

P 7504

**LA REPONSE IMMUNITAIRE DU PORCELET**  
**EFFETS DE L'IMMUNITE PASSIVE SUR L'IMMUNISATION DU PORCELET**  
**INDUITE A L'AIDE D'UN ANTIGENE INERTE : LE LYSOZYME**

*P. ROUZE, M. HOUDAYER et J.J. METZGER*

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

Lors des dernières journées de la Recherche Porcine nous avons exposé les premiers résultats montrant l'apparition d'une immunité active induite contre le lysozyme, en présence d'une immunité spécifique d'origine colostrale, chez des animaux sevrés (1). Nous avons pu étendre cette même observation aux porcelets nouveau-nés (2), ceux-ci étant capables d'effectuer une réponse immunitaire anti-lysozyme de même nature que celle développée chez des adultes (3). Il est possible d'obtenir, par injection intrapéritonéale d'immunoglobulines spécifiques, une immunisation passive des porcelets comparable à l'immunité sérique conférée par la voie naturelle colostro-intestinale (2). Nous avons pu définir des conditions optimales d'immunisation du porcelet par le lysozyme. L'emploi d'adjuvant complet de Freund (ACF) permet d'utiliser des doses immunisantes d'antigène au moins 100 fois plus faibles (1 mg/100 mg). La polymérisation accroît 20 fois l'immunogénicité du lysozyme. Dans ces conditions la stimulation antigénique par le lysozyme permet le développement d'une immunité active chez les animaux, quel que soit leur âge (de 7 jours à 2 mois) et la quantité des anticorps passifs mesurés par hémagglutination passive (de 5 à 9 log<sub>2</sub>), sans que la dose immunisante optimale soit augmentée (2). Ces résultats, en contradiction avec ceux de travaux publiés précédemment (4, 5) nous ont conduits à penser que s'il existe un seuil d'anticorps passifs au-delà duquel on observe le phénomène d'inhibition de la réponse immunitaire active (5), ce seuil pour le lysozyme et dans les conditions décrites ci-dessus doit être supérieur à 9 log<sub>2</sub> (2).

Dans le but de rechercher les facteurs susceptibles d'affecter le niveau de ce seuil, nous nous sommes proposés de tester, dans ce travail, l'effet d'une stimulation antigénique en absence d'ACF chez les porcs passivement immunisés.

Cette étude a été réalisée simultanément et sur les mêmes animaux que ceux de l'expérience présentée par G. CORTIER dans ces Journées (6), ce qui nous a permis d'apporter un contrôle réciproque des résultats de chaque expérience par l'utilisation sur un même animal de deux antigènes différents, de comparer dans une même expérience les résultats obtenus avec un antigène vivant (une souche thermosensible du virus de la Peste porcine classique (7)) et un antigène protéique inerte (le lysozyme), et enfin d'apprécier les effets de l'épreuve par un virus virulent sur l'immunité envers un autre antigène.

#### **MATERIEL ET METHODES**

48 porcelets au sevrage, pesant de 15 à 20 kg et provenant d'un élevage conventionnel ont été répartis au hasard par lots de 12. A l'intérieur de chaque lot les animaux sont divisés en 3 groupes selon les différents traitements subis.

● **Calendrier et mode d'injection** (tableau 1) :

— Au jour 0 chaque porc a reçu en une seule injection intrapéritonéale 50 ml de solution contenant suivant les lots A, B, C ou D respectivement 0, 100, 200 et 400 mg d'anticorps anti-lysozyme et 400, 200, 50 et 0 mg d'anticorps anti-virus de la Peste porcine (VPP). Toutes les injections ont été ajustées à 400 mg par addition d'immunoglobulines non spécifiques.

— Au jour 3, à l'intérieur de chaque lot, les groupes de 4 ont été constitués : le premier ne recevant aucun antigène sert à contrôler la disparition des anticorps injectés passivement, le second reçoit par voie intra-

musculaire 9 mg de lysozyme copolymérisé tandis qu'il reçoit le virus vaccinal (souche Thiverval) par instillation nasale ; le troisième reçoit par voie pernasale 80 mg de lysozyme copolymérisé en même temps que le virus vaccinal par voie intramusculaire.

– Au jour 104, chez tous les animaux, on procède à une injection de rappel par voie intramusculaire : de 20 mg de lysozyme natif.

– Au jour 125 une dose d'épreuve virulente de  $10^6$  UFP de virus de la Peste porcine classique (souche Alfort) est administrée par instillation nasale à tous les porcelets.

**TABLEAU 1**  
REPARTITION DES DIFFERENTS LOTS ET GROUPES PAR TRAITEMENT

| L<br>O<br>T<br>S | IMMUNITE PASSIVE             |                               |   | IMMUNISATION ACTIVE                            |           |      |                     |        | RAPPEL<br>ET EPREUVE |                                     |                                    |                                       |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|---|--|-----------|------|---------------------|--------|----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
|                  | Jour 0                       |                               |   | Jour 3   |           |      |                     |        | Jour 104             | Jour 125                            |                                    |                                       |
|                  | ANTICORPS<br>ANTI-LZ<br>(mg) | ANTICORPS<br>ANTI-VPP<br>(mg) | IMMUNO-<br>GLOBULINES<br>NON<br>SPECIFIQUES<br>(mg) | S<br>Y<br>M<br>B<br>O<br>L<br>I<br>Q<br>U<br>E | Lz - BGG  |      | SOUCHE<br>THIVERVAL |        | dose<br>(UFP)        | voie                                |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   |  | dose (mg) | voie | dose (UFP)          | voie   |                      |                                     |                                    |                                       |
| A                | 0                            | 400                           | 0   | x  | 0         | 0    | X                   | 0      | X                    | IDENTIQUES<br>POUR TOUS<br>LES LOTS |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | ●  | 9         | 36   | I.M.                | $10^5$ | I.N.                 |                                     |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | □  | 80        | 320  | I.N.                | $10^4$ | I.M.                 |                                     |                                    |                                       |
| B                | 100                          | 200                           | 100   | x  | 0         | 0    | X                   | 0      | X                    |                                     | RAPPEL :<br>20 mg Lz natif<br>I.M. |                                       |
|                  |                              |                               |   | ●  | 9         | 36   | I.M.                | $10^5$ | I.N.                 |                                     |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | □  | 80        | 320  | I.N.                | $10^4$ | I.M.                 |                                     |                                    |                                       |
| C                | 200                          | 50                            | 150   | x  | 0         | 0    | X                   | 0      | X                    |                                     |                                    | EPREUVE :<br>$10^6$ UFP virus<br>I.N. |
|                  |                              |                               |   | ●  | 9         | 36   | I.M.                | $10^5$ | I.N.                 |                                     |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | □  | 80        | 320  | I.N.                | $10^4$ | I.M.                 |                                     |                                    |                                       |
| D                | 400                          | 0                             | 0   | x  | 0         | 0    | X                   | 0      | X                    |                                     |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | ●  | 9         | 36   | I.M.                | $10^5$ | I.N.                 |                                     |                                    |                                       |
|                  |                              |                               |   | □  | 80        | 320  | I.N.                | $10^4$ | I.M.                 |                                     |                                    |                                       |

● **Préparation des immunoglobulines non spécifiques et des anticorps :**

Des immunoglobulines non spécifiques ont été préparées à partir de sérum normal de porc qui, après avoir été précipité par un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, ont été éluées sur colonne de DE 52 équilibrée en tampon phosphate 0.01 M pH 8. Les anticorps anti-lysozyme et anti VPP ont été obtenus par la même technique à partir d'antisérums hyperimmuns. Après lyophilisation les anticorps et les immunoglobulines non spécifiques ont été dissous à 8 g/l en sérum glucosé hypertonique préalablement filtré et contenant des antibiotiques.

### ● Antigènes :

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule (Boehringer) a été copolymérisé avec la gamma globuline de bœuf (BGG Pentex) dans la proportion de 1 pour 4, à l'aide de la glutaraldehyde selon la technique décrite par AVRAMEAS (8). Le gel obtenu a été dispersé finement et injecté en solution physiologique. Pour l'injection de rappel 20 mg de lysozyme natif ont été dissous dans 2 ml de solution physiologique et inoculés par voie intramusculaire.

### ● Titrage des anticorps :

Les animaux sont saignés au jour 0 puis à intervalle hebdomadaire par ponction dans la veine cave antérieure. Les sérums, après décomplémentation et absorption à l'aide d'érythrocytes de mouton, sont titrés pour leur activité anti-lysozyme et anti-BGG par la technique d'hémagglutination passive (9, 3).

## RESULTATS

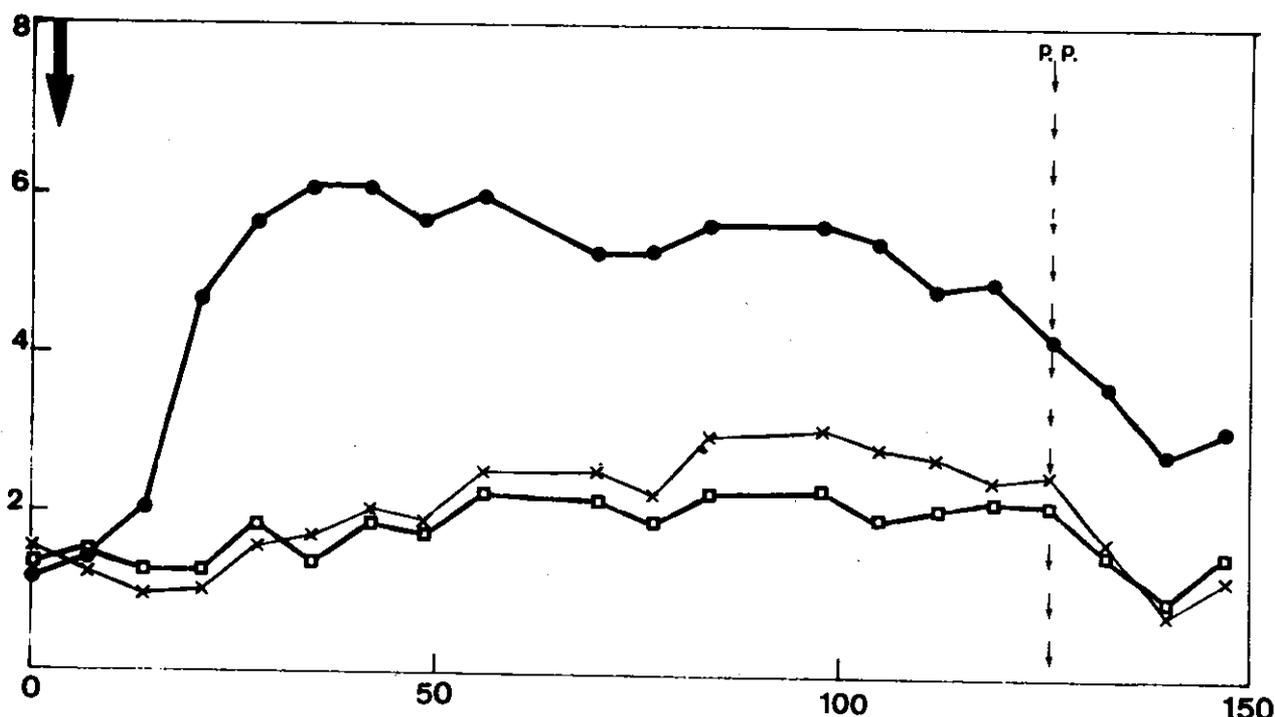
### 1/ Analyse de la réponse primaire

La copolymérisation du lysozyme avec la BGG lors de la première injection d'antigène nous permet d'analyser la réponse primaire en anticorps anti-BGG dans les sérums de porcelets ayant reçu soit 36 mg de BGG par voie intramusculaire, soit 320 mg de BGG par voie intranasale.

La figure 1 nous montre une cinétique de synthèse d'anticorps caractéristique d'une réponse primaire chez les animaux immunisés par voie parentérale (le titre des anticorps hémagglutinants atteint 6 log<sub>2</sub> dès la 4<sup>ème</sup> semaine) alors que chez ceux qui ont reçu la BGG par voie intranasale il n'apparaît pas de réponse significative.

FIGURE 1

CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES ANTICORPS ANTI-BGG



— en abscisse : temps en jour, en ordonnée : titre en anticorps hémagglutinants (log<sub>2</sub>).  
 — la flèche indique le moment de l'immunisation (jour 3), le trait fleché (p.p.) l'épreuve virulente par la Peste porcine (jour 125)  
 — quantité et voie d'injection de l'antigène  
 ●—● 36 mg, I.M. ; □—□ 320 mg, I.N. ; x—x 0 mg (témoin).

En l'absence d'anticorps passifs (fig. 2A) une première injection de lysozyme, la dose étant 4 fois plus faible que celle de la BGG, conduit à une réponse en anticorps anti-lysozyme d'un niveau très faible chez les animaux inoculés par voie intramusculaire et non significativement différente des contrôles chez ceux inoculés par voie nasale.

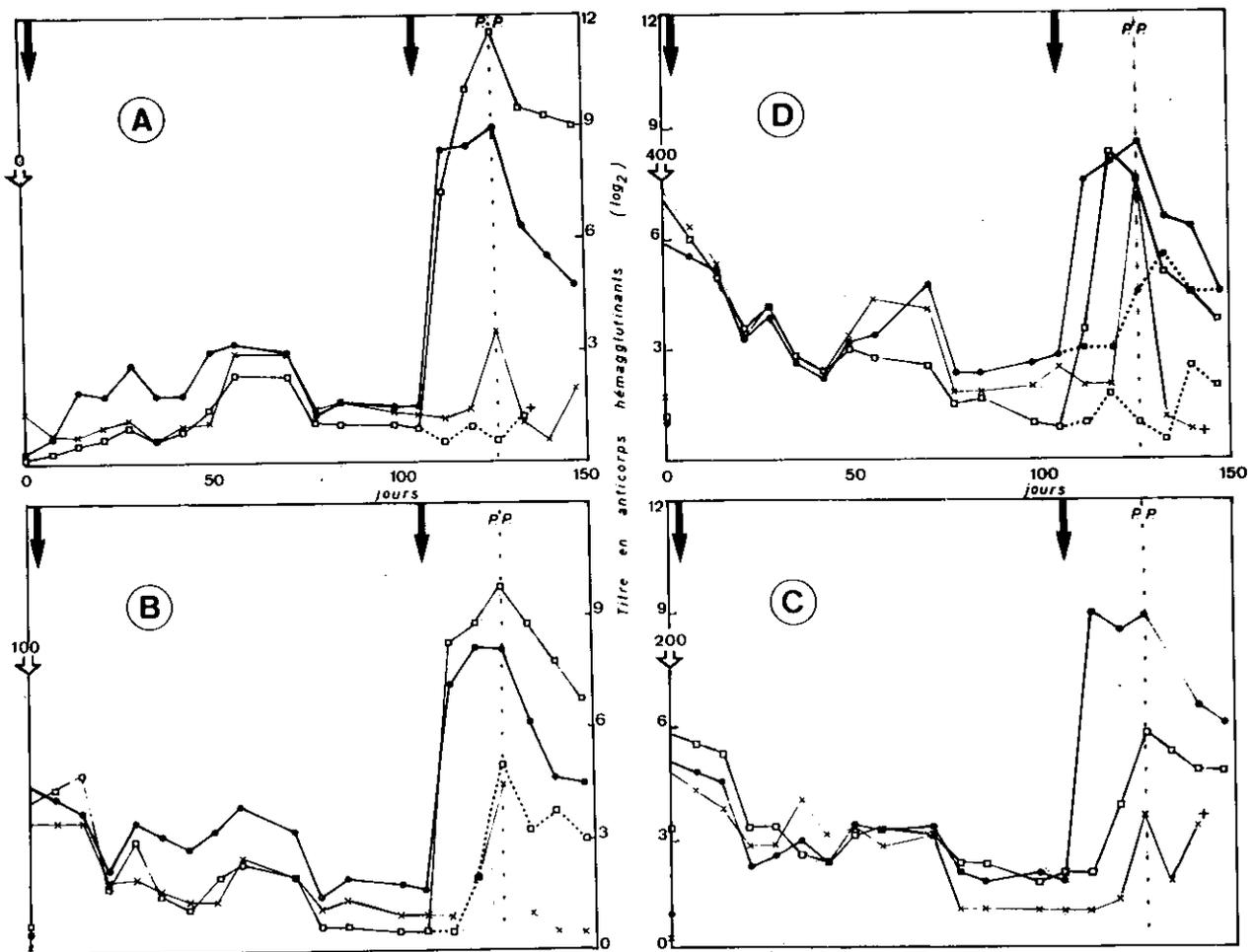
## 2/ Analyse de la réponse anti-lysozyme (figure 2).

### a) Devenir des anticorps injectés.

Le titre initial des anticorps passifs est proportionnel à la dose injectée. Nul dans le lot A, il atteint  $6/7 \log_2$  dans le lot D. Cette quantité d'anticorps décroît exponentiellement avec une vitesse de demi-disparition de l'ordre de 18 jours.

FIGURE 2

EVOLUTION DES ANTICORPS HEMAGGLUTININANTS ANTI-LYSOZYME EN FONCTION DU TEMPS



- les 1ère et 2ème immunisations ont été effectuées aux jours indiqués par les flèches noires (jour 3, jour 104).
- immunisation primaire : quantité et voie d'injection de l'antigène ●—● 36 mg, I.M. ; □—□ 80 mg, I.N. ; x—x 0 mg (témoin).
- les flèches creuses indiquent le moment (jour 0) et la quantité d'anticorps anti-lysozyme injectés, chaque figure correspondant à une quantité déterminée (0 mg : lot A, 100 mg : lot B, 200 mg : lot C, 400 mg : lot D).

*b) Cinétique de la réponse immunitaire dans les témoins en l'absence d'anticorps passifs (fig.2A)*

Après la première injection de lysozyme les animaux ne montrent pas de réponse primaire apparente. Cependant la seconde injection conduit, dans le groupe stimulé par voie intramusculaire, à une réponse secondaire caractérisée par l'apparition précoce d'un titre élevé d'anticorps alors que le groupe témoin manifeste une réponse primaire. Dans le groupe stimulé par voie nasale, après l'injection intramusculaire de rappel, seuls deux animaux sur 3 présentent une réaction secondaire typique.

*c) Effets des anticorps passifs sur la réponse anti-lysozyme.*

Les résultats obtenus dans le lot D (fig. 2D) traduisent l'effet de l'immunité passive. Il apparaît qu'après la première injection de lysozyme l'évolution du titre des anticorps est la même dans les 3 groupes : disparition des anticorps injectés et absence apparente de réponse primaire. Comme dans le lot A, la deuxième injection conduit à une réponse secondaire pour les groupes stimulés par les voies intramusculaire et intranasale. Cependant seuls 2 animaux sur 3 présentent ce type de réponse anamnétique et l'amplitude de celle-ci se trouve sensiblement réduite en particulier dans le groupe stimulé par la voie nasale.

Les figures 2B et 2C montrent que les animaux de ces deux lots présentent des situations intermédiaires, à savoir qu'après la seconde injection tous ceux stimulés par la voie intramusculaire ont développé une réaction secondaire alors que ceux stimulés par la voie nasale présentent pour la moitié du groupe une réaction primaire (fig. 2B) ou même une réaction primaire atypique pour le lot C (fig. 2C).

**3/ Devenir de l'immunité anti-lysozyme lors de l'infection par une souche virulente de la peste porcine.**

L'épreuve virulente par la Peste porcine affecte sensiblement le niveau d'immunité envers le lysozyme. Le lot A présente une chute importante du titre des anticorps sériques : or ce sont ces animaux qui possèdent la plus faible immunité anti-virus (6) et qui font la maladie clinique la plus importante. A l'opposé les animaux du lot D, qui résistent à l'épreuve du virus virulent, voient leur titre en anticorps anti-lysozyme moins perturbé. En particulier ceux des animaux de ce lot qui, bien que stimulés, font une réponse primaire voient cette réponse se poursuivre normalement. Au contraire dans tous les lots, les animaux du groupe témoin non stimulé au jour 3 ne résistent pas à l'épreuve et présentent une réponse primaire anti-lysozyme brusquement interrompue.

**DISCUSSION**

Dans les conditions que nous avons utilisées, l'immunisation avec le lysozyme n'a pas permis de mettre en évidence une réaction primaire significative. Par contre, l'immunisation avec une dose quatre fois plus forte de BGG, et sans ACF, a suscité chez tous les porcelets ayant reçu l'antigène par voie intramusculaire une réaction présentant tous les caractères de la réponse primaire telle que nous l'avions décrite dans nos expériences précédentes (3). La différence des réponses anti-lysozyme et anti-BGG pourrait être rapportée à une différence d'immunogénicité des antigènes en cause ainsi qu'à une différence dans les doses utilisées. Cependant les phénomènes de rappel observés dans la plupart des cas montrent que les animaux ont été "sensibilisés", c'est-à-dire qu'ils ont été immunisés sans que les anticorps spécifiques n'atteignent un titre décelable dans le sérum. Ceci nous conduit donc à conclure que la dose nécessaire pour la "sensibilisation" est beaucoup plus faible que celle capable de produire une réaction primaire.

Avec une dose dix fois plus forte d'antigène, l'immunisation primaire par voie nasale n'a pas permis de déceler une réponse au niveau sérique. Pourtant ces animaux ont développé une réaction de rappel parfois très forte après la deuxième injection. Ce résultat confirme que, comme pour l'immunisation par voie parentérale, la dose "sensibilisante" est très inférieure à la dose immunisante. Cependant, l'immunisation pernasale permet également d'aboutir à une "sensibilisation" générale de l'animal.

Les résultats de notre expérience montrent l'effet des anticorps passifs sur la stimulation antigénique en l'absence d'adjuvant. Il apparaît en effet que la présence d'anticorps en quantité importante, affecte la réponse immunitaire active : le nombre des animaux effectivement stimulés, en réagissant à une seconde injection par une réponse secondaire, tend à diminuer ; d'autre part l'intensité de cette réponse va décroissant. Nous

concluons de ces observations qu'un titre d'anticorps passifs de 6 à 7 log<sub>2</sub>, correspondant à l'injection intrapéritonéale de 400 mg d'immunoglobulines spécifiques, constitue le seuil d'immunisation efficace par voie intramusculaire. Pour la voie pernasale ce seuil, dans nos conditions expérimentales, semble sensiblement plus bas puisque déjà les doses de 100 et 200 mg d'anticorps passifs modifient la réponse immunitaire par rapport à celle des témoins.

Nos précédentes expériences conduites en présence d'ACF avec des titres en anticorps passifs atteignant 9 log<sub>2</sub> ne nous ont pas permis de mettre en évidence ce phénomène d'inhibition (2). On sait que l'ACF est susceptible d'induire la production d'interféron (10). Compte tenu que l'interféron inhibe la multiplication virale, nous avons préféré dans notre expérience ne pas introduire de contrôle utilisant cet adjuvant, de peur de diminuer l'effet de la vaccination par le vaccin à virus vivant de la Peste porcine. Bien qu'une conclusion définitive ne puisse être obtenue qu'après une expérimentation réalisée avec un contrôle interne en l'absence de virus, il semble cependant que la présence d'adjuvant est capable d'élever ce seuil d'inhibition de la réaction immunitaire active par les anticorps. Dans le but de surmonter la barrière de l'immunité colostrale en en conservant les avantages, la recherche d'immunostimulants possédant la même activité que l'ACF mais d'un emploi possible en pratique vétérinaire se révélerait d'un intérêt certain.

Lorsque nous considérons les effets de l'épreuve par le virus de la Peste porcine classique produits sur la réponse antilysozyme, nous observons une chute brutale des anticorps sériques dont l'intensité est très marquée surtout chez les animaux ayant présenté des signes cliniques plus ou moins intenses. La nature de cette immunodépression peut être rapportée, soit à une augmentation de la dégradation des anticorps par un catabolisme protéique exacerbé, soit à un arrêt spécifique ou non de la synthèse des immunoglobulines par les lymphocytes. En effet la multiplication du virus de la Peste porcine classique s'effectue dans les cellules du système réticulo-endothélial. Celle-ci peut donc interférer avec les capacités immunitaires du Porc comme cela a déjà été décrit pour d'autres virus (11).

Il nous semble enfin important de souligner le parallélisme des résultats obtenus dans une même expérience avec deux antigènes aussi différents qu'un vaccin à virus vivant, la souche Thiverval de la Peste porcine et un antigène protéique inerte le lysozyme. Cette expérience a permis de déterminer dans les deux cas l'existence et le niveau d'un seuil d'anticorps passifs au dessous duquel l'immunisation par l'antigène spécifique devient possible. Les travaux réalisés sur le terrain et rapportés dans ces journées par M. LAUNAIS (12) montrent combien la détermination de ce seuil et la modification de son niveau présentent un intérêt pratique, puisqu'elles permettent de choisir la période la plus favorable à la vaccination de jeunes animaux et d'en étendre la durée.

## REMERCIEMENTS

Nous voulons remercier ici Messieurs A. DUTERTRE et F. SECK pour leur assistance que nous avons pu apprécier tout au long de ces expériences.

Ce travail a été réalisé en partie avec le support financier d'un contrat de la Communauté Economique Européenne.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) ROUZE, P. (1974) - La réponse immunitaire du jeune porcelet. Journées de la Rech. Porcine en France, 1974, 17.
- (2) ROUZE, P., HOUDAYER, M. & METZGER, J.J. (1974). Immunological response in piglets : effect of passive specific antibodies. 3rd I.P.V.S. Meeting.
- (3) HOUDAYER, M., ROUZE, P. & METZGER, J.J. (1974). Characterization of the humoral immune response in the piglet. 3rd I.P.V.S. Meeting.
- (4) HOERLEIN, A.B. (1957). The influence of colostrum on antibody response in baby pigs. *J. Immunol.*, **78**, 112.
- (5) UHR, J.W. & MOLLER, G. (1968). Regulatory effect of antibody on the immune response. *Adv. in Immun.*, **8**, 81.
- (6) CORTHIER, G. (1975). Influence de l'immunité passive sur la réponse du porcelet aux infections virales. Application à la Peste porcine classique. Journées de Recherche Porcine en France, 1975.
- (7) AYNAUD, J.M. (1968). Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la Peste porcine. *Rech. vétér.*, **1**, 25.
- (8) AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. (1969) The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbants *Immunochem.*, **6**, 53.

- (9) AVRAMEAS, S., TAUDOU B. & CHUILLON, S. (1969) Glutaraldéhyde, cyanuric chloride and tetraazotized O-dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochem.* **6**, 67.
- (10) GORHE, D.S., AYNAUD, J.M., PARAF, A. (1967). Inhibition de la multiplication du virus de la Fièvre aphteuse chez la souris adulte traitée par l'adjuvant de Freund. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **264**, 2698.
- (11) MICHAELS, R.H. (1972). Suppression of antibody response in congenital rubella. *The Journal of pediatrics (St.Louis)*, **80** (4), 583.
- (12) LAUNAIS, M. (1975). Vaccination du jeune porcelet contre la Peste porcine à l'aide de la souche Thiverval en présence d'immunité maternelle dans les conditions du terrain. *Journées de Recherche Porcine en France*, 1975.