

Facteurs influençant la réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps envers des cellules infectées par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1, BHV 1*)

G. HANTON, B. BROCHIER, E. THIRY, G. DERBOVEN,
P.-P. PASTORET

Service de Virologie, Immunologie et Pathologie des maladies virales,
Faculté de Médecine vétérinaire,
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles, Belgique.

RESUME

La réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) a été réalisée avec des polymorphonucléaires neutrophiles bovins d'origine mammaire en présence d'anticorps dirigés contre des cellules infectées par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine.

La cytolysé spécifique due à l'ADCC s'est avérée maximale après 18 heures d'incubation.

Le sérum frais, par le complément qu'il contient, possède un effet cytolytique propre et renforce l'ADCC.

Les résultats obtenus par la méthode décrite ont été comparés avec ceux obtenus par d'autres auteurs.

Manuscrit déposé le 25.03.1983.

Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.) et le Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.).

Gilles Hanton est boursier de l'Administration Générale de la Coopération au Développement (A.G.C.D.).

INTRODUCTION

La réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity : ADCC) est une réaction de cytotoxicité exercée par certains leucocytes non présensibilisés. Ceux-ci sont en effet capables de lyser sélectivement des cellules présensibilisées par des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes qu'elles portent à leur surface (Mota, 1980 ; Tizard, 1977).

La réaction d'ADCC semble intervenir dans différents phénomènes biologiques, comme le rejet de greffes (Lightbody and Rosenberg, 1974) et la défense antitumorale (Pollack *et al.*, 1972). Cette réaction est intéressante en médecine vétérinaire, car elle joue sans doute également un rôle dans la défense contre les virus et, en particulier, contre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*, BHV 1).

Les cellules attaquées au cours de la réaction d'ADCC sont appelées cellules-cibles (Target cells : TC). Elles comprennent des globules rouges, des cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus (Zarkower *et al.*, 1982 ; Levy *et al.*, 1979 ; Ashworth *et al.*, 1979 ; Kohl *et al.*, 1977).

Les cellules responsables de la cytolysé sont appelées des cellules effectrices (Effector cells : EC). Elles comprennent des macrophages, certains lymphocytes et les polymorphonucléaires neutrophiles (Rentier et Wallen, 1980 ; Shore *et al.*, 1977 ; Rouse *et al.*, 1976 et 1978 ; Gale et Zigelboim, 1975). Toutes les cellules effectrices possèdent un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines (Grewal *et al.*, 1978). Dans l'espèce bovine, les polymorphonucléaires (PMN) mam-

maires constituent la population d'EC la plus efficace dans la lyse de cellules de culture infectées par le virus BHV 1 et sensibilisées par des anticorps spécifiques anti-BHV 1 (Grewal *et al.*, 1977 ; Rouse *et al.*, 1978 ; Wardley *et al.*, 1976b).

Le présent travail se propose de décrire l'évolution de l'ADCC exercée par des PMN bovins en fonction du temps, de contrôler la spécificité de la réaction et de comparer l'efficacité des sérums frais ou inactivés à sensibiliser des cellules infectées par le BHV 1.

MATERIEL ET METHODES

1) Cellules effectrices : les polymorphonucléaires (PMN) sont obtenus suivant la technique de Wardley *et al.* (1976a) en stimulant le quartier du pis d'une génisse par injection de 5 µg de lipopolysaccharides d'*E. Coli* dissous dans 5 ml de milieu Hank's. Les PMN sont récupérés 18 h plus tard en rinçant le quartier injecté à l'aide du même milieu. Ils sont purifiés par dépôt sur Ficoll-Paque (densité 1,077), lavés deux fois, remis en suspension dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium) ou du RPMI ; leur concentration est déterminée et ajustée à 10^7 /ml.

2) Cellules cibles : une couche monocellulaire de cellules GBK (Georgia Bovine Kidney) cultivée en boîte de Petri est recouverte avec un 1 ml de milieu MEM contenant 10^7 PFU de BHV 1 (souche Los Angeles) et 1 mCi de Cr⁵¹. Après 1 h de contact, le virus et le chrome non absorbés sont éliminés et la boîte est incubée pendant 18 h. Les cellules sont alors trypsinisées, lavées deux fois, remises en suspension dans du milieu MEM ou RPMI, leur concentration est déterminée et ajustée à 10^5 /ml.

3) Sérums anti-BHV 1 : ils sont fournis par 2 génisses et 4 taurillons infectés de manière latente. Ces sérums possèdent une forte teneur en anticorps neutralisants (Thiry *et al.*, 1983), une partie du sérum est gardée frais, l'autre est inactivée au bain-marie à 56° pendant 30 minutes. Des dilutions pro-

gressives sont effectuées dans du milieu MEM ou RPMI.

4) Mesure de l'évolution de l'ADCC en fonction du temps. Dans chacun des trous d'une microplaquette, on ajoute successivement 1 ml de suspension de cellules cibles, 1 ml de suspension de PMN et 0,2 ml d'une dilution du sérum inactivé. Pour chaque dilution, 4 essais sont effectués. Des témoins sont obtenus en ajoutant à 1 ml de suspension de cellules cibles soit 1 ml de suspension de PMN (témoin P), soit 1 ml de milieu RPMI (témoin R).

La quantité totale de Cr^{51} contenue dans les cellules cibles est déterminée en ajoutant 1 ml d'une solution à 5 % de Triton X à 1 ml de suspension de cellules cibles.

A intervalles réguliers, les plaques sont centrifugées pendant 5 minutes à 200 g et 110 μl de surnageant sont récupérés dans chaque trou.

L'effet cytolytique est évalué en mesurant la radioactivité (exprimée en coups par minute : cpm) de ce surnageant à l'aide d'un compteur γ .

Afin de compenser l'effet de concentration, la formule suivante est appliquée :

$$R_{\text{en}} = R_{\text{en-1}} + [R_{\text{on}} - R_{\text{on-1}}] \left[\frac{2200 - 110 (11-1)}{2200} \right]$$

R_{e} =radioactivité corrigée en fonction de la concentration

R_{o} =radioactivité mesurée

n =nombre de prélèvements effectués.

La libération spécifique du Cr^{51} (specific release : SR) due à l'ADCC est obtenue par

$$\text{la formule } SR = \frac{X - P}{T - P}$$

X =Cpm de l'échantillon testé, P =Cpm du témoin P

T =Cpm après libération totale du Cr^{51} sous l'action du triton X.

5) Comparaison entre sérum frais et inactivé et confirmation de la spécificité de la réaction.

Les différents composants sont ajoutés dans les trous d'une microplaquette dans les mêmes proportions que précédemment, mais en quantité 10 fois moindre. Après 19 h de réaction, les plaques sont centrifugées et 110 μl de surnageant repris dans chaque trou. La radioactivité est déterminée et la libération spécifique calculée. Des essais sont réalisés parallèlement avec des cellules GBK infectées par le BHV 1 et des cellules GBK indemnes, avec des dilutions de sérum frais et inactivé. Des témoins sont prévus pour juger de l'action du sérum sur des cellules en l'absence de PMN.

6) Un essai d'ADCC est réalisé avec des cellules GBK infectées par le mutant thermosensible du virus BHV 1. (Souche vaccinale ts RLB 106).

RESULTATS

1) Evolution de l'ADCC en fonction du temps

La figure 1 montre la courbe d'évolution de la libération spécifique de Cr due à l'ADCC en fonction du temps. C'est vers 18 heures que cette libération est maximale. L'évolution de la radioactivité des surnageants (non présentée) montre en effet qu'à ce moment, la lyse due à la réaction d'ADCC a atteint un niveau élevé alors que la lyse spontanée des cellules GBK est encore faible. Après 36 heures, la lyse spontanée est telle qu'elle masque celle attribuable à l'ADCC.

2) Comparaison des sérum frais et inactivé

La figure 2 reprend la relation entre les dilutions du sérum d'une des 2 génisses et la libération spécifique. On constate qu'en présence de PMN, la réaction est encore décelable à des dilutions de 1/2 500 du sérum. Le sérum frais montre une activité clairement plus élevée que le sérum inactivé, mais uniquement

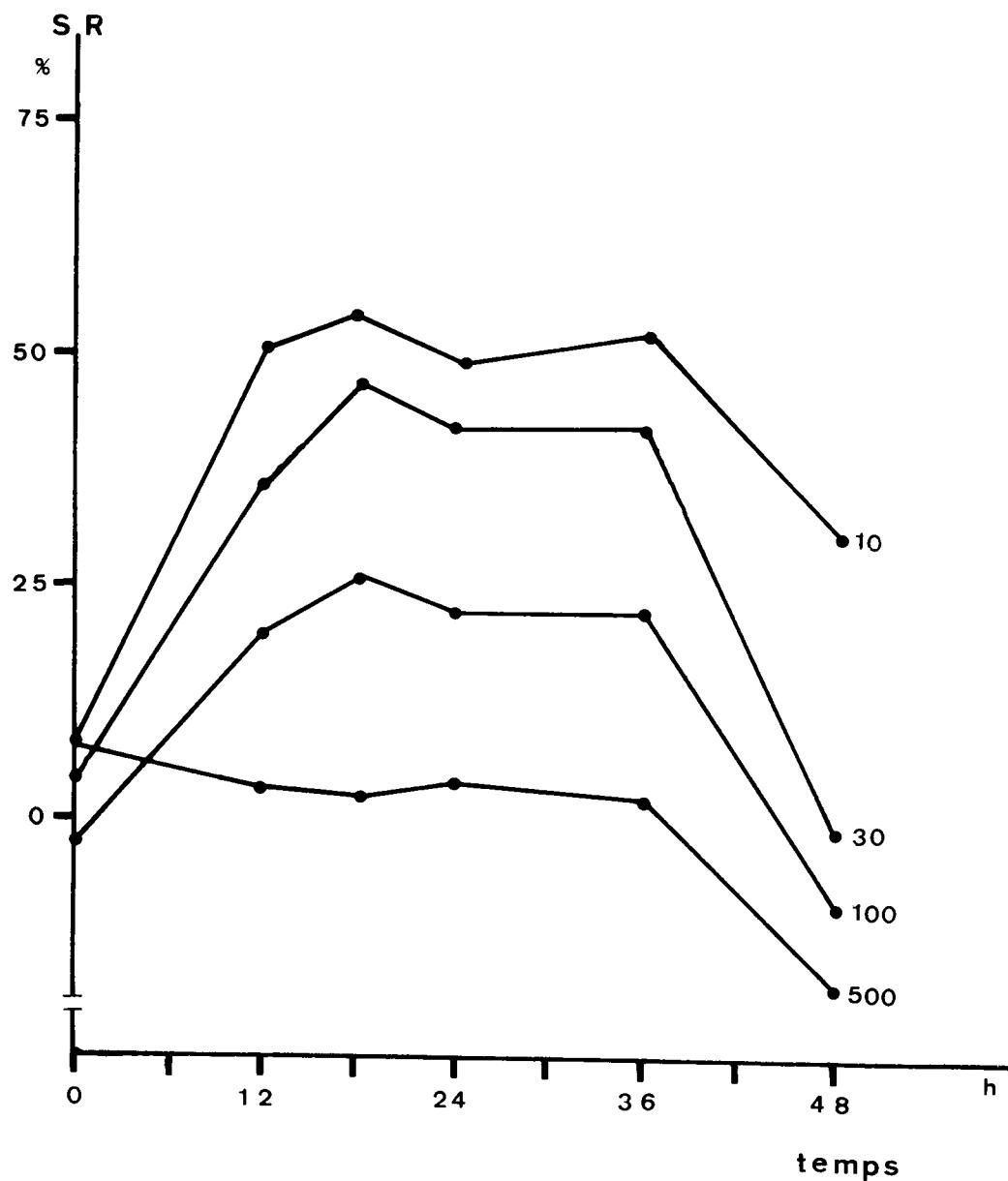


Fig. 1. — Evolution en fonction du temps de l'ADCC envers des cellules GBK infectées par le BHV 1. Dilution 1/10, 1/30, 1/100 et 1/500 du sérum spécifique inactivé.

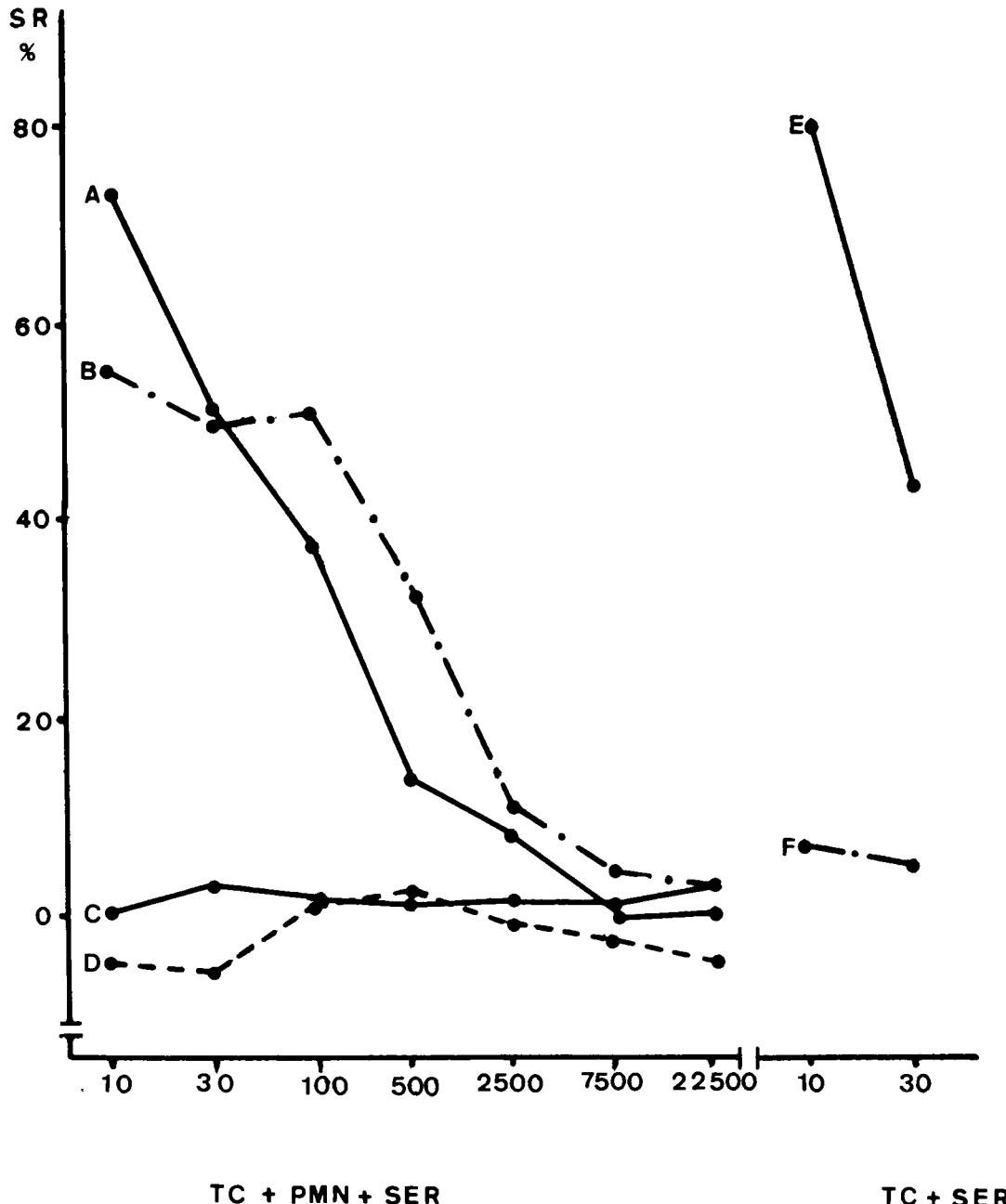


Fig. 2. — Influence de la dilution du sérum sur la lyse de cellules GBK en présence ou en absence de polymorphonucléaires (PMN).

- A. Cellules GBK infectées par le BHV 1 en présence de sérum frais et de PMN.
- B. Cellules GBK infectées par le BHV 1 en présence de sérum inactivé et de PMN.
- C. Cellules GBK indemnes en présence de sérum frais et de PMN.
- D. Cellules GBK indemnes en présence de sérum inactivé et de PMN.
- E. Cellules GBK infectées par le BHV 1 en présence de sérum frais uniquement.
- F. Cellules GBK infectées par le BHV 1 en présence de sérum inactivé uniquement.

aux faibles dilutions. En l'absence de PMN, le sérum inactivé ne conduit qu'à une très faible lyse cellulaire contrairement au sérum frais. Cette comparaison entre sérum frais et inactivé effectuée sur 6 animaux montre que le sérum frais provoque systématiquement une plus forte SR et que le sérum frais est également cytotoxique en l'absence de PMN (résultats non présentés).

3) Spécificité de la réaction

Quelle que soit la concentration du sérum, les PMN sont incapables de lyser des cellules GBK non infectées. Un sérum témoin venant d'un animal indemne d'infection par le BHV 1 s'est révélé incapable d'induire la réaction d'ADCC.

4) Utilisation du mutant t_s

Des cellules GBK infectées par cette souche virale se sont montrées parfaitement sensibles à la réaction d'ADCC.

5) Comparaison entre les milieux MEM et RPMI

Il s'est avéré préférable de suspendre les cellules cibles dans le milieu MEM, la lyse cellulaire spontanée y étant nettement plus faible.

DISCUSSION

Le fait que la libération spécifique de Cr lors de la réaction d'ADCC est maximale vers la 18^e heure correspond aux observations de Rouse *et al.* (1976) chez les bovins et de Ashworth *et al.* (1979) chez le porc.

La spécificité de l'ADCC est clairement confirmée dans nos conditions expé-

imentales. En effet, les PMN ne sont capables de détruire des cellules que si elles sont infectées par le virus BHV 1 et que des anticorps spécifiques sont présents.

L'activité propre du sérum frais (en l'absence de cellules effectrices) peut s'expliquer par l'action du complément (Babiuk *et al.*, 1975) qui est resté intact dans le sérum frais. Par contre, ce composant est détruit par le chauffage à 56° pendant 30 minutes et est donc absent dans le sérum inactivé qui ne provoque de cytolysé qu'en présence de PMN. En présence de PMN, le sérum frais induit une plus forte réaction d'ADCC que le sérum inactivé. Ceci s'explique également par l'existence du complément qui, outre son effet cytolytique propre renforce également l'action des PMN sur des cellules cibles en présence d'anticorps spécifiques (Rouse *et al.*, 1977a et b).

Cet effet de potentialisation n'est observable qu'aux faibles dilutions du sérum car il est probable qu'aux dilutions plus élevées le complément, trop dilué, ne peut plus agir.

Les observations de ce travail correspondent donc bien aux données de la littérature.

Il est intéressant de remarquer que dans la technique utilisée, tous les composants (lignée cellulaire, virus, cellules effectrices, anticorps, complément) sont d'origine bovine. On peut donc espérer que cette méthode constitue un bon modèle d'étude *in vitro* d'une réaction qui *in vivo* doit représenter un des moyens importants de lutte naturelle de l'organisme animal contre le virus BHV 1.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Professeur Babiuk, le Professeur McKercher et le

Docteur De Smedt qui nous ont respectivement fourni la souche de cellules GBK, la souche de virus LA et la souche de virus ts.

BIBLIOGRAPHIE

- ASHWORTH L.A.F., LLOYD B., BASKERVILLE A. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in Aujeszky's disease. *Arch. Virol.*, 1979, **59**, 307.
- BABIUK L.A., WARDLEY R.C., ROUSE B.T. Defense mechanisms against bovine herpesvirus: relationships of virus-host cell events to susceptibility to antibody complement cell lysis. *Infect. Immun.*, 1975, **12**, 958.
- GALE R.P., ZIGHELBOIM J. Polymorphonuclear leukocytes in antibody dependent cellular cytotoxicity. *J. Immun.*, 1975, **114**, 1047.
- GREWAL A.S., ROUSE B.T., BABIUK L.A. Mechanisms of resistance to herpesvirus: Comparison of the effectiveness of different cell types in mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Infect. Immun.*, 1977, **15**, 698.
- GREWAL A.S., ROUSE B.T., BABIUK L.A. Characterization of surface receptors on bovine leukocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 1978, **56**, 289.
- KOHL S., STARR S.E., OLESKE J.M., SHORE S.L., ASHMAN R.B., NAHMIAS A.J. Human monocyte-macrophage-mediated antibody dependent cytotoxicity to herpes simplex virus-infected cells. *J. Immun.*, 1977, **118**, 729.
- LIGHTBODY J.J., ROSENBERG J.C. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in prospective kidney transplant recipients. *J. Immunol.*, 1974, **112**, 890.
- LEVY P.C., SHAW G.M., LOBUGLIO A.E. Human monocyte, lymphocyte and granulocyte antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity towards tumor cells. I. general characteristics of cytolysis. *J. Immunol.*, 1979, **123**, 594.
- MOTA I., 1981. Activity of immune cells. In : « Fundamentals of immunology », Bier O.G., Dias da Silva W., Götze D., Mota I., Springer-Verlag, New York — Heidelberg, Berlin, 43.
- POLLACK S., HEPPNER G., BRAWN R.J., NELSON K. Specific killing of tumor cells *in vitro* in the presence of normal lymphoid cells and sera from hosts immune to the tumor antigens. *Int. J. Cancer.*, 1972, **9**, 316.
- RENTIER B., WALLEN W. Scanning and transmission electron microscopy study of antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity on measles virus-infected cells. *Infect. Immun.*, 1980, **30**, 305.
- ROUSE B.T., WARDLEY R.C., BABIUK L.A. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in cows: comparison of effector cell activity against heterologous erythorocyte and herpesvirus infected bovine target cells. *Infect. Immun.*, 1976, **13**, 1433.
- ROUSE B.T., GREWAL A.S., BABIUK L.A. Complement enhances antibody-dependent cell cytotoxicity. *Nature*, 1977, **266**, 456.
- ROUSE B.T., GREWAL A.S., BABIUK L.A., FUJIMIYA Y. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of herpesvirus-infected cells by complement. *Infect. Immun.*, 1977, **18**, 660.
- ROUSE B.T., BABIUK L.A., HENSON P.M. Neutrophils are mediators of antiviral immunity. *Experientia*, 1978, **31**, 346.
- SHORE S.L., MELEWICZ M., GORDON D.S. The mononuclear cell in human blood which mediates antibody-dependent cellular cytotoxicity to virus-infected target cells. I identification of the population of effector cells. *J. Immun.*, 1977, **118**, 558.
- THIRY E., BROCHIER B., HANTON G., DERBOVEN G., PASTORET P.-P. Réactivation du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. (*Bovine herpesvirus 1 : BHV 1*) non accompagnée de réexcrétion de particules infectieuses, après injection de dexaméthasone, chez des bovins préalablement soumis au test d'hyper-sensibilité retardée au BHV-1. *Ann. Méd. Vét.*, 1983, **127**, 377.
- TIZARD I.R., 1977. An introduction to veterinary immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia - London - Toronto, 90-91.
- WARDLEY R.C., ROUSE B.T., BABIUK L.A. The mammary gland of the ox: a convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages. *J. Retic. Soc.*, 1976, **19**, 29.

WARDLEY R.C., ROUSE B.T., BABIUK L.A.
Antibody-dependent cytotoxicity mediated by neutrophils : a possible mechanism of anti-viral defense. *J. Retic. Soc.*, 1976, **19**, 323.

ZARKOWER A., ESKEW M.L., SCHEUCHENZUBER W.Z., FERGUSON F.B., CONFER F. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 1590.

SUMMARY

Factors influencing the reaction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cells infected by infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovine herpesvirus 1, BHV 1*).

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity was performed with bovine mammary neutrophils and *Bovine herpesvirus 1*—infected target cells.

Maximum specific cytolysis occurs after an 18-hours incubation period. Fresh serum has its own lytic activity and enhances the ADCC.

This fact was related to the presence of complement.

The results obtained by the described method were compared with those obtained by other authors.