



HAL
open science

INDUCTION D'UNE ACTIVITÉ INTERFÉRON DANS LE MUCUS NASAL CHEZ LE VEAU PAR L'ASSOCIATION LÉVAMISOLE PAR VOIE GÉNÉRALE-VIRUS INACTIVÉ PAR VOIE LOCALE

C. Le Jan, J. Asso

► To cite this version:

C. Le Jan, J. Asso. INDUCTION D'UNE ACTIVITÉ INTERFÉRON DANS LE MUCUS NASAL CHEZ LE VEAU PAR L'ASSOCIATION LÉVAMISOLE PAR VOIE GÉNÉRALE-VIRUS INACTIVÉ PAR VOIE LOCALE. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1980, 11 (3), pp.307-312. <hal-00901281>

HAL Id: hal-00901281

<https://hal.science/hal-00901281v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

INDUCTION D'UNE ACTIVITÉ INTERFÉRON DANS LE MUCUS NASAL CHEZ LE VEAU PAR L'ASSOCIATION LÉVAMISOLE PAR VOIE GÉNÉRALE-VIRUS INACTIVÉ PAR VOIE LOCALE

C. LE JAN et J. ASSO

Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, I.N.R.A., 78850 Thiverval-Grignon, France

Summary

INDUCTION OF INTERFERON ACTIVITY IN NASAL MUCUS BY ASSOCIATION LEVAMISOLE BY SYSTEMIC ROUTE — INACTIVATED VIRUS BY LOCAL ROUTE. — Calf respiratory disease could have a non-specific origin. The respiratory tract bacterial flora is pathogen only if the animal faces stress which decreases the defence capacities of the respiratory mucosa. The simultaneous administration of UV irradiated IBR virus by nasal route and of levamisole by systemic route induces a protection which is accompanied by interferon synthesis in the nasal mucus. This protection is evaluated experimentally with an infectious IBR virus challenge. In the natural conditions the respiratory disease loses its transmissible aspect in the treated calves.

Le rôle protecteur, *in vivo*, de l'interféron lors d'infection virale a été clairement établi (Gresser *et al.*, 1976). Cette protection s'explique par l'action de l'interféron sur les cellules sensibles au virus, comme *in vitro*, mais peut aussi être liée à ses effets modulateurs des réactions immunitaires et activateurs des fonctions de cellules telles que macrophages et *natural killer* (Huddleston *et al.*, 1979). L'interféron peut être un élément important de la défense de l'organisme lors d'infections à étiologie virale multiple et mal définie ; c'est le cas des pneumonies enzootiques du jeune veau en élevage industriel, qui se traduisent pendant une période très courte (les quatre premières semaines de la vie) par des affections dont l'agent initiateur est viral (Parainfluenza 3, virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, adénovirus, réovirus, ...). Cette variété des agents isolés indique le rôle prédominant dans cette pathologie d'une diminution des défenses par les agressions contingentes aux

modalités de l'élevage intensif (Asso et Le Jan, 1977). On peut donc espérer protéger le veau soit en induisant une synthèse d'interféron local, qui limitera l'extension de l'infection virale, soit en stimulant les défenses cellulaires : l'interféron détecté alors sera une lymphokine produite par les lymphocytes activés. Mais les essais d'induction d'interféron chez le bovin se sont révélés décevants : la tylorone et les inducteurs synthétiques, tels que poly I-C, ne sont actifs qu'à une dose très proche de la dose toxique ; d'autre part, une première induction par ces substances est suivie d'une période de non-réactivité (Rosenquist, 1973). Le meilleur inducteur au niveau de la muqueuse respiratoire serait un virus vivant : lors d'infection expérimentale par voie intranasale avec le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (virus IBR), une synthèse locale d'interféron se produit durant la période de multiplication du virus : l'activité interféron disparaît quand cesse l'excrétion virale

(Rosenquist et Loan, 1969 ; Gerber *et al.*, 1978). Par contre, une administration intranasale d'une souche vaccinale de virus IBR rend le bovin réfractaire à une épreuve pratiquée quatre jours plus tard avec un rhinovirus (Cummins et Rosenquist, 1980). L'interféron, pour être efficace, doit être présent avant l'infection virale. Mais l'emploi par voie locale de virus vivants, contagieux, n'est pas recommandé en élevage. Nous avons donc cherché à stimuler l'apparition d'une activité interféron dans le mucus nasal en combinant : 1) un contact de la muqueuse nasale avec une souche de virus IBR inactivée par irradiation aux ultraviolets, et 2) un traitement par voie générale avec un immunostimulant, le lévamisole. Cette substance a été choisie parce qu'elle s'élimine partiellement par la muqueuse respiratoire, et parce que c'est un stimulant bien connu des fonctions T dépendantes, des monocytes et des macrophages, en particulier chez les individus déprimés (Rosenquist, 1973 ; Schreiber et Parsons, 1977 ; Soppi *et al.*, 1978).

Matériel et Méthodes

Virus

Le virus utilisé pour ce travail est une souche de virus IBR, isolée du terrain et adaptée à la culture sur cellules MDBK (plus de cinquante passages). Le titre des suspensions atteint, après 48 h de culture à 37 °C, 10⁷ UFP/ml. Cette souche n'est pas pathogène pour le veau, son inoculation ne provoque que de légers signes cliniques (jetage dans les jours suivant l'infection expérimentale). Le virus est inactivé par irradiation aux ultraviolets (20 min à 15 cm d'une lampe de 15 watts, General Electric), pour éviter toute possibilité de multiplication et de transmission du virus. La suspension après irradiation, n'exprime aucun pouvoir infectieux résiduel sur cultures de cellules *in vitro*.

Animaux d'expérience

Les lots d'expérience sont constitués de veaux de race Holstein-Frisonne, âgés de 8 à 15 jours et pesant environ 50 kg.

Lévamisole

Le lévamisole est administré par voie intramusculaire, sous forme d'une solution à 15 % (Nemisol Specia, lot n° 137).

Traitement des animaux

Le traitement consiste en la combinaison d'une instillation par voie intranasale de virus IBR inactivé (5 ml dans chaque narine d'une suspension titrant, avant inactivation, 10⁷ UFP/ml), et de lévamisole par voie intramusculaire. Le virus et le lévamisole sont administrés simultanément le premier jour : le lévamisole seul est réadministré toutes les 48 heures. Le traitement complet est renouvelé après une semaine.

Prélèvements de mucus nasal

Le mucus nasal est collecté au moyen d'éponges placées dans les cavités nasales durant 3-5 min. 5 ml de milieu Earle-lactalbumine sont ajoutés sur chaque éponge ; le liquide est exprimé à l'aide d'une seringue. L'effluent est immédiatement congelé. La qualité de l'éponge est importante : nous avons utilisé des cubes calibrés de Spon-tex (N.D.).

Recherche de virus

1 ml d'une dilution au 1/50 de l'échantillon de mucus nasal est distribué sur 6 cupules d'une microplaque de cellules MDBK, et incubé 3 jours à 37 °C.

Recherche d'anticorps spécifiques du virus de l'IBR

1 ml d'une dilution au 1/5 de l'échantillon de mucus nasal est chauffé 30 min à 56 °C, puis mêlé à 100 et 1000 UFP de virus IBR. Après incubation de 12 heures à 37 °C, le virus résiduel est recherché sur cultures de cellules MDBK, après dilution au 1/10.

Recherche d'une activité interféron

0,2 ml de l'échantillon de mucus nasal ou de sérum sont dilués de 1/3 en 1/3 sur cellules MDBK (4 cupules d'une microplaque pour chaque dilution). La culture est incubée une nuit à 37 °C, lavée et exposée à une quantité de VSV capable de détruire les cultures témoins en 36 heures à 37 °C (200 UFP/0,2 ml). La même technique est employée après traitement de l'échantillon 24 heures à pH 2 (4 °C). Une préparation standard d'interféron de bovin, produite sur cellules primaires de rein de veau par induction avec le virus de Newcastle, est incluse dans chaque série de mesures comme témoin positif.

Tableau 1. — Activité interféron dans le mucus nasal

Groupe 1	veau (n°)	jours après le début du traitement								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
		nature du traitement ^a								
		V + L	L	L	...	V + L	L	L
	1	0 ^b	30	30	30	0	30	90	30	0
	2	0	270	90	90	0	90	90	90	0
	3	0	30	90	30	0	90	30	90	0
	4	0	90	270	90	0	90	90	30	0
	5	0	30	30	0	0	270	90	90	0
	6	0	90	90	30	0	30	90	30	0

a : V = virus IBR irradié par voie intranasale ; L = lévamisole (5 mg/kg) par voie intramusculaire.

b : inverse de la dilution du mucus qui protège totalement le tapis de cellules MDBK contre 200 UFP de VSV dans nos conditions expérimentales.

Groupes 2, 3 et 4

ces groupes de six animaux chacun ont reçu :
 soit le virus IBR irradié et le lévamisole (2,5 mg/kg)
 soit le virus inactivé seul
 soit le lévamisole (5 mg/kg) seul

Aucune activité interféron n'a été détectée dans leur mucus nasal

Résultats.

Activité interféron dans le mucus nasal (Tabl. 1)

Lorsque les veaux ont reçu, selon le protocole décrit, le virus irradié par voie intranasale et le lévamisole par voie intramusculaire à la dose de 5 mg/kg, une activité interféron apparaît dans le mucus nasal ; elle se maintient si elle est entretenue par des réinoculations de lévamisole.

Lorsque les veaux ont reçu, selon le protocole décrit, le virus irradié par voie intranasale et le lévamisole par voie intramusculaire à la dose de 2,5 mg/kg, aucune activité interféron n'est détectable dans le mucus nasal.

Lorsque les veaux ont reçu le virus inactivé par voie intranasale, sans inoculation intramusculaire de lévamisole, aucune activité interféron n'est détectable dans le mucus nasal.

Lorsque les veaux ont reçu une inoculation intramusculaire de lévamisole à la dose de

5 mg/kg, sans administration intranasale de virus irradié, aucune activité interféron n'est détectable dans le mucus nasal.

Aucune activité interféron n'a été détectée dans le sérum des animaux des différents groupes.

Inoculation d'épreuve (Tabl. 2)

Une épreuve avec virus IBR vivant est pratiquée sur des animaux ayant reçu soit l'association lévamisole-virus irradié, soit le virus irradié seul. Les résultats, regroupés dans le tableau 2, montrent que l'administration du virus inactivé et de lévamisole prévient la multiplication du virus IBR lors d'une épreuve avec virus vivant.

Excrétion de virus IBR dans le mucus nasal

Aucune excrétion de virus IBR n'a été détectée chez les animaux ayant reçu le virus inactivé par voie intranasale, ni chez les animaux témoins.

Tableau 2. — Epreuve avec le virus vivant

Groupe 1

six veaux :

inoculés au jour 0 avec du virus IBR irradié par voie intranasale
 et avec du lévamisole (5 mg/kg) par voie intramusculaire
 au jour 2 avec du lévamisole (5 mg/kg) par voie intramusculaire
 éprouvés au jour 4 avec le virus IBR vivant par voie intranasale

Aucun virus IBR n'est isolé à partir du mucus nasal durant les quinze jours qui suivent l'épreuve

Groupe 2

six veaux :

inoculés au jour 0 avec du virus IBR irradié par voie intranasale
 éprouvés au jour 4 avec du virus IBR vivant par voie intranasale

Veau (n°)	Jours après l'épreuve														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	+ ^a	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

a : + = détection du virus dans le mucus nasal.

Anticorps anti-IBR

L'administration par voie intranasale du virus inactivé n'a pas induit la synthèse d'anticorps neutralisant spécifiquement le virus de l'IBR dans le mucus nasal, même en présence de lévamisole.

Discussion

L'administration de lévamisole par voie intramusculaire associée à une instillation intranasale de virus IBR irradié induit l'apparition dans le mucus nasal d'une activité interféron ; cette activité, fugace (48 h), est entretenue par des réinoculations de lévamisole. Dix jours après le début de l'induction, il faut associer à l'inoculation de lévamisole une nouvelle instillation de virus inactivé. Ce phénomène est dose-dépendant pour le lévamisole.

Un double signal est nécessaire pour l'induction locale de l'activité interféron : un contact de la muqueuse nasale avec du virus inactivé, et un traitement par voie générale

avec du lévamisole. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène.

Le lévamisole et le virus inactivé peuvent agir sur deux types différents de cellules, l'un dans le sang, l'autre dans la muqueuse respiratoire. Le lévamisole active les monocytes du sang, et accélère leur migration vers les muqueuses (Schreiber et Parsons, 1977 ; Amery, 1978 ; Anderson *et al.*, 1979) ; le virus inactivé touche directement les cellules de la muqueuse respiratoire. L'interféron pourrait être sécrété par les macrophages stimulés par le lévamisole dans les zones lymphoépithéliales de la muqueuse qui a reçu le virus irradié. Ces macrophages stimulés pourraient aussi amplifier la synthèse d'interféron par les lymphocytes touchés par le virus.

Le rôle des monocytes est souligné par l'activité transitoire du lévamisole sur la synthèse d'interféron. Si l'on veut entretenir la production d'interféron nasal, il faut répéter l'administration du lévamisole toutes les 48 heures. Par contre, une seule injection de lévamisole provoque la maturation du pool de

lymphocytes T immatures, et il faut trois semaines pour retrouver des lymphocytes sensibles à l'action du lévamisole (Amery, 1978). Chez le veau, le lévamisole (7 mg/kg) augmente la réponse des lymphocytes circulant pendant au moins 5 jours (Le Jan, soumis pour publication). L'intervention des lymphocytes T paraît peu probable dans la synthèse d'interféron nasal, sauf si elle résulte d'une coopération entre lymphocytes T et monocytes activés par le lévamisole. On peut aussi envisager l'intervention du lévamisole, ou de ses métabolites, directement sur les cellules de la muqueuse en contact avec le virus.

Enfin le lévamisole ou ses métabolites pourraient avoir un effet direct sur les cellules de la muqueuse : on sait que le lévamisole augmente le métabolisme cellulaire, et particulièrement les arrangements microtubulaires (Symoens et Rosenthal, 1977). Les cellules qui ont subi l'action du lévamisole répondraient de façon intense et persistante au virus irradié.

Une caractérisation de l'interféron induit dans le mucus nasal, et particulièrement de ses propriétés biologiques, donnera une première indication sur les cellules impliquées dans sa synthèse : interféron de type 1 produit par des cellules épithéliales, ou interféron de type 2, lymphokine produite par les cellules lymphoïdes activées.

Les veaux qui produisent de l'interféron dans leurs voies respiratoires résistent à une inoculation d'épreuve avec du virus infectieux. Nous avons appliqué cette méthode sur le terrain. Pour des raisons pratiques, nous avons administré le lévamisole par voie buccale. Les résultats obtenus sur plus de 3000 veaux montrent l'efficacité de la protection dans les lots traités : l'incidence des maladies respiratoires d'allure contagieuse est nettement diminuée au cours des trois premières semaines de la vie.

Accepté pour publication, le 18 juin 1980.

Résumé

La maladie respiratoire du veau pourrait avoir une origine non spécifique : la flore du tractus respiratoire ne devient pathogène que si l'animal subit des agressions qui diminuent les capacités de défense de la muqueuse respiratoire. L'administration simultanée de virus IBR irradié par voie nasale et de lévamisole par voie générale induit une protection qui se manifeste par l'apparition d'interféron dans le mucus nasal. Cette protection est évaluée expérimentalement par une épreuve avec du virus IBR infectieux. Sur le terrain, la maladie respiratoire perd son allure contagieuse chez les veaux traités.

Références

- AMERY W.K., 1978. The mechanism of action of levamisole : immune restoration through enhanced cell maturation. *J. Ret. Endoth. Soc.*, **24**, 187-193.
- ANDERSON R., OOSTHUIZEN R., THERON A., VAN RENSBURG A.J., 1979. The *in vitro* evaluation of certain neutrophil and lymphocyte functions following the ingestion of 150 mg oral dose of levamisole : assessment of the extent and duration of neutrophil chemotaxis, protein iodination and lymphocyte transformation. *Clin. Exp. Imm.*, **35**, 478-483.
- ASSO J., LE JAN C., 1977. Viral infections of the respiratory tract of calves : local immunity. *Vet. Sci. Comm.*, **1**, 297-305.
- CUMMINS J.M., ROSENQUIST B.D., 1980. Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **141**, 161-165.
- GERBER J.D., MARRON A.E., KUCERA C.J., 1978. Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to IBR virus vaccines administered intranasally or intramuscularly. *Am. J. Vet. Res.*, **39**, 753-760.
- GRESSER I., TOVEY M.G., BANDU M.I., MAURY C., BROUTY-BOYE D., 1976. Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. I. Rapid evolution of encephalomyocarditis virus infection. *J. Exp. Med.*, **144**, 1305-1315.
- HUDDLESTONE J.R., MERIGAN Jr T.C., OLDSTONE M.B.A., 1979. Induction and kinetics of natural killer cells in human following interferon therapy. *Nature*, **282**, 417-419.

- LE JAN C. *In vivo* effects of levamisole on responses of blood lymphocytes to T mitogens in calf. Soumis pour publication.
- ROSENQUIST B.D., 1973. Induction and biological significance of interferon, with particular reference to cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 821-824.
- ROSENQUIST B.D., LOAN R.W., 1969. Interferon induction in the bovine species by IBR virus. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 1305-1312.
- SCHREIBER A.D., PARSONS J.N., 1977. Effect of levamisole on the human monocyte IgG receptor. *J. Immunol.*, **118**, 1119-1121.
- SOPPI E., FRAKI J., ESKOLA J., RUUSKANEN O. 1978. Effect of levamisole on the maturation of guinea pig thymocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **11**, 318-327.
- SYMOENS J., ROSENTHAL M., 1977. Levamisole in the modulation of the immune response : the current experimental and clinical status. *J. Retic. Endoth. Soc.*, **21**, 175-221.