

VIRULENCE DES LYMPHOCYTES DANS LA MALADIE DE MAREK

Françoise COUDERT et L. CAUCHY
avec la collaboration technique de J. RICHARD

Station de Pathologie aviaire,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
Domaine de l'Orfrasière
Nouzilly B.P. 1
37380 Monnaie

RÉSUMÉ

L'étude de la virulence des lymphocytes dans la maladie de Marek est envisagée *in vivo* puis *in vitro*.

Une méthode de purification de ces lymphocytes est décrite. Les lymphocytes issus d'animaux atteints de maladie de Marek transmettent régulièrement la maladie lorsqu'ils sont inoculés à des poussins d'un jour. Les cultures cellulaires (fibroblastes d'embryons de poulet) contaminées par des lymphocytes intacts ou broyés transmettent la maladie : par contre, l'inoculation de poussins sensibles avec les surnageants de culture conduisent à des résultats différents selon les conditions de préparation des lymphocytes.

Les modifications observées *in vitro*, sur les cultures de fibroblastes contaminées par des lymphocytes intacts ou broyés sont rapportées et la production d'effets cytopathogènes discutée.

Les résultats obtenus permettent de souligner le rôle prépondérant des lymphocytes dans la pathogénie de la maladie.

I. — INTRODUCTION

Au cours du développement de la maladie de Marek chez les oiseaux, de nombreuses observations mettent en cause les lymphocytes, en particulier :

— l'envahissement des structures nerveuses par une population cellulaire variée composée essentiellement de lymphocytes (CAUCHY, 1971),

— l'installation fréquente de tumeurs lymphoïdes sur les organes tels que l'ovaire, la rate, les reins, le foie, le cœur,...

— l'aplasie rapide de la bourse de Fabricius et du thymus qui sont chez le Poulet les organes lymphogènes les plus actifs (JAKOWSKI *et al.*, 1969-1970).

Tous ces phénomènes conduisent à penser que les lymphocytes doivent jouer un rôle important qu'il serait intéressant de connaître et d'approfondir.

Nous avons recherché l'existence éventuelle de la virulence des lymphocytes purifiés provenant d'animaux cliniquement atteints, en inoculant ces cellules à des poussins axéniques d'un jour. Ce travail est complété par une étude *in vitro*, en introduisant sur des cultures de fibroblastes d'embryons de poulet sains des lymphocytes infectés ayant subi des traitements variables.

II. — MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. — Animaux

La souche choisie pour ce travail est une *Leghorn* dite *PA 12* élevée à notre Station depuis plusieurs années. Ces animaux, exempts de vaccination et de supplémentation médicamenteuse dans l'aliment, sont élevés en troupeau fermé dans des locaux à très haute protection sanitaire : tous les poulets sont reconnus indemnes de maladies spécifiques telles que parasitoses diverses, pullorose, mycoplasmoses, encéphalomyélite aviaire, leucose lymphoïde et maladie de Marek. Ce troupeau répond à l'appellation d' « orthoxénique » suivant la définition donnée par AYCARDI et SCHELLENBERG (1970). La sensibilité de cette souche à l'agent virulent de la maladie de Marek est stable. Le taux de mortalité cumulée au 80^e jour après l'inoculation à un jour par voie parentérale, avec du sang total infecté, est de 80 p. 100 (1).

Cette souche *PA 12* n'entre pas parmi les souches particulièrement sensibles à la maladie de Marek, mais l'absence chez ces animaux d'agents pathogènes spécifiques en fait un excellent outil de travail.

B. — Virus

La seule souche virale utilisée pour cette expérimentation est la souche HPRS 16 aimablement fournie à notre laboratoire par le docteur BIGGS (Poultry Research Station, Houghton, Hunts, Grande-Bretagne).

Afin de pouvoir la conserver, cette souche est régulièrement passée sur animaux sensibles. Le sang sert d'inoculum. Le prélèvement s'effectue stérilement par ponction cardiaque sur animaux de 45 à 55 jours cliniquement atteints. L'inoculation de cellules sanguines à des poussins d'un jour par voie parentérale peut se pratiquer le jour du prélèvement mais, de façon plus courante, ces cellules sont mises en surgélation dans un conteneur d'azote liquide et restent à — 170°C jusqu'à utilisation.

C. — Séparation et traitement des lymphocytes

Depuis plusieurs années de nombreux auteurs ont signalé la propriété des polynucléaires et des monocytes d'adhérer aux différentes surfaces qui leur sont offertes. Cette adhésivité est maximale entre 37°C et 40°C ; elle varie en fonction du matériau offert comme support à ces cellules. CARTIER *et al.* (1969) décrivent l'ensemble des méthodes connues jusqu'à nos jours. Ils montrent que les meilleurs résultats furent obtenus par des supports tels que : billes de polystyrène THOMSON *et al.*, 1966), fibres de laine de verre (BORJESON, 1966), billes de polyamide (2). (DEBRAY SACHS *et al.*, 1968) ou autres fibres synthétiques (SCHELLENKENS *et al.*, 1968). Pour le sang du poulet nous avons obtenu les résultats les plus satisfaisants en utilisant des fibres synthétiques (3). Le sang total, prélevé stérilement par ponction intra-cardiaque et sur héparine, est directement introduit dans une colonne thermostatée contenant les fibres synthétiques. L'écoulement doit se faire lentement ; un flux trop important empêcherait les polynucléaires et les monocytes d'adhérer aux surfaces qui leur sont offertes.

(1) Les animaux de cette souche, maintenus dans des conditions d'élevage orthoxénique jusqu'à 8 semaines, puis placés dans les conditions habituelles d'élevage, s'avèrent par contre résistants à l'infection naturelle après cet âge (AYCARDI, communication personnelle).

(2) Polyamide : fibres de nylon (N, D).

(3) Fibres synthétiques Leucopak, Laboratoire Travenol.

Le produit de l'écoulement, contenant les lymphocytes non retenus, est recueilli à la surface d'une solution stérile de carboxyméthyl-cellulose (CMC) à 3 p. 1000 dans une solution de tampon phosphate (PBS). La sédimentation s'effectue dans des tubes droits contenant 1/3 de CMC pour 2/3 de sang ; cette sédimentation se poursuit pendant 2 à 3 heures. Ce temps écoulé, les globules rouges se sont assez nettement séparés ; le surnageant est recueilli afin de le centrifuger à une vitesse de 281 g pendant 25 minutes. Cette centrifugation s'effectue en tubes coniques.

Le culot de centrifugation présente deux catégories cellulaires nettement différenciées : des globules rouges accumulés dans la pointe du tube et un ménisque lymphocytaire qui le recouvre. Seul ce dernier est remis en suspension dans quelques millilitres de PBS. Le rendement de cette méthode en lymphocytes purifiés peut être considéré comme faible (40 à 50 p. 100 après passage sur colonne) mais la pureté de la suspension obtenue est très grande : 99,9 p. 100 de lymphocytes pour 0,1 p. 100 d'autres leucocytes qui sont le plus souvent des monocytes.

Au cours de notre expérimentation, les lymphocytes serviront d'inoculum pour les oiseaux mais aussi d'inoculum pour des cultures de fibroblastes d'embryons de poulet. Dans ce dernier cas, les lymphocytes sont introduits simultanément à la mise en culture soit sous forme de cellules intactes, soit après broyage de celles-ci.

Cette destruction ménagée est réalisée à moins de 10°C, au broyeur de Potter, jusqu'à ce que la suspension numériquement connue de lymphocytes purifiés introduite dans l'appareil ne comporte plus d'éléments cellulaires entiers (contrôle microscopique). Le rapport de trois cellules fibroblastiques pour une cellule inoculante lymphocytaire fut la proportion employée tout au long de l'expérimentation.

Dans les essais effectués avec des leucocytes totaux, ces derniers sont obtenus par simple sédimentation du sang total et par prélèvement du surnageant.

D. — Culture de fibroblastes d'embryons de poulet

Après trypsination d'embryons de 9 à 12 jours à 37°C, les cellules embryonnaires sont ensemencées à une concentration optimale de 700 000 cellules par ml de milieu. Si nous introduisons un nombre supérieur de cellules, la formation du tapis s'effectue de façon explosive et en trois à quatre jours de culture le nombre de cellules devient tellement important qu'il se produit un décollement rapide du tapis cellulaire de son support. Un nombre de cellules inférieur à 700 000 par millilitre ne donne jamais un tapis régulier aux cellules jointives.

Le milieu de croissance se compose de solution de Eagle à double concentration d'acides aminés + 10 p. 100 de sérum de veau + 100 U/ml de pénicilline + 100 µg de streptomycine + bicarbonate (à 5,5 p. 100 dans de l'eau désionisée) en quantité suffisante pour que le pH soit ajusté entre 7,2 et 7,4. Cette solution de bicarbonate est ajoutée juste au moment de la mise en culture afin d'éviter une alcalinisation excessive, nocive à une bonne croissance des cellules. Dès que ces dernières sont adhérentes aux flacons de culture (Falcon plastics), c'est-à-dire le lendemain de l'ensemencement, le milieu est renouvelé :

- 1° pour rejeter les cellules n'ayant pas adhéré à la paroi du flacon,
- 2° pour en introduire un nouveau appauvri en sérum (1 à 2 p. 100) afin de ralentir la croissance des cellules et d'éviter un décollement du tapis formé.

L'entretien des cultures se fait en changeant le milieu deux fois par semaine. Des passages successifs s'effectuent soit par passages aveugles pour les cultures de longue durée, soit par subculture pour l'obtention de cultures secondaires. Dans ce dernier cas, le tapis de la culture primaire est trypsiné (trypsine 0,25 p. 100 dans du PBS), les cellules décollées sont recueillies, centrifugées à 106 g pendant 10 minutes et remises dans de nouveaux flacons. L'ensemencement se fait à une concentration de 800 000 à 900 000 cellules par millilitre afin de compenser la détérioration des cellules par la trypsine. Pour les passages aveugles, les cellules obtenues après le processus de trypsination sont remises en culture en présence de nouveaux fibroblastes d'embryons de poulet.

E. — Mise en surgélation en azote liquide

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 30 p. 100 dans une solution de PBS complète est mélangé à partie égale avec la suspension cellulaire à surgeler. Ces cellules peuvent se trouver soit dans une solution de PBS, soit dans quelques millilitres de milieu complet enrichi en sérum de veau. La surgélation se fait de façon lente et progressive en respectant des paliers de congélation réguliers. Cette surgélation ne doit pas s'effectuer en moins de 45 minutes afin de ne pas détruire l'intégrité cellulaire.

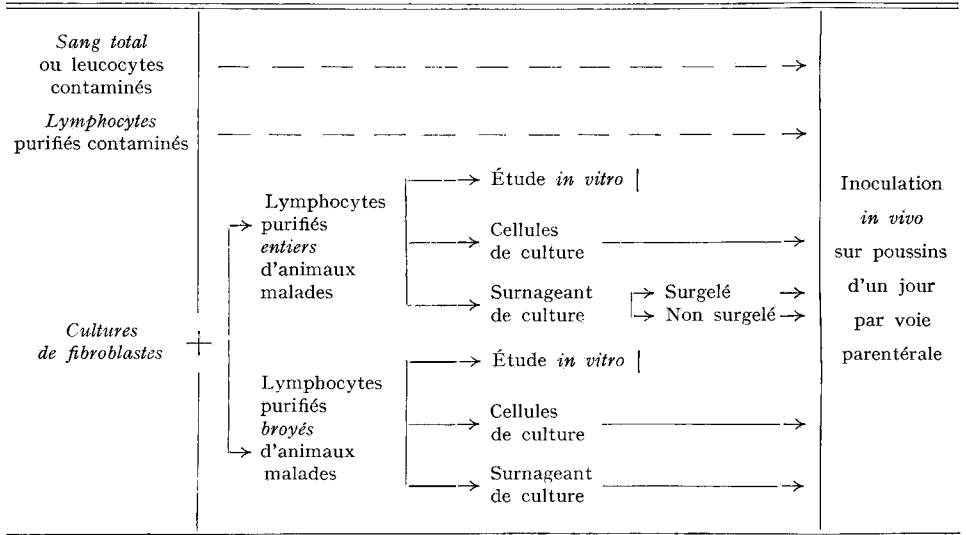
F. — *Protocole expérimental*

L'expérimentation comporte 2 aspects : une étude *in vivo* et une étude *in vitro* (tabl. I).

In vivo, de nombreux inoculum tels que du sang total, des leucocytes, des lymphocytes purifiés issus d'animaux cliniquement atteints furent injectés à des poussins d'un jour par voie parentérale afin de vérifier leur virulence. De même, nous avons étudié la virulence de cultures de fibroblastes primaires ou secondaires ayant été contaminées soit par des lymphocytes entiers d'animaux malades, soit par des lymphocytes broyés, en les inoculant à des poussins d'un jour.

TABLEAU I

Schéma du déroulement de l'expérimentation



In vitro, ces mêmes cultures furent suivies afin d'étudier l'évolution d'éventuels effets cytopathogènes. Le développement et l'aspect du tapis cellulaire présumé virulent ont été comparés à ceux des cultures de fibroblastes témoins non infectés.

III. — RÉSULTATS

De nombreux essais effectués par notre laboratoire pendant les années antérieures nous ont montré et confirmé la virulence du sang et singulièrement des leucocytes. Dans cette expérimentation, nous avons recherché plus spécifiquement la virulence d'une suspension de lymphocytes purifiés, issus d'animaux cliniquement atteints de maladie de Marek. Ce contrôle s'est effectué par des essais *in vivo* et *in vitro*.

A. — *Étude de la virulence des lymphocytes in vivo*

I. *Pouvoir infectant des lymphocytes purifiés.*

Deux millions de ces cellules sont injectées par poulet, par voie intra-abdominale. Simultanément d'autres inoculum tels que des leucocytes totaux (2 millions par animal) ou du sang total (0,2 ml par poussin) sont inoculés de façon similaire.

Pour un chiffre moyen de 3 000 000 de cellules par mm³ de sang, lorsque l'on injecte 0,2 ml de sang aux poussins, on introduit environ 600 000 000 de cellules.

Pour notre troupeau de *Leghorn*, la proportion de lymphocytes parmi les leucocytes se situe entre 65 p. 100 et 75 p. 100 donc, si l'on considère un nombre moyen de 30 000 leucocytes par mm³ de sang total, le nombre de lymphocytes parmi ces leucocytes est de 19 500 cellules à 22 500 cellules par mm³ de sang total, soit 19,5 millions à 22,5 millions par ml et 3,9 à 4,5 millions pour 0,2 ml de sang total.

TABLEAU 2

Pouvoir infectant des suspensions de lymphocytes purifiés

Numéro de l'expérience	Nature de l'inoculum	Nombre d'animaux inoculés	Lésions observées		Nombre d'oiseaux	
			microscopiques seulement	macroscopiques	avec lésions	sans lésion
903	Sang total	30	7	23	30	0
904		29	10	18	28	1
905 *		19	3	12	15	2
908		23	4	17	21	2
909		28	3	21	24	4
903	Leucocytes totaux	15	1	14	15	0
904		10	4	6	10	0
905		12	4	7	11	1
908		23	5	15	20	3
104		23	5	15	20	2
105		12	4	7	11	1
104	Lymphocytes purifiés	10	0	10	10	0
105		14	0	14	14	0

* 2 morts accidentellement.

L'analyse du tableau 2 permet d'établir que les trois inoculums issus d'animaux atteints de maladie de Marek : le sang, les leucocytes et les lymphocytes purifiés sont virulents et transmettent régulièrement la maladie. Les atteintes lésionnelles sont toutes de type macroscopique pour l'inoculum de lymphocytes, alors qu'elles doivent être décelées en microscopie pour un certain nombre d'oiseaux inoculés par les autres catégories cellulaires. Cette remarque traduit un net pouvoir pathogène pour les lymphocytes purifiés.

2. Pouvoir infectant des cultures cellulaires contaminées par :

a) Des lymphocytes intacts.

Le tapis de fibroblastes d'embryons de poulet contaminés par des lymphocytes intacts issus d'animaux cliniquement atteints a subi, après huit jours de culture primaire, une subculture. Elle a pour but théorique d'exclure le maximum de lymphocytes présents au sein de la culture primaire. L'inoculation des poussins n'est pratiquée que cinq jours après cette mise en subculture.

Les cellules de la culture secondaire inoculées à sept poussins leur ont transmis la maladie (tabl. 3).

Trois oiseaux possédaient des lésions macroscopiques et quatre des lésions microscopiques seulement.

TABLEAU 3

Virulence des cultures de fibroblastes d'embryons de poulet contaminées par des lymphocytes entiers issus d'oiseaux atteints de maladie de Marek

		N° de l'expérimentation	Nombre d'animaux inoculés	Nombre d'animaux malades	Nature des lésions		
					macroscopiques	microscopiques seulement	
Culture de fibroblastes +	Cellules de culture secondaire (2)	101	7	7	3	4	
Lymphocytes purifiés infectés entiers (1)		Milieu de culture primaire (3)	Surgelé { → → Non surgelé	101	7	0	0
	105			10	0	0	
	105			10	10	9	1
Culture de fibroblastes (témoins)	+ {	Lymphocytes purifiés sains	101	6	0	0	0

(1) Le nombre de lymphocytes infectants est de 1 pour 4 cellules fibroblastiques mises en culture.

(2) Le nombre de cellules de culture inoculées par poulet est de 2 millions environ.

(3) Le milieu de culture primaire a été centrifugé à 281 g pendant 20 minutes et c'est l'amas de débris et de cellules qui a été inoculé aux poussins d'un jour.

Le milieu de culture primaire donne des résultats différents selon que l'inoculum a subi ou non un processus de surgélation. Les deux essais effectués à partir des suspensions surgelées, portant en tout sur 17 animaux inoculés, n'ont donné aucun résultat positif. Par contre, le même inoculum non surgelé fut très virulent et les 10 animaux de l'essai furent contaminés. Parmi tous les oiseaux, un seul poulet n'a montré que des lésions microscopiques, tous les autres furent atteints sans qu'une confirmation histologique s'avère nécessaire.

b) *Des lymphocytes broyés.*

La culture (inoculum) n'a pas subi de subculture comme pour l'essai précédemment cité.

Pendant la période de culture, de 10 jours consécutifs, deux changements complets de milieu permirent de rejeter le maximum de débris. Les résultats obtenus furent variables en fonction de l'expérimentation : quatre poussins sur sept se trouvèrent contaminés à la suite de l'inoculation des cellules de la culture (tabl. 4).

Le milieu de culture semble donner des résultats plus nuancés : zéro poussin sur dix inoculés pour l'essai 102 furent contaminés, et cinq poussins sur sept inoculés ont répondu positivement pour l'essai numéro 101.

TABLEAU 4

Virulence des cultures de fibroblastes d'embryons de poulet contaminées par des lymphocytes finement broyés issus d'animaux atteints de maladie de Marek

		N° de l'expérience	Nombre d'animaux inoculés	Nombre d'animaux malades	Nature des lésions	
					microscopiques seulement	macroscopiques
Culture de fibroblastes, embryons de poulet + Lymphocytes purifiés broyés	Cellules de culture primaire (1) →	101	7	4	0	4
	Milieu de culture primaire (2) →	101 102	7 10	5 0	3 0	2 0
Culture de fibroblastes (témoins)	+ { Lymphocytes sains	101	6	0	0	0

(1) Le nombre de cellules inoculées par poussin est de 2 millions environ.

(2) Le milieu de culture est centrifugé. L'agrégat de sédimentation sert d'inoculum ; il se compose d'une très importante partie de débris cellulaires.

B. — *Étude in vitro de la virulence des lymphocytes*

L'activité des inoculums virulents sur culture de fibroblastes est différente selon que les lymphocytes purifiés sont introduits sous forme de cellules intactes ou sous forme de débris finement broyés.

I. *Virulence des lymphocytes intacts.*

Ces cultures furent suivies pendant des périodes s'étalant de 15 jours pour les cultures primaires à quatre mois pour celles entretenues par passages aveugles. Les effets cytopathogènes furent peu nombreux. Les plages sont apparues le plus souvent vers le 14^e jour (pl. I, fig. 1) pour évoluer vers une rétraction cellulaire (pl. I, fig. 2) vers le 17^e jour. Vers les 23 et 24^e jours, ces formations reprennent un aspect moins altéré et se rapprochent de la normale (pl. I, fig. 3), les cellules fibroblastiques se multiplient activement et occupent de nouveau l'espace ayant formé plage (pl. I, fig. 4). Au-delà du 25^e jour, peu de remarques furent notées car pour éviter une dégradation totale des cellules formant le tapis, il est indispensable soit d'effectuer une subculture, soit de lui faire subir un passage aveugle.

2. Virulence des lymphocytes broyés.

Les lymphocytes broyés provoquent sur le tapis de fibroblastes une action inhibitrice qu'il est difficile d'assimiler aux effets cytopathogènes (pl. II, fig. 2). Les débris lymphocytaires s'agglutinent sur les cellules fibroblastiques qui s'étalent sur le fond de la boîte de culture. Ils forment des amas que même plusieurs rinçages avec du PBS ne parviennent pas à décoller. Le nombre de cellules fibroblastiques fixées reste très insuffisant pour obtenir un tapis régulier de cellules jointives.

IV. — DISCUSSION

Sur poussins, les différents inoculums expérimentés tels que le sang total, les leucocytes ou les lymphocytes purifiés ont tous donné des résultats positifs. Les oiseaux n'ayant pas contracté la maladie au cours des différents essais furent peu nombreux.

Il est intéressant de constater que les poulets inoculés par des lymphocytes présentent tous des lésions macroscopiques et que l'histologie fut inutile pour déterminer la présence de la maladie. Tous les autres inoculums envisagés, tels que le sang et les leucocytes, ont nécessité une confirmation par l'histologie pour certains animaux paraissant indemnes. En 1970, CAUCHY en comparant des inoculums de leucocytes, d'hématies et de sang total parvenait à la conclusion que l'agent virulent se trouve véhiculé par les leucocytes et non par les érythrocytes du sang circulant. Nos résultats permettent de confirmer cette hypothèse et même de soulever la suivante : les lymphocytes seuls, soit 65 à 75 p. 100 des leucocytes totaux sont aussi virulents que toutes les cellules blanches réunies. Peut-être sont-elles les cellules « hôtes » intermédiaires préférentielles de l'agent virulent, cellules susceptibles de transporter dans tout l'organisme l'information virale.

Ces résultats s'ajoutent aux différents essais faits sur les inoculations cellulaires, telles que le sang ou les suspensions tumorales par LERCHE et FRITZSCHE (1934), SEVOIAN, CHAMBERLAIN (1962), HORIUCHI (1969), et montrent que si BIGGS et PAYNE (1967) n'ont pas trouvé de différence entre leurs inoculums sanguins, cela peut tenir à une purification insuffisante de chaque extrait cellulaire inoculé.

Les lymphocytes du sang circulant transmettent régulièrement la maladie de Marek et pourtant, de façon paradoxale, aucune forme virale n'a été décélée par nous au microscope électronique dans ces lymphocytes de départ. KOTTARIDIS et LUGINBUHL (1970) décrivent de [rares particules virales intranucléaires dans quelques lymphocytes d'animaux infectés. NAZERIAN (1970) étudie les lymphocytes entourant la base du follicule plumeux et n'y décèle aucune particule ; par contre, ces mêmes auteurs, après de très nombreuses recherches sur les cellules des tumeurs des gonades et les cellules d'infiltrations nerveuses, sont parvenus à déceler dans quelques lymphocytes des particules virales. CAMPBELL et WOODS (1970) décrivent un virus de type herpès dans le noyau de lymphocytes mis en culture et ayant subi une transformation blastique. Des résultats récents nous permettent actuellement d'affirmer que les lymphocytes issus d'animaux malades, ne montrant pas de particules virulentes, mis dans des conditions particulières sont

aptes à multiplier le virus sous sa forme virale apparente caractéristique (CAUCHY et COUDERT, 1972).

Ces mêmes lymphocytes issus du sang circulant, inoculés intacts à des cultures de fibroblastes d'embryons de poulet, semblent rendre virulentes les cellules de la culture.

Si nous analysons avec plus de précision le comportement et l'évolution des lymphocytes mis en culture avec des fibroblastes d'embryons de poulet, nous constatons que ces lymphocytes réagissent d'une façon totalement différente de celle des lymphocytes mis en monoculture et qui restent en suspension dans le milieu d'entretien. En présence d'autres cellules, ils paraissent devenir dépendants de ces cellules « nourricières ». Suivis en microscopie en contraste de phase, ces lymphocytes semblent s'intégrer à la culture de fibroblastes sans laisser de possibilité de les distinguer par la suite. En suspension, il est facile d'extraire ces cellules de leur milieu, mais intégrées dans une structure de tapis cellulaire, il devient aléatoire de les rejeter toutes après plusieurs rinçages ; il n'est pas certain que tous les lymphocytes ayant servi d'inoculum soient rejetés. Théoriquement, la subculture doit faciliter une dégénérescence plus rapide et plus efficace des lymphocytes ; pratiquement, l'intégrité cellulaire du lymphocyte ne semble pas plus affectée que la cellule fibroblastique qui n'éprouve aucune difficulté à se fixer et à recommencer un nouveau cycle de multiplication. En conséquence, le problème se pose de savoir si plusieurs changements de milieu, plusieurs rinçages et une subculture sont des interventions suffisantes pour entraîner la destruction des lymphocytes introduits en tant qu'inoculum. Sinon, il nous est permis d'émettre l'hypothèse que les lymphocytes poursuivent leur développement ou leur survie et multiplient eux-mêmes le virus au sein de la culture de fibroblastes. Cette hypothèse confirmerait celles de ANDERSON et SEVOIAN (1969) qui pensaient déjà que le lymphocyte pouvait survivre et donc transmettre la maladie. Dans le cas contraire, si les lymphocytes ne sont plus présents, les fibroblastes contaminés seraient capables de transmettre seuls la maladie. Les inoculations faites sur poussins d'un jour avec le milieu de culture de 24 heures semblent confirmer la présence de peu de cellules lymphocytaires virulentes. Nous pensons que, vraisemblablement, les lymphocytes restant en suspension dans le milieu sont ceux qui, au cours des diverses manipulations de purification, se sont trouvés altérés et sont en voie de destruction. Ce fait expliquerait la sensibilité de ces cellules au processus de surgélation qui semble avoir provoqué la perte totale de la virulence.

Le milieu de culture (expérimentation 105, tabl. 3) inoculé à des poussins de un jour transmet la maladie. Ce fait montre que les lymphocytes en voie de destruction sont encore virulents. Si ce même milieu, avant d'être inoculé aux poussins, subit une surgélation puis une décongélation, il perd totalement sa virulence. Tout se passe donc comme si les cellules qui restent en suspension dans le milieu de culture étaient des cellules très fragiles, en survie temporaire. Un point particulier supplémentaire nous amène à penser que les lymphocytes sont toujours présents et multiplient le virus : si l'on étudie l'activité cytopathogène de l'inoculum, le nombre de plages observées est réduit. Rappelons à ce sujet que la souche virale HPRS 16, avant de parvenir à notre laboratoire, n'avait subi au laboratoire de Houghton que deux passages consécutifs sur culture de reins de poulet. A notre Station, cette souche virale ne fut entretenue que par passages réguliers sur poulets vivants sans jamais poursuivre son adaptation sur culture. Notre souche se

révèle actuellement très virulente *in vivo*, mais d'adaptation lente et difficile *in vitro*. Ce dernier point semble aussi confirmer que les lymphocytes intacts introduits en culture de cellules (des fibroblastes dans le cas présent), doivent survivre et même doivent pouvoir se multiplier et multiplier le virus en se servant des cellules fibroblastiques en tant que cellules nourricières, sans que ces dernières acceptent obligatoirement le virus et le multiplient pour leur propre compte.

Pour essayer d'annuler la notion de cellule dans l'inoculum, nous avons broyé nos lymphocytes de départ de façon à libérer les particules virulentes de la structure cellulaire du lymphocyte. Le broyage cellulaire semble libérer des produits de dégradation ou certains enzymes qui provoquent, une fois introduits sur la culture de fibroblastes, une action cytotoxique entraînant d'importantes difficultés de croissance pour les cellules fibroblastiques présentes.

Cette variabilité, inhérente à la culture même, induite par les effets cytotoxiques des lymphocytes broyés, explique les résultats différents obtenus après inoculation des cellules de la culture puis de son milieu d'entretien sur poussin d'un jour (expérimentations 101 et 102, tabl. 4).

V. — CONCLUSION

Les cellules reconnues jusqu'à ce jour comme ayant un rôle déterminant dans la pathogénie de la maladie sont peu nombreuses. Seules les cellules de desquamation de la base des follicules plumeux semblent responsables de la transmission par l'air ambiant.

Ce travail montre que les lymphocytes du sang circulant sont parmi les cellules les plus virulentes connues. Leur virulence, jointe à leur grand nombre dans tous les organes atteints, leur potentiel de différenciation et leur mobilité, laissent présumer qu'ils doivent jouer un rôle pathogénique essentiel au cours de la maladie de Marek et participer directement à la dissémination du virus dans l'organisme.

Reçu pour publication en août 1972.

SUMMARY

THE INFECTIVITY OF LYMPHOCYTES IN MAREK'S DISEASE

The infectivity of lymphocytes in Marek's disease is studied *in vivo* and *in vitro*.

A method of purification of these lymphocytes is described. When day old chicks are inoculated with lymphocytes from an animal suffering from Marek's disease they always become infected. Cell cultures of fibroblasts from chick embryos inoculated with intact or fragmented lymphocytes transmit the disease, but the inoculation of live chickens with the supernatant of the culture produces different effects according to the preparation of the lymphocytes.

The effects seen *in vitro* on cultures of fibroblasts seeded with intact or fragmented lymphocytes are reported and the cytopathic effects discussed.

The results indicate the major role of lymphocytes in the pathogenicity of the disease.

РЕЗЮМЕ

Вирулентность лимфоцитов при болезни марека.

Наше исследование о вирулентности лимфоцитов при болезни Марека производилось с начала *in vivo* а потом *in vitro*.

В этой статье мы описали метод очищения этих лимфоцитов. Лимфоциты полученные от животных зараженных болезнью Марека регулярно передают болезнь, когда их вспрыскивают однодневным цыплятам. Клеточные культуры (фибробласты зародышей цыплят) зараженные целыми или раздробленными лимфоцитами передают болезнь; наоборот, инокуляция чувствительным цыплятам всплывами этих культур ведут к различным результатам в связи с условиями при которых был приготовлен препарат лимфоцитов. Мы описали модификации наблюдающиеся *in vitro*, на культурах фибробластов зараженных целыми или раздробленными лимфоцитами и обсуждали цитопатогенные эффекты.

Полученные результаты позволяют подчеркнуть преобладающую роль лимфоцитов в патогении болезни.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON K., SEVOIAN M., 1969 a. Morphological description of cell cultures containing a type-II (Marek's) leukosis virus (JM Strain). *Avian Dis.*, **13** (3), 470-485.
- ANDERSON K., SEVOIAN M., 1969 b. Bioassay of cell cultures containing a type-II leukosis virus (JM Strain). *Avian Dis.*, **13** (3), 486-500.
- AYCARDI J., SCHELLENBERG P., 1970. *Principes et techniques de l'élevage orthoxénique : application à l'aviculture industrielle*. 38^e session générale du Comité de l'O. I. E., Rapport n° 130, 32 p.
- BIGGS P. M., PAYNE L. N., 1967. Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *J. nation. Cancer Inst.*, **39** (2), 267-280.
- BÖRJESON J., CARDELL S., NORDEN A., 1966. A simple procedure for the determination of DNA synthesis in cultured lymphocytes. *Scand. J. Haematol.*, **3** (2), 158-164.
- CAMPBELL J. G., WOODE G. N., 1970. Demonstration of a Herpes-type virus short-term cultured blood lymphocytes associated with Marek's disease. *J. med. Microbiol.*, **3**(3), 463-473.
- CARTIER P., MARCHAND J.-C., GARREAU H., 1969. La séparation des cellules sanguines. *Ann. Biol. clin.*, **27** (3-4), 133-157.
- CAUCHY L., 1970. *Recherches virologiques, expérimentales et infrastructurales sur une néoplasie : la maladie de Marek*. Thèse Doct. Sci. nat., Univ., Paris, 79 p.
- CAUCHY L., 1971. La maladie de Marek. Histologie, ultrastructure des cellules et des particules virales. *Ann. Rech. vétér.*, **2** (1), 5-32.
- CAUCHY L., COUDERT F., 1972. Particules de type Herpès de la maladie de Marek dans les lymphocytes infectés et maintenus *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **274**, D, 1864-1866.
- DEBRAY-SACHS M., DORMONT J., 1968. Isolement des lymphocytes à partir du sang circulant chez l'homme normal et urémique. *Rev. fr. Étud. clin. biol.*, **13** (4), 414-417.
- HORIUCHI T., TEZUKA A., SHOYA S., YUASA N., 1969. Lymphomatous lesions induced in chickens by cellular inoculum. *Nation. Inst. animal. Health Quart.*, Jap., **9** (4), 203-212.
- JAKOWSKI R. M., FREDRICKSON T. N., LIGINBUHL R. E., HELMBOLDT C. F., 1969. Early changes in bursa of Fabricius from Marek's disease. *Avian Dis.*, **13** (1), 215-222.
- JAKOWSKI R. M., FREDRICKSON T. N., CHOMIAK T. W., LUGINBUHL R. E., 1970. Hematopoietic destruction in Marek's disease. *Avian Dis.*, **14** (2), 374-385.

- KOTTARIDIS S. D., LUGINBUHL R. E., 1970. Investigation of leucocytes from chickens with Marek's disease. *Nature*, **228** (5269), 372-373.
- LERCHE M., FRITZSCHE K., 1934. Histopathologie und Diagnostik der Geflügellähme. *Z. Infekt. Krankh. parasit. Krankh. Hyg. Haustiere*, **45** (2-3), 89-128.
- NAZERIAN K., 1970. Attenuation of Marek's disease virus and study of its properties in two different cell cultures. *J. nation. Cancer, Inst.*, **44** (6), 1257-1268.
- NAZERIAN K., WITTER, R. L., 1970. Cell-free transmission and *in vivo* replication of Marek's disease virus. *J. Virol.*, **5** (3), 388-397.
- SHELLEKENS P. Th. A., EIJSVOOGEL V. P., 1968. Lymphocyte transformation *in vitro*. I. Tissue culture conditions and quantitative measurements. *Clin. exper. Immunol.*, **3** (6), 571-584.
- SEVOIAN M., CHAMBERLAIN D. M., COUNTER F., 1962. Avian lymphomatosis. I.- Experimental reproduction of the neural and visceral forms. *Veter. Med.*, **57**, 500-501.
- THOMSON A. E. R., BULL J. M., ROBINSON M. A., 1966. A procedure for separating viable lymphocytes from human blood and some studies on their susceptibility to hypotonic shocks. *Brit. J. Haematol.*, **12** (4), 433-446.

PLANCHE I

*Étude des effets cytopathogènes
sur cultures de fibroblastes d'embryons de poulet
inoculés par des lymphocytes purifiés, intacts,
provenant d'animaux atteints de maladie de Marek*

FIG. 1. — *14^e jour de culture.* — Formation d'une plage nettement différenciée des cellules du tapis de fibroblastes.

FIG. 2. — *17^e jour de culture.* — La même plage que « fig. 1 » poursuivant son évolution. Rétraction des cellules centrales et apparition de décollement périphérique.

FIG. 3. — *24^e jour de culture.* — La plage s'est nettement agrandie et arrondie. A noter que les cellules fibroblastiques semblent repeupler l'ancienne plage.

FIG. 4. — *25^e jour de culture.* — Les cellules nouvelles du centre de la plage sont moins altérées que le tapis cellulaire primitif qui les entoure.



PLANCHE II

Effet cytotoxique de l'inoculum de lymphocytes broyés sur culture de fibroblastes d'embryon de poulet.

FIG. 1

Inoculum de lymphocytes intacts, développement normal du tapis.

FIG. 2

Inoculum de lymphocytes broyés.
Le tapis cellulaire se développe difficilement.
A noter les agglutinats de débris lymphocytaires sur les cellules fibroblastiques anormales.

