

# Le test de transformation lymphoblastique pour l'étude de l'immunocompétence du bétail

B. BROCHIER \*, P.-P. PASTORET \*, E. THIRY \*, J. ROUPAIN \*\*,

Ch. MICHAUX \*\*, G. DERBOVEN \*, O. BARTA \*\*\*

\* Service de Virologie-Immunologie,

\*\* Service de Génétique,  
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège,  
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles, Belgique.

\*\*\* Department of Veterinary Microbiology and Parasitology,  
School of Veterinary Medicine,  
Louisiana State University,  
Baton-Rouge, Louisiana, U.S.A.

## 1) Principe du test de transformation lymphoblastique (TTL) :

Le principe de la technique repose sur la découverte faite par Nowell (1960) que la phytohémagglutinine (PHA) transforme *in vitro* les petits lymphocytes en cellules prolifératives.

En effet, des lymphocytes cultivés *in vitro* se transforment en cellules prolifératives ou lymphoblastes sous l'effet d'une stimulation par des substances mitogènes spécifiques ou non. Cette transformation est d'ailleurs un stade obligé lors de toute réponse immunitaire chez un animal et précède la différenciation en cellules effectrices de l'immunité. *In vitro*, la prolifération est estimée par l'addition de thy-

midine tritiée au milieu de culture et par la mesure de son incorporation dans le DNA des cellules filles.

Parmi les mitogènes figurent les phyto-mitogènes : ce sont des lectines d'origine végétale, dont les plus couramment utilisées sont la concanavaline A (Con A), le pokeweed mitogen (PWM) et la phyto-hémagglutinine (PHA) ; ils exercent une action stimulante peu spécifique sur l'ensemble de la population lymphocytaire.

Une stimulation beaucoup plus spécifique, limitée à un nombre restreint de clones lymphocytaires provenant d'un animal préalablement sensibilisé est induite par l'utilisation d'antigènes (viraux, bactériens, cellulaires, ...).

En outre, testant la réponse des lymphocytes humains et porcins en présence de PHA, Forsdijke a, en 1967, établi que l'addition de sérum au milieu de culture était indispensable à la bonne survie et à la prolifération des lymphocytes.

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.).

Manuscrit déposé le 7-10-1982.

Le test de transformation lymphoblastique permet donc de sonder l'aptitude des lymphocytes à se multiplier en réponse à certains stimuli ; il s'agit d'un test fonctionnel des lymphocytes.

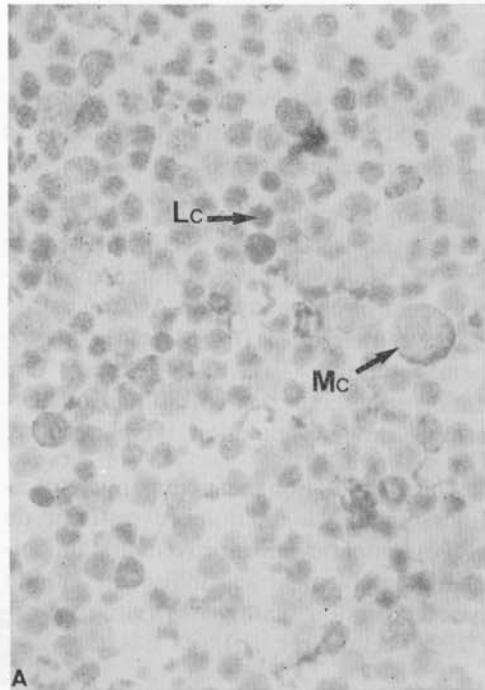
Les caractéristiques de base du TTL pratiqué à l'aide de lymphocytes d'origine bovine ont été étudiées par Lazary *et al.* (1974) et Muscoplat et collaborateurs (1974). Il a été largement utilisé depuis (Kristensen *et al.*, 1982).

La figure 1 illustre la transformation d'un lymphocyte en lymphoblaste (forme proliférative) alors que la figure 2 donne

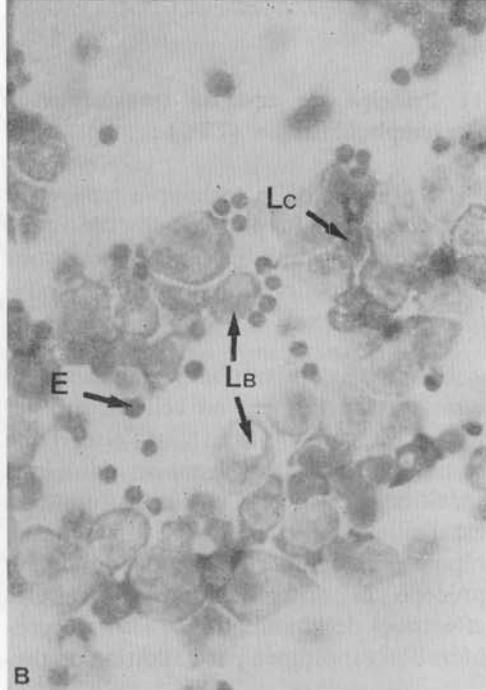
le schéma du test tel qu'il est généralement pratiqué.

## 2) Intérêt du TTL :

En immunologie clinique, le TTL permet d'évaluer l'immunocompétence des animaux (Barta et Oyekan, 1981) ou une part des fluctuations immunitaires qui accompagnent de nombreuses maladies animales (Kristensen *et al.*, 1982). Le TTL permet notamment de détecter un déficit fonctionnel immunitaire (Biberfeld *et al.*, 1974) sans pour cela qu'une lymphopénie soit décelée (Lopez *et al.*, 1975).



1. A.



1. B.

Fig. 1. — A : population de cellules sanguines mononucléées isolées sur coussin de Ficoll-Paque, avant sa mise en culture. B : même population après 3 jours de culture en présence de PHA ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Préparations colorées au Diff-Quick après centrifugation sur lame en cytocentrifugeuse (CYTOSPIN). Grossissement  $400\times$ .

Lc=lymphocyte, Lb=lymphoblaste, Mc=monocyte et E=érythrocyte.

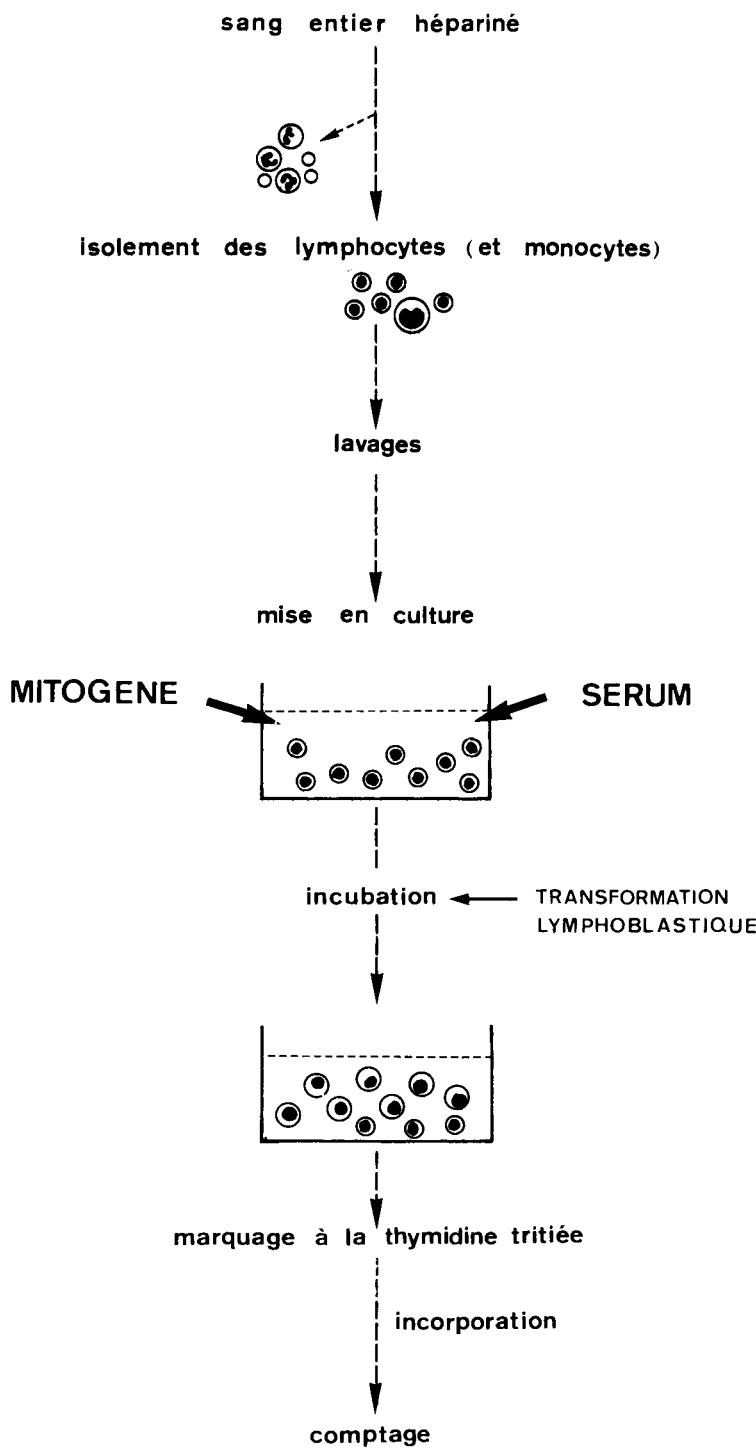


Fig. 2. — Schéma du test de transformation lymphoblastique.

**3) Facteurs qui influencent les résultats obtenus par le TTL :**

L'ensemble des variables influençant le test est donné au tableau 1.

TABLEAU 1. — Variables dépendantes de la technique utilisée qui influencent les résultats du test.

<i>Variables influençant les résultats du test :</i>	
— LYMPHOCYTES :	
— technique d'isolement	
— concentration finale dans le milieu	
— durée d'incubation.	
— SERUM :	
— origine	
— quantité ajoutée au milieu.	
— MITOGENES :	
— type	
— concentration.	
— MARQUAGE A LA THY -H <sub>3</sub> :	
— durée d'incorporation	
— concentration.	

a) *Sérum* (origine et concentration dans le milieu) :

Le sérum contient des macromolécules et des facteurs de faible poids moléculaire qui exercent des effets de régulation sur la multiplication des cellules (Forsdijke, 1973 ; Walker et Lucas, 1971 ; Yachnin et Raymond, 1975).

Ces facteurs sériques sont encore mal définis et l'effet complexe du sérum entier n'est qu'imparfaitement compris.

Chez l'animal, la compétence immunitaire dépend donc à la fois de la capacité fonctionnelle des lymphocytes, et de la présence dans les liquides organiques de facteurs susceptibles d'influencer les fonctions lymphocytaires. L'action suppressive du sérum est, par exemple, rapportée

pour de nombreuses maladies infectieuses (Barta et Oyekan, 1981).

En immunologie clinique, la distinction entre un déficit fonctionnel des lymphocytes et une action depressive du sérum nécessite dès lors l'addition au milieu de culture de plusieurs types de sérum : du sérum autologue, frais et inactivé, du sérum homologue et/ou du sérum de veau foetal.

Le rapport entre les concentrations de sérum et de mitogène exerce également une influence (Forsdijke, 1967).

b) *Mitogènes* :

Influence de la multiplication spontanée des lymphocytes :

La multiplication spontanée des lymphocytes (background de stimulation), c'est-à-dire en l'absence de mitogène, est systématiquement mesurée en vue de calculer l'indice de stimulation, mais constitue également une information à elle seule car elle varie en intensité.

De nombreux facteurs influencent cette activité spontanée des lymphocytes ; certains ont pu être déterminés (ex. : âge et état sanitaire de l'animal, environnement, corticostéroïdes, ...) mais beaucoup d'entre eux sont encore inconnus.

Chez les bovins sains que nous avons examinés, les valeurs de multiplication spontanée variaient d'environ 200 à plusieurs milliers de coups par minute. Des variations d'une telle amplitude ont également été observées au cours du temps.

*Influence qualitative des mitogènes :*

Chez le bovin, les trois lectines les plus couramment utilisées (Con A, PWM et PHA) stimulent préférentiellement la population lymphocytaire thymodérivée

(lymphocytes T), alors que les lymphocytes B répondent à un moindre degré à la Con A et au PWM et très faiblement à la PHA (Rouse et Babuik, 1974 ; Lazary *et al.*, 1974 ; Muscoplat *et al.*, 1974a et b ; Pearson *et al.*, 1979).

Cette caractéristique influence nécessairement le test.

#### *Influence quantitative des mitogènes :*

La prolifération maximale des cellules dépend également de la concentration du milieu nutritif en mitogène. L'utilisation de plusieurs concentrations de chaque mitogène permet d'établir les courbes dose-réponse correspondantes et ensuite d'estimer les doses optimales et suboptimales à utiliser ultérieurement.

La concentration optimale est celle qui induit une stimulation maximale des lymphocytes, la concentration suboptimale correspond à une stimulation équivalente à 50 % de celle obtenue par la dose optimale. Les concentrations de stimulation propres à chaque phytomitogène utilisé sont données par le tableau 2.

TABLEAU 2. — Concentrations optimales et suboptimales de stimulation, propres aux trois mitogènes utilisés.

mitogène	dose	
	suboptimale	optimale
CON A	5 µg/ml	15 µg/ml
PWM	2 µg/ml	10 µg/ml
PHA	25 µg/ml	50 µg/ml

#### **4) Interprétation des résultats :**

La mesure d'incorporation de la thymidine tritiée dans le DNA des lympho-

cytes en multiplication est exprimée en coups par minute (cpm). Les chiffres obtenus sans stimulation (multiplication spontanée) et avec chacun des mitogènes sont comparés entre eux et examinés séparément.

Les réponses aux mitogènes, observées dans les cultures lymphocytaires stimulées, sont comparées entre elles en vue de mesurer l'influence éventuelle du type de mitogène utilisé, de sa concentration, et également du type de sérum ajouté.

L'indice de stimulation (IS) est calculé en divisant la valeur obtenue pour les cellules stimulées par celle obtenue pour des cellules non stimulées. L'interprétation des résultats d'un TTL doit se faire en comparant les valeurs obtenues chez l'animal testé avec celles obtenues chez d'autres animaux témoins testés simultanément.

Il est également souhaitable, pour s'assurer de la reproductibilité de la technique, de comparer les résultats obtenus à l'issue d'une manipulation antérieure.

#### **5) Conclusions**

Le test de transformation lymphoblastique doit être interprété avec beaucoup de précautions. L'utilisation simultanée de plusieurs types de sérums (Barta *et al.*, 1982) évite les erreurs qui pourraient résulter des effets modulateurs du sérum. L'emploi simultané des doses optimales et suboptimales des différents mitogènes permet de réunir les conditions propres à une bonne standardisation du test. Les valeurs de multiplication spontanée des lymphocytes constituent une information en soi et doivent être examinées soigneusement avant de considérer l'indice de stimulation.

Quoi qu'il en soit, le TTL, correctement utilisé, est un excellent instrument pour évaluer l'immunocompétence des animaux, car il renseigne sur la capacité fonctionnelle des lymphocytes et autorise la comparaison d'animaux contemporains.

Lorsqu'il s'agit d'étudier les profils immunologiques accompagnant certaines

maladies ou de mesurer l'influence de divers facteurs (environnementaux, endocrinien, ...) sur la fonction lymphocytaire, il nous semble préférable de considérer de manière plus approfondie et absolue les valeurs du background et des réponses aux différents mitogènes.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARTA O., OYEKAN P.P. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis.*, 1981, **4**, 209.
- BARTA O., OYEKAN P.P., WALTMAN C. In : O. Barta (Editeur), Manuel of Veterinary Clinical Immunology, 2nd Edition, School of Veterinary Medicine LSU, Baton Rouge, LA, U.S.A., 1982, B5/1 - B5/14.
- BIBERFELD G., BIBERFELD P., STERMER G. Cell mediated immune response following *Mycoplasma pneumoniae* infection in man. I. Lymphocyte stimulation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1974, **17**, 29.
- FORSDIJKE D.R. Quantitative nucleic acid changes during phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in vitro. Dependence of the response on phytohemagglutinin-serum ratio. *Biochem. J.*, 1967, **105**, 679.
- FORSDIJKE D.R. Serum and lymphocyte activation by phytohemagglutinin. *Exp. Cell. Res.*, 1973, **77**, 216.
- KRISTENSEN F., KRISTENSEN B., LAZARY S. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1982, **3**, 203.
- LAZARY S., RIVERA E., DE WECK A.L., GERBER H., NICOLET J. In vitro stimulation of bovine leucocytes by phytohemagglutinin and other mitogens. *Res. Vet. Sci.*, 1974, **17**, 344.
- LOPEZ C., SIMMONS R.L., TOURNAINE J.L., PARK B.M., FISZKISS D.F., NAJARIAN J.S., GOOD R.A. Discrepancy between PHA responsiveness and quantitative estimates of T cell numbers during chronic renal failure and immunosuppression after transplantation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1975, **4**, 135.
- MUSCOPLAT C.C., ALHAJI I., JOHNSON D.W., POMEROY K.A., OLSON J.M., LARSON V.L., STEVENS J.B., SORENSEN D.K. Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytic cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1974a, **35**, 1053.
- MUSCOPLAT C.C., CHEN A.W., JOHNSON D.W., ALHAJI I. In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. *Am. J. Vet. Res.*, 1974b, **35**, 1557.
- NOWELL P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 1960, **20**, 462.
- PEARSON T.W., ROELANTS G.E., LUNDIN L.B., MAYOR-WHITEY K.S. The bovine lymphoid system binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. *J. Immunol. Methods*, 1979, **26**, 271.
- RENSHAW H.W., ECKBLAD W.P., EVERSON D.O., TASSINARI P.D., AMOS D., Ontogeny of immunocompetence in cattle: evaluation of phytomitogen induced in vitro bovine fetal lymphocyte blastogenesis, using a whole blood culture technique. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, **38**, 1141.
- ROUSE B.T., BABIUK L.A. Host response to infectious bovine rhinotracheitis virus. III: isolation and immunologic activities of bovine T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1974, **113**, 1391.
- WALKER S., LUCAS Z.J. Mitogen-serum relationship in transformation of lymphocytes in vitro. In : McIntyre O.R. (Editeur), Proceedings of the Fourth Leukocyte Culture Conference, 1971. Appleton-Century-Crofts, New York, NY, 49-56.
- YACHNIN S., RAYMOND J. An absolute requirement for serum macromolecules in phytohemagglutinin-induced human lymphocyte DNA synthesis. *Clin. Exp. Immunol.*, 1975, **22**, 153.