

P8605

COMPARAISON DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DU MACROPHAGE ALVÉOLAIRE ET DES TAUX D'IMMUNOGLOBULINES DES SÉCRÉTIONS TRACHÉOBRONCHIQUES DU PORC LARGE WHITE ET DU PORC MEI-SHAN

*J.M. SACHOT (1), S. BERNARD (1), Elizabeth BOTTREAU (1),
Christiane de VAUREIX (2), B. CHARLEY (2)*

*Institut National de la Recherche Agronomique
(1) Laboratoire de Pathologie Porcine, 37380 NOUZILLY
(2) Station de Virologie et d'Immunologie, 78850 THIVERVAL-GRIGNON*

INTRODUCTION

Les races porcines chinoises introduites en France semblent présenter une sensibilité plus élevée aux maladies respiratoires, par rapport aux races européennes. Cette sensibilité particulière a été observée dans les troupeaux INRA où ces animaux sont élevés conjointement et dans les mêmes conditions avec des porcs européens, notamment à la Station du Magneraud. Une forme suraiguë, aiguë et chronique accompagnée de signes cliniques (essoufflement, dyspnée) et de lésions (pneumonie, pleuropneumonie avec de nombreuses adhérences) étaient présents chez les animaux chinois uniquement (résultats non publiés).

Face à cette situation, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la sensibilité du porc chinois aux maladies respiratoires pourrait être liée, en partie, à un défaut des propriétés fonctionnelles du Macrophage alvéolaire (MPA). En effet, chez la souris, la sensibilité ou la résistance de l'organisme à certaines infections virales (MHV : Mouse Hepatitis Virus) est étroitement liée aux propriétés du macrophage (VIRELIZIER *et al.*, 1976, 1977, 1981). De plus, de nombreux travaux montrent le rôle majeur du MPA dans les mécanismes de défense du tractus respiratoire, dont il est « la plaque tournante » (chez le porc : CHARLEY, 1978, 1982, 1983).

L'objectif de cette recherche est donc de préciser et de quantifier cette sensibilité, en comparant celle de la race chinoise Mei-Shan (MS) et celle de la race européenne Large-White (LW), à partir de l'étude des propriétés du Macrophage alvéolaire (MPA).

Compte tenu du rôle important que jouent les Immunoglobulines (Ig) dans la défense du tractus respiratoire, nous avons également entrepris leur étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

LES ANIMAUX

Les expériences ont porté sur 15 porcelets « conventionnels » de race Large-White (LW) et 13 de race Mei-Shan (MS). Ces animaux étaient âgés d'environ 3 à 5 mois 1/2, et cliniquement indemnes de maladies respiratoires. Ils étaient élevés dans le même local.

RÉCOLTE DES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES (MPA)

La technique utilisée a été décrite précédemment (CHARLEY, 1982). Un lavage pulmonaire *post-mortem* est réalisé. Le milieu de lavage est centrifugé. Le surnageant est conservé en vue du dosage des Ig. Les cellules bronchoalvéolaires présentes dans le culot de centrifugation sont mises en culture sur un support plastique. Des tests sont ensuite réalisés sur ces cultures cellulaires afin de quantifier les propriétés fonctionnelles des MPA.

TIRAGE DES IMMUNOGLOBULINES DES SÉCRÉTIONS TRACHÉOBRONCHIQUES PAR LA TECHNIQUE ELISA

Les différentes classes d'Ig sont dosées dans le milieu de lavage pulmonaire par une technique ELISA classique. Des globulines de lapin anti-différentes classes d'Ig de porc sont fixées au fond des cupules d'une microplaque de titration. Un mélange d'échantillons et d'Ig de porcs purifiées, couplées à de la peroxydase sont alors en compétition pour se fixer sur les globulines de lapin. Après lavage, on révèle les enzymes fixées, par réaction avec un substrat. La densité optique de la coloration obtenue est lue sur un lecteur de plaques à 405 nm. Les concentrations des différentes classes d'Ig sont calculées à l'aide d'une courbe étalon et exprimées en µg/ml.

PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES, IN VITRO

A - Étalement, adhérence, viabilité

1 - Étalement

Le pourcentage de MPA étalés est déterminé par observation au microscope inversé après 24,48 ou 72 h de culture (CHARLEY, 1983) :

$$\text{pourcentage de MPA étalés} = \frac{\text{nombre de MPA étalés}}{\text{nombre total de cellules adhérentes observées}} \times 100$$

2 - Adhérence

Des cultures de MPA sont incubées pendant 1 heure en présence d'une solution de Trypsine-Versène qui a pour effet de décoller les cellules adhérentes (cultures « test ») ou en présence de milieu (cultures « témoin »). Les tapis cellulaires sont ensuite lavés et le pourcentage de cellules demeurées adhérentes est déterminé par un test au rouge neutre (voir ci-dessous).

$$\text{pourcentage de MPA adhérents} = \frac{\text{DO culture « test »}}{\text{DO culture « témoin »}} \times 100$$

3 - Viabilité

La viabilité *in vitro* des MPA est déterminée par un test au rouge neutre (CHARLEY *et al.*, 1983). On incube des cultures de MPA avec une solution de rouge neutre. La quantité de rouge neutre ingérée reflète la viabilité des MPA ; pour mesurer cette quantité, on dissout le rouge neutre ingéré avec de l'alcool dont on mesure ensuite la densité optique à 460 nm.

B - Activité phagocytaire

1 - Phagocytose et Bactéricidie de *Listeria monocytogenes* :

Cette technique a été décrite précédemment (CHARLEY/1982) Brièvement, on ajoute une suspension de bactéries aux cultures de MPA. Le nombre de bactéries phagocytées est déterminé, par une numération bactérienne sur Agar, après 35 mn d'incubation (Phagocytose) et après 4 h d'incubation. Le rapport entre le nombre de bactéries numérées après 4 h et 35 mn d'incubation détermine l'index de multiplication des bactéries entre ces 2 temps. Plus cet index est élevé, plus l'activité bactéricide des MPA est faible.

2 - Phagocytose des globules rouges de mouton sensibilisés :

On ajoute à des cultures de MPA des globules rouges de moutons sensibilisés (GRMs) par un sérum de lapin anti-GRM (10 GRMs pour 1 MPA) (cultures « essai »). Parallèlement, on réalise des cultures « témoin » (sans GRMs)

Après 30 minutes d'incubation, on lave les tapis cellulaires avec une solution hémolytique, puis on lyse les MPA et les GRMs ingérés par congélation à -20°C et décongélation répétées 3 fois.

La quantité de GRMs phagocytés par les MPA est déterminée en dosant leur activité peroxydase par réaction enzymatique avec un substrat (BERNARD, non publié) :

$$\text{Quantité de GRMs phagocytés} = \text{DO « essai »} - \text{DO « témoin »}$$

C - Sensibilité des MPA à une infection par le coronavirus de la gastroentérite transmissible (GET)

Nous avons quantifié les effets cytopathiques, dus au virus, en déterminant le pourcentage de cellules vivantes dans des cultures infectées par rapport à des cultures témoin, par un test au rouge neutre effectué 24, 48 et 72 h après l'infection

Nous avons également déterminé le titre infectieux du virus et le titre d'interféron produits sur MPA, 48 h après l'infection.

Ces techniques ont été décrites précédemment (LAUDE, 1984)

RÉSULTATS

CONCENTRATION DES DIFFÉRENTES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES dans les sécrétions trachéobronchiques (tableau 1)

TABLEAU 1
CONCENTRATION ET POURCENTAGE RESPECTIFS DES DIFFÉRENTES CLASSES D'IG DANS LES MILIEUX DE LAVAGES PULMONAIRES EN FONCTION DE LA RACE

Race	IgG		IgA		IgM	
	LW	MS	LW	MS	LW	MS
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	53 (36) ^(a)	41 (27)	40 (21)	36 (26)	1,2 (0,5)	1,2 (0,5)
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)/ DO	64 (27)	66 (44)	53 (29)	57 (53)	1,6 (0,6)	2,0 (0,5)
% Ig totales	54 (11,5)	52,7 (16,2)	44,5 (11,6)	45,5 (10,2)	1,4 (0,6)	1,7 (0,5)

(a) (écart-type) effectif : LW : 13
MS : 10

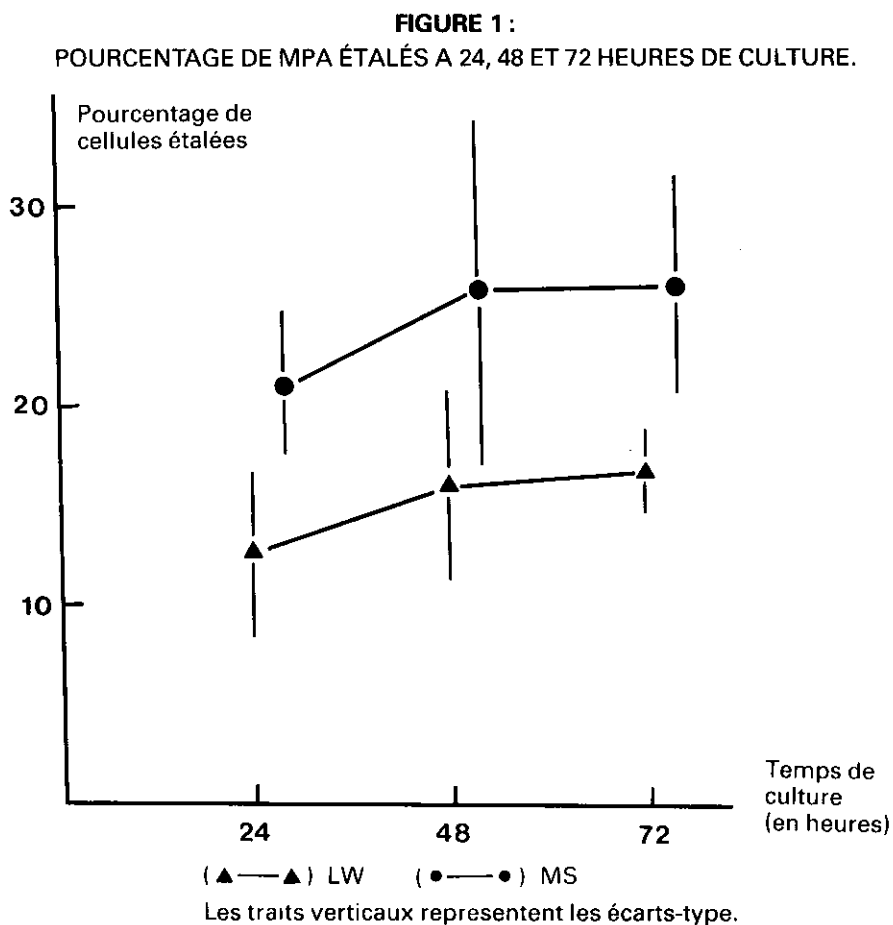
Les concentrations des différentes classes d'Ig sont similaires pour les 2 races de porcs. Par ailleurs, pour la race LW, le pourcentage d'IgG diminue avec l'âge des animaux et le pourcentage d'IgA augmente. Pour la race MS, ces variations sont inverses.

PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES, IN VITRO

A – Étalement, adhérence, viabilité

1 - Étalement :

Le pourcentage de MPA étalés à 24, 48 ou 72 h de culture est significativement plus important dans les cultures de MPA de porcs MS par rapport à celles des MPA de porcs LW (figure 1)



2 - Adhérence :

Le pourcentage de MPA demeurés adhérents après action de la Trypsine-Versène est supérieur dans les cultures de MPA de porcs MS (tableau 2)

TABLEAU 2
ÉVALUATION DE L'ADHÉRENCE *IN VITRO* DES MPA EN FONCTION DE LA RACE

Race	Moyenne*	Ecart-type	Minimum	Maximum
LW	20,3	9,0	9,4	30,0
MS	44,7	14,5	34,0	68,0

* Exprimée en pourcentage de MPA adhérents.

3 - Viabilité :

La capacité de survie, in vitro, des MPA est similaire pour les 2 races (résultats non présentés par une figure ou un tableau).

B – Capacité phagocytaire

1 - Phagocytose et bactéricidie de *Listeria monocytogenes*

Les résultats présentés au tableau 3 montrent que les capacités phagocytaires et bactéricides des MPA vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* sont similaires pour les 2 races.

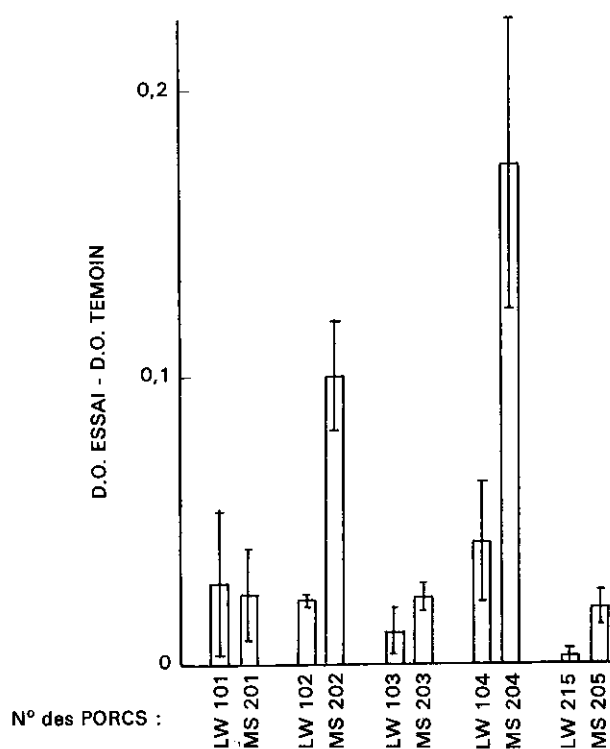
TABLEAU 3
ACTIVITÉ PHAGOCYTAIRE ET BACTÉRICIDES *IN VITRO* DES MPA
VIS-A-VIS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, EN FONCTION DE LA RACE

	Race	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	Effectif
Capacité phagocytaire (% de bactéries ingérées)	LW	6,2	17,8	0,06	53,7	9
	MS	4,0	12,6	0,04	42,1	11
Capacité bactéricide (index de multiplication des bac- téries en présence de MPA)	LW	30,3	40,7	2,6	148	14
	MS	30,5	30,1	2,9	111	13

2 - Phagocytose des GRMs

La figure 2 nous indique que, dans 4 expériences sur 5, la capacité phagocytaire des MPA de porcs MS, vis-à-vis des GRMs est significativement plus importante que celle des MPA de porcs LW.

FIGURE 2
PHAGOCYTOSE, IN VITRO, DES GRMs PAR LES MPA :



DO essai - DO témoin représente le nombre de GRMs ingérés.

C – Sensibilité au virus de la GET

- Les effets cytopathiques, dus à l'infection virale, sont plus importants sur les cultures de MPA de porcs LW (figure 3).
- Le titre infectieux du virus, 48 h après l'infection, est nettement supérieur dans les surnageants de culture de MPA de porcs LW par rapport aux MS (tableau 4).
- Par contre, les titres d'interféron, dans les surnageants de cultures cellulaires infectées, ne sont pas significativement différents entre les 2 races (tableau 4).

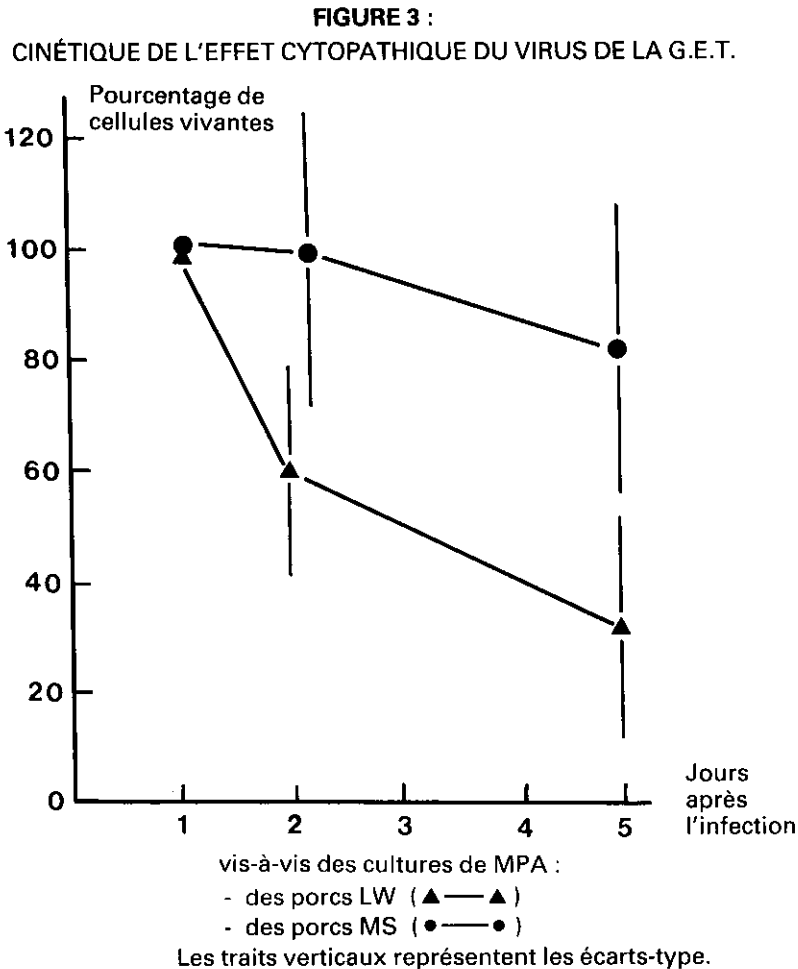


TABLEAU 4
CAPACITÉ DES MPA A PRODUIRE DU VIRUS (CORONAVIRUS G.E.T.) ET DE L'INTERFÉRON EN FONCTION DE LA RACE

	Race	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	Effectif
Titre de virus* (TCCPE ₅₀ × 10 ³ /ml)	LW	11,4	12,7	0,6	41,0	10
	MS	0,64	0,5	0,2	1,6	8
Titre d'IFN* (UI/ml)	LW	327	340	2	1 000	15
	MS	205	290	4	1 000	13

* Déterminés dans les surnageants de culture, 48 h après l'infection virale.

DISCUSSION

Nous avons cherché à savoir si la différence de sensibilité aux maladies respiratoires observée entre les porcs de race MS et LW pouvait s'expliquer par une différence éventuelle des propriétés fonctionnelles, *in vitro*, des MPA de ces porcs, et/ou à une différence au niveau des Ig locales.

De nos résultats, il ressort les points suivants :

1 – Les concentrations des différentes classes d'Ig des sécrétions trachéobronchiques des porcs des 2 races semblent similaires dans nos conditions de dosage. Il apparaît, par contre, que ces concentrations varient de façon inverse en fonction de l'âge ; ces faits seraient intéressants à confirmer étant donné le rôle important que jouent les Ig au niveau local et notamment les IgA (METZGER, 1975).

2 – Les MPA de porcs MS paraissent plus activés que ceux des porcs LW. En effet les capacités d'adhérence et d'étalement *in vitro*, qui sont considérées comme des critères d'activation (NORTH, 1978) des MPA, sont supérieures dans la race chinoise étudiée. Ce point semble aller à l'encontre de la sensibilité des porcs chinois aux maladies respiratoires, mais on peut émettre l'hypothèse que cette activation est une conséquence d'une stimulation plus importante par divers facteurs (bactéries pathogènes, notamment).

3 – L'activité phagocytaire des MPA de porcs MS semble plus intense vis-à-vis des GRMs. A cet égard, il serait intéressant d'étudier plus précisément cette opsonisation. Notons aussi que les macrophages peuvent être le lieu de la multiplication des germes et être un vecteur de dissémination de la maladie.

4 – Les MPA de porc MS résistent mieux à l'infection par le coronavirus de la G.E.T. que les MPA de porc LW : effets cytopathiques moins marqués et multiplication virale moins intense.

Il ne semble donc pas que l'on puisse relier la différence de sensibilité aux maladies respiratoires à un défaut de propriétés fonctionnelles des MPA de porcs MS. En effet certaines de ces propriétés paraissent même supérieures pour cette race. Cependant, notre étude a porté sur un nombre limité de propriétés fonctionnelles. Des recherches ultérieures portant sur d'autres aspects des fonctions macrophagiques devraient permettre de confirmer ou non ces résultats.

Par ailleurs, des infections respiratoires expérimentales, effectuées à la Station de Pathologie Porcine de Ploufrangan, sur des porcelets SPF des 2 races, n'ont pas permis de confirmer que les porcelets MS sont plus sensibles aux maladies respiratoires que les porcelets LW. Au contraire, les porcs LW présentaient des signes cliniques un peu plus prononcés que les MS (KOBISCH, communication personnelle).

Ces résultats semblent aller dans le même sens que les nôtres. Ils ont été obtenus sur des porcs jeunes alors que les observations effectuées à la Station du Magneraud concernaient des animaux plus âgés. On peut donc émettre l'hypothèse que l'âge pourrait être un facteur déterminant dans l'induction des maladies respiratoires des porcs chinois.

Mais, les maladies respiratoires étant des maladies multifactorielles, bien d'autres facteurs mériteraient d'être étudiés. Citons :

- l'anatomie et la physiologie des voies respiratoires supérieures,
- l'ambiance climatique,
- les lymphocytes-bronchoalvéolaires et le tissu lymphoïde associé aux bronches, etc.

En conclusion, cette étude, bien que partielle, n'a pas permis de déterminer un défaut des propriétés des MPA des porcs MS. Cependant, certaines observations seraient intéressantes à confirmer, notamment la résistance plus importante des MPA de porcs MS à l'infection par le coronavirus de GET.

BIBLIOGRAPHIE

- CHARLEY B., 1978. Rec. Méd. Vét., **154** (7-8), 673-688.
- CHARLEY B., 1982. Ann. Rech. Vét., **13**, 1-9.
- CHARLEY B., 1983. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), **134E**, 51-59.

- CHARLEY B., LECLERC L., PETIT E., CHEDID L., 1983. *Res. Vét. Sci.*, **34**, 212-217.
- LAUDE H., CHARLEY B., GELFI J., 1984. *J. Gen. Virol.*, **65**, 327-332.
- METZGER J.J., PERY P., 1975. *Rec. Méd. Vét.*, **151**, 761-767.
- NORTH R.J., 1978. *J. Immunol.*, **121** (3), 806-816.
- VIRELIZIER J.L., ALLISON A.C. 1976. *Arch. Virol.*, **50**, 279.
- VIRELIZIER J.L., ALLISON A.C., DE MAYER E., 1977. *Infect. Immun.*, **17**, 282.
- VIRELIZIER J.L., 1981. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **92**, 51-64.