

P9503

## **INFLUENCE DE LA CYCLOSPORINE A SUR LA RÉPONSE DU PORC A L'INFECTION EXPÉRIMENTALE PAR LE ROTAVIRUS ET LE CORONAVIRUS G.E.T.**

*S. BERNARD (1), I. LANTIER (1), E. BOTTREAU (1), J.M. AYNAUD (1),  
C. LABONNARDIERE (2), C. RICOUR (3) F. ARNAUD-BATHANDIER (3)*

*(1) INRA - Laboratoire de Pathologie Porcine - 37380 NOUZILLY*

*(2) INRA - Station de Virologie et d'Immunologie - 78850 THIVERVAL-GRIGNON*

*(3) Assistance Publique - Hôpital des Enfants Malades, Service de Gastroentérologie Pédiatrique et de Nutrition,  
149, rue de Sèvres - 75730 PARIS*

### **INTRODUCTION**

En raison de son activité immunodépressive et de sa faible toxicité, la cyclosporine A est maintenant utilisée avec succès en médecine humaine pour inhiber la réaction du rejet du greffon lors des greffes d'organes divers (THOMSON, 1983; WEIL, 1984). Les immunodépresseurs favorisent souvent le développement d'infections virales ou bactériennes. Dans la perspective de la greffe de l'intestin chez l'enfant (RICOUR *et al.*, 1983), 34 porcs de 25 kg ont été utilisés comme modèle expérimental pour rechercher si la cyclosporine A administrée quotidiennement par voie orale est susceptible de modifier les conditions de la réponse de l'organisme à l'infection orale avec le rotavirus et le coronavirus G.E.T.

En d'autres termes, l'expérimentation présentée dans ce rapport a pour objectif de vérifier si, soumis à un traitement oral prolongé avec la cyclosporine A, l'organisme du jeune n'acquiert pas une plus grande sensibilité aux infections virales du tractus digestif. De plus, dans l'éventualité d'une modification de la réponse du porc à l'un ou l'autre de ces deux virus entériques, nous disposerions d'une nouvelle approche originale pour aborder de façon indirecte l'étude de la physiologie immunitaire de l'intestin.

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **1 - Les animaux**

Issus du croisement entre les races Large White et Landrace les 34 porcelets âgés de 2 mois proviennent du même élevage. Lors de leur arrivée (jour J0), ils sont placés dans la même cage. Le lendemain (jour J1), les 34 porcelets font l'objet d'une opération de randomisation à la suite de laquelle ils sont bagués et répartis en 2 groupes (I et II) de 17 animaux composés chacun

de 2 lots (groupe I = lots R et B ; groupe II = lots V et N). Les 2 groupes sont placés dans 2 cages métalliques comportant des caillebotis à 60 cm du sol. L'abreuvement est automatique et un aliment classique (granulés pour porcs en croissance) est distribué une fois par jour par des nourrisseurs propres à chacune des 2 cages. Bien que séparées ces dernières sont situées dans le même local qui est isolé. L'ambiance climatique est contrôlée et les effluents (air et eaux usées) sont stérilisés à la sortie du bâtiment expérimental.

## **2 - Le traitement par la cyclosporine**

Dans chacune des 2 cages, un lot sur 2 (lots B et N) est traité quotidiennement à partir du 27 décembre inclus (jour J7) avec la cyclosporine A. Chaque animal des 2 lots traités B et N, reçoit le matin à jeun par voie orale à l'aide d'un pistolet doseur la cyclosporine en excipient huileux (1) à raison de 20 mg/kg. La dose de 500 mg par animal et par jour sera ultérieurement maintenue tout au long de l'expérimentation quelle que soit la croissance pondérale de ces derniers.

## **3 - Immunisation avec les globules rouges du mouton**

14 jours après le début du traitement par la cyclosporine, chacun des 34 porcs reçoit par voie intrapéritonéale une suspension de globules rouges de mouton, équivalent à 3,75 ml de culot d'érythrocytes lavés, sous un volume de 10 ml.

## **4 - Infection expérimentale avec le rotavirus porcin**

14 jours après le début du traitement, chacun des porcs du groupe I (R + B) reçoit par voie orale une suspension de rotavirus porcin (souche OSU fournie par le Dr E.H. BOHL) dans les conditions suivantes : le virus est multiplié sur cellules de rein de singe (Ma104). Le surnageant d'une culture de 24 h est immédiatement fractionné et congelé en partie aliquote. Cette préparation, titrée par recherche de l'effet cytopathogène en dilution limite sur microplaque ( $5 \cdot 10^4$  unités infectieuses/ml), a servi à l'infection des porcs. Chaque animal a reçu par voie orale 45 ml de virus dilué 6 fois dans du tampon Mac Ilvaine (0,025M, pH : 4, NaCl 0,15 M). Cette dose est relativement faible pour des animaux de cet âge, mais doit permettre de faire apparaître des différences au niveau clinique si la drogue a un effet dépresseur.

## **5 - Infection expérimentale avec le coronavirus de la gastroentérite transmissible (G.E.T.) du porc**

40 jours après le début du traitement par la cyclosporine, chacun des 34 porcs reçoit par voie orale dans les conditions suivantes une suspension de coronavirus G.E.T. (souche sauvage virulente GEP-II) : à jeun et sans eau depuis 24 heures, chaque animal reçoit  $10^5$  doses infectieuses en suspension dans 200 ml de Tampon Mac Ilvaine (0,025M; pH : 4,0) additionné de NaCl (0,15M) et à la température de +4°C. La suspension est introduite dans la cavité buccale de l'animal en contention, à l'aide d'un pistolet doseur. Mises au point au laboratoire, ces conditions particulières d'administration permettent de limiter au maximum l'inactivation du pouvoir infectieux du coronavirus (dont la fragilité est élevée dans l'environnement physicochimique du tractus digestif du

(1) la cyclosporine A (soluté buvable, OL-27400, 100 mg/ml, 022K3) nous a été gracieusement fournie par les Laboratoires SANDOZ. Cette dernière a été diluée au 1/2 avec de l'huile domestique avant administration aux animaux.

porc adulte) au cours de son transit entre la cavité buccale et son site de multiplication (jéjunum et ileum). Isolée en Bretagne par Ph. VANNIER, la souche sauvage virulente de coronavirus G.E.T. (souche G.E.P.-II) a été passée une fois sur porcelet « SPF » nouveau-né et produite à Nouzilly sur des porcelets âgés de 5 jours. 20 heures après l'infection orale des porcelets, le contenu de l'intestin grêle est récolté par un lavage avec du milieu de culture cellulaire, centrifugé (60 minutes à 15 000 RPM) et filtré sur membrane (0,45 microns). Conservé à -70 °C, le stock de coronavirus virulent contient 10<sup>6</sup> doses infectieuses/ml vis-à-vis du porcelet nouveau-né et ne renferme aucun rotavirus contaminant.

## 6 - Observations cliniques

Des pesées périodiques des animaux ont permis de suivre la croissance pondérale de chacun des 4 lots. Les réactions cliniques (diarrhée, anorexie...) et la mortalité sont relevées quotidiennement. Critère quantitatif de l'intensité de la diarrhée, le pourcentage d'humidité est évalué dans chacun des échantillons de matières fécales. Immédiatement après leur prélèvement une partie aliquote (1 à 2 g) de matières fécales est pesée et étuvée à 85 °C pendant 8 heures. Le pourcentage d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$\text{pourcentage d'humidité} = \frac{\text{feces brutes} - \text{feces sèches}}{\text{feces brutes}} \times 100$$

## 7 - Prélèvements d'échantillons en vue d'analyses

a) à partir du sang prélevé une fois par semaine ou plus souvent selon les nécessités :

- titrage de l'activité interféron consécutive à l'infection G.E.T. en cellules MDBK vis-à-vis du virus V.S.V. (LA BONNARDIÈRE, 1981).
- titrage des activités anticorps spécifiques des globules rouges de mouton (hémagglutination), du rotavirus (test ELISA), du coronavirus G.E.T. (séroneutralisation)
- titrage des classes d'immunoglobulines supportant l'activité anticorps antirotavirus (test ELISA)

b) à partir des matières fécales récoltées 2 fois par semaine :

- évaluation du pourcentage d'humidité
  - titrage des antigènes rotavirus (test ELISA)
  - titrage des copro-anticorps spécifiques du rotavirus et des classes d'immunoglobulines correspondantes (test ELISA)
  - titrage des immuns complexes rotavirus (test ELISA)
- L'ensemble des techniques ELISA mises en œuvre a été décrit précédemment (S. BERNARD, 1984).

## RÉSULTATS

### 1 – Influence de la cyclosporine A sur l'état général des animaux

#### A – Croissance pondérale

Le régime alimentaire donné aux animaux durant cette expérience a été calculé pour ne permettre que l'entretien et non la croissance des porcs.

La cyclosporine A n'a pas eu directement ou indirectement d'action sur le gain de poids des animaux ( $P < 0,05$ ).

#### B – Humidité des feces

Le pourcentage normal d'humidité des feces, dans nos conditions, semble se situer entre 55 et 65%. Le ramollissement des matières fécales a été pris en considération pour des valeurs supérieures à 75%. Les cas les plus sévères de diarrhée sont allés jusqu'à 90%. L'observation des résultats des 50 premiers jours d'expérience des lots V (sans cyclosporine A) et N (avec cyclosporine A) montre une différence significative ( $P < 0,02$ ) dans le nombre d'animaux ayant des selles ramollies et cela en l'absence d'infection expérimentale (tableau 1). Il est possible que les 10 ml de supplément quotidien d'huile (excipient de la cyclosporine) soient responsables de cet état chez les animaux traités. Les animaux témoins n'ayant pas reçu d'huile, il n'est pas possible de conclure si cette perturbation du transit intestinal est due à la cyclosporine A ou à l'alimentation.

TABLEAU 1

INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA CYCLOSPORINE A SUR L'ÉVOLUTION DU POURCENTAGE D'ANIMAUX DONT LES FECES PRESENTENT UN TAUX D'HUMIDITÉ SUPÉRIEUR A 75 %

Période des prélèvements	LOTS D'ANIMAUX			
	R	B	V	N
	Cy - Ro + (*) (n = 8)	Cy + Ro + (*) (n = 9)	Cy - Ro - (*) (n = 8)	Cy + Ro - (*) (n = 9)
14 jours avant infection Rota.	09 (**)	13	00	22
28 jours P.I. Rota.	12	27	21	40
15 jours P.I. G.E.T.	15	31	15	44

(\*) animaux traités Cy<sup>+</sup> ou non (Cy<sup>-</sup>) avec la cyclosporine et infectés (Ro<sup>+</sup>) ou non (Ro<sup>-</sup>) avec le Rotavirus

(\*\*) pourcentage d'animaux ayant plus de 75 % d'eau dans les feces

#### C – Système pileux

Il a été observé chez les animaux traités le développement général et progressif du système pileux.

### 2 – Influence de la cyclosporine A sur la réponse immunitaire humorale sérique à l'injection de globules rouges de mouton

La cinétique d'apparition des agglutinines est donnée (tableau 2). Presque tous les animaux ont des anticorps anti globules rouges de mouton 10 jours après l'injection. Le titre anticorps se

stabilise très vite vers  $2 \log_2$  pour les animaux témoin et vers  $2,5 \log_2$  pour les animaux traités. L'analyse statistique par blocs complets équilibrés donne une différence significative ( $F(1,150) = 14,91$   $P < 1\%$ ) entre la réponse immunitaire humorale des animaux traités ou non. Les animaux qui ont absorbé la cyclosporine A semblent donner un taux d'hémagglutine supérieur au témoin.

**TABLEAU 2**  
INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA CYCLOSPORINE A SUR LA CINÉTIQUE D'APPARITION DES ANTICORPS ANTI GLOBULES ROUGES DE MOUTON DANS LE SÉRUM DES PORCS.

Jours après l'injection de globules rouges	LOTS D'ANIMAUX			
	R + V		B + N	
	Cy- (*) (n = 16)		Cy+ (*) (n = 18)	
0	0,15 (**)	(0,38) (***)	0,20	(0,42)
8	1,80	(0,70)	2,15	(0,77)
15	2,00	(0,85)	2,35	(0,84)
22	1,95	(0,98)	2,45	(0,89)
29	1,95	(0,81)	2,40	(0,88)

(\*) animaux traités (Cy+) ou non (Cy-) avec la cyclosporine  
(\*\*) titre de l'activité anticorps anti globules rouges de mouton ( $\log_2$ )  
(\*\*\*) écart-type

### 3 – Influence de la cyclosporine A sur la réponse des animaux à l'infection expérimentale par le rotavirus, souche OSU.

#### A – Observations cliniques

Aucun des animaux des deux lots infectés n'a présenté de signes de diarrhée après l'infection par le rotavirus. Le pourcentage d'humidité des feces montre une augmentation des animaux ayant des selles ramollies (>75% d'humidité), chez les animaux traités, mais la proportion d'animaux présentant les mêmes symptômes est pratiquement identique chez les animaux traités non infectés (tableau 1).

#### B – Cinétique d'excrétion des antigènes rotavirus dans les matières fécales

Présentés dans le tableau 3, les résultats montrent que le titre des antigènes rotavirus est déjà élevé au départ de l'expérience (les animaux proviennent d'un élevage conventionnel). Le traitement par la cyclosporine n'a pas d'influence significative sur la cinétique d'excrétion dans les antigènes rotavirus. Cependant, le titre d'antigènes rotavirus est statistiquement supérieur dans les lots d'animaux ayant fait l'objet d'une infection expérimentale par le rotavirus indépendamment du traitement par la cyclosporine.

#### C – Cinétique d'excrétion des copro-anticorps antirotavirus et des immuns complexes

Présentés dans le tableau 4, les résultats montrent que la cyclosporine n'a pas d'influence significative sur la cinétique d'excrétion des copro-anticorps antirotavirus ou de celle des immuns complexes.

### 4 Influence de la cyclosporine A sur la réponse des animaux à l'infection expérimentale par le coronavirus G.E.T.

#### A – Observations cliniques

Considérant les réactions cliniques (4 animaux sur 34 ont manifesté une diarrhée bénigne)

TABLEAU 3

INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA CYCLOSPORINE A SUR L'ÉVOLUTION DU TITRE EN ANTIGÈNES ROTAVIRUS DANS LES FECES DE PORCS INFECTÉS OU NON PAR LE ROTAVIRUS

Période des prélèvements	LOTS D'ANIMAUX			
	R	B	V	N
	Cy <sup>-</sup> Ro <sup>+</sup> (*) (n = 8)	Cy <sup>+</sup> Ro <sup>+</sup> (*) (n = 9)	Cy <sup>-</sup> Ro <sup>-</sup> (*) (n = 8)	Cy <sup>+</sup> Ro <sup>-</sup> (*) (n = 9)
14 jours avant infection Rota.	455 (**) (105) (***)	441 (93)	366 (82)	317 (92)
14 jours P.I. Rota.	470 (8)	453 (63)	346 (63)	317 (23)
28 jours P.I. Rota.	417 (25)	452 (80)	268 (95)	294 (64)
15 jours P.I. G.E.T.	381 (73)	303 (26)	254 (83)	264 (65)

- (\*) animaux traités Cy<sup>+</sup> ou non (Cy<sup>-</sup>) avec la cyclosporine et infectés (Ro<sup>+</sup>) ou non (Ro<sup>-</sup>) avec le Rotavirus  
 (\*\*) titre en antigène rotavirus exprimé par le niveau de la densité optique ( $\times 100$ ) de la réaction enzymatique (ELISA). Le seuil de positivité étant  $230 \pm 85$   
 (\*\*\*) Ecart-type

TABLEAU 4

INFLUENCE DU TRAITEMENT PAR LA CYCLOSPORINE A SUR L'ÉVOLUTION DU TITRE DES COPROANTICORPS ANTI ROTAVIRUS CHEZ DES PORCS INFECTÉS OU NON PAR LE ROTAVIRUS

Période des prélèvements	LOTS D'ANIMAUX			
	R	B	V	N
	Cy <sup>-</sup> Ro <sup>+</sup> (*) (n = 8)	Cy <sup>+</sup> Ro <sup>+</sup> (*) (n = 9)	Cy <sup>-</sup> Ro <sup>-</sup> (*) (n = 8)	Cy <sup>+</sup> Ro <sup>-</sup> (*) (n = 9)
14 jours avant infection Rota.	9,6 (**) (6,10) (***)	6,4 (3,35)	8,6 (3,05)	6,4 (4,09)
14 jours P.I. Rota.	9,8 (4,17)	12,1 (5,39)	9,1 (5,24)	10,6 (4,78)
28 jours P.I. Rota.	18,8 (8,91)	16 (10,42)	7,7 (2,74)	6,3 (4,59)
15 jours P.I. G.E.T.	8,1 (3,62)	7,2 (8,01)	5,7 (1,82)	5,3 (5,36)

- (\*) animaux traités Cy<sup>+</sup> ou non (Cy<sup>-</sup>) avec la cyclosporine A et infectés (Ro<sup>+</sup>) ou non (Ro<sup>-</sup>) avec le Rotavirus  
 (\*\*) titre de l'activité coproanticorps anti Rotavirus en g/ml  
 (\*\*\*) Ecart-type

et l'évolution du pourcentage d'humidité dans les matières fécales, la cyclosporine n'a pas d'influence significative.

#### B – Cinétique d'apparition dans le sérum de l'activité interféron et des anticorps neutralisants anti coronavirus G.E.T.

Les résultats sont présentés dans les figures 1 et 2. La réponse interféron est observée entre le 2<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> jour, tandis que les anticorps sont détectables à partir du 9<sup>e</sup> jour. Considérant la réponse interféron ou la réponse anticorps (figure 3), il n'y a pas de différences significatives entre les animaux traités et les animaux non traités par la cyclosporine.

FIGURE 1

CINÉTIQUE D'APPARITION DE L'ACTIVITÉ INTERFERON DANS LE SÉRUM DE CHACUN DES ANIMAUX TRAITÉS PAR LA CYCLOSPORINE À (LOTS B ET N) ET NON TRAITÉS (LOTS R ET V) À LA SUITE DE L'INFECTION ORALE PAR LE CORONAVIRUS G.E.T.

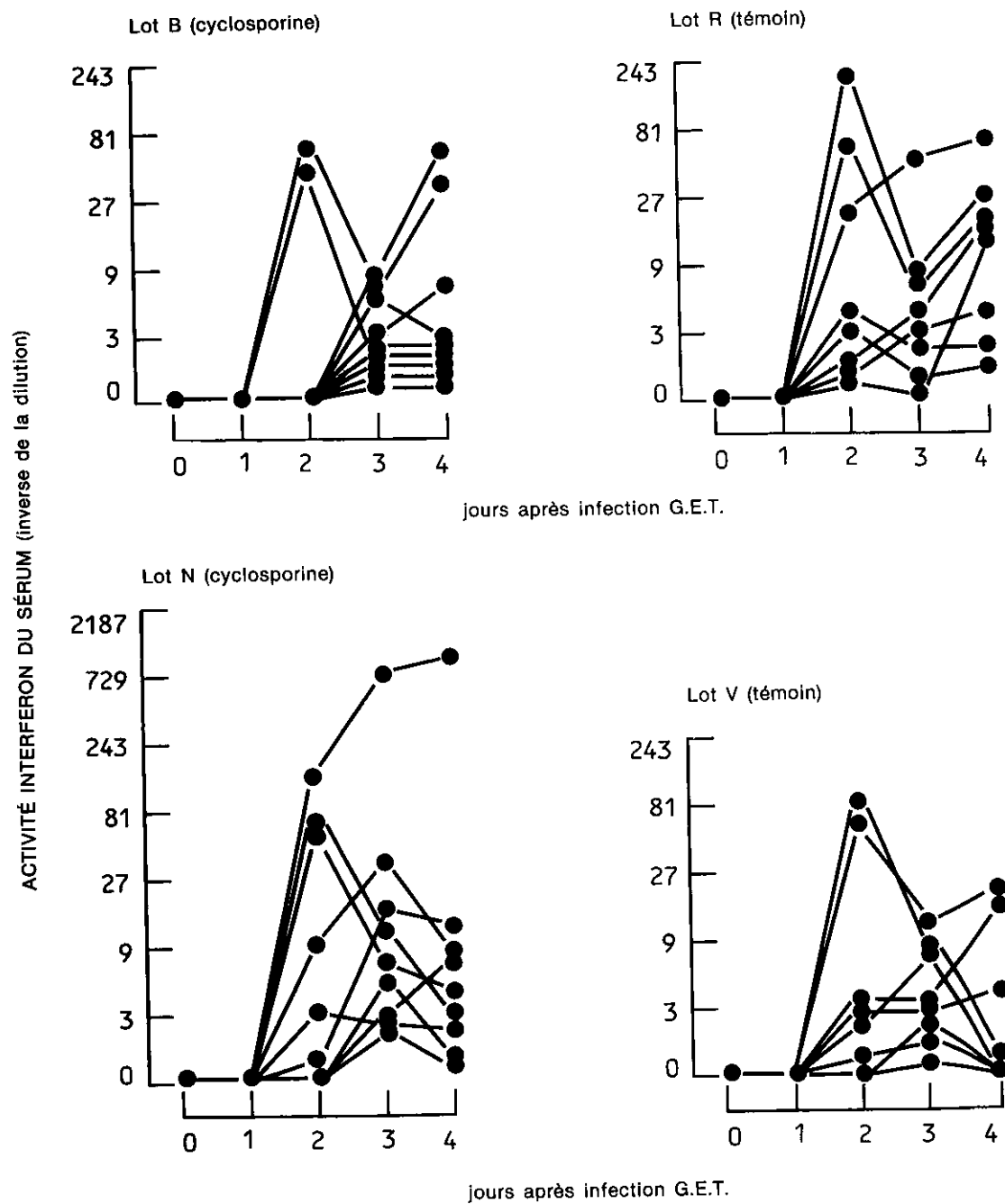


FIGURE 2

CINÉTIQUE D'APPARITION DE L'ACTIVITÉ NEUTRALISANTE ANTI-CORONAVIRUS G.E.T. DANS LE SÉRUM DE CHACUN DES ANIMAUX TRAITÉS PAR LA CYCLOSPORINE A (LOTS B ET N) ET NON TRAITÉS (LOTS R ET V) À LA SUITE DE L'INFECTION ORALE PAR LE CORONAVIRUS G.E.T.

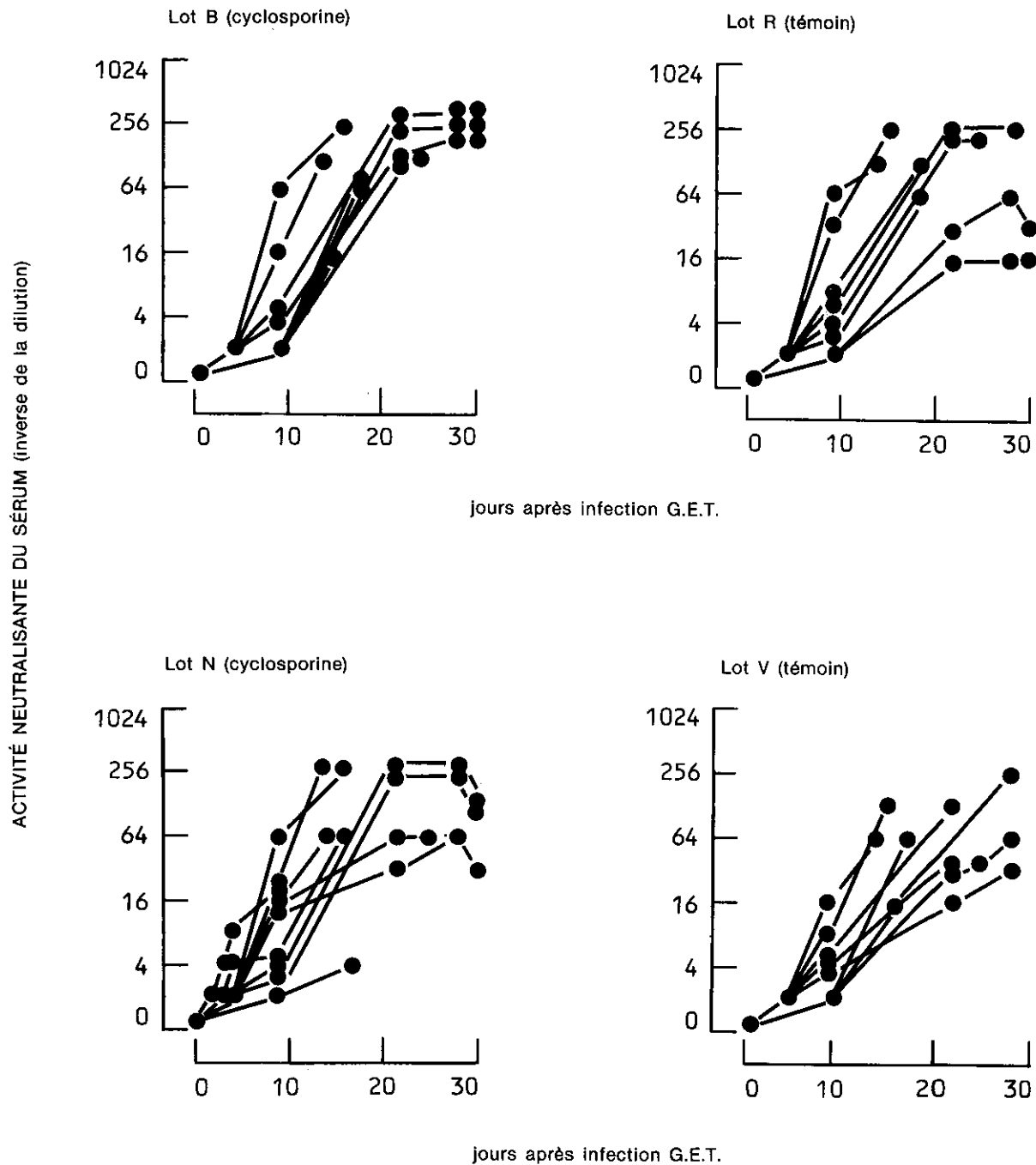
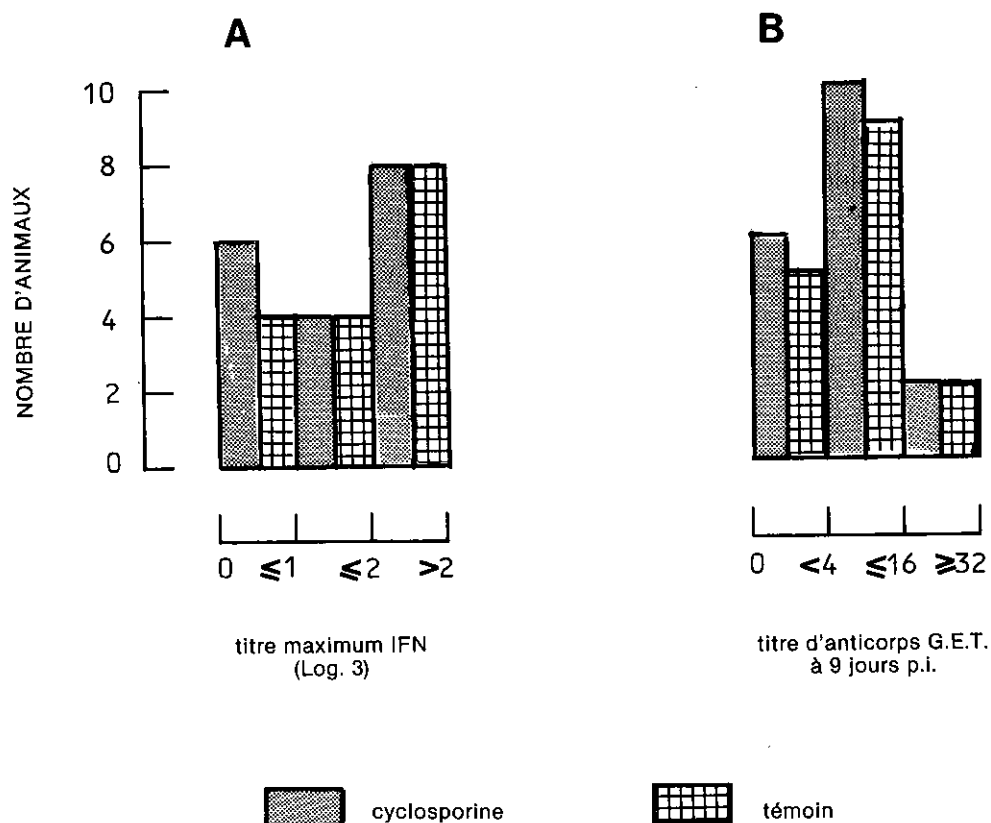




FIGURE 3

DISTRIBUTION DES ANIMAUX TRAITÉS OU NON PAR LA CYCLOSPORINE EN FONCTION SOIT DU TITRE MAXIMUM DE L'INTERFERON CIRCULANT (A GAUCHE), SOIT EN FONCTION DU NIVEAU DE L'ACTIVITÉ NEUTRALISANTE OBSERVÉE DANS LE SÉRUM 9 JOURS APRÈS L'INFECTION PAR LE CORONAVIRUS G.E.T. ( A DROITE)



## DISCUSSION

La cyclosporine A inhibe de façon réversible et sélective certaines fonctions des lymphocytes T normalement exprimées après sensibilisation par un antigène. Contrairement à d'autres immunodépresseurs, son action ne s'accompagne pas d'effets secondaires tels que la dégradation de certains tissus lymphoïdes (MACKIE, 1981). L'état de dépression partielle du système immunitaire à la suite de la prise de cyclosporine A entraîne parfois le développement de surinfections virales (cytomégalovirus, virus herpétique, virus E.B.) bactériennes ou fongiques chez les individus faisant l'objet de greffes d'organes (KAY, 1983). Lorsque la virulence du virus est en partie contrôlée par l'activité des lymphocytes T (virus de la vaccine, virus sindbis, virus herpes), le traitement par la cyclosporine favorise la diminution de la résistance de l'animal à ces infection (COLE, 1983).

Concernant le tractus digestif et en particulier l'intestin, on ne dispose pas encore d'information. On sait que la réponse clinique et virologique à l'entérovirus type 2 est stimulée chez le porc à la suite du traitement par la cyclophosphamide (DERBYSHIRE, 1983). Nos résultats sont en faveur d'une absence d'influence de la cyclosporine sur la réponse du porc de 25 kg à l'infection orale avec deux virus entéropathogènes spécifiques de l'espèce porcine. Des résultats identiques ont été obtenus d'une part avec des porcelets nouveau-nés infectés avec le coronavirus G.E.T. (JM. AYNAUD, résultats non publiés) et d'autre part avec 3 porcs de 70 kg ayant subi depuis plus de 15 mois une greffe de l'intestin grêle et traités quotidiennement avec la cyclosporine A par voie

orale (RICOUR *et al.*, résultats en cours de publication). Nos résultats suggèrent que les composantes immunitaires atteintes et modifiées par la cyclosporine A, interviennent peu ou pas dans la réponse locale ou générale de l'organisme à une infection virale de l'intestin grêle. Il reste maintenant à déterminer si ces nouvelles données s'appliquent également à d'autres agents infectieux entéropathogènes tels que les bactéries par exemple.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Patrick LECHOPIER et Philippe BERNARDET pour leur aide au niveau des installations expérimentales, ainsi que Christiane de VAUREIX pour le titrage de l'interféron en culture cellulaire.

Nous remercions également la Société SANDOZ pour l'aide accordée à cette expérimentation.

## BIBLIOGRAPHIE

- COLE G.A. *et al.*, 1983. *Transplant. Proc.* **15**, suppl. 1, 2271-2277
- BERNARD S., *et al.*, 1984, *Ann. Rech. Vet.* **15**, sous presse
- DERBYSHIRE J.B., 1983. *Can. J. Comp. Med.*, **47**, 235-237
- KAY H.E. *et al.*, 1983. *Transplantation*, **36**, 491-495
- LABONNARDIÈRE C. *et al.*, 1981. *Infect. Immun.* **32**, 28-31
- MACKIE E.J., 1981. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 189-194
- RICOUR C. *et al.*, 1983. *Transplant. Proc.*, **15**, 3019-3026
- THOMSON A.W., 1983. *Austr. J. Exp. Med. Sci.*, **61**, 147-172
- WEIL C., 1984. *Med. Res. Rev.*, **4**, 221-265