

98505

DÉFENSES NON SPÉCIFIQUES CONTRE LA GASTROENTÉRITE TRANSMISSIBLE :

Étude des interactions virus-lymphocytes

B. CHARLEY, H. LAUDE, C. LA BONNARDIÈRE

I.N.R.A. - Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie - 78850 THIVERVAL-GRIGNON

La Gastroentérite transmissible (G.E.T.) est une entérite virale aiguë, particulièrement grave pour le porcelet, puisqu'elle peut entraîner jusqu'à 100% de mortalité chez les animaux âgés de moins de 2 semaines (SAVEY ET LAUDE, 1979). Le virus responsable de cette maladie est un Coronavirus qui se multiplie dans les entérocytes de l'intestin grêle. Cependant, des études récentes indiquent que d'autres cellules et en particulier des cellules immunocompétentes, sont également capables d'interagir avec le virus de la G.E.T. Ainsi, nous avons montré que le virus G.E.T. se multipliait dans des cultures de macrophages alvéolaires de porc, y provoquant l'apparition d'un effet cytopathogène marqué et la production d'interféron (LAUDE *et al.*, 1984). De plus, des macrophages alvéolaires prélevés sur des porcelets expérimentalement infectés, produisent à la fois du virus infectieux et de l'interféron (LA BONNARDIÈRE ET LAUDE, 1983). Ces études sur les interactions virus GET-macrophages suggèrent que la sphère pulmonaire constitue un site d'infection ainsi qu'un lieu de production d'interféron, présent à des titres élevés chez les porcelets infectés (LA BONNARDIÈRE ET LAUDE, 1981).

En prolongement de ces études, nous nous sommes intéressés également aux interactions entre virus GET et lymphocytes, en considérant à la fois les effets du virus sur les lymphocytes et le rôle joué par ces cellules dans la lutte contre l'infection virale. Dans cet exposé nous montrons que le virus GET, bien qu'incapable de se multiplier dans les lymphocytes, déclenche la production d'interféron par ces cellules. D'autre part, les lymphocytes de porcs non immuns se révèlent aptes à limiter la réplication virale *in vitro* et à tuer des cellules infectées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Isolement de lymphocytes

Les lymphocytes sanguins sont préparés après sédimentation des erythrocytes par le Dextran (1 vol. Dextran « 200 » à 50 mg/ml + 3 vol. sang), par centrifugation sur Ficoll-Télébrix.

Les lymphocytes spléniques sont obtenus par dilacération de l'organe puis centrifugation sur Ficoll-Télébrix. Les lymphocytes intestinaux sont préparés par lavage de l'intestin grêle et centrifugation sur Ficoll (H. SALMON, non publié) ou sur Percoll (A. PETIT, non publié).

2) Virus G.E.T.

La souche virale Purdue 115, adaptée à la culture cellulaire a été produite et titrée (en unités formant plaque, UFP) selon les méthodes précédemment décrite (LAUDE, 1981).

3) Interféron

Le titrage d'interféron s'est effectué sur cellules MDBK infectées par le virus VSV (LA BONNARDIÈRE ET LAUDE, 1981).

4) Activité cytotoxique et effet antiviral des lymphocytes de porc

L'activité cytotoxique des lymphocytes est estimée par la mesure du relargage de radioactivité de cellules porcines RPTG infectées, marquées par⁷⁵ Sélénométhionine, trypsinées et incubées 1 nuit en présence des lymphocytes. Dans les mêmes conditions, l'effet antiviral est mesuré par titrage du virus GET présent dans les cocultures RPTG + lymphocytes et dans les cultures RPTG seules.

RÉSULTATS

1) Effets du virus GET sur les lymphocytes de porc

Des lymphocytes de porcs, préparés à partir du sang, de la rate ou de l'intestin ont été incubés *in vitro* avec du virus GET à une multiplicité d'infection de 1 UFP par cellule. Aucune production virale n'a pu être détectée dans ces cultures (24 h et 48 h p.i.), ce qui contraste avec les résultats obtenus dans le cas de l'infection des macrophages (LAUDE *et al.*, 1984).

Dans les mêmes conditions, les lymphocytes infectés produisent très tôt après infection de 100 à 3 000 unités d'interféron par ml (CHARLEY *et al.*, 1983). De plus, une préparation virale inactivée par les rayons ultraviolets (20 mn) est toujours capable d'induire la production d'interféron leucocytaire (figure 1) contrairement à ce qui est observé pour les macrophages (LAUDE ET AL., 1984). Si cette préparation virale (titrant 10^7 UFP/ml avant inactivation) est inactivée aux UV puis injectée par voie veineuse à raison de 5 ml par porcelet de 4 jours, on observe après 18 heures, la production d'interféron sérique (environ 75 unités/ml) qui disparaît 48 h après injection.

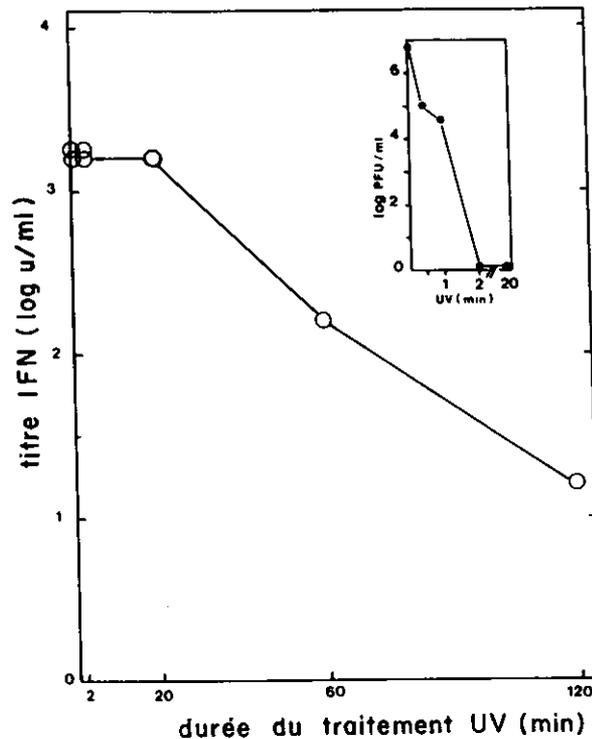
2) Effets des leucocytes de porcs non immuns sur l'infection virale

Des lymphocytes sanguins de porcs, mis en présence de cellules rénales porcines (RPTG) infectées par le virus GET, provoquent une inhibition importante de la multiplication virale (tableau 1). Cette activité lymphocytaire est non-spécifique puisque les lymphocytes proviennent d'animaux dépourvus d'anticorps anti-GET. De plus, elle n'est pas due à la synthèse d'interféron puisque l'inhibition de la multiplication virale persiste en présence d'anticorps anti-interféron.

L'inhibition de la multiplication virale est également observée avec des lymphocytes intestinaux ou des lymphocytes sanguins de porcelets âgés de 8 jours (tableau 1) mais cependant pas avec des cellules non lymphoïdes (rectales ou rénales : tableau 1). Nous avons cherché à savoir si cette action inhibitrice était due à un effet cytotoxique des lymphocytes; en effet, dans

FIGURE 1

EFFETS DE LA DURÉE D'EXPOSITION DU VIRUS GET AUX RAYONS UV SUR LA CAPACITÉ DU VIRUS A INDUIRE DE L'INTERFERON LEUCOCYTAIRE. (1)



(1) La courbe insérée dans la figure a trait à la cinétique d'inactivation du pouvoir infectieux par les UV et indique que 2 mn d'exposition aux UV suffisaient à inactiver la suspension virale

TABLEAU 1

EFFET DES LYMPHOCYTES DE PORC SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS GET EN CULTURE

Origine des cellules (âge)	Pourcentage d'inhibition de la multiplication virale
Lymphocytes sanguins (adulte)	80 à 99 %
Lymphocytes intestinaux (adulte)	53 à 98 %
Lymphocytes sanguins (8 jours)	70 à 94 %
Cellules non lymphoïdes humaines	
• cellules rectales en lignée	0 %
• cellules rénales en lignée	25 %
Thymocytes de souris	0 %

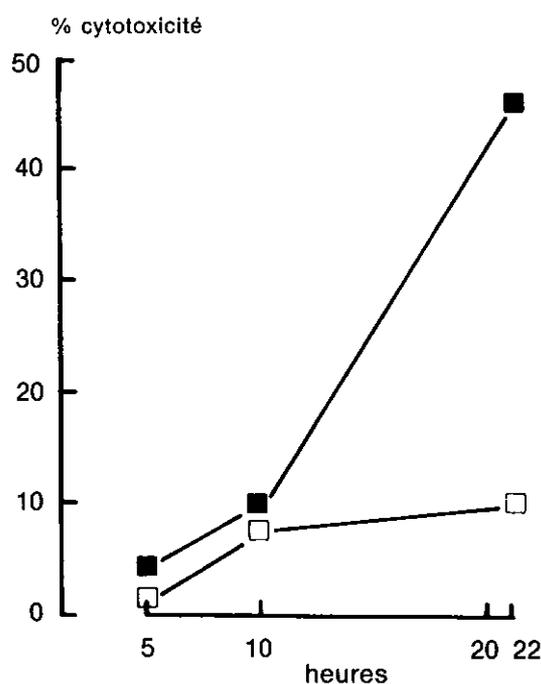
d'autres espèces animales on sait que les lymphocytes peuvent détruire des cellules infectées par un virus avant que celui-ci n'ait accompli son cycle complet de réplication. Cette cytotoxicité spontanée a été étudiée, dans le cas du porc, vis à vis des cellules PK15 infectées par le virus GET (Cepica, 1982).

Par immunofluorescence de membrane, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine E₂, nous observons que des antigènes viraux sont exprimés à la surface des cellules après une nuit d'infection. Dans ces conditions, les lymphocytes sanguins de porcs adultes exercent, en 22 h, une activité cytotoxique nettement plus importante vis à vis des cellules RPTG infectées que vis à vis des cellules non infectées (figure 2).

Dans le même temps, de l'interféron apparaît dans le milieu. Par contre, les lymphocytes de porcelets de 8 jours sont dépourvus d'activité cytotoxique vis à vis des RPTG infectées.

FIGURE 2

CINÉTIQUE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE SPONTANÉE DE LYMPHOCYTES DE PORC ADULTE, VIS-A-VIS DE CELLULES RPTG INFECTÉES (CARRÉS NOIRS) OU NON INFECTÉES (CARRÉS BLANCS)



DISCUSSION

Le virus GET interagit, non seulement avec les entérocytes, mais aussi avec des cellules impliquées dans les défenses immunitaires de l'hôte : macrophages et lymphocytes. Dans les lymphocytes, et en l'absence de toute réplication virale, le virus, même inactivé, est inducteur d'interféron.

Cette propriété est également vraie *in vivo* en remarquant toutefois que la production d'interféron sérique est, alors, beaucoup plus brève que celle qui est induite par le virus pleinement infectieux (La Bonnardière et Laude, 1981). Ces résultats confirment la bonne aptitude du virus GET à induire une défense antivirale non-spécifique, telle que l'interféron, chez le jeune animal.

Les lymphocytes exercent, quant à eux, une influence directe sur la réplication du virus GET : en effet, ils inhibent, indépendamment de l'interféron produit, la multiplication du virus dans

les cellules RPTG infectées. Cette activité antivirale semble, dans l'état actuel de nos recherches, être propre aux leucocytes de porcs puisque des thymocytes de souris et des cellules humaines non lymphoïdes sont inactives. Les lymphocytes de porcs adultes sont également aptes à détruire des cellules RPTG infectées.

Cependant, cette cytotoxicité spontanée ne peut expliquer l'inhibition de la multiplication virale puisque les lymphocytes de porcelets, dépourvus d'activité cytotoxique, peuvent inhiber la répliation virale.

Nous suggérons donc que la sensibilité du porcelet à la GET pourrait être partiellement liée soit à l'absence d'activité cytotoxique spontanée, soit à l'insuffisance de l'activité antivirale due au nombre restreint de lymphocytes chez le jeune. Dans cette perspective, nos efforts vont porter sur la recherche des moyens susceptibles d'accroître l'efficacité de l'activité antivirale et/ou de la cytotoxicité spontanée des lymphocytes de porcelets.

BIBLIOGRAPHIE

- CEPICA A., 1982. Thèse Ph. D., Guelph.
- CHARLEY B., PETIT E., LAUDE H., LA BONNARDIERE C., 1983. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), **134E**, 119-126.
- LA BONNARDIERE C., LAUDE H., 1981. Inf. Immun., **32**, 28-31.
- LA BONNARDIERE C., LAUDE H., 1983. Ann. Rech. Vét., **14**, 507-511.
- LAUDE H., 1981. J. Gen. Virol., **56**, 235-240.
- LAUDE H., CHARLEY B., GELFI J., 1984. J. Gen. Virol., **65**, 327-332.
- SAVEY M., LAUDE H., 1979. Le Point Vétérinaire, **9**, 47-56.