmonicida. *J. Fish Biol.* **20**:438-444.
- Tatner, M.F. et M.J. Manning. 1983. Growth of the lymphoid organs in rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.), from one to fifteen months of age. *J. Zool. London* **199**:503-520.
- Tatner, M.F. et M.J. Manning. 1983a. The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*), in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev. Comp. Immunol.* **7**:69-75.
- Tomonaga, S., K. Kobayashi, K. Hagiwara, K. Sasaki, et K. Sezaki. 1985. Studies on immunoglobulin forming cells in Heterodontus japonicus, a cartilaginous fish. *Dev. Comp. Immunol.* **9**:617-626.
- Vestergard Jorgensen, P.E. 1973. The nature and biological activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and immunized rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Arch. ges Virusforschung* **42**:9-20.
- Vilain, C., M.C. Wetzel, L. Du Pasquier et J. Charlemagne. 1984. Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp

- (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev. Comp. Immunol.* **8**:611-622.
- Wechsler, S.J., P.E. McAllister, F.M. Hetrick et D.P. Anderson. 1986. Effect of exogenous corticosteroids on circulating virus and neutralizing antibodies in striped bass (*Morone saxatilis*) infected with infectious pancreatic necrosis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:305-311.
- Wetzel, M.C. et J. Charlemagne. 1985. Antibody diversity in fish. Isoelectrofocalisation study of individually-purified specific antibodies in three teleost fish species: tench, carp and goldfish. *Dev. Comp. Immunol.* **9**:261-270.
- Wolf, K. et J.A. Mann. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro* **16**:168-179.
- Wolf, K. et M.C. Quimby. 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* **135**:1065-1066.
- Wolf, K. et M.C. Quimby. 1969. Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J. Fish. Res. Board Can.* **26**:2511-2516.
- Wolf, K. et M.C. Quimby. 1971. Salmonid viruses: IPNV. Morphology, pathology and serology of first European isolations. *Arch. ges. Virusforsch* **34**:144-156.
- Wolf, K., S.F. Sniesko, C.E. Dunbar et E. Pyle. 1960. Virus nature of IPN in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**:105-108.
- Wolski, S.C., B.S. Roberson et F.M. Hetrick. 1986. Monoclonal antibodies to the SP strain of IPNV. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**:75-80.
- Wood, E.M., S.F. Sniesko et U.T. Yasutake. 1955. IPN in brook trout. *A.M.A. Arch. Pathol.* **60**:26-28.

- Yamamoto, T. 1974. Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. *J. Fish. Res. Board. Can.* **31**:397-402.
- Yamamoto, T. 1975. Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in a lake. *J. Fish. Res. Board. Can.* **32**:568-570.
- Yamamoto, T. 1975a. IPNV carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* **21**:1343-1347.
- Yu, K.K.Y., R.D. MacDonald et A.R. Moore. 1982. Replication of IPNV in trout leucocytes and detection of the carrier state. *J. Fish Dis.* **5**:401-410.
- Zapata, A. 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **3**:55-65.