
SÉCURITÉ AU LABORATOIRE

Pierre Payment et Michel Trudel

1. INTRODUCTION

La sécurité au laboratoire ne commence pas seulement lorsqu'il s'agit de manipuler un virus reconnu hautement infectieux pour l'homme. La règle d'or est que tous les échantillons pathologiques, le sang et le sérum (même normal), les cultures cellulaires, les virus, les produits chimiques et les produits radioactifs doivent être manipulés avec soin. La liste des virus pathogènes pour l'homme s'allonge de jour en jour et des virus apparemment inoffensifs deviennent meurtriers dans certaines conditions de laboratoire où leur concentration est artificiellement augmentée de plusieurs logarithmes. Le Conseil de recherches médicales du Canada a publié une liste assez complète des virus et du niveau de confinement requis pour leur manipulation (CRM, 1979). On peut consulter aussi le rapport *Laboratory safety for arbovirus and certain other viruses of vertebrates*. (1980). Plusieurs produits chimiques d'utilisation courante sont très toxiques ou reconnus cancérigènes (acides et alcalis concentrés, acrylamide, benzidine, bromure de cyanogène, di-amino-benzidine, dodecyl sulfate de sodium, tétroxyde d'osmium, etc.). Enfin, l'accumulation de radiations, à la suite de

l'utilisation mal contrôlée de l'iode ou du phosphore radioactif (I^{125} , I^{131} , P^{32}) peut entraîner des problèmes de santé. Nous référons le lecteur aux revues de Miller *et al.* (1986), Block (1983), Bretherick (1975) et Steere (1971). On ne saurait donc trop insister sur l'importance de vérifier le danger potentiel de tous les produits utilisés au laboratoire.

Le centre de recherche en virologie a émis des règles minimales concernant la sécurité au laboratoire (Tableau 1). Certaines de ces règles peuvent paraître exagérées ou simplistes, mais l'expérience a démontré que les accidents, parfois fatals, avaient généralement pour cause un relâchement des règles élémentaires de biosécurité.

Nous possédons les connaissances, les techniques et l'équipement nécessaire pour prévenir les infections de laboratoire. Nous devons cependant avoir la sagesse de les utiliser pour confiner les agents infectieux ou toxiques. D'ailleurs, le terme "confinement" a une signification toute particulière en virologie: il décrit l'ensemble des méthodes qui régissent la manipulation d'agents infectieux ou toxiques dans le laboratoire.

2. TYPES DE CONFINEMENT

On reconnaît deux types de confinements: le confinement primaire, soit la protection du personnel et l'environnement immédiat du laboratoire, tel que fourni par des méthodes microbiologiques adéquates, la vaccination du personnel lorsque disponible, et l'équipement de laboratoire approprié; le confinement secondaire réfère à la protection de l'environnement extérieur au laboratoire, tel que fourni par les bonnes pratiques opérationnelles et les installations appropriées. Les trois éléments d'un bon confinement regroupent donc: les bonnes techniques microbiologiques, l'équipement de biosécurité et les installations appropriées.

2.1. BONNES TECHNIQUES

L'élément le plus important du confinement est le **respect intégral des techniques aseptiques** développées en microbiologie. Chaque laboratoire devrait développer ou adopter un manuel d'opération microbiologique qui identifie les dangers potentiels et qui définit les procédures et techniques à utiliser pour la manipulation des différents agents et produits afin de minimiser les risques de contagion ou d'intoxications.

Une **bonne hygiène personnelle** est une étape essentielle dans l'élaboration d'une protection efficace. Le simple fait de se laver régulièrement les mains et de ne jamais les porter à la bouche ou aux yeux constitue une barrière efficace contre plusieurs infections. Le port du masque chirurgical permet aussi de réduire non seulement le risque d'auto-infection mais aussi la contamination du matériel utilisé.

Tout liquide, infectieux ou non, doit être manipulé à l'aide de pipettes ou de distributeurs appropriés: il est strictement

interdit de pipetter à la bouche, car cette pratique représente un risque élevé d'infection ou d'intoxication. Il en va de même pour les fumeurs: *il est strictement défendu de fumer dans les laboratoires*, car en plus des dangers évidents, le simple fait de porter la main à la bouche augmente le risque d'infection. D'autre part, les accidents de travail devraient toujours être rapportés au supérieur immédiat et pris en note. Ces accidents ne se limitent pas seulement aux coupures, mais aussi éraflures, morsures, piqûres et éclaboussures (chimiques ou biologiques).

Les surfaces de laboratoire doivent être décontaminées plusieurs fois par jour au cours d'un travail constant. L'hypochlorite de sodium à 10-100 mg/L ou le Wescodyne à 2% sont efficaces contre la majorité des micro-organismes: il faut cependant se rappeler que pour être efficace, tout agent décontaminant doit pouvoir agir pendant un certain temps. Le phénol à 2% qui a pendant longtemps été utilisé pour la décontamination des surfaces est à déconseiller vu sa haute toxicité: ce produit est facilement absorbé par la peau et les muqueuses du système respiratoire et digestif.

Un sarrau (blouse de laboratoire) est souvent la seule barrière entre nos vêtements et le matériel infectieux. Le sarrau doit être porté, boutons attachés, pendant toute manipulation de micro-organismes, produits biologiques ou produits chimiques. Au moment des réunions, de la pause-café ou des repas, il doit être laissé au laboratoire. Lorsqu'il se produit un accident de laboratoire comportant l'émission d'aérosols, on doit changer de sarrau.

Autre point important, **la décontamination du matériel souillé**: les agents décontaminants dont l'efficacité est reconnue sont la chaleur et les halogènes (le

chlore et l'iode sont les plus utilisés à des concentrations de 10-100 mg/L). La décontamination par la chaleur à 121°C/103 kPa de pression, durant 30 minutes, n'est pas toujours complète: une décontamination d'une heure est recommandée.

2.2. ÉQUIPEMENT DE BIOSÉCURITÉ

L'équipement de biosécurité comprend les **hottes à débit laminaire** et les différents contenants hermétiques pour confiner les micro-organismes. La hotte à débit laminaire constitue l'équipement principal pour confiner les aérosols infectieux générés par la manipulation des liquides biologiques et autres. Trois types de hotte sont disponibles: deux types avec ouverture frontale et air circulé filtré (Classe I et II) qui offrent une protection au personnel et à l'environnement et un type (Classe III) complètement étanche, fournissant le plus haut degré de confinement. Dans le cas de manipulations de petites quantités de produits toxiques, la hotte chimique avec évacuation à l'extérieur est requise.

L'équipement de biosécurité comprend aussi les éléments pour la protection personnelle comme: les gants, sarraus, tabliers, robes chirurgicales, couvre-chaussures, respirateurs, masques faciaux, lunettes de sécurité, sacs hermétiques, etc.

2.3. INSTALLATIONS

Au Canada, les *Directives concernant la manipulation de molécules d'ADN produites par recombinaison et des cellules et virus animaux* (Conseil de recherches médicales du

Canada, 1979), définissent les pratiques de laboratoires applicables ainsi que le confinement et les installations appropriées au travail microbiologique. On y définit six niveaux de confinement (A à F) correspondant au risque inhérent aux agents étudiés. Ces niveaux de confinement sont équivalents aux niveaux définis par le National Institute of Health des États-Unis (P1 à P4). Il est recommandé de consulter ces guides pour les correspondances exactes.

3. RÉFÉRENCES

- . 1980. Laboratory safety for arbovirus and certain other viruses of vertebrates. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 29: 1359-1381.
- . 1979. *Directives concernant la manipulation des molécules d'ADN produites par recombinaison et de cellules de virus animaux*, Conseil de Recherches médicales du Canada, Ottawa.
- Block, S.S. 1983. *Disinfection, sterilization and preservation*, 3rd edition. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., 1053 pages.
- Bretherick, L. 1975. *Handbook of reactive chemical hazards*. CRC Press, Cleveland, Ohio, 976 pages.
- Miller, B.M., Gerschel, D.H.M., Richardson, J.H., Vesley, D., Songer, J.R., Housewright, R.D. et Barkley, W.E. 1986. *Laboratory safety: Principles and practices*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 372 pages.
- Steere, N.V. 1971. *CRC Handbook of Laboratory Safety*. CRC Press, Boca Raton, Fa, 854 pages.

Tableau 1
Mesures de sécurité

-
1. Il est strictement interdit de fumer, boire ou manger ailleurs que dans les locaux réservés à ces fins. La nourriture sera déposée aux endroits désignés à cette fin, jamais dans les laboratoires.
 2. Le port du sarrau est obligatoire pour tout le personnel ayant à manipuler des produits biologiques humains ou animaux et des produits chimiques: on doit boutonner son sarrau. On ne doit pas porter le sarrau au cours des réunions, à la pause-café ou aux repas. On ne doit pas sortir de l'édifice avec un sarrau souillé: s'en procurer un propre si l'on doit travailler dans un autre édifice. On doit faire laver son sarrau à toutes les semaines, ou plus souvent si nécessaire.
 3. On recommande le port des gants chirurgicaux à usage unique pour toute manipulation d'échantillons humains ou animaux, tels que le sang, les tissus, les selles, etc.
 4. On ne doit pas pipetter avec la bouche. On utilise une poire ou tout autre système convenable. Les poires devront être régulièrement renouvelées ou décontaminées par un moyen approprié.
 5. On doit effectuer toute les manipulations d'échantillons humains ou animaux dans une hotte laminaire, les échantillons doivent être placés sur une surface adsorbante plastifiée et doivent être envoyés à la décontamination à la fin du travail. Toutes les manipulations de produits toxiques doivent être faites sous une hotte chimique.
 6. On doit décontaminer les tables de travail après chaque utilisation et à la fin de la journée avec un agent désinfectant (une solution contenant au moins 10 mg/L de chlore libre ou 2% de Wescodyne ou de Proviodyne).
 7. On portera tout le matériel utilisé (verrerie ou matériel à jeter) à la décontamination avant qu'il soit lavé ou jeté. Le matériel à décontaminer doit être placé dans des sacs ou contenants sans fuite, fermés hermétiquement, avant de sortir du laboratoire.
 8. On doit se laver les mains avec du savon après chaque manipulation et avant de quitter le laboratoire.
 9. On doit effectuer toutes les manipulations de façon à réduire la formation et l'émission d'aérosols.
 10. On doit éviter de souiller les cahiers de laboratoire et les feuilles de travail.
 11. Il est interdit aux visiteurs non accompagnés d'entrer dans les laboratoires.

DANS LE CAS D'UN ACCIDENT DE TRAVAIL, ON DOIT:

- A) Laver à l'eau toutes les coupures et se rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant.
 - B) Rincer à l'eau ou à l'eau physiologique toute contamination des yeux avec le matériel de laboratoire et se rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant.
 - C) Rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant tout autre accident tel que brûlures, morsures ou piqûres.
-

2

CULTURE DE CELLULES EN FEUILLETS

Pierre Payment et Michel Trudel

1. MILIEUX DE CULTURE

Chaque type cellulaire a des besoins nutritifs bien spécifiques qui sont déterminés non seulement par l'expérience des chercheurs, mais aussi par l'adaptation de la population cellulaire au milieu utilisé. Il y a donc presque autant de variations dans la composition et l'utilisation des milieux de culture qu'il y a de types de cellules en culture.

La majorité des milieux de culture sont des milieux synthétiques disponibles commercialement (GIBCO Laboratories Inc., Grand Island, N.Y.). On y ajoute de 0.5 à 10% de sérum de fœtus de veau (SFV) ou de sérum de veau (SV). Certains ajoutent en plus de 1 à 10% d'hydrolysate de lactalbumine. Ces milieux sont tamponnés par du bicarbonate, ce qui nous oblige à utiliser des étuves à CO₂ (atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air) si les récipients de culture ne sont pas hermétiques. Les tampons organiques, tel que l'HEPES (acide hydroxy ethyl piperazine sulfonique), permettent de remédier aux problèmes inhérents à ces étuves,

mais leur usage n'est pas généralisé, car plusieurs cellules et virus requièrent la présence de bicarbonate pour leur croissance.

Voici quelques milieux de culture couramment utilisés et leur utilisation. Il ne faut cependant pas oublier que chaque type cellulaire peut avoir des besoins bien particuliers: on a donc avantage à bien se renseigner avant d'en entreprendre la culture.

Milieu 199 (base saline de Earle): élaboration de la croissance des cultures primaires par l'ajout de 5% à 10% de sérum de fœtus de veau.

Milieu MEM (Minimal Essential Medium) (base saline de Earle): utilisé pour l'entretien et croissance des lignées cellulaires et parfois pour l'élaboration et le maintien des cultures primaires. On y ajoute 10% de sérum de fœtus veau pour la croissance et de 0.5 à 2% pour le maintien.

Milieu EBM (Eagle Basal Medium) (base saline de Earle): utilisé pour la multi-

plication et le maintien de lignées diploïdes ou continues, en y ajoutant de 0.5 à 10% de sérum de fœtus de veau.

NOTE: Tous ces milieux peuvent aussi être obtenus avec une base saline de Hank. Cette base diffère de celle de Earle principalement par sa concentration cinq fois plus faible en bicarbonate. Elle est donc moins bien tamponnée et est exposée à des changements plus rapides de pH.

1.1. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont utilisés en culture cellulaire pour réduire la contamination par les bactéries, les champignons et les mycoplasmes. Leur emploi ne doit pas servir à camoufler des mauvaises techniques de travail, mais à maintenir en bon état les cultures cellulaires. Certains types cellulaires, les cultures primaires et les lignées diploïdes en particulier, exigent l'utilisation d'antibiotiques, mais certains peuvent être toxiques à des concentrations trop élevées. Les concentrations recommandées ne devront donc pas être augmentées. Le tableau 1 indique les antibiotiques les plus utilisés et leur concentration finale dans le milieu de culture. On aura avantage à préparer des solutions 100X qui seront conservées à -20°C , en volumes de 5 mL. On utilisera une solution contenant un seul ou plusieurs de ces antibiotiques selon la protection requise et le spectre d'activité des antibiotiques.

1.2. PRÉPARATION, STÉRILISATION ET CONSERVATION

L'apparition sur le marché de milieux synthétiques en poudre a simplifié la préparation des milieux de culture. Ces milieux sont offerts en sachets contenant suffisamment de poudre pour préparer 5

ou 10 litres de milieu complet par la simple addition d'eau. La qualité de l'eau utilisée est sans doute la composante la plus importante: l'eau devrait être tri-distillée, mais en pratique, on utilise de l'eau bi-distillée-déminéralisée, ou purifiée dans des systèmes spéciaux (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Il faudra ajouter du bicarbonate de sodium et ajuster à pH 7.2-7.4 avant de stériliser à froid sur des membranes filtrantes de $0.22\ \mu\text{m}$. Le milieu est réparti en bouteilles qui seront conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Conserver les milieux préparés et vendus sous forme concentrée liquide (2X, 5X ou 10X) à 4°C , mais on y ajoutera de la glutamine avant de les utiliser. Ces milieux sont très pratiques pour les laboratoires utilisant seulement de faibles quantités de milieux de culture: il suffit d'y ajouter de l'eau tri-distillée stérile.

Les quelques règles suivantes sont simples mais elles permettront d'éviter beaucoup de problèmes:

- a) Conserver les solutions utilisées à la température optimale et donner la préférence aux solutions fraîches dans la préparation des cultures (Tableau 2).
- b) Protéger de la lumière toutes les solutions et en particulier les milieux de culture: certaines ondes provoqueraient en quelques heures seulement la formation de composés toxiques pour les cellules.
- c) S'assurer de la qualité chimique de l'eau utilisée.
- d) Vérifier l'isotonicité du milieu.
- e) Utiliser de préférence des solutions à 37°C sur les cellules.

Tableau 1
Antibiotiques utilisés en cultures cellulaires

Antibiotique	Micro-organismes susceptibles	Concentration
Pénicilline	Bactéries Gram +	100 U/mL
Streptomycine	Bactéries Gram –	100 µg/mL
Fungizone (Amphotéricine B)	Champignons et levures	2.5 µg/mL
Mycostatine	Champignons et levures	100 µg/mL
Kanamycine	Bactéries et mycoplasmes	100 µg/mL
Néomycine	Large spectre	50 µg/mL
Tylocine	Mycoplasmes	60 µg/mL
Auréomycine	Large spectre	50 µg/mL
Gentamycine	Large spectre	50 µg/mL

Tableau 2
Entreposage des solutions pour culture cellulaire

Solutions	Température	Durée	Autres conditions
Solutions salines	20°C	1 an	à l'abri de la lumière
Milieus de culture (liquides)			
– avec glutamine	4°C	2 mois ^a	à l'abri de la lumière
– sans glutamine	4°C	4-6 mois	à l'abri de la lumière
Milieus en poudre	4°C	1 an	à l'abri de la lumière
Sérum	-20°C	6 mois	
Sérum inactivé par la chaleur	4°C	6 mois	
Antibiotiques			
– lyophilisés	4°C	1 an	
– liquides (100X)	-20°C	6-12 mois	
Glutamine (100X, 200 mM)	-20°C	6 mois	
Trypsine	-20°C	2-3 mois	
	4°C	1 semaine	
Versène	20°C	1 an	
Hydrolysats de lactalbumine	4°C	2-3 mois	
Bicarbonate de sodium (7,5%)	20°C	1 an	bouteilles hermétiques

^a Après 2 mois, il est préférable d'ajouter 2 mM de glutamine au milieu de culture (1 mL/100 mL d'une solution à 200 mM) avant de l'utiliser.

Tableau 3
Stérilisation des solutions

Autoclaver ^a	Filtrer ^b
Agar	Glucose (<10%)
Glycérol	Glutamine
HEPES	Collagénase
Hydrolysate de lactalbumine	Sérum
Rouge de phénol	Trypsine
EDTA	Vitamines
Eau	NaOH 1 N
Glucose (>10%)	HCl 1 N
	Acides aminés
	Antibiotiques
	Bicarbonate de sodium (7.5%)

^a Autoclaver 20 min 15 lbs (103 kPa) à 121°C.
^b Sur une membrane stérile de 0.2 µm.

1.3. SOLUTIONS DISPERSANTES

La **trypsine** peut être obtenue sous forme cristalline (Millipore Corporation ou Sigma Chemicals) ou liquide déjà préparée à 0.25% dans une solution saline isotonique tamponnée (GIBCO). Cet enzyme brise les liens protéiques inter-cellulaires et libère ainsi chaque cellule. Il est nécessaire d'arrêter l'action enzymatique de la trypsine sinon les cellules seront tuées. L'addition de milieu de culture contenant du sérum de fœtus de veau aux cellules dissociées, remplit cette fonction car ce sérum contient des inhibiteurs de la trypsine.

Le **versène** est une solution à 0.02% d'EDTA (ethylene diamino acetic acid) dans une solution saline isotonique tamponnée ne contenant aucun sel de calcium ou de magnésium. Cette substance, en agissant comme accepteur des ions bivalents ou trivalents, peut provoquer la dissociation des cellules. En effet, les liens qui retiennent les cellules entre elles ou à

un substrat solide (verre ou plastique) sont dépendants de la présence de ces ions. Ici encore, il sera nécessaire de neutraliser l'EDTA par l'addition de milieu de culture contenant de grandes quantités d'ions inorganiques.

Le **pH des solutions dispersantes est important** car à un pH inférieur à 7, la trypsine est inactive et à un pH supérieur à 8, les cellules sont rapidement endommagées. Or, c'est en solution alcaline que la trypsine est la plus active. **La trypsine, pour être plus active, est donc préparée à pH 7.4 à 7.8.**

La **température des solutions dispersantes doit toujours être amenée à 37°C avant de les placer en contact avec les cellules.** La dispersion du feuillet doit être rapide sinon les cellules seront irrémédiablement endommagées. De plus, l'action des agents dispersants est optimale à cette température. Différentes solutions dispersantes sont utilisées dans nos laboratoires: trypsine-PBS, trypsine-citrate, trypsine-EDTA et versène. Elles sont stérilisées par filtration sur membrane 0.22 µm stérile.

1.3.1. Trypsine-PBS

Solutions

Trypsine (0.25%) dans de la saline phosphatée à pH 7.2-7.4

Préparation de la saline phosphatée (PBS: Phosphate Buffered Saline)

Solution A

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g

H₂Oà 800 mL

Solution B

CaCl₂0.100 g

ou CaCl₂·2H₂O0.132 g

H₂Oà 100 mL

Solution C

MgCl₂·6H₂O0.1 g

H₂Oà 100 mL

Dissoudre les sels dans l'ordre indiqué puis mélanger les solutions A et C. Ajouter lentement le mélange A-C à la solution B en agitant sans cesse. Stériliser par filtration sur membrane 0.22 µm stérile ou à l'autoclave: chaque solution sera traitée séparément pendant 10 min à 100°C, puis le mélange sera effectué de façon aseptique. Ajouter 0.25% de trypsine purifiée.

1.3.2. Trypsine-citrate

Trypsine (0.25%) dans un tampon citrate pH 7.8

Préparation du tampon citrate:

Citrate de sodium2.96 g

NaCl6.00 g

H₂O1.00 L

Ajuster à pH 7.8.

1.3.3. Trypsine-EDTA

Trypsine (0.05%) et EDTA-disodique (0.02%) dans du PBS, sans calcium ni magnésium.

Préparation du PBS sans calcium - magnésium

NaCl8.00 g/L

KCl0.20 g/L

Na₂HPO₄1.15 g/L

KH₂PO₄0.20 g/L

Glucose0.20 g/L

Le pH de cette solution est de 7.4.

1.3.4. Versène

EDTA disodique (0.02%) dans du PBS sans calcium ni magnésium.

1.3.5. Utilisation de ces solutions dispersantes

L'utilisation de ces différentes solutions a un caractère historique et reflète les besoins particuliers de certains chercheurs.

La **trypsine-PBS** est une solution d'utilité générale. Cependant, à pH 7.2-7.4, l'effet dispersant de la trypsine est plus lent. Certains types cellulaires sont très sensibles à une action prolongée de cet enzyme; plusieurs préfèrent donc utiliser le versène ou la trypsine-citrate.

La **trypsine-citrate** est aussi une solution d'utilité générale, mais dont le pH est plus approprié à l'action de la trypsine.

La **trypsine-EDTA** est utilisée dans certains laboratoires pour accélérer le processus de dispersion cellulaire.

Le **versène** est surtout utilisé lorsque l'action de la trypsine entraîne des pertes importantes de la viabilité cellulaire par son action protéolytique.

1.4. DISPERSION D'UN FEUILLET CELLULAIRE

1. Vidanger le milieu de culture.
2. Rincer le feuillet cellulaire avec 10 mL d'une solution saline ou de milieu de culture sans sérum préchauffé à 37°C (si la solution utilisée pour la dispersion contient de l'EDTA, rincer le feuillet cellulaire avec du PBS sans calcium ni magnésium ou de la saline).

ou

Rincer le feuillet avec quelques millilitres de la solution dispersante à 37°C. Il est préférable de déposer les solutions sur la face opposée au feuillet cellulaire puis de faire glisser

lentement la solution sur le feuillet. Pour vidanger, procéder à l'inverse.

3. Ajouter 2 mL de la solution dispersante et la répartir sur le feuillet cellulaire.
4. Incuber 10-15 min à 37°C.
5. Recueillir les cellules en agitant doucement.
6. Les remettre en suspension dans le milieu de culture approprié contenant 10% de SFV (le SFV a une action anti-tryptique).
7. Après le comptage cellulaire, il faut diluer les cellules dans le milieu de croissance et les placer dans le récipient approprié.

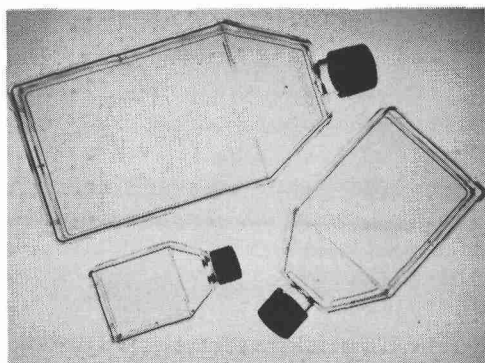


Figure 1

Flacons pour culture cellulaire

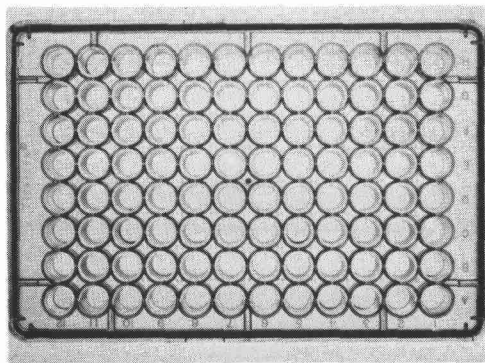


Figure 2

Microcassette pour culture cellulaire

1.5. PRÉPARATION DE CULTURES PRIMAIRES

1.5.1. Cultures primaires de reins de singe

IMPORTANT: Les cultures primaires de cellules de reins ou d'autres organes de singe nécessitent un niveau de confinement de catégorie C en raison des micro-organismes pathogènes pour l'homme qu'elles peuvent contenir (normes du Conseil de recherches médicales du Canada). Toutes les manipulations devront donc être réalisées à ce niveau de confinement. S'il s'agit de reins provenant d'autres espèces animales, un niveau de confinement B sera adéquat.

Solutions requises

Tampon ou milieu préchauffé à 37°C pour le transport des reins après le prélèvement et pour le lavage des reins coupés avant la trypsination.

Trypsine-PBS préchauffée à 37°C pour disperser les cellules.

Milieu 199-Hank additionné de 2% de SFV inactivé et de pénicilline (100 U/ mL) streptomycine (100 µg/mL) pour l'initiation de la culture.

Milieu 199-Earle, 1% SFV, Pen-Strep pour le maintien des cellules.

Méthode

1. *Prélèvement des reins:* Anesthésier, saigner, raser et laver l'animal, prélever les reins dans une salle d'opération en dehors de l'animalerie. Désinfecter la peau avec une solution de Wescodyne avant d'inciser à l'aide d'instruments stérilisés. Flamber le

tissu sous-cutané, inciser les muscles, prélever les reins et les placer dans un bocal stérilisé contenant du PBS. On doit pratiquer une autopsie sur les animaux qui seront examinés par un vétérinaire. Utiliser les reins provenant uniquement d'animaux ne montrant aucun signe de maladie infectieuse. On peut aussi améliorer le rendement cellulaire en perfusant les reins *in situ* avec la trypsine.

2. Transférer stérilement les reins dans un grand vase de Petri à l'aide d'une pince stérilisée (rejeter l'instrument).
3. Enlever la capsule, le tissu conjonctif et les caillots de sang à l'aide d'une pince et d'un scalpel stérilisés (rejeter les instruments).
4. Placer les reins dans un nouveau vase de Petri à l'aide d'une pince stérilisée.
5. *Culture cellulaire :* Couper les cortex en fragments de tissus d'environ 1 mm³, rejeter la substance médullaire.
6. Transférer les fragments dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de PBS préchauffé à 37°C.
7. Laver trois fois avec 150 mL de PBS préchauffé à 37°C.
8. Transférer les tissus dans un erlenmeyer de 500 mL contenant une barre magnétique.
9. Rincer trois fois avec 150 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C.
10. Rejeter le dernier rinçage et ajouter 100 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C aux fragments de tissus.

11. Agiter pendant 5 min à l'aide d'une agitateur magnétique dans une étuve à 37°C.
12. Rejeter ce premier surnageant.
13. Ajouter 150 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C, puis replacer dans l'étuve pendant 30 min.
14. Récupérer le surnageant de chaque trypsination dans une bouteille à centrifugation contenant 10 mL de SFV et centrifuger à 100 x g pendant 20 min.
15. Vidanger le surnageant dans un récipient stérilisé et récupérer le culot.
16. Préparer 500 mL de milieu 199-Hank, contenant 2% SFV, 100 U/ mL de pénicilline et 100 µg/ mL streptomycine, préchauffés à 37°C. Réserver 300 mL dans un erlenmeyer de 500 mL, et le reste (10 à 20 mL par fraction) serviront à récupérer et rincer les cellules en culot, et iront rejoindre les 300 mL en attente.
17. Répéter les opérations 15 et 16 jusqu'à ce que le tissu soit complètement épuisé.
18. Faire un comptage cellulaire au bleu de Trypan en considérant le volume final des fractions de trypsination. Maintenir les cellules en suspension avec un agitateur magnétique.
19. Préparer une suspension à 175 000 cellules/mL et placer dans les récipients appropriés.

1.5.2. Cultures de fibroblastes aviaires (poulet, canard)

1. Prélever stérilement les embryons des oeufs (poussin de 10-14 jours, canard de 13-14 jours).
2. Enlever la tête, les ailes et les pattes.
3. Couper en petits morceaux le reste du corps.
4. Rincer trois fois avec du tampon PBS (voir 1.5.1).
5. Rincer une fois avec de la trypsine-PBS.
6. Faire deux trypsinations de 30 min avec de la trypsine-PBS, à la température de la pièce.
7. Centrifuger pendant 15 min à 800 x g.
8. Suspendre les cellules dans du milieu MEM-Hank 6% SFV avec Pen-Strep.
9. Faire un comptage cellulaire au bleu de Trypan.
10. Ajuster la suspension à 800 000 cellules/mL dans du milieu MEM-Hank 6% SFV avec Pen-Strep.
11. Répartir dans les récipients appropriés et incubé à 37°C.
12. À la confluence, changer le milieu pour un mélange 1:4 de milieux MEM-Hank: MEM-Earle additionné de 0.5% SFV et de Pen-Strep.

2. ENTRETIEN DES CULTURES

2.1. ENTRETIEN DES CULTURES PRIMAIRES

Les cultures primaires ne peuvent être maintenues longtemps, contrairement aux cellules en lignées. Elles sont donc utilisées directement pour la production ou l'isolement de virus, quoi qu'il soit aussi possible de les utiliser au deuxième ou troisième passage. Dans ce cas, la sensibilité de ces cellules à certains virus est cependant réduite. Cette option permet cependant la congélation des cellules au premier passage et leur utilisation au besoin.

Un mélange en parties égales de milieu MEM-Hank et de milieu MEM-Earle additionné de 0.5–2% de SFV permettra de maintenir la plupart des cultures primaires. Certains types cellulaires requièrent des milieux de culture différents et il faudra se renseigner sur les besoins de ces cellules.

2.2. ENTRETIEN DES CULTURES EN LIGNÉES CONTINUES

Contrairement aux cellules en culture primaire ou aux cellules diploïdes, les cellules en lignées continues peuvent être sous-cultivées des centaines de fois. Au cours de ces nombreuses générations, les caractères originaux des cellules seront perdus peu à peu et le nombre de chromosomes deviendra hétéropleïde. Ces cellules ont un taux de multiplication beaucoup plus élevé que les autres types, et il est possible de faire des dilutions des sous-cultures de 1:5 à 1:20.

Les passages seront faits par trypsination du feuillet cellulaire, puis par dilution dans un milieu de croissance.

Méthode

1. Vidanger le milieu de culture.
2. Rincer la culture avec 5-10 mL de solution dispersante à 37°C.
3. Incuber à 37°C en présence de 1-2 mL de solution dispersante.
4. Lorsque le feuillet est détaché, ajouter 5-10 mL de milieu de croissance et disperser les cellules à l'aide d'une pipette munie d'une poire.
5. Faire un comptage après coloration au Bleu de Trypan.
6. Diluer la suspension cellulaire dans le milieu de croissance et répartir dans les récipients de culture. La dilution à effectuer pour chaque type cellulaire est déterminée par l'expérience; généralement, une dilution de 1:3 à 1:5 est effectuée.
7. Incuber à 37°C.
8. Changer le milieu de culture pour un milieu de maintien (milieu additionné de 2% de SFV), lorsque le feuillet est confluent, .
9. Il est possible de conserver les cellules dans le milieu de maintien plusieurs semaines en changeant ce milieu une ou deux fois par semaine. Il est aussi possible de ralentir le métabolisme et la croissance des cellules en incubant les cultures à 33 ou 35°C.

Il est avantageux de maintenir une ou deux bouteilles d'un type cellulaire donné. Ces cellules seront sous-cultivées à tous les 7-10 jours. Si l'utilisation d'un type cellulaire est occasionnelle, il est

alors préférable de préparer une banque cellulaire congelée.

Volume de solution selon le type de récipients:

Surface	25 cm ²	75 cm ²	150 cm ²
Rinçage	5 mL	5 mL	10 mL
Trypsine	2 mL	3 mL	5 mL
Milieu	10 mL	45 mL	100 mL

2.3. ENTRETIEN DES CULTURES DE CELLULES DIPLOÏDES

Les cultures diploïdes possèdent encore la plupart des caractères originaux de l'organe d'origine. Ces cellules peuvent être cultivées jusqu'à environ 50 générations, puis elles vieillissent, cessent de se diviser et meurent.

Leur culture exige des précautions beaucoup plus grandes que la culture des cellules hétéroploïdes ou même des cultures primaires. Les précautions suivantes sont vitales pour le maintien des cellules diploïdes de poumon humain (WI-38 par exemple).

- Utilisation du milieu EBM-D (Eagle Basal Medium-Diploïd) (base de Earle) contenant 50 µg/mL d'auréomycine). (*Reconstituer 500 mg d'auréomycine avec 50 mL d'eau distillée à 37°C, puis répartir en volumes de 5 mL et congeler à -20°C. Ajouter 5 mL/500 mL de milieu de culture.*)
- Toutes les solutions qui entrent en contact avec les cellules doivent être chauffées à 37°C.
- Toutes les solutions seront ajustées à pH 7.2 et ne devront jamais dépasser pH 7.4 même après incubation à 37°C.

- On ne doit jamais déposer les récipients de culture contenant les cellules sur des surfaces froides (tables en acier ou autres). Utiliser une surface de protection, telle que du Styrofoam ou du carton ondulé.
- Effectuer régulièrement la multiplication des cellules: une fois par semaine, dilution 1:2, confluence en 3 à 4 jours (1 génération).

2.3.1. Élaboration d'une culture cellulaire à partir de cellules congelées

1. Ampoule contenant 2 x 10⁶ cellules dans 1 mL de milieu EBM-D avec 10% de SFV, 10% de glycérol et de l'auréomycine.
2. Préchauffer à 37°C 20 mL de milieu additionné de 10% de SFV et d'auréomycine.
3. Placer l'ampoule pendant 2 min dans un bain-marie à 37°C.
4. Prélever le contenu de l'ampoule à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, dissocier les cellules et compléter à 20 mL avec le milieu préchauffé.
5. Placer cette suspension cellulaire dans un flacon de 75 cm² non fermé hermétiquement. Incuber à 37°C dans une étuve à CO₂ (5% CO₂).
6. Après 24 h, fermer le bouchon hermétiquement après avoir changé le milieu pour 20 mL de milieu neuf.
7. Placer à 37°C pendant 6 jours.
8. Effectuer des multiplications régulières.

2.3.2. Multiplication des cellules diploïdes

1. Vidanger le milieu et ajouter 5 mL de trypsine-PBS sur la paroi opposée aux cellules puis retourner le flacon lentement pour baigner les cellules.
2. Après 1-2 min, vidanger la trypsine par le côté opposé aux cellules, ajouter 2 mL de trypsine-PBS et placer le flacon à 37°C pendant 10-20 min.
3. Ajouter 5 mL de milieu à 37°C, puis dissocier les cellules à l'aide d'une pipette. Compléter avec 35 mL de milieu et répartir dans deux bouteilles. Incuber à 37°C.

Il est très important:

- de préchauffer toutes les solutions à 37°C
- de ne jamais placer les bouteilles sur une surface froide
- de ne jamais les laisser à la température de la pièce
- de bien dissocier les cellules
- de multiplier par 2 ou par 4 et inverser à chaque multiplication afin de ne pas épuiser les cellules
- de toujours utiliser de la trypsine-PBS et du milieu EBM-D

Il est aussi très important de noter le nombre de passages puisque ces cellules cesseront de se multiplier après 50 passages environ. À chaque dilution 1:2 le nombre de passages (générations) augmente de 1 (on incube la culture pendant 3 à 4 jours). Lors d'une dilution 1:4 le nombre de passages augmente de 2 (on incube alors la culture de 5 à 7 jours). En

plus de déterminer le nombre de passages, il est utile de déterminer le taux de multiplication de cellules diploïdes. En effet, ce taux sera différent au cours des derniers passages.

2.4. COMPTAGE CELLULAIRE

2.4.1. Coloration au violet de cristal

Le cristal violet colore en bleu les noyaux des cellules et permet d'en faire le comptage, y compris celles en agrégat.

Solution

Cristal violet	1.0 g
Acide citrique	19.2 g
Eau déminéralisée	1.0 L

Dissoudre l'acide citrique dans l'eau puis ajouter le cristal violet.

Cette solution se conserve à la température de la pièce.

Méthode

1. Ajouter 0.5 mL de la solution colorante, à 0.5 mL de la suspension cellulaire à compter.
2. Bien mélanger avec une pipette Pasteur afin de briser les agrégats de cellules.
3. Placer une goutte dans chaque chambre d'un hématimètre Neubauer.
4. Compter le nombre de cellules dans 25 petits carrés du centre de chaque chambre. Il devrait y avoir environ 100 cellules par chambre. S'il y en a beaucoup plus, on peut compter seulement 5 chambres au hasard et multiplier par 5 la valeur obtenue, ou encore diluer 1:2 ou 1:5 la suspension

- cellulaire et multiplier par 2 ou 5 selon le cas. Additionner les deux valeurs.
5. Le nombre de cellules/mL est obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Cellules/mL} = \frac{\text{cellules comptées}}{2} \times 10\,000 \times 2$$

où 10 000 est la constante de la chambre de comptage. Ce facteur ramène le nombre de cellules comptées à un volume de 1 mL. Les cellules comptées dans chaque chambre sont contenues dans un volume de 1 mm x 1 mm x 0.1 mm, soit 1/10 000 de cm³ (1 cm³ = 1 mL).

Diviser le nombre de cellules comptées par 2 pour obtenir une moyenne. Multiplier cette moyenne par 2 dans le but de compenser pour la dilution faite à l'étape 1. Ces deux valeurs s'annulent (dans ce cas particulier) et la formule devient:

$$\text{Cellules/mL} = \frac{\text{cellules dans 2 chambres}}{2} \times 10\,000$$

2.4.2. Coloration au Trypan bleu (épreuve d'exclusion du colorant)

Le Trypan bleu est un colorant vital qui ne pénètre que dans les cellules mortes dont la membrane ne peut plus l'exclure.

Solution

Trypan bleu1 g
PBS100 mL

Méthode

1. Ajouter 0.1 mL de la solution colorante à 0.4 mL de la suspension cellulaire à compter.

2. Bien mélanger la suspension avec une pipette Pasteur.
3. Déposer une goutte dans chacune des chambres d'un hématimètre Neubauer.
4. Compter le nombre de cellules totales dans la section centrale (25 carrés), ou encore dans cinq sous-sections de chaque chambre choisies au hasard et multiplier par 5 la valeur obtenue. Les cellules mortes sont colorées en bleu. Les cellules vivantes sont incolores. Il est préférable de compter le contenu de 2 chambres et d'en faire la moyenne.
5. Le nombre de cellules vivantes/mL est évalué par la formule suivante:

$$\text{Cellules incolores dans 25 carrés} \times 10\,000 \times 5/4$$

On multiplie par 10 000 pour obtenir la valeur par millilitre, le volume évalué étant de 0.1 mm³ (1 mm x 1 mm x 0.1 mm) soit 5 carrés x 5 carrés multiplié par l'espace entre lame et lamelle (0.1 mm). Enfin, on multiplie par 5/4 pour compenser la dilution provoquée par l'addition du colorant à l'étape 1.

3. CLONAGE

Les cultures obtenues à partir d'explants et de certaines lignées cellulaires sont un mélange de types cellulaires. Il est parfois utile d'obtenir des cellules issues d'une seule cellule et possédant, de ce fait, les caractères de celle-ci. Le processus de sélection est le clonage et la lignée obtenue est appelée "clone".

1. Préparer une suspension monocellulaire à partir de la lignée cellulaire à étudier.

2. Diluer à 20 cellules/mL dans le milieu approprié contenant 10% de SFV.
3. Déposer 50 μ L de cette suspension dans chacune des cupules d'un plateau à 96 cupules à fond plat.
4. Ajouter 100 μ L de milieu de croissance à chaque cupule.
5. Replacer le couvercle et incuber 3 h à 37°C dans une étuve à CO₂ humidifiée.
6. Examiner chaque cupule au microscope. Marquer celles qui contiennent une seule cellule.
7. Replacer à 37°C.
8. Examiner à chaque jour et noter le taux de croissance et la morphologie cellulaire.
9. Changer le milieu tous les 3 ou 4 jours ou plus souvent si nécessaire.
10. Vidanger le milieu de culture dans les cas où les cellules ont formé un feuillet et ajouter 100 μ L de trypsine-PBS par cupule.
11. Recueillir les cellules qui se détachent avec une pipette Pasteur et les placer dans une cupule d'un plateau à 12 ou 24 cupules.
12. Ajouter du milieu de croissance et incuber à 37°C.
13. Lorsque le feuillet est confluent, trypsiniser les cellules et les transférer dans un flacon de 25 cm². À la confluence, passer à un flacon de 75 cm² et ainsi de suite.

4. ÉPREUVE DE FORMATION DES COLONIES

Cette épreuve a pour but de déterminer quelle fraction d'une suspension cellulaire peut se développer et être ainsi à l'origine d'une nouvelle colonie. En effet, toutes les cellules ne possèdent pas ce potentiel et une simple épreuve d'exclusion du colorant n'est jamais concluante pour déterminer la viabilité des cellules.

1. Préparer une suspension monocellulaire de 500 à 2000 cellules/mL dans le milieu approprié contenant 10% de SFV.
2. Placer 1 mL de cette suspension dans une boîte de Petri de 60 mm dont le fond est quadrillé (assurez-vous qu'il s'agit bien d'un récipient pour culture de tissus).
3. Ajouter 4 mL de milieu contenant 10% de SFV. Mélanger par un mouvement rotatif et placer dans une étuve à CO₂ à 37°C.
4. Examiner après 18 heures pour connaître le taux d'adhésion.
5. Incuber 6 jours à 37°C.
6. Vidanger le milieu, rincer trois fois au PBS et sécher au séchoir électrique.
7. Fixer 10 min au méthanol absolu.
8. Rincer au PBS.
9. Colorer au Giemsa 1% pendant 45 min (ou Bleu de Toluidine 1% pendant une minute).

10. Vidanger le colorant et rincer à l'eau.
11. Compter, sous le microscope, les colonies formées de cinq cellules ou plus, dans 22 carrés choisis au hasard dans la partie centrale de la boîte de Petri. Il y a 440 carreaux dans une boîte de Petri de 60 mm; 1/20 de la surface est donc compté.

% cellules ayant formé des colonies =

$$\frac{\text{Colonies dans 22 carrés} \times 20}{\text{Nombre de cellules ensemencées}}$$

5. CONGÉLATION ET DÉCONGÉLATION

5.1. CONGÉLATION DES CELLULES

1. Trypsiner un ou plusieurs feuillets cellulaires confluent.
2. Suspender les cellules dans un milieu de croissance contenant 10% de SFV et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde) et ajuster la concentration cellulaire à 1.5×10^6 cellules /mL.
3. Répartir dans des cryotubes de 2 mL et placer 1 mL par ampoule.
4. Placer à 4°C au moins 3 h.
5. Abaisser la température entre 4°C et -25°C des tubes à raison de 1°C/min. Agiter les ampoules avant de commencer la congélation.
6. Lorsque la température a atteint -25°C, abaisser rapidement à -70°C ou moins (azote liquide).
7. Conserver à -70°C ou moins.

Les étapes 4, 5 et 6 sont réalisées dans un appareil automatique. Des méthodes ma-

nuelles sont possibles, mais l'appareillage automatique et la conservation sous vapeur d'azote sont préférables car une perte de viabilité peut se produire à -70°C.

5.2. DÉCONGÉLATION ET MISE EN CULTURE

1. Plonger le tube dans un bain-marie à 37°C jusqu'à ce que toute la glace soit fondue.
2. Ouvrir le tube de façon aseptique et placer son contenu dans le milieu de croissance, puis dans un flacon de 25 ou 75 cm².
3. Incuber à 37°C.
4. Changer le milieu après 24 h.
5. Effectuer les sous-cultures (trypsiner, diluer, etc.).

6. ÉTALEMENT DE CHROMOSOMES

Cette technique permet d'étaler les chromosomes sur un seul plan; on peut ainsi les identifier et les énumérer afin de caractériser une lignée cellulaire.

1. Obtenir un flacon de 75 cm² contenant les cellules à étudier.
2. Ajouter au milieu de culture 0.2 µg/mL de colcémide, incuber 5 h à 37°C, puis trypsiner les cellules.
3. Centrifuger les cellules 10 min à 1000 x g et rejeter le surnageant.
4. Ajouter très lentement 2 mL de la solution hypotonique suivante préchauffée à 37°C: 1 mL de SFV dans 14 mL d'eau distillée.

5. Suspendre délicatement les cellules et incuber 30 min à 37°C.
 6. Centrifuger 5 min à 1000 x g et rejeter le surnageant.
 7. Ajouter 3 mL du fixateur suivant, fraîchement préparé: 3 mL de méthanol absolu et 1 mL d'acide acétique glacial (ne pas suspendre les cellules).
 8. Incuber 30 min à 20°C, suspendre les cellules, centrifuger 5 min à 1000 x g.
 9. Rejeter le surnageant et ajouter 2 mL de fixateur fraîchement préparé (voir étape 7).
 10. Suspendre les cellules et reprendre les étapes 5 à 7 à deux reprises.
 11. Rejeter le surnageant et ajouter juste assez de fixateur pour obtenir une suspension uniforme (déterminée par l'expérience).
 12. Laisser tomber 1 ou 2 gouttes de cette suspension sur une lampe propre. Avant l'utilisation, les lames sont conservées dans un bain d'eau distillée; on enlève le surplus d'eau juste avant l'usage.
 13. Sécher rapidement au séchoir électrique.
 14. Colorer 6 min dans une solution 1/50 (fraîchement préparée) de Giemsa.
 15. Rincer à l'eau distillée, sécher puis monter sous lamelle.
 16. Trouver les étalements complets par microscopie, et procéder à l'identification et au comptage.
- ## 7. RÉFÉRENCE
- Freshney, R. I. 1987. *Culture of animal cells. A manual of basic techniques*. 2e Edition. Alan R. Liss Inc, New York, 397 pages.

3

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES VIRUS

Pierre Payment et Michel Trudel

1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Plusieurs des échantillons soumis pour examen virologique sont contaminés par des bactéries ou des champignons et il est nécessaire de les centrifuger et de les traiter avec des antibiotiques.

La **solution concentrée d'antibiotiques (100X)** contient 10 000 unités de pénicilline, 10 000 µg de streptomycine et parfois 100 µg d'amphotéricine B par millilitre (Pen-Strep-Amph). On l'utilise à 1 ou 2% en cultures cellulaires et à 5 à 10% pour les échantillons cliniques.

1.1. SELLES

1. Placer 5 g de selles et 50 mL de PBS dans une bouteille stérile de 100 mL contenant 20-25 billes de verre de 4-5 mm.
2. Émulsionner jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
3. Décanter et centrifuger à 3000 x g pendant 60 min à 4°C.
4. Recueillir 10 mL de surnageant et y ajouter 0.5 mL de la solution d'antibiotiques 100X.
5. Laisser 1 h à 4°C.
6. Ensemencer sur cultures cellulaires (0.3 mL par tube en macrotechnique et 50 µL par cupule en microtechnique), ou inoculer à des oeufs embryonnés ou à des souriceaux.
7. Observer les cultures cellulaires tous les deux jours.
8. Lorsqu'un effet cytopathique se manifeste, ou après 10 jours, recueillir le surnageant de la culture et le réensemencer sur de nouvelles cultures.
9. Observer tous les deux jours pendant 10 jours ou aussi longtemps que les cultures témoins se conservent en bon état. Si une dégénérescence caractéristique se produit, typer le virus. Sinon, il faudra considérer l'échantillon négatif, à moins que les oeufs ou les souriceaux aient présenté des lésions.

1.2. ÉCOUVILLONS ET LIQUIDES BIOLOGIQUES

Les écouvillons devront avoir été placés dans 2-3 mL de milieu de transport (milieu 199-base de Hank, 2% de SFV et 5% de la solution d'antibiotiques).

1. S'il s'agit d'un écouvillon, bien le presser dans le milieu de transport pour en extraire l'échantillon.
2. Si le liquide est contaminé (trouble) et, en particulier, s'il s'agit d'un écouvillon rectal, centrifuger 30 min à $3\,000 \times g$ à 4°C.
3. Ajouter 5% de la solution d'antibiotiques 100X.
4. Laisser 60 min à 4°C.
5. Ensemencer sur cultures cellulaires ou inoculer à l'oeuf embryonné ou au souriceau.

1.3. TISSUS

1. Broyer le tissu dans un mortier ou dans un homogénéisateur mécanique avec suffisamment de PBS pour obtenir une suspension à 20%.
2. Centrifuger 30 min à $3\,000 \times g$ à 4°C.
3. Ajouter 5% de la solution d'antibiotiques 100X.
4. Ensemencer sur cultures cellulaires ou inoculer à des souriceaux.

1.4. ORGANES DE SOURICEAUX

Il faut procéder de la même façon que pour les tissus, mais en prenant soin de laver les tissus pour les débarrasser de la glycérine tamponnée, s'ils y ont été conservés.

2. INOCULATION À L'OEUF EMBRYONNÉ

2.1. VOIE AMNIOTIQUE

Utiliser des oeufs de 7 jours pour le virus des oreillons et des oeufs de 11 jours pour le virus de l'influenza.

1. Désinfecter la coquille au niveau de la chambre à air avec une gaze imbibée d'alcool à 70%.
2. Pratiquer dans la coquille une ouverture de 1 cm de diamètre en utilisant des ciseaux stérilisés.
3. Éclaircir la membrane coquillière avec une goutte d'alcool à 15%.
4. Injecter 0.2 mL d'échantillon dans la cavité amniotique de l'oeuf (3 oeufs par échantillon). Viser l'oeil de l'embryon. Utiliser une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 26G-3/8.
5. Fermer l'ouverture avec du pansement adhésif stérile.
6. Incuber dans une étuve humidifiée en position verticale à 33°C pour le virus de l'influenza ou à 37°C pour le virus des oreillons.
7. Mirer les oeufs après 24 h et rejeter ceux dont l'embryon est mort.
8. Recueillir après 2-4 jours pour le virus de l'influenza ou après 5-7 jours pour le virus des oreillons.
9. Placer les oeufs pendant 18 h à 4°C (ou 30 min à -20°C) pour tuer l'embryon.
10. Agrandir l'ouverture de la coquille et replier la membrane chorio-allantoïde sur celle-ci à l'aide d'une pince stérilisée.

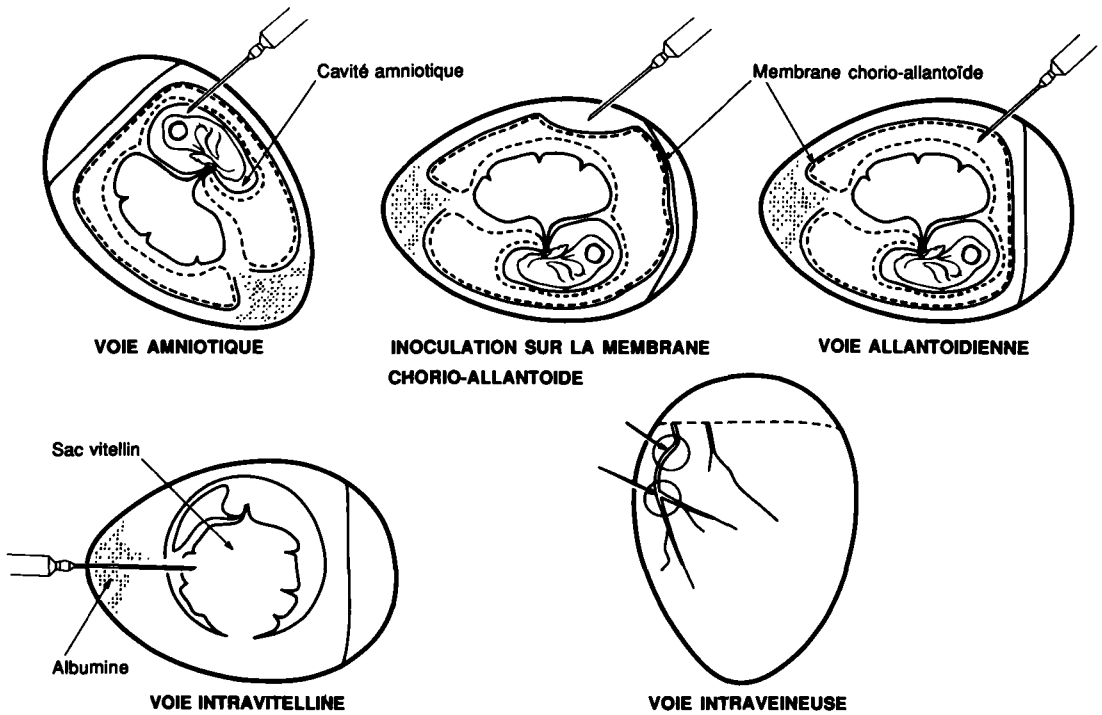


Figure 1

Voies d'inoculation à l'oeuf embryonné

11. Écarter l'embryon avec la pince et aspirer le liquide allantoïde avec une pipette de 10 mL.
12. Pencher l'oeuf de façon à faire sortir la tête de l'embryon. A l'aide d'une seringue de 5 mL (aiguille 20G-1 1/2"), transpercer la membrane amniotique et aspirer le liquide amniotique.
13. Effectuer les épreuves appropriées sur les liquides recueillis (hémagglutination, fixation du complément, ELISA, hémadSORPTION, etc.).

2.2. VOIE ALLANTOÏDE

Utiliser des oeufs de 7 jours pour le virus des oreillons et de 11 jours pour le virus de l'influenza. Il faut procéder de la même façon que pour la voie amniotique, mais en faisant une inoculation peu profonde au travers de la membrane chorio-allantoïde en visant le côté de la coquille afin d'éviter la cavité amniotique. De plus, il n'est pas nécessaire de poursuivre après l'opération 11, section 2.1.

2.3. VOIE VITELLINE

1. Mirer des oeufs embryonnés de 6 jours et s'assurer de leur vitalité.

2. Avec un mire-oeufs, localiser l'extrémité de la membrane vitelline (côté opposé à la chambre à air).
3. Désinfecter la coquille à l'alcool 70%. Avec une aiguille stérilisée, pratiquer une ouverture ponctiforme dans la chambre à air.
4. Inoculer 0.25 à 0.50 mL d'échantillon à l'aide d'une seringue de 1 mL (aiguille 22G-11/2") à l'extrémité opposée à la chambre à air.
5. Obturer les deux extrémités avec du ruban chirurgical.
6. Incuber dans une étuve à la température la plus favorable à la multiplication du virus recherché.
7. Examiner quotidiennement et rejeter les oeufs qui meurent prématurément (en deçà de 24 h).
8. À la fin de l'incubation, prélever le liquide vitellin: insérer une aiguille 18G-11/2", montée sur une seringue de 5 mL, dans la cavité vitelline (ouverture opposée à la chambre à air) et prélever de 2 à 5 mL.
5. Injecter 50 μ L dans le sens de la circulation, avec une seringue à tuberculine en verre (aiguille 26 G-3/8"). Retirer l'aiguille doucement, le biseau vers le haut (cette étape est plus facilement réalisée en utilisant le mire-oeufs).
6. Fermer l'ouverture avec du pansement adhésif stérile.
7. Incuber à la température appropriée.
8. Mirer les oeufs après 24 h et rejeter les embryons morts.
9. Mirer à chaque jour et placer les embryons morts à 4°C pour la nuit. Le lendemain, prélever le liquide ou l'embryon pour analyses subséquentes.

2.4. VOIE INTRA VEINEUSE

1. Mirer des oeufs embryonnés de 11 jours et s'assurer de leur vitalité.
2. Repérer la grosse veine de la membrane chorio-allantoïde et la direction du flux sanguin.
3. Décontaminer la coquille à l'alcool 70%.
4. Découper dans la coquille une ouverture triangulaire au-dessus de la veine.

2.5. MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDE

1. Mirer des oeufs de 11 jours et s'assurer de leur vitalité.
2. À l'aide du mire-oeufs, repérer l'endroit près de la chambre à air où la membrane chorio-allantoïde est la plus développée.
3. À l'aide d'une aiguille stérilisée, percer un trou dans la chambre à air après avoir désinfecté la coquille à l'alcool.
4. Faire un petit trou dans la coquille et la membrane coquillière puis pratiquer une ouverture triangulaire à l'aide d'une pince fine (attention à la membrane chorio-allantoïde).

5. La membrane chorio-allantoïde devrait s'affaisser. Si rien ne se produit, appliquer, à l'aide d'une poire, une succion douce au niveau du trou de la chambre à air.
6. Déposer 50 µL d'échantillon sur la membrane affaissée (ne pas tourner les oeufs après l'inoculation).
7. Obturer les deux ouvertures avec du ruban adhésif stérile.
8. Incuber à la température optimale pour la croissance du virus étudié (37°C pour les virus pox et herpès).
9. Mirer et rejeter les embryons qui meurent en deçà de 24 h.
10. Prélever la membrane chorio-allantoïde après 3 jours:
 - a) placer l'oeuf sur un portoir, le côté d'inoculation vers le haut
 - b) coller un ruban adhésif sur la coquille
 - c) couper la partie supérieure de la coquille à l'aide de ciseaux stérilisés
 - d) détacher la membrane chorio-allantoïde et placer cette substance dans une boîte de Petri contenant de la saline et 5% de formol pour inactiver le virus
 - e) placer la boîte de Petri sur une surface sombre pour faciliter l'observation des foyers d'infection ("pocks").

3. ISOLEMENT SUR CULTURES CELLULAIRES

3.1. CHOIX

Certaines cellules étant sensibles à plusieurs types de virus, on ne peut utiliser

d'utiliser, pour l'isolement des virus, que quelques types cellulaires. Les trois types suggérés sont:

- une culture primaire
- une culture de cellules diploïdes
- une culture de cellules en lignées continues (hétéroploïdes)

Dans nos laboratoires, les cellules utilisées pour représenter chacun de ces types sont respectivement:

- des cultures primaires de cellules de rein de singe cercopithèque (RC) ou de singe rhésus (RRh)
- des cellules IMPH (Institut de Microbiologie-poumon humain) et WI-38 (Wistar-38); toutes deux sont des cellules embryonnaires de poumon humain
- des cellules Hep-2 (carcinome humain de larynx)

3.2. ISOLEMENT

La première étape est l'ensemencement des cultures cellulaires de l'échantillon préparé plus tôt. Les techniques d'identification des virus seront décrites plus loin.

3.2.1. Macrotechnique

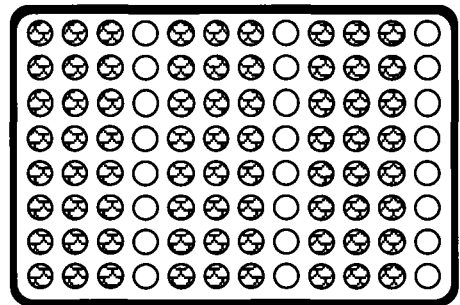
1. Préparer les cultures cellulaires en tubes (1.5 mL/tube).
2. Vidanger le milieu, à la confluence du feuillet cellulaire.
3. Ensemencer 0.3 mL dans trois tubes de chaque type cellulaire utilisé et compléter avec 1.2 mL de milieu de culture (voir les sections précédentes pour la préparation des échantillons).

4. Incuber à 37°C.
5. Observer à tous les deux jours.
6. Réensemencer 0.3 mL sur de nouvelles cultures, à l'apparition d'un effet cytopathique ou après 10 jours.
7. Incuber à 37°C et observer à tous les deux jours.
8. Effectuer l'une des opérations suivantes, à l'apparition de l'effet cytopathique, ou après 10 jours:
 - observer au microscope électronique
 - typer par séroneutralisation (s'il y a un effet cytopathique)
 - effectuer une hémadsorption (si le virus soupçonné est hémadsorbant)
 - effectuer un "challenge" avec le virus écho 11 (si l'on croit qu'il s'agit du virus de la rubéole)
 - faire une coloration hémalun-éosine ou Giemsa si la dégénérescence est typique du virus herpétique (dans ce cas, il est préférable d'utiliser des tubes Leighton).

3.2.2. Microtechnique

1. Ensemencer dans un plateau à 96 cupules, à fond plat des cellules utilisées (0.1 mL/ cupule dans du milieu de croissance): 199-Hank: MEM-Earle (1:1), 10% SFV et 1% de la solution d'antibiotiques (100X). Les cellules seront ensemencées aux concentrations suivantes: rein de singe à 130 000 cellules/mL, lignée hétéropléide (Hep-2) à 50 000 cellules/mL, diploïdes (WI-38) à 150 000 cellules/mL. Distribuer ces cellules comme

l'indique la figure à raison de 0.1 mL/cupule.



C1 C2 C3 C1 C2 C3 C1 C2 C3
 C1 = cellules de rein de singe cercopithèque
 C2 = cellules diploïdes humaines
 C3 = cellules en lignée hétéropléides

2. Incuber les cultures à 37°C dans une étuve à CO₂ (5%) humidifiée.
3. Vidanger le milieu par inversion sur des gazes stérilisées (trois épaisseurs) ou par aspiration, avant d'ensemencer les échantillons ou les passages.
4. Ensemencer 50 µL d'échantillon dans au moins 8 cupules par type cellulaire, dans les rangées 1 à 3 ou 9 à 11.
5. Ajouter 100 µL de milieu de maintien (MEM-Earle, 2% SFV, antibiotiques).
6. Incuber à 37°C dans une étuve à CO₂.
7. Observer à tous les 2 jours jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique bien marqué ou pendant 10 jours.
8. Faire un second passage.
9. Typer, si positif, tel que décrit pour la macrotechnique.

4. IDENTIFICATION DES VIRUS

4.1. HÉMAGGLUTINATION

Plusieurs virus peuvent être mis en évidence, par une réaction d'agglutination d'hématies. Pour chaque virus recherché, il faut sélectionner les conditions appropriées: provenance des hématies, tampon et température de réaction.

4.1.1. Tampons

Saline

NaCl	8.5 g
H ₂ O	à 1 L

Saline phosphatée (PBS) (usage général) (pH 7.2)

NaCl	8.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.1 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.3 g
H ₂ O	à 1.0 L

Saline boratée (pour Togavirus) (pH 9)

Solution mère de saline boratée pH 9 (SB)

Acide borique 0.5 M (30.92 g/L solubilisé dans H ₂ O bouillante)	100 mL
---	--------

NaCl 0.15 M	80 mL
NaOH 1 M	24 mL
H ₂ O	à 1 L

Solution mère d'albumine sérique ovine (ASB)

Albumine sérique bovine (fraction V)	4 g
---	-----

Saline boratée pH 9	90 mL
---------------------------	-------

Ajuster à pH 9 avec du NaOH 2N,
puis compléter à 100 mL avec de l'eau
distillée.

Saline boratée – albumine sérique bovine (SBASB)

Solution mère d'albumine.....	100 mL
-------------------------------	--------

Saline boratée pH 9	900 mL
---------------------------	--------

NOTE: Stériliser ces solutions par filtra-
tion aseptique sur filtre 0.22 µm.

Saline phosphatée (pH variable)

Solutions mères

NaCl 1.5 M	88 g/L
Na ₂ HPO ₄ 2 M	284 g/L
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 2 M	276 g/L

Solutions de travail

Solution 1

1.5 M NaCl	100 mL
2.0 M Na ₂ HPO ₄	100 mL
H ₂ O	à 1 L

Solution 2

1.5 M NaCl	100 mL
2.0 M NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	100 mL
H ₂ O	à 1 L

Mélanger les solutions 1 et 2 selon le ta-
bleau suivant pour obtenir le pH indiqué
lorsque ces solutions sont mélangées avec
un volume égal de saline boratée-albumi-
ne bovine (SBAB):

pH final	mL de 1	mL de 2
5.7	3.0	97.0
6.0	12.5	87.5
6.2	22.0	78.0
6.4	32.0	68.0
6.6	45.0	55.0
6.8	55.0	45.0
7.0	64.0	36.0
7.2	72.0	28.0
7.4	79.0	21.0

Dissoudre séparément le barbital et la gélatine dans 250 mL d'eau chauffée, puis mélanger les autres réactifs.

4.1.2. Préparation des hématies

1. Prélever le sang par vénipuncture, ou ponction cardiaque, dans quatre fois leur volume d'Alsever.
2. Centrifuger à 1000 x g 15 min.
3. Rejeter le surnageant et suspendre le culot d'hématies dans le volume initial du tampon qui servira à l'héماغglutination.
4. Reprendre les étapes 2 et 3 trois fois.

NOTE: Pour toutes les épreuves d'héماغglutination destinées à mettre un virus en évidence, on doit toujours inclure dans l'épreuve les témoins appropriés, par exemple les liquides amniotique, vitellin ou allantotide provenant d'oeufs non inoculés ou encore du surnageant de cultures cellulaires non infectées.

4.1.3. Caractéristiques des héماغglutinines de quelques virus

Virus de la rubéole

Le virus de la rubéole agglutine les hématies de poussin d'un jour (0.25%) dans le tampon DGV à 4°C en 1 h. Un traitement au Tween-80-éther augmente parfois le titre héماغglutinant.

Virus de la rougeole

Le virus de la rougeole agglutine les hématies de singe cercopithèque (1%) dans la saline phosphatée (pH 7.2) à 37°C en 1 h.

Alsever (pH 6.1)

Dextrose, anhydre	2.05 g
Citrate de sodium.....	0.80 g
Acide citrique.....	0.55 g
NaCl.....	0.42 g
H ₂ O	à 1 litre

Dextrose-Gélatine-Véronal (DGV) (pH 7.3)

Barbital (acide barbiturique)	0.58 g
Gélatine	0.60 g
Barbital de sodium	0.38 g
CaCl ₂	0.02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.12 g
NaCl.....	8.50 g
Dextrose	10.0 g
H ₂ O	à 1 L

Virus des oreillons

Le virus des oreillons peut agglutiner les hématies de poule (0.5%) dans de la saline à 4°C en 1 h ou des hématies de cobaye dans les mêmes conditions, mais en 90 min. Le titre hémagglutinant peut parfois être augmenté par un traitement au Tween 80-éther de la préparation.

Réovirus

Les réovirus agglutinent les hématies humaines de type 0 (0.4%) dans de la saline à 20°C en 1 h.

Adénovirus

Les adénovirus ont été classifiés en quatre groupes d'agglutination:

Groupe I : agglutinent les hématies du singe rhésus. Ce sont les types 3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25 et 28.

Groupe II : agglutinent les hématies du rat. Ce sont les types 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 26 et 27.

Groupe III : agglutinent peu les hématies du rat mais dont l'hémagglutination est augmentée en présence d'un sérum immun hétérotypique (contre un autre sérotype). Ce sont les types 1, 2, 4, 5 et 6.

Groupe IV : aucune mise en évidence d'hémagglutinine.

Les deux espèces d'hématies sont diluées à 0.4%, dans le tampon DGV. L'hémagglutination est mise en évidence en 1 h à 37°C. Afin d'éli-

miner une agglutination non spécifique des hématies, on peut ajouter du sérum normal de lapin. On l'utilise dans le tampon à la concentration minimale permettant la formation d'un bouton bien défini des hématies.

Entérovirus

Plusieurs entérovirus peuvent agglutiner les hématies humaines "O" en saline phosphatée à pH 5.8 ou 7.4 à 4°C ou à 37°C. La mise en évidence de ces hémagglutinines n'apporte rien à l'identification des entérovirus et est donc peu utilisée.

Togavirus

L'hémagglutination de ces virus est dépendante du pH, et chaque antigène inconnu doit être évalué dans une gamme de tampon de pH 5.2 à 7.4. On utilise la saline phosphatée décrite plus haut et des hématies de poule ou d'oie (0.4%). Les préparations sont incubées 30 min à 22°C ou 37°C.

Virus influenza

Les virus influenza agglutinent les hématies humaines "O" et celles de cobaye et de poule, toutes à 0.5% en saline phosphatée à 22°C. On laisse sédimenter jusqu'à ce que les hématies témoins déposent.

Virus para-influenza

Les virus para-influenza agglutinent les hématies humaines "O" et celles de cobaye (0.5%) en saline phosphatée (pH 7.2) à 22 ou 37°C en 1 h.

4.1.4. Titrage d'un virus hémagglutinant

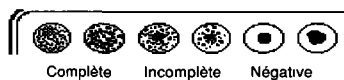
La technique décrite ici est une technique d'application générale qui a pour but de

familiariser le lecteur avec l'utilisation des microtechniques.

1. Dans la première cupule d'un plateau, placer 50 μL de l'antigène viral à titrer.
2. Dans toutes les autres cupules de la rangée, placer 25 μL de tampon.
3. Diluer l'antigène à l'aide de fourchettes à dilution de 25 μL à partir de la première cupule.
4. Ajouter 25 μL d'une suspension d'hématies à la concentration appropriée.
5. Incuber à la température appropriée.
6. Lire les résultats.

Le titre d'un antigène viral est l'équivalent de la dernière dilution de l'antigène qui agglutine complètement ou partiellement les hématies. Cette dilution contient une unité hémagglutinante de cet antigène viral.

Interprétation des résultats:



Agglutination complète

Les hématies sont distribuées en un tapis uniforme au fond de la cupule. Parfois, les fourchettes à dilution vont marquer le fond de la cupule; les hématies auront alors un aspect plus rugueux que l'on ne devra pas confondre avec une agglutination incomplète.

Agglutination incomplète

Les hématies non agglutinées sédimentent en un anneau plus ou moins épais sur un tapis d'hématies agglutinées.

Agglutination négative

Les hématies non agglutinées sédimentent en un "bouton" compact au centre de la cupule.

Afin de confirmer l'isolement d'un virus ou encore d'en déterminer le sérotype, on peut utiliser des antisérums spécifiques qui réagissent avec le virus et l'empêcheront d'agglutiner les hématies: c'est l'épreuve d'**Inhibition de l'hémagglutination**. La description de cette technique est présentée au Chapitre 12.

4.2. HÉMADSORPTION

4.2.1. Mise en évidence

Les virus possédant des hémagglutinines peuvent provoquer l'attachement d'hématies aux cellules qu'ils infectent: c'est l'hémadsorption. La plupart des myxovirus provoquent ce phénomène; nous décrivons la technique telle appliquée à ces virus.

1. Préparer une suspension d'hématies de cobaye à 10% dans du PBS et la conserver à 4°C. Préparer une suspension à 0.5% en mélangeant 1 mL de cette suspension à 19 mL de PBS.
2. Vidanger le surnageant des cultures ensemencées et des cultures témoins (conserver le surnageant des cultures infectées pour la microscopie électronique).
3. Ajouter à chaque tube 0.2 mL de la suspension d'hématies (50 μL en microtechnique).

4. Incuber 30 min à 4°C.
5. Laver les cultures trois fois au PBS à 4°C.
6. Observer l'hémadsorption au microscope et graduer de négative (0) à complète (4) selon la quantité d'hématies adsorbées. Il faut bien observer les cultures témoins car des hématies vieillies ou des infections virales latentes des cellules utilisées peuvent résulter en une hémadsorption non spécifique.
7. Incuber 60 min à 37°C: les virus possédant une neuraminidase vont s'éluer.
8. Noter s'il y a eu élution.
6. Ajouter 0.2 mL ou 0.05 mL de la suspension d'hématies à 0.5%.
7. Incuber 20 min à 4°C.
8. Observer à faible grossissement au microscope. Si l'hémadsorption est bloquée dans les cultures ayant reçu l'antisérum, celui-ci est considéré comme étant spécifique et le virus identifié.

Une variante de cette technique est utilisée de la façon suivante: l'inoculum et l'antisérum (1:1) sont incubés à 37°C pendant une heure et l'on dépose 0.05 mL de cette suspension dans les cupules appropriées. Après incubation pendant 5 à 7 jours à 33°C, rincer les feuillets et procéder comme il a été précédemment décrit en 6, 7 et 8.

4.2.2. Inhibition de l'hémadsorption

L'inhibition de l'hémadsorption permet d'identifier les virus hémadsorbants par blocage de l'hémadsorption à l'aide d'antisérums spécifiques.

1. Infecter les cellules avec le virus hémadsorbant (quatre tubes ou quatre cupules).
2. Incuber pendant 5 à 7 jours à 37°C.
3. Vidanger le milieu et rincer les feuillets au PBS.
4. Préparer une dilution 1/10 d'un antisérum spécifique et placer sur la moitié des cultures: deux tubes ou cupules, 0.2 mL/tube, 0.05 mL/cupule. Sur l'autre partie des cultures, placer 0.2 mL (ou 0.05 mL) de PBS.
5. Incuber 60 min à 37°C.

4.3. EFFETS CYTOPATHIQUES

Lorsqu'ils se développent dans des cellules ou cultures, certains virus provoquent des changements morphologiques typiques. L'effet cytopathique est gradué de négatif à 4+ de la façon suivante:

- 1+ 25% ou moins des cellules sont infectées et l'effet cytopathique se manifeste par foyers seulement.
- 2+ 25 à 50% des cellules montrent un effet cytopathique.
- 3+ 50 à 75% des cellules montrent un effet cytopathique.
- 4+ 75 à 100% des cellules montrent un effet cytopathique.

Entérovirus

Seuls les virus suivants provoquent un effet cytopathique sur les cultures cellulaires: polio 1, 2, 3; coxsackie B1 à B6, coxsackie A7 et A9 Echo 1 à 34. Cet effet cytopathique se manifeste généralement par un arrondissement des cellules suivi du décollement des cellules du feuillet.

Adénovirus

Les adénovirus provoquent un arrondissement des cellules et une augmentation de la réfringence. Les cellules dégénérées marquent une forte tendance à l'agrégation.

Myxovirus

Les virus influenza, oreillons, respiratoire syncytial, rougeole et SV-5 provoquent des effets cytopathiques caractéristiques:

- Influenza et oreillons (pas toutes les souches): seulement 10% des

cellules sont affectées; elles deviennent granuleuses et arrondies.

- Rougeole: formation de cellules géantes (syncytiums) ayant la forme d'un anneau. Certaines cellules s'allongent en fuseau. L'effet cytopathique n'atteint que 50% du feuillet.
- SV-5: semblable à celui de la rougeole, mais les syncytiums n'ont pas l'apparence d'un anneau.
- Respiratoire syncytial: formation de syncytiums (cellules géantes multinucléées).

Herpesvirus

L'infection par ces virus produit des cellules géantes multinucléées.

Virus simiens

Le virus spumeux et le virus SV-40 provoquent une vacuolisation cellulaire caractéristique. Ces virus sont souvent présents dans les cultures de cellules normales de rein de singe.

Propriétés hémagglutinantes des virus humains

Virus	Type d'hématies	%	Température d'incubation	Traitement des sérums
Coxsackie A20, 21, 24 Echo 3, 11, 19, 13	Homme, type O	0.4%	4°C	Kaolin
Coxsackie B 1, 3, 5 Echo 6, 7, 12, 20, 21, 24, 29, 30	Homme, type O	0.4%	37°C	Kaolin
Coxsackie A7	Poulet	0.4%	22°C	Kaolin
Réo	Homme, type O	0.4%	22°C	Kaolin
Influenza (isolement frais) A.B, Para 1, 2, 3, Sendai	Homme, type O ou cobaye (frais)	0.4%	22°C	Receptor Destroying Enzyme (RDE), adsorption
Oreillons Influenza C, (A, B adapté)	Poulet	0.4%	22 et 4°C	RDE, adsorption
PVM	Souris	0.4%	22°C	
Corona	Poulet, rat, souris	0.4%	22°C	Adsorption
Rougeole	Cerco, rhésus	0.4%	37°C	Adsorption
Vaccine	Poulet	0.4%	22°C	Adsorption
Adéno I	Rhésus	0.4%	37°C	Adsorption
Adéno II, III	Rat	0.4%	37°C	Adsorption
Polyome	Cobaye	0.4%	4°C	RDE
Virus K	Mouton	0.4%	4°C	
Virus H	Cobaye	0.4%	22°C	Kaolin, adsorption
Rubéole	Poussin (24 h)	0.25%	4°C	Hep-MnCl ₂ , adsorption
Togavirus Alpha	Poussin (24 h)	0.25%	22-37°C	Kaolin, adsorption
Flavivirus	Poussin (24 h)	0.25%	22-37°C	Kaolin, adsorption

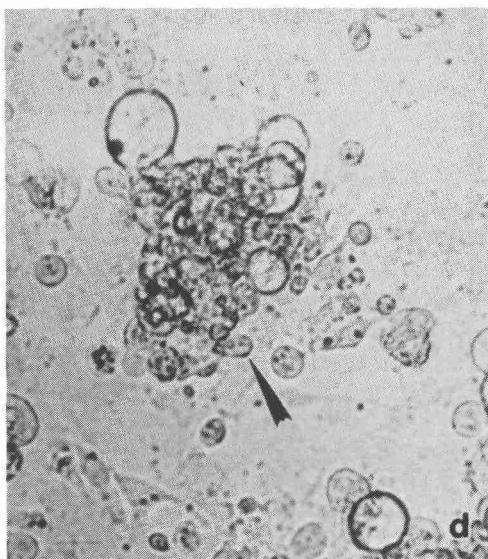
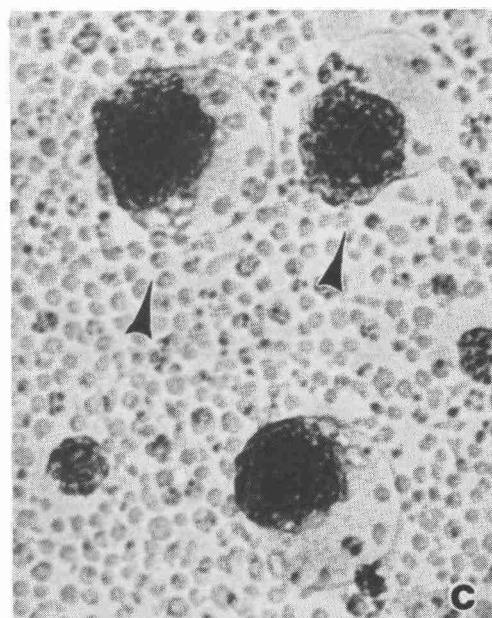
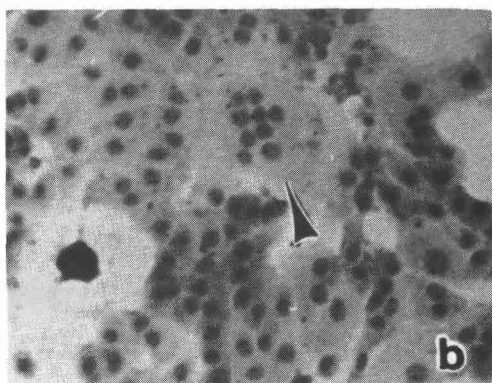
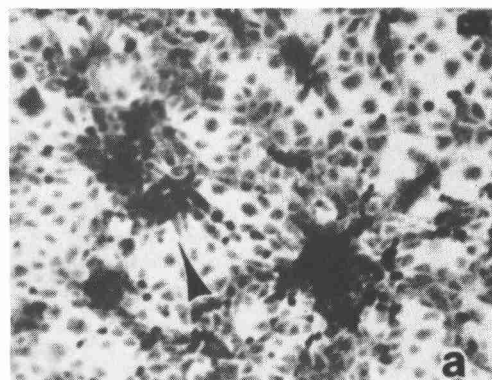


Figure 2

Exemples d'effets cytopathiques causés par quelques virus

Foyers d'infection causés par la multiplication du virus de la rubéole dans les cellules de rein de lapin (RK-13) (a). Syncytiums formés lors de l'infection de cellules Hep-2 par le virus respiratoire syncytial humain (b). Syncytiums formés lors de l'infection de cellules CEM par le virus de l'immunodéficience humaine (c) (photographie: Dr Lise Thibodeau, Institut Armand-Frappier). Foyers d'infection et hypertrophie cellulaire lors de l'infection de fibroblastes de *Lapomis macrochirus* (Bluegill fry) par le virus de lymphocystose (d) (photographie: Joël Heppel, Institut Armand-Frappier)

4.3.1. Titrage de virus par effet cytopathique

Cette technique de titrage peut être appliquée à tous les virus provoquant un effet cytopathique caractéristique. Le titre du virus sera évalué par une formule statistique en fonction du nombre de cupules inoculées. Ce titrage peut être réalisé soit en ensemençant le virus sur un feuillet établi ou encore en mélangeant le virus au moment de la préparation des cellules.

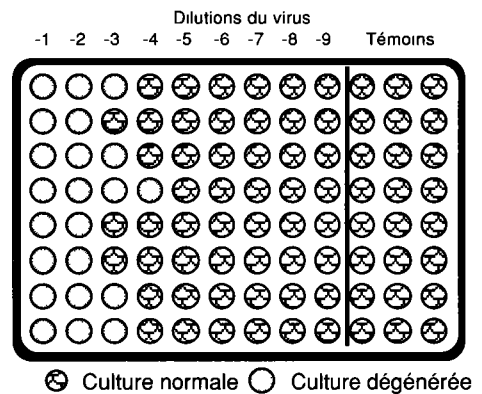
1. Préparer des dilutions décimales du virus à titrer dans du milieu de maintien (changer de pipette à chaque dilution).
2. Vidanger le milieu et ensemencer 25 µL de chaque dilution dans les cupules appropriées (voir exemple) de plateaux à 96 cupules à fond plat (préparées à l'avance pour que le feuillet soit confluent au moment de l'ensemencement).
3. Ensemencer 25 µL de chaque dilution dans quatre cupules (ou plus). Plus on utilise de cupules, plus la précision du titre obtenu sera grande. En général, on utilisera le même nombre de cupules que le facteur de dilution utilisé.
4. Ajouter 0.1 mL de milieu de maintien à toutes les cupules. Conserver quelques cupules comme témoins cellulaires. Il est bon de titrer à chaque fois un virus témoin réparti en volumes de 1-2 mL et de le conserver à -70°C.
5. Incuber à 37°C.
6. Lire à tous les jours et noter les cupules dans lesquelles les cellules sont dégénérées.

7. Lorsque l'effet cytopathique a cessé de progresser (après 3 à 10 jours), évaluer le titre infectieux soit par la méthode de Reed et Muench, soit par la méthode Kärber.

4.3.2. Détermination du titre infectieux

4.3.2.1. Méthode de Reed-Muench

Il faut déterminer les dilutions chevauchant le point 50%, 10⁻³ et 10⁻⁴ dans l'exemple suivant.



La dose infectieuse en culture de tissus est évaluée selon la formule suivante:

$$\text{DICT}_{50} = \text{Dilution supérieure} + \frac{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - 50\%}{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - \% \text{ dil. inf. à } 50\%} \times \log_{10} (\text{dil.})$$

Dans l'exemple précédent, où les dilutions sont décimales

$$\text{DICT}_{50} = 3 + \frac{62.5\% - 50\%}{62.5\% - 12.5\%} \times \log_{10} (10)$$

donc:

$$\text{DICT}_{50} = 3 + \frac{12.5}{1.50} = 3.25 / 0.025 \text{ mL}$$

ou de 10^{4.85} /mL (on doit ajouter 1.6, le log₁₀ de 40).

4.3.2.2. Méthode de Kärber

Cette méthode utilise la formule suivante pour apprécier la dose infectieuse 50%:

$$\text{DICT}_{50} = -\Delta - \delta (S - 0.5)$$

où $\Delta = \log_{10}$ de la dilution montrant 100% de dégénérescence

$$\delta = \log_{10} \text{ du facteur de dilution}$$

$$\log_{10} 10 = 1.0$$

$$\log_{10} 5 = 0.7$$

$$\log_{10} 2 = 0.3$$

$S =$ somme des cupules (ou tubes) dégénérées, incluant celles de la dilution où il y a 100% de dégénérescence. Cette dernière a pour valeur l'unité, et chaque autre dilution une fraction de l'unité.

Dans l'exemple précédent:

$\Delta = -2$, dernière dilution où 100% (8/8) des cultures sont dégénérées

$\delta = 1$ ou $\log_{10} 10$ puisque des dilutions décimales ont été utilisées

$S = 1.750$ car à la dilution

-2: 8/8 donc 1.000

-3: 5/8 donc 0.625

-4: 1/8 donc 0.125

-5: 0/8 donc 0.000

Somme = 1.750

En remplaçant ces valeurs dans l'équation:

$$\text{DICT}_{50} = \Delta - \delta (S - 0.5)$$

$$\text{DICT}_{50} = -2 - (1) (1.75 - 0.5)$$

$$\text{DICT}_{50} = -2 - 1.250$$

$$\text{DICT}_{50} = -3.25$$

$$\text{DICT}_{50} = 10^{-3.25} / 0.025 \text{ mL}$$

Dans tous les cas, si une précision plus élevée ou moins élevée est requise, on pourra utiliser plus ou moins de cupules par dilution (3, 4, 5, 12, etc.) selon les besoins et titrer plusieurs virus par plateau.

4.4. TITRAGE PAR PLAGES

4.4.1. Entérovirus

Certains virus, dont les entérovirus, provoquent des plages de lyse dans le feuillet cellulaire en milieu nutritif gélifié. Ces plages ayant pour origine une seule particule infectieuse, il est possible de titrer un virus avec une grande précision.

1. Préparer des cellules, sensibles au virus étudié, dans des flacons de 25 cm².
2. Vidanger le milieu à la confluence.
3. Préparer des dilutions décimales du virus à titrer dans un milieu de maintien.
4. Ensemencer deux flacons par dilution à raison de 0.4 mL/flacon.
5. Incuber 1 h à 37°C en prenant soin d'agiter délicatement les flacons à toutes les 15 min afin de favoriser l'adsorption du virus.
6. Préparer le milieu à base d'agar, pendant cette incubation:

Solution A

MEM-Earle (10X)	20 mL
Glutamine (200 mM)	2 mL
Sérum de fœtus de veau	4 mL
NaHCO ₃ 7.5%	5 mL
Rouge neutre (1:1 000)	3 mL
Penicilline 10 000 U/mL	
streptomycine 10 000 µg/mL ...	2 mL
H ₂ O	64 mL
Total	100 mL

Stériliser en autoclavant 20 min à 120°C. Placer l'agar chaud dans un bain-marie à 45-47°C pendant 15-20 min. Agiter après quelques minutes pour en assurer l'uniformité.

Solution B

Bacto-Agar	3 g
H ₂ O	100 mL

Solution de travail

Mélanger A et B en volumes égaux et placer au bain-marie à 45-47°C. Il ne faut pas les préparer plus de 15 min à l'avance car les constituants du milieu de culture s'inactivent rapidement à cette température.

- À l'aide d'une seringue semi-automatique, placer 5-7 mL de milieu à base d'agar sur la face opposée au feuillet cellulaire (ceci permet au milieu de se refroidir avant de toucher les cellules; une température de plus de 40°C pouvant tuer les cellules. Prendre garde car le milieu se solidifie entre

37 et 40°C. Inverser le flacon et répartir le milieu sur le feuillet cellulaire.

- Protéger les flacons de la lumière et laisser 30 min à la température de la pièce pour permettre la solidification du milieu.
- Incuber à 37°C en position inversée (le feuillet en haut) à l'abri de la lumière.
- Compter le nombre de plages à 48 et 72 h.
- Le titre du virus en unités formant des plages (ufp) est calculé de la façon suivante à partir des flacons contenant si possible entre 25-70 plages:

$$\text{ufp/mL} = \frac{\text{Plages dans "n" bouteilles}}{n} \times \text{dilution} \times \frac{10}{4}$$

Exemple: si à la dilution 10⁻⁶, il y a respectivement 58 et 51 plages dans les deux flacons (n= 2) où l'on a ensemencé 0.4 mL, le titre sera le suivant:

$$\text{ufp/mL} = \frac{109}{2} \times 10^{-6} \times \frac{10}{4}$$

et

$$\text{ufp/mL} = 136 \times 10^6 \text{ ufp/mL ou } 10^{8.13} \text{ ufp/mL}$$

Le facteur 10/4 ramène le titre infectieux par mL puisque 0.4 mL de virus a été inoculé.

Certains virus ne produiront des plages que sous un milieu semi-solide: on utilisera alors le méthyl cellulose qui est semi-solide à 37°C et semi-liquide à 4°C. Cette substance est utilisée à 1% (p/v) après avoir été autoclavée: elle aura alors l'apparence d'une pâte épaisse qui pourra

être solubilisée en la plaçant à 4°C ou sur la glace pendant quelques heures.

4.4.2. Autres virus

Certains virus provoquent un effet cytopathique, mais malheureusement, celui-ci est lent ou peu marqué. La présence du rouge neutre dans le milieu de culture rend celui-ci toxique pour les cellules pendant de longues incubations. Il est alors préférable de procéder en deux étapes: une première incubation avec agar sans rouge neutre, puis une seconde de 24 à 48 h avec le colorant. Procéder comme il a été décrit pour les entérovirus en omettant le rouge neutre, incubé 7 à 10 jours, puis rajouter 5 mL de milieu avec agar et rouge neutre.

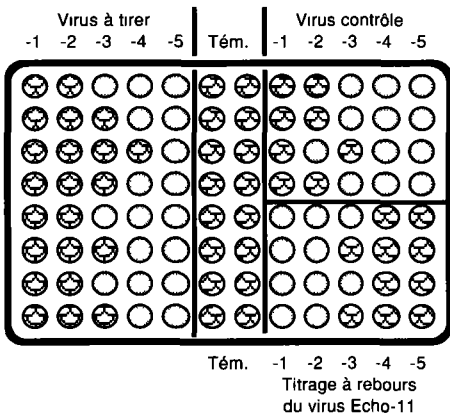
Pour d'autres virus, il est nécessaire de favoriser la production des plages. L'addition de DEAE-DEXTRAN (Pharmacia Fine Chemicals) à 100 µg/mL réussit souvent à favoriser l'apparition des plages de lyse cellulaire dans le cas des virus qui n'en produisent que difficilement.

4.5. TITRAGE PAR INTERFÉRENCE

Le virus de la rubéole peut être titré par effet cytopathique ou par la technique des plages. Cependant, comme toutes les souches ne sont pas cytopathogènes, l'application de ces techniques est difficile. On a cependant démontré que le virus de la rubéole bloquait la réplication des entérovirus dans les cellules qu'il infecte. On a tiré parti de cette observation et mis au point une technique de titrage par interférence sur cellules de rein de singe cercopithèque. Le virus de la rubéole ne cause aucun effet cytopathique sur ces cellules alors que le virus Echo-11 produit au contraire un effet cytopathique rapide.

1. Préparer une suspension de cellules de rein de cercopithèque à 200 000 cellules/mL dans un milieu de croissance.
2. Placer 100 µL de la suspension cellulaire dans chacune des cupules d'un plateau stérile.
3. Ajouter 50 µL de milieu de croissance.
4. Incuber à 37°C dans une étuve humidifiée à CO₂ pendant 24 h ou jusqu'à la formation d'un feuillet confluent.
5. Vidanger le milieu par inversion sur des gazes stériles.
6. Placer 50 µL de virus, dilué préalablement dans un milieu de maintien, dans des tubes, à l'intérieur de quatre cupules pour chaque dilution. Commencer l'ensemencement par la dilution la plus élevée afin de ne pas contaminer les dilutions.
7. Ajouter 50 µL de milieu de maintien.
8. Prévoir un virus témoin, c'est-à-dire le titrage d'un virus connu, conservé en petits volumes à -70°C. Prévoir aussi des cultures témoins.
9. Incuber 7 jours à 37°C.
10. Ajouter 1 000 DICT₅₀ de virus Echo-11 dans 25 µL de milieu de maintien. Ces 1 000 doses supposent un titrage préalable du virus et sa répartition en petits volumes après une dilution convenable (c'est-à-dire après la congélation à un titre permettant une dilution de 1/25 à 1/50 avant usage).
11. Incuber 3 jours à 37°C.

12. Déterminer le nombre de cupules montrant un effet cytopathique et celles qui ont été protégées. Les cupules ne montrant aucun effet cytopathique sont celles qui contiennent le virus de la rubéole: elles ont été "protégées" de l'infection par le virus Echo-11. Pour la détermination du titre du virus de la rubéole par la formule de Kärber, **on retiendra donc le nombre de cultures protégées.**
13. Déterminer le titre viral en appliquant la formule de Kärber aux résultats (voir la section sur la détermination de la $DICT_{50}$).



Résultats

Virus à titrer: $10^{3.25}/0.025$ mL

Virus contrôle: $10^{2.5}/0.025$ mL

Virus Echo-11: $10^{3.0}/0.025$ mL

4.6. ÉPREUVE DE NEUTRALISATION DE L'INFECTIVITÉ

Cette épreuve est spécifique en ce sens qu'elle permet d'identifier un virus si l'on possède des antisérums mono-spécifiques, c'est-à-dire dirigés contre un seul virus. Ainsi, un virus isolé à partir d'un

prélèvement clinique pourra être identifié en utilisant une batterie d'antisérums mono-spécifiques. La neutralisation de l'effet cytopathique par l'un des sérums indiquera l'identité du virus.

1. Déterminer la $DICT_{50}$ du virus en microtechnique.
2. Dans des tubes stérilisés, bien mélanger 0.2 mL de virus à $100 DICT_{50}/25 \mu L$ et 0.2 mL d'antisérums à 20 unités/ $25 \mu L$ (l'unité étant la dernière dilution du sérum qui neutralise $100 DICT_{50}/25 \mu L$ du virus). On utilise généralement plusieurs antisérums (voir figure).
3. Incuber pendant 60 min à la température de la pièce. Prévoir un virus témoin incubé simultanément dans les mêmes conditions.
4. Dans quatre cupules, placer $25 \mu L$ du mélange sérum-virus, puis $50 \mu L$ de milieu de maintien.
5. Pour chaque dilution du virus, ensemer 25 μL de virus dans quatre cupules puis compléter avec $100 \mu L$ de milieu de maintien.
6. Prévoir deux cupules qui contiendront $25 \mu L$ des antisérums à 20 unités et $100 \mu L$ de milieu de maintien de même que des cupules ne contenant que des cellules et du milieu.
7. Lire l'effet cytopathique à tous les 2 jours pendant 8 jours.
8. Vérifier le nombre de doses de virus, les cellules témoins et les témoins sérums.
9. Déterminer quel antisérum a inhibé la multiplication du virus (dans

l'exemple suivant, le virus est un poliovirus de type 3).

Antisérums	Témoins cellulaires						
Polio 1	○	○	○	○	○	○	○
Polio 2	○	○	○	○	○	○	○
Polio 3	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
Coxs. A1	○	○	○	○	○	○	○
Coxs. A2	○	○	○	○	○	○	○
Coxs. B9	○	○	○	○	○	○	○
Echo 11	○	○	○	○	○	○	○
Echo 12	○	○	○	○	○	○	○
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7

Titration à rebours
du virus à typer

4.7. PRÉPARATION DE MÉLANGES D'ANTISÉRUMS

Le coût et le temps nécessaires au typage de chaque nouveau virus par des sérums mono-spécifiques ne permettent pas d'employer la technique régulière. On utilise alors des mélanges de sérums.

1. Obtenir des antisérums mono-spécifiques ayant des titres très élevés (plus de 1000 unités/0.1 mL d'antisérum). Chaque sérum ne doit pas occuper plus de 10% d'un mélange.
2. Titrer individuellement chaque sérum contre 100 $DICT_{50}$ /0.1 mL de virus. Le titre est exprimé en unités d'anticorps/0.1 mL: une unité étant la dernière dilution du sérum qui protège contre 100 $DICT_{50}$ de virus/0.1 mL.
3. Chaque mélange doit contenir 20 unités d'anticorps/0.1 mL. On doit diviser par 20 la dilution contenant une unité. Ex.: si la dilution 1:640

contient 1 unité/ 0.1 mL de sérum. Donc, $640/20 = 32$ et la dilution 1:32 contient 20 unités/ 0.1 mL.

4. Incorporer les sérums individuels dans le mélange.

Ex.: Mélange des sérums anti-polio-virus sérotypes 1, 2 et 3:

Antisérums:

anti-polio 1	1: 5120/0.1 mL
anti-polio 2	1: 20480/0.1 mL
anti-polio 3	1: 10240/0.1 mL

Pour obtenir 20 unités d'anticorps il faut diluer:

Polio 1	$5120 \div 20 = 1: 256$
Polio 2	$20480 \div 20 = 1: 1024$
Polio 3	$10240 \div 20 = 1: 512$

5. Déterminer le volume du mélange.

Diviser le volume requis par la dilution contenant 20 unités d'anticorps.

Ainsi pour 1 litre d'antisérum:

Polio 1:	$1000 \div 256$	3.90 mL
Polio 2:	$1000 \div 1024$	0.98 mL
Polio 3:	$1000 \div 512$	1.95 mL
TOTAL		6.83 mL

Donc, le mélange contiendra, dans 1 litre de milieu de maintien:

3.90 mL d'antisérum Polio 1
0.98 mL d'antisérum Polio 2
1.95 mL d'antisérum Polio 3

6. Répartir en petits volumes et congeler à -20°C .

Évaluation du nombre de doses au cours d'un titrage à rebours d'un virus

Nombre de cupules (tubes) montrant un effet cytopathique à la dilution				
Pur	1:10	1:100	1:1000	Doses
4	4	4	3	2000
4	4	4	2	1000
4	4	4	1	500
4	4	4	0	300
4	4	3	0	200
4	4	2	0	100
4	4	1	0	50
4	3	2	0	50
4	3	1	0	30
4	3	0	0	20
4	2	2	0	30
4	2	1	0	20
4	2	0	0	10
4	1	0	0	5
4	0	0	0	3

Nombres correspondant aux log₂

Log ₂	Nombre	Log ₂	Nombre
1	2	21	2 097 152
2	4	22	4 194 304
3	8	23	8 388 608
4	16	24	16 777 216
5	32	25	33 554 432
6	64	26	67 108 864
7	128	27	134 217 728
8	256	28	268 435 456
9	512	29	536 870 912
10	1 024	30	1 073 741 824
11	2 048	31	2 147 483 648
12	4 096	32	4 294 967 296
13	8 192	33	8 589 934 592
14	16 384	34	17 179 869 184
15	32 768	35	34 359 738 368
16	65 536	36	68 719 476 736
17	131 072	37	137 438 953 472
18	262 144	38	274 877 906 944
19	524 288	39	549 755 813 888
20	1 048 576	40	1 099 511 627 776

Liste des log₂ de 1 à 25 et des nombres correspondants

Log ₂	Nombre	Log ₂	Nombre
1.00	2.0	10.00	1 024
1.25	2.4	10.25	1 218
1.50	2.8	10.50	1 448
1.75	3.4	10.75	1 722
2.00	4.0	11.00	2 048
2.25	4.8	11.25	2 435
2.50	5.7	11.50	2 896
2.75	6.7	11.75	3 444
3.00	8.0	12.00	4 096
3.25	9.5	12.25	4 871
3.50	11	12.50	5 793
3.75	13	12.75	6 889
4.00	16	13.00	8 192
4.25	19	13.25	9 742
4.50	23	13.50	11 585
4.75	27	13.75	13 777
5.00	32	14.00	16 384
5.25	38	14.25	19 484
5.50	45	14.50	23 170
5.75	54	14.75	27 554
6.00	64	15.00	32 768
6.25	76	16.00	65 536
6.50	91	17.00	131 072
6.75	108	18.00	262 144
7.00	128	19.00	524 288
7.25	152	20.00	1 048 576
7.50	181	21.00	2 097 152
7.75	215	22.00	4 194 304
8.00	256	23.00	8 388 608
8.25	304	24.00	16 777 216
8.50	362	25.00	33 554 432
8.75	431		
9.00	512		
9.25	609		
9.50	724		
9.75	861		

Log₁₀ et antilog des nombres de 1 à 10

Nombre	Log ₁₀	Antilog ₁₀	Nombre
1.0	0.000	0.00	1.000
1.5	0.176	0.05	1.122
2.0	0.301	0.10	1.259
2.5	0.398	0.15	1.413
3.0	0.477	0.20	1.585
3.5	0.544	0.25	1.778
4.0	0.602	0.30	1.995
4.5	0.653	0.35	2.239
5.0	0.699	0.40	2.512
5.5	0.740	0.45	2.818
6.0	0.778	0.50	3.162
6.5	0.813	0.55	3.548
7.0	0.845	0.60	3.981
7.5	0.875	0.65	4.467
8.0	0.903	0.70	5.012
8.5	0.929	0.75	5.623
9.0	0.954	0.80	6.310
9.5	0.978	0.85	7.079
10.0	1.000	0.90	7.943
		0.95	8.913
		1.00	10.000

4.8. SENSIBILITÉ À L'ÉTHER

Cette épreuve permet d'identifier les virus enveloppés qui seront inactivés par l'éther. En effet, l'enveloppe virale est dérivée des membranes cellulaires et contient une grande quantité de lipides; ceux-ci, extraits par l'éther, détruisent le potentiel infectieux du virus.

1. Ajouter 1.5 mL d'éther à 0.5 mL de la suspension virale à éprouver.
2. Agiter vigoureusement.
3. Laisser reposer 1-2 h à 20°C en agitant occasionnellement ou 18-25 h à 4°C.

4. Placer le mélange dans un vase de Petri (en verre car le plastique est attaqué par l'éther) et laisser l'éther s'évaporer.
5. Préparer des dilutions décimales de la suspension virale traitée et du même virus non traité.
6. Titrer les deux virus et comparer les titres obtenus (inclure à titre de témoins un virus résistant et un virus sensible à l'éther).

4.9. SENSIBILITÉ AU 5-IUDR

Les virus dont l'acide nucléique est l'ADN sont inhibés par le 5-iodo-désoxyuridine (5-IUDR), alors que les virus à ARN ne le sont généralement pas.

Solution de 5-IUDR

Dissoudre 17.7 mg de 5-IUDR dans 10 mL d'eau distillée, puis compléter à 100 mL avec du milieu de maintien. Diluer 1:10 dans le milieu de culture avant usage.

Méthode

1. Préparer des dilutions décimales du virus à éprouver. Préparer aussi des dilutions de poliovirus (ou un autre virus à ARN) et d'herpèsvirus (ou autre virus à ADN) dans du milieu de maintien.
2. Ensemencer sur cellules en tubes ou en plateau comme pour un titrage.
3. Placer le milieu de maintien contenant de l'IUDR, sur la moitié des cultures; sur l'autre moitié, utiliser du milieu normal.
4. Incuber puis noter les titres avant d'interpréter les résultats:

- le virus de la polio ne doit pas être affecté
- le virus de l'herpès doit être complètement inhibé
- si les contrôles sont adéquats, interpréter l'épreuve avec le virus inconnu.

4.10. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Le microscope électronique s'est révélé un instrument des plus utiles pour le diagnostic rapide de certaines maladies à virus. Le virus peut être visualisé directement à partir de matériel provenant de lésions cutanées ou de sécrétions ou, plus souvent, après un passage sur cultures cellulaires. L'immuno-électro-microscopie (IEM) permet non seulement d'observer les virus en faible quantité, mais aussi de les identifier à l'aide d'antisérums spécifiques. La préparation des échantillons pour la microscopie électronique et l'IEM est décrite dans le chapitre sur la microscopie électronique.

Les échantillons pourront être: selles, sécrétions, lavages de gorge, lésions cutanées, cultures cellulaires (cellules et surnageants), sérums.

4.11. ÉPREUVE DE TEMPÉRATURE

Cette méthode est surtout utilisée pour le virus *Herpes simplex*.

1. Préparer des dilutions décimales du virus (10^{-1} à 10^{-7}) dans du milieu de maintien (MEM-Earle, 2% SFV, antibiotiques).
2. Ensemencer 0.1 mL de chaque dilution dans quatre tubes ou flacons, contenant des cellules de rein de cerco-pithèque en culture primaire ou secondaire.

3. Ajouter 1.5 mL de milieu de maintien.
4. Incuber deux tubes de chaque dilution à 37°C et les deux autres tubes à 40°C.
5. Lire à tous les 2 jours pendant 7-8 jours.

NOTE: Prévoir un virus contrôle pour le type 1 et pour le type 2 à chaque température.

Interprétation

Le virus herpès simplex type 1 provoquera la dégénérescence des cultures à 40°C alors que le type 2 n'aura aucun effet.

4.12. INOCULATION AUX SOURICEAUX NOUVEAU-NÉS

Les souriceaux nouveau-nés sont très sensibles au virus coxsackie A et à certains Togavirus et peuvent donc servir à l'isolement de ceux-ci.

1. Inoculer 0.02 mL par voie intracérébrale (IC) et 0.05 mL par voie intrapéritonéale (IP). Utiliser une aiguille 26-3/8" et une seringue à tuberculine de 1 mL.
2. Deux fois par jour, à tous les jours, surveiller l'apparition de symptômes de maladie, de paralysie ou de mortalité. Faire l'histopathologie des animaux atteints.
3. Prélever les cerveaux ou les muscles des membres des animaux paralysés, morts ou malades pour examen histopathologique.

NOTES:

- S'il est nécessaire de préserver les tissus prélevés pour des études ultérieures, on doit les placer dans une solution de glycérine phosphatée (tampon phosphate 0.2 M pH 7.4 et glycérine en volumes égaux).
- Observer les animaux pendant 14 jours.
- Utiliser quatre souriceaux pour l'inoculation IC et quatre autres souriceaux pour l'inoculation IP.
- Effectuer une visite chaque jour non seulement pour vérifier l'état des animaux inoculés mais aussi la présence de nouveau-nés, car l'inoculation doit se faire dans les 24 h suivant la naissance.
- Ne pas toucher les souriceaux avec les doigts. Utiliser des gants ou des pinces pour éviter le cannibalisme.

Interprétation

La maladie ou la mort des souriceaux peut être causée par un agent infectieux ou par la toxicité de l'inoculum. Si la mort survient dans les 24 h après l'inoculation, diluer l'échantillon 1:10 et reprendre l'inoculation.

5. RÉFÉRENCE

Lenette, E.H., et Schmidt, N.J. 1979. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. American Public Health Association, Washington, DC, 575 pages.

4

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MODÈLES ANIMAUX

Gilles Lussier

1. INTRODUCTION

Les animaux de laboratoire ont énormément contribué à l'acquisition de nos connaissances dans le domaine de la virologie. Il est même permis de penser que la presque totalité des virus des mammifères que nous connaissons aujourd'hui a été inoculée aux animaux de laboratoire, en particulier à la souris. Les animaux demeurent encore importants en recherche biomédicale; leur production et leur utilisation sont maintenant considérées comme une science qui a recours à diverses disciplines afin de fournir à l'expérimentateur un matériel vivant qui lui assure des résultats valables et reproductibles.

Dans ce chapitre, il nous a semblé utile de rappeler l'importante contribution des rongeurs au domaine de la virologie et d'insister sur certains points importants pour assurer leur utilisation rationnelle et profitable.

2. PRINCIPALES ESPÈCES

2.1. SOURIS

L'utilisation de la souris en virologie expérimentale remonte à la fin des années 1920. Dès ce moment, on s'est également intéressé aux infections naturelles de la souris à la suite de l'isolement des virus de l'ectromélie, de la poliomyélite et de la chorio-méningite lymphocytaire. Ces infections naturelles furent alors utilisées comme modèles pour l'étude d'infections similaires chez l'homme et pour l'étude de l'interaction entre l'hôte et le virus. Si la seconde Grande Guerre a quelque peu ralenti les activités de recherche, elle a toutefois mis en lumière la nécessité de développer des moyens efficaces de prévention des infections virales pour les forces armées ce qui stimula à nouveau les recherches en virologie et l'utilisation de la souris comme animal d'expérience.

La première utilisation expérimentale de la souris en virologie semble remonter à 1908 alors que Remlinger nota sa suscep-

tibilité au virus de la rage. Peu de temps après, on se rendit compte que le virus herpès simplex et celui de la vaccine étaient également pathogènes. Cependant le réel point de départ de l'utilisation de la souris remonte à l'observation de Theiler relativement à sa susceptibilité pour le virus de la fièvre jaune. Theiler démontra qu'il était en effet possible de quantifier la présence du virus avec beaucoup de précision en procédant à la dilution du matériel infectieux et à son inoculation par voie intracérébrale. Par la suite, des collègues de Theiler mirent au point une épreuve de protection qui fut abondamment utilisée dans les études séro-épidémiologiques impliquant l'inoculation intra-péritonéale d'un mélange virus-sérum. Les recherches sur la fièvre jaune conduisirent également à l'identification de plusieurs autres virus ce qui encouragea la mise sur pied, à l'échelle mondiale, d'un vaste programme de recherche sur les arbovirus essentiellement basé sur l'utilisation de la souris. **Aujourd'hui encore, en dépit des progrès réalisés dans le domaine de la culture cellulaire, plusieurs arbovirologistes considèrent que la souris demeure essentielle pour l'isolement de nouveaux virus.**

C'est également au cours des recherches sur la classification des arbovirus que les scientifiques de la Fondation Rockefeller découvrirent la présence de virus propres à la souris et qui s'avéraient responsables de perturbations des résultats expérimentaux. Le premier de ces virus à être identifié fut celui de l'encéphalomyélite et dès 1937 Burnet et Freeman mirent en garde les virologistes en les prévenant que *"dans toute recherche de virus nécessitant plus d'un passage chez l'animal, ils devaient toujours garder à l'esprit la possibilité d'isoler un virus latent chez l'animal qui pourrait s'ajouter à celui qu'ils recherchent ou qui pourrait parfois même s'y substituer"*. A cette même époque, Andrews *et al.* (1934) démon-

trèrent que la souris était susceptible au virus de l'influenza lorsqu'il était administré par voie intranasale. Cette observation fut l'amorce de recherches qui se poursuivent encore aujourd'hui visant à mieux comprendre la pathogénie de l'infection et les moyens de défense de l'organisme. En 1948, une découverte fortuite effectuée par Dalldorf et Sickles conduisit à l'identification, grâce à la souris, de dizaines de nouveaux virus. Ces virologistes identifièrent un virus pathogène pour le souriceau nouveau-né présent dans les matières fécales d'enfants de la ville de Coxsackie dans l'état de New York atteints d'une forme atypique de "poliomyélite".

La souris devint également l'animal de choix en immunologie expérimentale lorsqu'en 1951 Medawar *et al.* rapportèrent que le rejet de greffe pouvait être prévenu grâce à l'inoculation préalable de cellules lymphoïdes provenant d'animaux de la même souche que celle d'où originait le greffon. Dix ans plus tard, Miller démontra l'importance du thymus dans la réponse immune à la suite de ses expériences sur la thymectomie. Parallèlement à ces études dans le domaine de l'immunologie, la souris continua à être fortement utile pour l'étude de la pathogénie des infections virales et pour la compréhension des mécanismes de défense des infections virales tant naturelles qu'expérimentales.

2.2. RAT

L'utilisation du rat a suivi une voie quelque peu différente de celle de la souris et remonte en 1906 avec les travaux de Donaldson de l'Institut Wistar de Philadelphie. Partant de l'observation que le rat est omnivore et que son système nerveux se développe comme celui de l'homme mais à un rythme plus rapide, Donaldson conclut que cet animal pour-

rait être avantageusement utilisé dans des études portant sur la nutrition et sur le fonctionnement du système nerveux. Avec la création quelques années plus tard de la première souche consanguine, le rat fut abondamment utilisé en endocrinologie, en physiologie de la reproduction, en cancérologie et en génétique. Cependant son utilisation en microbiologie et plus particulièrement en virologie ne fut toujours que relativement très marginale.

2.3. COBAYE

En dépit de sa grande susceptibilité au bacille de la tuberculose et à de nombreuses rickettsies, le cobaye n'a pas non plus été très utilisé en virologie, si ce n'est pour la production d'anticorps. Plus récemment toutefois deux de ses infections naturelles, l'infection à cytomégalo-virus et la leucémie, ont été avantageusement utilisées en pathologie virale comparée comme modèle pour l'étude des infections humaines (Hsiung *et al.* 1986).

2.4. HAMSTER

Tous les hamsters dorés (*Meriones unguiculatus*) utilisés aujourd'hui en recherche biologique sont les descendants de huit hamsters capturés en Syrie en 1930. Le hamster devint très vite l'animal préféré dans plusieurs types de recherche en raison de sa susceptibilité à plusieurs infections virales expérimentales mais surtout en raison du fait qu'il est relativement exempt d'infections naturelles. Le hamster a été utilisé comme modèle animal dans l'étude de la pathogénie d'un grand nombre d'infections virales; c'est cependant pour la recherche du pouvoir oncogène des virus des mammifères qu'il fut particulièrement utile (Merkow et Slifkin 1973).

3. FACTEURS INFLUENÇANT LE CHOIX ET L'UTILISATION

3.1. FACTEURS RELIÉS À L'HÔTE

Avec l'avènement des cultures cellulaires, l'animal de laboratoire est moins utilisé que par le passé, il demeure cependant toujours un outil de recherche fort utile. Toutefois pour en retirer tous les avantages possibles, l'expérimentateur doit tenir compte de certains facteurs susceptibles de modifier la réponse de l'animal.

Dans cette section, nous nous bornerons à effectuer un survol des facteurs reliés soit à l'hôte, soit au virus susceptibles d'influencer considérablement les résultats de la recherche. Les facteurs reliés à l'hôte ont particulièrement trait au génotype, à l'âge, au sexe, à l'environnement et à la flore microbienne, tandis que les facteurs reliés au virus ont trait à la virulence, à la dose et aux voies d'inoculation.

3.1.1. Génotype

En raison de leur coût moins élevé, les animaux de lignées non consanguines ont été utilisées pendant plusieurs décennies en recherche virologique; ils demeurent encore très utiles dans les laboratoires de diagnostic et de contrôle. Toutefois de nombreuses souches consanguines sont maintenant disponibles; en plus d'être histocompatibles, ces souches ont l'avantage de posséder un patrimoine génétique défini permettant l'obtention de résultats expérimentaux constants et reproductibles. Le choix de la souche utilisée doit donc être effectué en fonction des objectifs poursuivis. Les variations de la susceptibilité et de la résistance aux infections virales naturelles ou expérimentales de diverses souches animales sont impor-

tantes et ont déjà fait l'objet d'une revue de question (Bang 1978).

3.1.2. Age

Les jeunes, particulièrement avant le sevrage, sont généralement plus sensibles que les adultes à l'inoculation d'une même dose de virus. Le développement de la résistance varie suivant la virulence et la dose du virus. Cette résistance est plus manifeste à la suite de l'administration du virus par voie périphérique plutôt que par voie intracérébrale; la première méthode déclenche plus facilement la mise en branle des moyens de défense de l'hôte. Ainsi chez l'adulte, l'administration d'un virus par voie intracérébrale peut être mortelle alors que l'administration du même virus par voie périphérique pourrait être tout à fait asymptomatique. Par contre la compétence immunologique peut diminuer chez les animaux âgés et leur susceptibilité à l'infection peut ainsi augmenter.

Cette résistance reliée à l'âge peut modifier plusieurs paramètres visibles de l'infection tels que la période d'incubation, le pourcentage de survie, la gravité des signes cliniques, la sévérité et l'étendue des lésions et le nombre de voies par lesquelles l'animal peut être infecté. Ainsi chez la femelle en gestation, l'inoculation d'un virus directement dans la cavité utérine peut induire des lésions. Cependant au cours d'une infection naturelle la susceptibilité du fœtus varie suivant la capacité que possède le virus de traverser la barrière placentaire et suivant le stade de la grossesse au moment de l'infection. Les mécanismes impliqués dans la résistance en fonction de l'âge ne sont pas complètement élucidés, on sait cependant que le développement du système immunologique y joue un rôle-clé et que la maturation des cellules du système lym-

pho-réticulaire apparaît essentielle (Sigel 1952, Skamene *et al.* 1980).

3.1.3. Sexe

Plusieurs travaux ont démontré que le sexe de l'animal peut faire varier la réponse à une infection virale. Ainsi, les souris mâles de plusieurs souches consanguines sont plus sensibles que les femelles au développement d'une hyperglycémie consécutive à une infection par le virus de l'encéphalomyocardite (Boucher *et al.* 1975). La castration augmente la résistance des mâles face au même virus. La gestation peut aussi influencer sur la susceptibilité à certaines infections. Pour expliquer ce phénomène, on a émis l'hypothèse que cette susceptibilité accrue serait reliée à une diminution de l'immunité cellulaire (St. Hill *et al.* 1973). Il est donc prudent de tenir compte de ce facteur dans la planification d'une expérimentation.

3.1.4. Statut microbiologique

La présence d'infections non apparentes chez les animaux utilisés peut avoir des conséquences fâcheuses sur les résultats de l'expérimentation animale et être la cause de pertes de temps et d'argent fort considérables (Bhatt *et al.* 1986). Dans les conditions que l'on peut qualifier de normales, l'hôte et le microbe sont généralement dans un état d'équilibre; cependant cet équilibre peut être rompu lorsque l'animal est soumis à l'action de facteurs d'agression où l'on assiste à une diminution de ses moyens de défense. Il suffit souvent de conditions ne présentant aucun caractère exceptionnel pour révéler une infection non apparente et déclencher l'apparition de graves épizooties. Ainsi les variations dans les conditions climatiques tels que le changement de température et d'humidité, le transport, l'adapta-

tion à un nouveau milieu ou à un nouveau régime, une intervention chirurgicale, l'administration de substances immunosuppressives peuvent déclencher la transformation d'une infection latente en une infection déclarée.

Les infections non apparentes peuvent également modifier la réponse immunitaire de l'animal. Ainsi une infection de la souris par le virus de la chorio-méningite lymphocytaire inhibe les réponses humorale et cellulaire (Mims et Wainwright 1968), induit la production d'interféron (Ronco *et al.* 1981) et stimule l'activité des cellules NK et des macrophages (Welsh 1978, Blanden et Mims 1973). De même l'infection par le cytomégalovirus est associée à une suppression dramatique de la réponse immunologique chez la souris et le rat. Par contre, une infection latente par le virus de la déshydrogénase lactique s'accompagne d'une augmentation de la réponse immunologique humorale et d'une suppression transitoire de la réponse immunologique cellulaire. De très nombreux exemples de perturbations de la réponse de l'animal sont rapportés dans la littérature scientifique (Bhatt *et al.* 1986). Les infections latentes sont également importantes à cause des erreurs d'interprétation qu'elles peuvent provoquer. Ainsi les lésions pulmonaires consécutives à une infection par le virus Sendai ont déjà été décrites comme étant des lésions néoplasiques.

L'importance de certaines infections est grande en raison des dangers possibles de transmission à l'homme soit directement, soit par l'intermédiaire des tissus, des sérums ou des vaccins obtenus de ces animaux infectés; c'est notamment le cas de la chorio-méningite lymphocytaire et de l'infection par le virus Hantaan (Bowen *et al.* 1975, Lussier et Descôteaux 1986).

L'entretien et la manipulation des animaux en cours d'expérimentation ne doivent pas non plus contribuer à la diffusion des infections mais doivent plutôt viser à en restreindre la propagation. Pour ce faire, la stérilisation de la nourriture, de l'eau et de la litière est souvent recommandable. D'autre part, l'utilisation d'animaux dont la flore microbienne est connue (i.e. animaux exempts de pathogènes spécifiques ou d'animaux gnotobiotiques) réduit l'importance des infections intercurrentes. Il n'est pas non plus recommandé de loger les animaux d'espèces différentes dans les mêmes locaux, pas plus que d'y loger des animaux de même espèce mais provenant d'élevages différents. Les humains peuvent également être la source de certaines infections; l'utilisation de masques, de gants, de vêtements à usage unique, de même que la désinfection de la peau contribuent à réduire ce risque. La restriction de la circulation dans l'animalerie réduit également les risques de transmission des infections, tout comme le fait l'utilisation de filtres sur les cages. L'équipement nécessaire au lavage et à la stérilisation des cages et à l'incinération du matériel contaminé et des animaux morts devrait être disponible à proximité des locaux où sont gardés les animaux (Wedum 1974, Pike 1976).

L'état sanitaire des animaux gardés en colonie devrait être déterminé à intervalles réguliers au moyen d'épreuves sérologiques appropriées (Smith 1984). Les animaux obtenus de l'extérieur et dont on ne connaît pas l'état sanitaire devraient être gardés en quarantaine et leur état évalué avant leur utilisation ou leur intégration dans des pièces où sont déjà logés d'autres animaux. L'ajout de quelques animaux de plus que le nombre nécessaire à l'expérimentation permet de

procéder à des examens réguliers pour déceler l'apparition d'infections latentes. À cette fin, on peut également utiliser des animaux gnotobiotiques ou exempts d'organismes pathogènes spécifiques placés dans des endroits stratégiques de l'animalerie. En plus des examens sérologiques réguliers, la présence d'infections devrait également être recherchée par un examen macroscopique et microscopique des tissus prélevés lors de la nécropsie.

3.1.5. Environnement physique

L'environnement peut également influencer les résultats expérimentaux; cette influence est cependant difficile à évaluer de façon précise. Par exemple, la contamination de la nourriture peut faire varier la susceptibilité de l'animal aux infections virales. Les cycles de lumière et d'obscurité, le bruit, la qualité de l'air, la présence d'odeurs, d'insecticides, de désinfectants volatiles et d'ammoniaque, les changements de cages sont aussi des facteurs importants de variation (Pakes *et al.* 1984). Dans la mesure du possible ces facteurs doivent être standardisés (Friedman *et al.* 1967, Lussier 1986). Il a été démontré, par exemple, que les variations de la température ambiante peuvent augmenter ou diminuer la résistance de l'animal. Ainsi, les souris infectées par le virus de la rage et gardées dans des locaux où la température est élevée au cours d'une infection sont plus résistantes que les souris gardées à la température normale.

3.2. FACTEURS RELIÉS À L'AGENT

Les facteurs reliés à l'agent et influençant la réponse de l'animal à une infection virale peuvent dépendre de la virulence, de la dose et de la voie d'inoculation des virus.

3.2.1. Virulence

La virulence d'un virus chez un animal inoculé expérimentalement peut s'exprimer de manières diverses. Généralement la façon la plus facile de le faire est par l'observation de lésions et de signes cliniques. La virulence est alors évaluée par l'inoculation de groupes d'animaux avec des dilutions sériées du virus et par la mesure de la réponse déterminée soit par l'apparition de signes cliniques ou de lésions, soit par la recherche de virus ou par l'utilisation d'épreuves sérologiques. La virulence peut également être déterminée par l'observation de lésions macroscopiques ou microscopiques dans un tissu ou un organe donné. La virulence peut enfin dépendre de modifications apportées au virus; ainsi elle peut être diminuée par une inactivation chimique ou par la sélection de mutants non virulents.

La virulence peut aussi être reliée à la souche du virus utilisée; elle doit être évaluée en tenant compte des facteurs reliés à l'hôte ainsi que des facteurs susceptibles de la modifier tels que la dose, la voie d'inoculation et le nombre de passages chez l'animal. Le pouvoir pathogène d'un virus pour un hôte donné est généralement proportionnel à la concentration de virus inoculé. Un virus est généralement plus virulent lorsqu'il est administré par voie intracérébrale, comparativement à une inoculation par voie parentérale.

La virulence d'un virus peut être altérée de diverses façons. Ainsi, le passage d'un virus en culture cellulaire peut diminuer sa virulence. Le tropisme pour certains organes peut également être modifié par passages sériés. Ainsi, le virus grippal peut acquérir une affinité pour le foie et produire des lésions hépatiques à la suite de passages répétés chez la souris. Le tro-

pisme d'un virus pour un organe donné, tout comme l'intensité et la distribution des lésions produites, peuvent donc varier en fonction du nombre de passages effectués.

3.2.2. Dose

La pathogénie d'une infection expérimentale est souvent reliée à la dose de virus administrée. Une forte dose non seulement provoque-t-elle une plus forte morbidité et une plus grande mortalité mais elle diminue également le temps de survie et provoque plus rapidement l'apparition de lésions qui sont généralement plus graves que chez les animaux ne recevant qu'une plus faible dose.

3.2.3. Voie d'inoculation

L'importance de la voie d'inoculation dans la production d'une infection virale expérimentale a été constatée depuis très longtemps. Par exemple, une inoculation par voie intracérébrale provoque un traumatisme sévère alors qu'une inoculation par les autres voies est sujette à l'influence des facteurs pouvant faire varier la résistance ou la susceptibilité de l'hôte.

3.2.3.1. Voie intracérébrale

Le fait que certains virus soient faiblement pathogènes après une inoculation par les voies périphériques mais qu'ils se montrent très virulents lorsqu'administrés par voie intracérébrale démontre la sensibilité de cette voie. L'inoculation d'un virus directement dans le cerveau évite les mécanismes de défense naturelle de l'organisme, y compris la barrière sang-cerveau et élimine la nécessité d'une réplication virale en dehors du système nerveux central avant l'envahissement de celui-ci. On sait que la pression lors d'une inoculation par voie intracérébrale est d'à peu près trente fois plus forte que celle

exercée par le liquide céphalo-rachidien. La rupture de l'arachnoïde par suite de cette augmentation de la pression, le dépôt du virus le long du trajet de l'aiguille et la rupture des vaisseaux capillaires sont autant de facteurs qui contribuent à la dissémination du virus. Comme l'inoculation intracérébrale provoque d'importantes lésions traumatiques, elle peut entraîner des mortalités soudaines. D'autre part, il est plus facile d'inoculer de jeunes animaux que des adultes par voie intracérébrale puisque la boîte crânienne n'est alors pas encore complètement calcifiée. Les adultes devraient donc préférablement être inoculés par d'autres voies. La voie cérébrale n'est pas non plus normalement empruntée par les virus au cours des infections naturelles; son utilisation pour déterminer la pathogénie d'une infection virale rend alors l'interprétation beaucoup plus difficile. L'inoculation par la voie intracérébrale peut également provoquer des séquelles graves comme par exemple le blocage de l'aqueduc de Sylvius et le développement subséquent d'une hydrocéphalie.

3.2.3.2. Voies périphériques

3.2.3.2.1. Voie respiratoire

L'administration par la voie respiratoire ressemble à celle que prennent plusieurs virus au cours d'infections naturelles. L'inoculum peut être placé soit à l'embouchure des narines d'où il est inhalé ou soit administré par aérosols. La première méthode favorise le dépôt du virus au niveau des voies respiratoires supérieures bien que l'infection puisse également se rendre jusqu'aux poumons. C'est une méthode d'administration rapide et économique par laquelle il est malheureusement difficile de quantifier exactement la dose administrée. Une anesthésie préalable facilite la pénétration

de l'inoculum dans les cavités nasales. Il est cependant bon de se rappeler que certains gaz anesthésiques comme l'éther peuvent inactiver des virus sensibles aux solvants lipidiques. L'administration par aérosols est généralement effectuée dans des chambres spécialement conçues à cet effet; elle a le désavantage d'être dispendieuse mais a l'avantage de pouvoir mieux contrôler la dose et l'uniformité du matériel infectieux administré.

Le devenir de l'inoculum administré par la voie respiratoire dépend du tropisme de l'agent. Une virémie peut survenir après la réplication du virus au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures. Les virus neurotropes peuvent gagner le cerveau après avoir envahi la muqueuse olfactive en suivant le trajet des fibres nerveuses innervant la muqueuse nasale. L'infection peut être transmise aux autres animaux par les aérosols et par les particules contaminées en suspension dans l'air. Tous les facteurs externes et les conditions environnementales pouvant faciliter ou minimiser ces effets doivent donc être considérés lors de la planification d'une expérience.

3.2.3.2.2. Voie orale

C'est la voie de choix pour l'administration des virus entériques; cette voie est également utilisée pour l'administration de plusieurs autres virus. Les virus peuvent être incorporés à la nourriture, introduits dans la bouche ou administrés directement dans l'estomac au moyen d'une sonde. Le fait de retirer l'eau et la litière avant et après l'administration offre la possibilité d'obtenir des conditions plus reproductibles. À la suite d'une administration par la voie orale, le virus peut également parvenir au niveau de l'appareil respiratoire à cause des communications anatomiques entre le rhinopharynx et l'oropharynx. Le degré de

maturation des cellules de la muqueuse intestinale et des cellules lymphoïdes de l'intestin influencent le devenir de l'agent administré. Par exemple, la muqueuse intestinale des souriceaux nouveau-nés ne protège pas efficacement contre un envahissement viral.

3.2.3.2.3. Voie intraveineuse

L'administration par voie intraveineuse assure presque instantanément une grande diffusion du matériel inoculé. La localisation du virus administré par cette voie dépend de son tropisme; cependant le système réticulo-endothélial joue un rôle important de défense en raison de sa capacité à débarrasser le sang des substances étrangères. Les virus possédant la capacité de s'adsorber ou de se répliquer dans les cellules réticulo-endothéliales ou hématopoïétiques peuvent cependant éviter cette ligne de défense.

3.2.3.2.4. Voie intrapéritonéale

C'est une voie facile d'accès chez les rongeurs permettant une inoculation rapide et bien quantifiable. Les virus introduits dans la cavité péritonéale peuvent se répliquer au niveau des cellules mésothéliales mais ils sont rapidement absorbés dans la circulation. L'utilisation de la voie intrapéritonéale pour l'étude de la transmission d'une infection virale chez la femelle en gestation doit cependant être faite avec précautions puisque les virus peuvent accidentellement être introduits au niveau du système génito-urinaire.

3.2.3.2.5. Voies sous-cutanée et intradermique

L'inoculation dans ou sous la peau s'apparente à une transmission naturelle par morsure ou par piqure. Bien que le virus puisse être acheminé au niveau des gan-

glions mésentériques régionaux par la voie lymphatique, il est aussi fréquemment acheminé par les capillaires vers la circulation sanguine. L'inoculation intra-dermique ou dans le coussinet plantaire est utile pour l'étude de la pathogénie d'un agent qui envahit l'organisme par le système nerveux périphérique comme, par exemple, l'herpesvirus ou le virus rabique.

3.2.3.2.6. Voie intra-utérine

L'inoculation par la voie intra-vaginale a été utilisée pour le développement de modèles pour l'étude des infections génitales humaines à herpèsvirus type 2. Le virus est introduit au moyen d'un écouvillon et les souris mâles placées au contact des femelles infectées peuvent développer des lésions herpétiques au niveau du pénis. Chez la femelle en gestation, les résultats d'une infection effectuée à travers la paroi utérine varient cependant en fonction du stade de gestation. L'inoculation par voie intra-utérine ne constitue cependant pas un bon modèle pour l'étude de la transmission verticale des infections virales.

4. SIGNES VISIBLES

Au moins quatre moyens peuvent être utilisés pour reconnaître la présence d'une infection virale naturelle ou expérimentale; ce sont les signes cliniques, les lésions, la réponse immune et l'isolement de l'agent. Les méthodes utilisées pour leur mise en évidence peuvent varier suivant les objectifs de l'expérimentation et les possibilités de l'expérimentateur.

4.1. SYMPTÔMES CLINIQUES

L'observation des signes cliniques est un indicateur très grossier de la présence d'une infection virale. Les symptômes ne sont généralement pas très spécifiques puisque l'animal ne réagit que d'une façon très limitée; d'où la nécessité de procéder parfois à des prélèvements de tissus ou de sérum pour y effectuer des analyses plus approfondies. L'intensité des symptômes associés à une infection virale varie: certains peuvent être facilement décelés, telle la mortalité, d'autres, au contraire, peuvent être très subtiles et passer inaperçus. Chez les rongeurs, l'animal malade apparaît dans un état léthargique, ramassé en boule, le dos voûté, le poil hérissé et l'abdomen rétracté. Les animaux atteints de lésions nerveuses ont une perte de réflexes et adoptent une posture et/ou une démarche anormales. Une affection de l'appareil digestif se traduit par de l'anorexie, de la déshydratation et de la diarrhée. Les infections de l'appareil respiratoire sont généralement accompagnées de dyspnée et parfois de jetage nasal. Les infections des voies génitales se traduisent par une baisse de la fécondité, la résorption des fœtus, une diminution du nombre de petits par portée et parfois par des anomalies congénitales.

La virulence du virus ou la susceptibilité de l'hôte sont fréquemment exprimées en terme de mortalité. Une dose LD_{50} indique que 50% des animaux inoculés sont morts par suite d'une inoculation par une voie donnée, à un âge précisé et dans un laps de temps déterminé. Le temps de survie moyen, et comme corollaire le temps moyen de mortalité, précisent le cours de l'infection et peuvent être calculés de la façon suivante:

Calcul du temps moyen de mortalité (TMM)

$$\sum \frac{\text{Jour où les mortalités sont survenues} \times \text{Nombre de mortalités au cours de cette journée}}{\text{Nombre total de mortalités}}$$

Calcul du temps moyen de survie (TMS)

$$\sum \frac{\text{Nombre de journées de survie} \times \text{Nombre d'animaux qui n'ont pas survécu au-delà de cette journée}}{\text{Nombre total d'animaux inoculés}}$$

4.2. LÉSIONS

Les lésions peuvent être observées macroscopiquement ou à l'examen histologique. Dans ce dernier cas, les examens sont effectués sur des tissus fixés et préparés à cette fin. Pour assurer une meilleure préservation des détails morphologiques lors de la recherche d'inclusions virales caractéristiques d'une infection par certains groupes de virus, il est préférable d'utiliser le fixateur de Bouin. Les lésions virales se traduisent généralement par une réaction inflammatoire à cellules mononucléées et/ou une nécrose tissulaire. Les méthodes immunocytochimiques comme la fluorescence et l'immunoperoxydase sont fréquemment utilisées pour la mise en évidence de l'antigène. Pour l'immunofluorescence, il est préférable de procéder à la congélation des tissus dans l'azote liquide. L'immunoperoxydase peut être pratiquée sur les tissus fixés dans le formol.

4.3. ÉPREUVES SÉROLOGIQUES

La présence d'une infection virale dans une colonie d'animaux peut généralement être reconnue par la détection d'anticorps spécifiques. A cette fin, les méthodes classiques d'inhibition de

l'hémagglutination, de la fixation du complément, de la neutralisation, de l'immunofluorescence et la technique ELISA peuvent être utilisées. Les réponses immunes primaires commencent généralement au cours de la première semaine suivant l'infection et atteignent leur maximum vers la troisième semaine. Pour les épreuves sérologiques, le sang entier sans addition d'agents de conservation est prélevé aseptiquement. Les précautions doivent être prises afin d'éviter l'hémolyse qui peut survenir par le passage forcé du sang dans une aiguille de petit calibre ou par son entreposage prolongé avant la séparation du sérum. Les sérums doivent être conservés à -20°C si les épreuves sérologiques ne peuvent être effectuées dans un court délai après le prélèvement.

4.4. ISOLEMENT VIRAL

L'isolement des virus a de meilleures chances d'être réussi lorsqu'il est pratiqué à partir de matériel frais prélevé aseptiquement ou à partir de tissus conservés à -60°C . On devrait éviter l'exposition des tissus aux produits chimiques tels les solvants organiques (les anesthésiques) qui peuvent inactiver les virus sensibles. Les tissus prélevés sont dilués dans un milieu approprié et inoculés sur cultures cellulaires qui démontrent généralement des changements caractéristiques en présence de virus. Cependant en raison des coûts élevés, l'isolement est plus rarement utilisé que la sérologie pour le diagnostic des infections chez les animaux de laboratoire.

5. RÉFÉRENCES

Andrewes, C.H., Laidlaw, P.P., et Smith, W. 1934. The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. *Lancet* 2: 859-862.

- Bang, F.B. 1978. Genetics of resistance of animals to viruses. I. Introduction and studies in mice. *Adv. Virus Res.* 23: 269-348.
- Bhatt, P.N., Jacoby, R.O. Morse, H.C.III et New, A.E. (Éd.). 1986. *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research.* Academic Press, Inc. New York.
- Blanden, R.V. et Mims, C.A. 1973. Macrophage activation in mice infected with ectromelia or lymphocytic choriomeningitis virus. *Aust. J. Exp. Med. Sci.* 51: 393-398.
- Boucher, D.W., Hayashi, K., Rosenthal, J. et Notkins, A.L. 1975. Virus-induced diabetes mellitus. III. Influence of the sex and strain of the host. *J. Infect. Dis.* 131: 462-466.
- Bowen, G.S., Calisher, C.H., Winkler, W.G., Kraus, A.L., Fowler, E.H., Garman, R.H., Fraser, D.W. et Hinman, A.R. 1975. Laboratory studies of a lymphocytic choriomeningitis virus outbreak in man and laboratory animals. *Amer. J. Epidemiol.* 102: 233-240.
- Burnet, F.M. et Freeman, M. 1937. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Med. J. Aust.* 2: 218-299.
- Dalldorf, G. et Sickles, G.M. 1948. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science* 108: 61-62.
- Friedman, J.-C., Mahouy, G. et Sabourdy, M. 1967. Réflexions sur l'organisation de l'élevage des animaux de laboratoire et de l'expérimentation animale. *Rec. Méd. Vet.* 143: 879-887.
- Greenwood, M., Hill, A.B. Topley, W. W. C. et Wilson, J. 1936. Experimental epidemiology. *Med. Res. Counc. St. Brit. Spec. Rep. Ser.* No. 209.
- Guillon, J.-C. 1986. Virus murins: Implications en élevage et en expérimentation. *Sci. Tech. Anim. Lab.* 11: 187-194.
- Hsiung, G.-D., Griffith, B.P. et Bia, F.J. 1986. Herpesviruses and retroviruses of guinea pigs. In *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research.* P.N. Bhatt, R.O. Jacoby, A.C. Morse III et A.E. New (Edit.) Academic Press, New York, pages 451-504.
- Lussier, G. 1986. La gestion sanitaire des élevages de rongeurs utilisés en recherche biomédicale. *Rev. Vét. Can.* 27: 59-69.
- Lussier, G. et Descôteaux, J.-P. 1986. La fièvre hémorragique avec syndrome rénal. Une zoonose à surveiller. *Union Méd. Can.* 115: 303-304.
- Merkow, L.P. et Slifkin, M. 1973. Oncogenic adenoviruses. *Prog. Exp. Tumor Res.* 18: 1-293.
- Mims, C.A. et Wainwright, S. 1968. The immunodepressive action of lymphocytic choriomeningitis virus in mice. *J. Immunol.* 101: 717-724.
- Morse, H.C. 1981. The laboratory mouse - a historical perspective. *The Mouse in Biomedical Research.* Foster, H.L. Small, J.D. et Fox, J.G (Edit.). Volume 1 Academic Press, New York, pages 1-16.
- Pakes, S.P., Lu, Y.-S. et Meunier, P.C. 1984. Factors that complicate animal research. *Laboratory Animal Medicine.* J.G. Fox, B.J. Cohen et F.M. Loew édit. Academic Press, Inc. New York, pages 649-665.

- Remlinger, P. 1908. Transmission de la rage à la souris par ingestion. C. R. Soc. Biol., Paris 65: 385-386.
- Ronco, P., Rivière, Y., Thoua, Y., Bandu, M.T., Guillon, J.C., Verroust, P. et Morel-Maroger, L. 1981. Lymphocytic choriomeningitis in the nude mice. An immunological study. *Immunology* 43: 763-770.
- Sawer, W.A. et Lloyd, W. 1930. The use of mice in tests of immunity against yellow fever. *J. Exp. Med.* 54: 533-555.
- Sigel, M.M. 1952. Influence of age on susceptibility to virus infection with particular reference to laboratory animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 6: 247-280.
- Skamene, E., Kongshavn, P.A.L. and Landy, M. (Edit.) 1980. *Genetic Control of Natural Resistance to Infection and Malignancy*. Academic Press, New York.
- Smith, A.L. 1986. Serological tests for detection of antibody to rodent viruses. *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research*. P.N. Bhatt, R.O. Jacoby, A.C. Morse III et A.E. New (Edit.), Academic Press, New York, pages 731-776.
- St. Hill, C.A., Finn, R. et Denye, E. 1973. Depression of cellular immunity in pregnancy due to a serum factor. *Br. Med. J.* iii: 513-514.
- Theiler, M. 1930. Studies on the action of yellow fever virus in mice. *Ann. Trop. Med.* 24: 249-272.
- Theiler, M. 1934. Spontaneous encephalomyelitis of mice: a new virus disease. *Science* 80: 122.
- Welsh, R.M. 1978. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. *J. Exp. Med.* 148: 163-181.
- Whitman, L. 1943. Modified intraperitoneal protection test for yellow fever based on greater susceptibility of immature white mice to extraneural injection of yellow fever virus. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 23: 17-36.

5

TECHNIQUE D'INJECTION DES ANIMAUX

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

Divers aspects de la virologie moderne font appel à des animaux de laboratoire, soit comme modèles d'interactions entre un virus et un organisme vivant, soit comme outil de préparation de diverses substances biologiques. Le but du présent chapitre est de fournir des précisions détaillées sur quelques techniques d'inoculation de solutions aux animaux de laboratoire, permettant ainsi au lecteur de faire par lui-même l'apprentissage de ces techniques. La souris, étant donnée son utilisation fréquente, est utilisée pour fins d'illustration.

2. MATÉRIEL

2.1. SERINGUES

On utilise généralement des seringues jetables en plastique. Celles-ci sont disponibles commercialement en emballages individuels stériles. Un format de 1 mL, de type "tuberculine" est couramment

utilisé pour l'injection des souris. D'autres formats: 3, 5, 10 et 20 mL sont aussi disponibles avec un embout breveté de type "Luer Lok" permettant d'y visser les aiguilles appropriées. Les seringues de tels formats sont surtout utilisées pour les injections intrapéritonéales.

2.2. AIGUILLES

Les aiguilles utilisées pour injection consistent en un baril biseauté fait d'acier inoxydable et fixé à un adaptateur de plastique dont la couleur est caractéristique du format de l'aiguille. Elles sont présentées dans un protecteur de plastique, en emballages individuels et stériles. L'identification du format de l'aiguille consiste en un nombre entre 18 et 27 précédant la lettre G (diamètre du baril) et suivi d'un second nombre indiquant la longueur du baril (entre 9.5 et 38 mm ou 3/8 et 1 1/2 pouce). Il est à noter que plus le nombre indiquant le diamètre du baril est élevé, plus ce diamètre est petit.

3. MÉTHODES

Avant l'injection, le matériel à injecter est préalablement inséré dans la seringue; une aiguille est fixée à celle-ci et toutes les bulles d'air sont forcées à l'extérieur en tenant la seringue pointée vers le haut tout en tapant le baril de plastique avec le doigt, suivi d'un mouvement du piston vers le haut. On répète le procédé jusqu'à ce que toutes les bulles d'air soient éliminées (effectuer cette opération sous une hotte laminaire si le matériel à inoculer est pathogène).

3.1. INJECTION INTRAPÉRITONÉALE

D'une main, prendre la souris par la queue entre le pouce et l'index d'une main et la laisser s'agripper au grillage du couvercle de la cage. Avec l'autre main, prendre entre le pouce et l'index la peau du cou de l'animal après avoir placé son corps en légère tension en tirant sur la queue. Maintenir cette tension en plaçant la queue entre l'annulaire et l'auriculaire de la même main qui tient la peau du cou, de façon à ce que l'animal repose dans la paume de cette main. Placer finalement le majeur sous la souris de façon à ce que l'abdomen soit légèrement en saillie. Injecter à un angle d'environ 45°, l'aiguille étant dirigée vers le haut et insérée dans la portion inférieure de l'abdomen, soit à gauche ou à droite de la ligne médiane (Figure 1). L'aiguille ne devrait pas pénétrer plus de 5 mm environ. Les formats d'aiguilles recommandés sont les suivants: 25Gx16 mm (5/8 pouce) pour l'injection de solutions aqueuses et 23Gx25 mm (1 pouce) pour l'injection d'émulsions (par exemple des immunogènes dans l'adjuvant de Freund). Il est recommandé de ne pas injecter plus de 0.5 mL.

3.2. INJECTION INTRA VEINEUSE

Faire gonfler la veine de la queue de la souris, soit par immersion dans l'eau relativement chaude, soit par exposition aux rayons d'une lampe chauffante. Placer la souris dans un dispositif qui la maintiendra immobile tout en donnant accès à sa queue. Un tel dispositif peut être facilement fabriqué en fixant sur une planche de bois, de façon perpendiculaire, une seconde planche dans laquelle une encoche en forme de "V" a été coupée (Figure 2).

L'animal est placé d'un côté, sa queue projetant de l'autre côté. Il suffit alors de tirer légèrement sur la queue pour maintenir l'animal immobile. Certains dispositifs sont aussi disponibles commercialement.

En tenant l'aiguille (format suggéré: 26Gx13 mm, ou 1/2 pouce) avec son biseau vers le bas, insérer dans la veine de la queue, le plus près possible de son extrémité. Commencer à injecter: si l'aiguille est bien dans la veine, le liquide injecté déplacera la circulation sanguine; sinon, il y aura boursoufflement étant donnée l'injection dans les tissus. Dans ce dernier cas, répéter l'injection un peu plus loin du bout de la queue. Il est à noter que la pointe de l'aiguille est utilisée pour soulever le tissu recouvrant la queue et donner ainsi accès à la veine. Il est très important de maintenir l'aiguille la plus parallèle possible à la veine, de manière à ne pas passer au travers de celle-ci. Ne pas injecter plus de 0.2 mL. Une fois l'injection terminée et l'aiguille retirée, appliquer une légère pression sur le site d'injection pendant quelques instants pour prévenir une hémorragie.

3.3. INJECTION INTRACÉRÉBRALE

Utiliser une seringue de 1 mL avec une aiguille de format 26 ou 27G (longueur 9.5 ou 13 mm, soit 3/8 ou 1/2 pouce). Anesthésier la souris en la plaçant quelques instants dans un bocal de verre fermé dans le fond duquel on a placé de la ouate imbibée d'éther a été placée. Déposer l'animal endormi sur la table de travail, à plat sur son abdomen. Faire pénétrer l'aiguille au travers de la boîte crânienne en lui imprimant un mouvement de rotation. Le site d'injection se situe dans un des deux hémisphères cérébraux, quelques millimètres derrière

les yeux (Figure 3). Une fois la boîte crânienne transpercée, l'aiguille ne doit pas pénétrer plus de 4 mm (ceci est plus difficile avec des animaux plus âgés). Il est conseillé de ne pas injecter plus de 0.05 mL. Retirer ensuite l'aiguille et appliquer si nécessaire une pression au site d'injection en cas d'écoulement. S'assurer que l'animal se réveille bien, en le stimulant si nécessaire avec un léger jet d'air. De légères pressions exercées sur la région cardiaque avec le doigt peuvent quelquefois s'avérer nécessaires si le stress de l'injection a suscité un arrêt cardiaque. Vérifier l'état de santé de l'animal le lendemain.

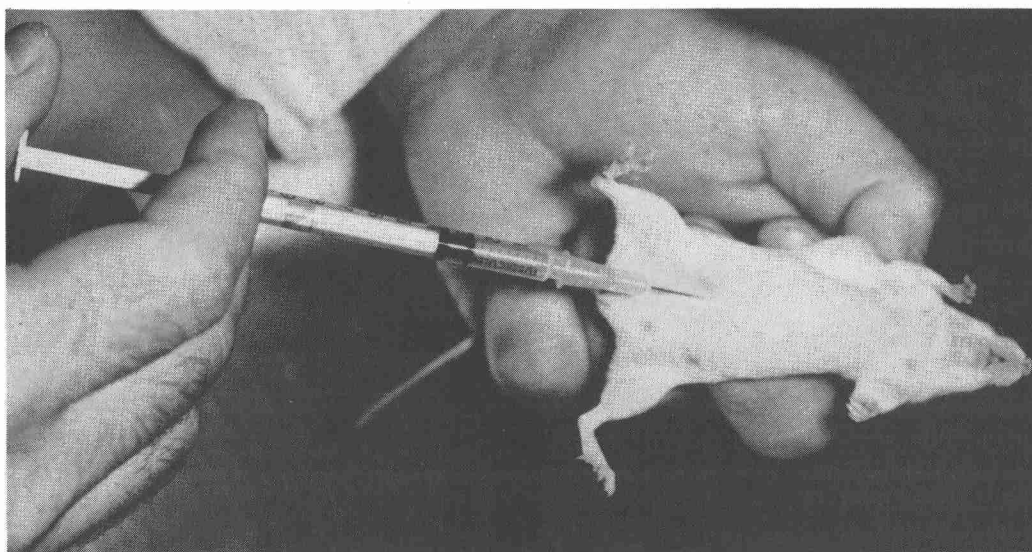


Figure 1
Injection intrapéritonéale

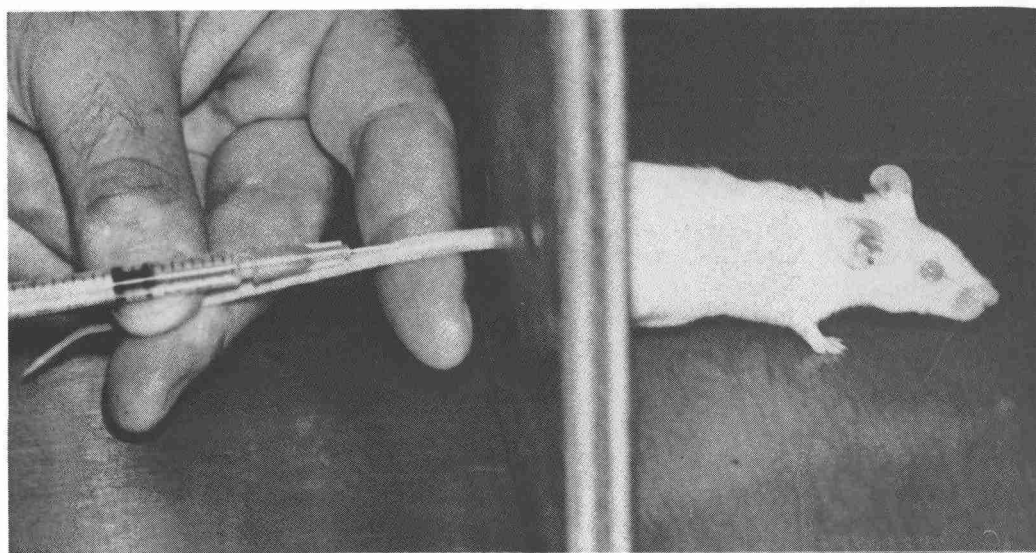


Figure 2
Injection intraveineuse

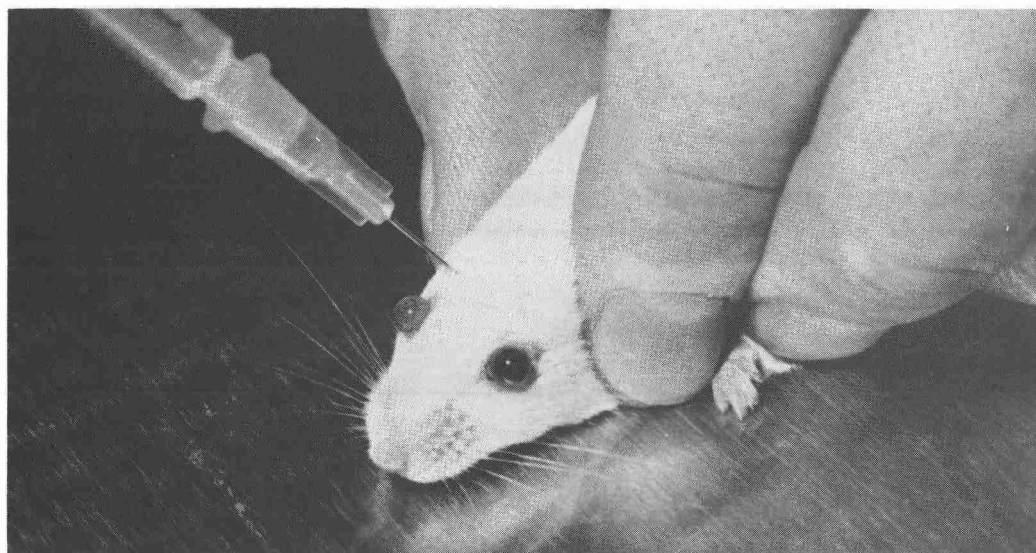


Figure 3
Injection intracérébrale