

# CARACTÉRISATION DE PLUSIEURS ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE L'INTERFÉRON GAMMA PORCIN

Sophie LAVERNE, Laurence LAVENANT, B. CHARLEY

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches de Virologie et d'Immunologie, 78850 THIVERVAL-GRIGNON

## 1. INTRODUCTION

L'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), produit par des lymphocytes T activés, est caractérisé par son activité antivirale puisqu'il est capable de protéger des cellules vis à vis des infections virales. De plus l'IFN $\gamma$  possède de nombreuses activités immunomodulatrices. Pour ces deux raisons, cette molécule fait l'objet de recherches intensives afin d'en définir d'éventuelles applications thérapeutiques. Des études menées chez les bovins ont d'ores et déjà démontré que l'injection d'une préparation d'IFN $\gamma$  bovin obtenu par génie génétique (IFN $\gamma$  recombinant) empêchait l'apparition des symptômes de fièvre des transports et compensait l'effet immunodépresseur du virus de l'herpès bovin (Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1987). Le développement des techniques de recombinaison génétique permet maintenant d'obtenir des quantités de matériel biologique, produit par des bactéries recombinantes, qui soient compatibles avec une bonne évaluation de son activité.

Dans cette communication, nous présentons les premiers résultats obtenus ayant trait aux effets antiviraux et immunomodulateurs de l'interféron gamma porcine obtenu par recombinaison génétique.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. INTERFÉRON

L'interféron  $\gamma$  recombinant porcine purifié (rPoIFN $\gamma$ ) a été gracieusement fourni par Ciba Geigy limited (Bâle, Suisse). Son activité spécifique est de 5 à 10 x 10<sup>6</sup> unités antivirales par mg de protéine.

### 2.2. TITRAGE DE L'IFN

Le titrage de l'effet antiviral de l'IFN est réalisé en microplaques à fond plat selon la technique décrite par La Bonnardière et Laude (1981) : des tapis de cellules rénales porcines (lignée PD5) sont prétraitées une nuit par différentes dilutions d'IFN puis infectées par le Coronavirus de la Gastroentérite

transmissible (GET) à différentes multiplicités d'infection (Laude, 1981). Les titres d'IFN sont exprimés par la dilution maximale entraînant une protection totale des cellules vis à vis de l'effet cytopathique du virus.

### 2.3. STIMULATION DE L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE SPONTANÉE DES LYMPHOCYTES DU PORC

Des lymphocytes du sang périphérique de porcs Large White âgés de plus de 2 mois et de porcelets de 4 à 8 jours ont été isolés par centrifugation sur Ficoll, puis mis en cultures et prétraités une nuit avec l'IFN (Charley *et al.*, 1985). Leur activité cytotoxique (ou NK) est ensuite évaluée par leur capacité de tuer des cellules tumorales humaines K562, par un test de relargage de chrome 51 en 4 heures (Charley *et al.*, 1983). Les résultats des tests de cytotoxicité sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité.

### 2.4. INDUCTION DE PRODUCTION D'INTERLEUKINE 1 PAR LES MONOCYTES

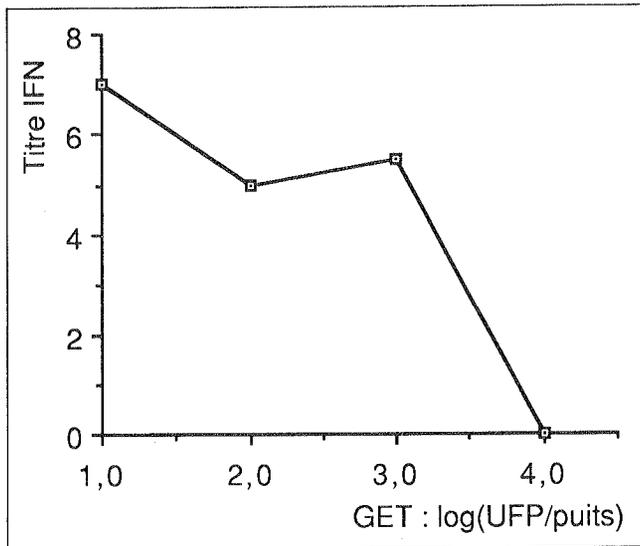
Le protocole utilisé est celui qui a été décrit par Arenzana-Seisdedos *et al.* (1985) pour les monocytes humains : des cultures de leucocytes sanguins de porcs enrichies en cellules adhérentes sont maintenues en survie 3 jours à 37°C puis traitées par l'IFN de nouveau 3 jours à 37°C. L'IFN est alors remplacé par du lipopolysaccharide (24 h à 37°C) puis les surnageants des monocytes activés sont prélevés, cependant que le contenu des cellules est récupéré par 3 cycles de congélation-décongélation. L'interleukine 1 (IL1) sécrétée par les monocytes, et intracellulaire, est titrée par incorporation de thymidine sur thymocytes de souris (Laverne et Charley, article en préparation). Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) de thymidine tritiée incorporée.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE L'IFN $\gamma$ PORCIN VIS A VIS DU VIRUS GET

L'IFN $\gamma$  porcine recombinant exerce une activité antivirale sur des cellules rénales porcines infectées par le virus GET : lorsque ces tapis cellulaires sont traités avec une dose de  $5 \times 10^4$  unités/ml de rPoIFN $\gamma$ , elles deviennent résistantes à l'infection par des doses virales inférieures ou égales à  $10^3$  unités formant plaque (UFP) par puits de culture (figure 1).

**FIGURE 1**  
ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE L'IFN $\gamma$  PORCIN RECOMBINANT SUR CELLULES RÉNALES PORCINES PD5 INFECTÉES PAR LE VIRUS GET  
variation du titre protecteur ( $\log_3$  de la plus haute dilution protectrice) en fonction du titre infectieux du virus d'épreuve ( $\log_{10}$  unités formant plaque par puits de culture)



#### 3.2. EFFET DE L'IFN PORCIN SUR L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES LYMPHOCYTES

Le prétraitement de lymphocytes de porcs âgés de plus de 2 mois, par des doses d'IFN $\gamma$  recombinant supérieures ou égales à  $0,1 \mu\text{g/ml}$  (environ  $10^3$  unités/ml) (Tableau 1) provoque une stimulation significative de leur activité cytotoxique. A la dose de  $1 \mu\text{g/ml}$  (environ  $10^4$  unités/ml) l'IFN porcine recombinant stimule aussi significativement l'activité cytotoxique (NK) de lymphocytes de porcelets âgés de moins d'une semaine (Tableau 2).

**TABLEAU 1**  
EFFET DE L'IFN $\gamma$  PORCIN RECOMBINANT SUR L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE (NK) DE LYMPHOCYTES DE PORCS ÂGÉS DE PLUS DE 2 MOIS

| rPoIFN $\gamma$ (ng/ml) | % CYTOTOXICITÉ   |                  |
|-------------------------|------------------|------------------|
|                         | valeurs extrêmes | moyenne (n=8)    |
| 0                       | 4,9 - 9,7        | 7,6              |
| 10                      | 5,2 - 15,2       | 10,5 (NS)        |
| $10^2$                  | 7,7 - 20,2       | 12,3 (p < 0,02)  |
| $10^3$                  | 8,7 - 18,5       | 12,9 (p < 0,001) |
| $10^4$                  | 8 - 18,7         | 15 (p < 0,001)   |

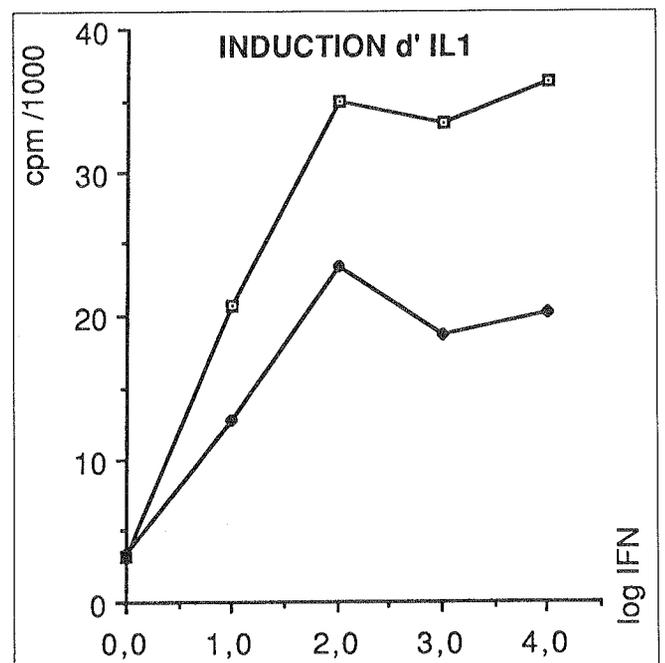
**TABLEAU 2**  
EFFET SUR L'IFN $\gamma$  PORCIN RECOMBINANT ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) SUR L'ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE (NK) DE LYMPHOCYTES DE 9 PORCELETS ÂGÉS DE 4 A 8 JOURS

| % DE CYTOTOXICITÉ |         |            |
|-------------------|---------|------------|
| Témoins           | Traités |            |
| 0                 | 0,5     | (p < 0,01) |
| 0                 | 7,9     |            |
| 0                 | 4,9     |            |
| 4,7               | 15,1    |            |
| 5,3               | 41,2    |            |
| 9                 | 28,2    |            |
| 11                | 24,5    |            |
| 14,7              | 27,3    |            |
| 20,1              | 25,9    |            |

#### 3.3. EFFET DE L'IFN $\gamma$ PORCIN SUR L'ACTIVATION DES MONOCYTES DE PORC

Des monocytes sanguins de porcs maintenus en culture pendant 6 jours puis incubés 1 nuit en présence de lipopolysaccharide (LPS) ne produisent pas d'IL1. De même, l'incubation de ces monocytes avec l'IFN $\gamma$  seul est sans effet. Par contre, le traitement de cultures de monocytes âgés de 3 jours par diverses doses d'IFN $\gamma$  pendant 3 jours, suivi de l'induction par le LPS, provoque la production intracellulaire et surtout la sécrétion d'une activité IL1 détectable dans les surnageants de monocytes. Cette activité IL1 est induite par des doses d'IFN $\gamma$  supérieures ou égales à  $100 \text{ ng/ml}$  ( $10^3$  unités/ml) (Figure 2).

**FIGURE 2**  
EFFET ACTIVATEUR DE L'IFN $\gamma$  PORCIN RECOMBINANT SUR LA PRODUCTION D'INTERLEUKINE 1 (14) PAR LES MONOCYTES SANGUINS PORCINS



L'activité IL1 est titrée par incorporation de thymidine tritiée (cpm) sur thymocytes de souris. Cette activité dans les surnageants de monocytes (courbe du haut) et dans les cellules elles-mêmes (courbe du bas) varie en fonction de la dose d'IFN $\gamma$  (en ng/ml)

#### 4. DISCUSSION

Une bonne évaluation des rôles biologiques de l'IFN $\gamma$  porcin et, ultérieurement, de ses applications thérapeutiques éventuelles, n'a été rendue possible que par l'obtention récente de produit par des bactéries recombinantes. Les premiers résultats obtenus nous indiquent que cet IFN $\gamma$  porcin exerce un effet antiviral vis à vis de l'infection de cellules rénales porcines par le Coronavirus de la GET. De plus, comme ce virus est également capable de se multiplier dans les macrophages pulmonaires du porc (Laude *et al.*, 1984), il est intéressant de noter que l'IFN $\gamma$  porcin protège également ces cellules de l'infection par le virus GET (Charley *et al.*, article soumis pour publication).

En plus de cet effet antiviral, nous montrons que l'IFN $\gamma$  porcin exerce des activités immunomodulatrices puisqu'il active les fonctions cytotoxiques naturelles (NK) des lymphocytes de porc et de porcelet et qu'il intervient comme premier signal dans l'activation des monocytes sanguins de porc, cette activation étant ici mesurée par la production d'Interleukine 1. Ces deux types d'activité (cytotoxique et macrophagique) sont importantes à considérer car elles interviennent dans les défenses naturelles, ou non spécifiques, des animaux à l'égard des maladies infectieuses. Ces premiers résultats *in vitro* ne constituent bien entendu que l'étape préalable à l'étude plus poussée de l'IFN $\gamma$ . Cependant, si on se réfère aux résultats encourageants obtenus chez les bovins (Biele-

feldt Ohmann *et al.*, 1987), il sera important de chercher à savoir si l'administration d'IFN $\gamma$  à des périodes de la vie du porc où il est particulièrement vulnérable (période néonatale, sevrage) permettra d'accroître ses moyens de lutte anti-infectieuse.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Docteur Vétérinaire S. MARTINOD (Ciba Geigy Santé Animale, St. Aubin, Suisse) qui nous a fourni gracieusement l'IFN $\gamma$  porcin recombinant, ainsi que Monsieur BONNEAU (INRA, Saint Gilles) qui a mis à notre disposition les porcelets.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ARENZANA-SEISDEDOS F., VIRELIZIER J.L., FIERES W., 1985. J. Immunol., **134**, 2444-2448.
- BIELEFELDT OHMANN H., LAWMAN M.J.P., BABIUK L.A., 1987. Antiviral Research, **7**, 187-210.
- CHARLEY B., PETIT E., LAUDE H., LA BONNARDIÈRE C., 1983. Ann. Virol. (Inst. Pasteur), **134 E**, 119-126.
- CHARLEY B., PETIT E., LA BONNARDIÈRE C., 1985. Ann. Rech. Vét., **16**, 399-402.
- LA BONNARDIÈRE C., LAUDE H., 1981. Infect. Immun., **32**, 28-31.
- LAUDE H., 1981. J. gen. Virol., **56**, 235-240.
- LAUDE H., CHARLEY B., GELFI J., 1984. J. gen. Virol., **65**, 327-332.