

Absence d'activité du HPA 23 (ammonium-5-tungsto-2-antimoniate) envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, le virus de la maladie d'Aujeszky et le rotavirus bovin

P. EVRARD **, E. THIRY *, A. SCHWERS *, J. LIGOT**,
P.-P. PASTORET *

* Chaire de Virologie et Pathologie des maladies virales,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège,
Rue des Vétérinaires 45, B-1070 Bruxelles.

** Institut Supérieur Industriel de l'Etat, section Agriculture,
Rue Saint-Victor 3, B-5200 Huy.

RESUME

L'activité antivirale de l'hétéropolyanion ammonium-5-tungsto-2-antimoniate (HPA 23) a été testée *in vitro* envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*, BHV 1), le virus de la maladie d'Aujeszky (*Suid herpesvirus 1*, SHV 1) et le rotavirus bovin, dans divers systèmes virus-cellules. Dans les différents cas, aucune réduction du nombre de plages n'a été observée, sauf lorsque le BHV 1 et le SHV 1 étaient mis en contact avec 70 mg/ml de HPA 23 2 heures (SHV 1, BHV 1), ou 24 heures (BHV 1) avant l'inoculation aux cultures cellulaires.

Un essai de traitement *in vivo* a été réalisé sur des lapins infectés expérimentalement par 50 unités formant plages de SHV 1 (100 mg/kg de HPA 23, répartis en deux injections sous-cutanées quotidiennes). Aucun effet de protection contre la maladie d'Aujeszky n'a été décelé chez les lapins.

INTRODUCTION

L'hétéropolyanion ammonium-5-tungsto-2-antimoniate (HPA 23) est un composé antiviral montrant une activité significative envers différents virus : inhibition *in vitro* du virus rabique (Tsiang *et al.*, 1978) ; inhibition de la transcriptase inverse de plusieurs retrovirus (Chermann *et al.*, 1975 ; Ablashi *et al.*, 1977) ; protection de la souris contre la leucémie induite par le virus de la leucémie de Friend (Jasmin *et al.*, 1974), contre le virus de l'encéphalomyélite et le virus de la stomatite vésiculeuse (Werner *et al.*, 1976). Par contre, le HPA 23 stimule la multiplication de l'herpesvirus Saïmiri (*Saïminiine herpesvirus 2*) et l'effet cytopathogène induit par ce virus ; il n'a aucun effet sur la multiplication d'un autre herpèsvirus, le virus Epstein-Barr (*Human herpesvirus 4*) (Ablashi *et al.*, 1977).

Cette substance antivirale qui présente un spectre d'action assez large n'a pas encore été testée sur des virus pathogènes pour les animaux domestiques, à l'exception du virus rabique.

Cet article rapporte les essais réalisés *in vitro* pour détecter l'activité antivirale du HPA 23 envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*, BHV 1), le virus de la maladie d'Aujeszky (*Suid herpesvirus 1*, SHV 1) et le rotavirus bovin.

Divers systèmes virus-cellules ont été utilisés, car le système cellulaire influence souvent l'activité des composés antiviraux envers le virus étudié. Un essai *in vivo* a été effectué sur des lapins infectés expérimentalement par le SHV 1.

MATERIEL ET METHODES

Culture de cellules et virus

Les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney) sont cultivées comme précédemment décrit (Thiry *et al.*, 1981). Les cellules RK 13 (Rabbit Kidney 13), les cellules testiculaires de veau (lignée primaire) et les cellules MA 104, d'origine simienne, sont entretenues dans les mêmes conditions que les cellules GBK. Les cellules sont placées en plaques de 24 trous de 1,9 cm² de diamètre.

Les souches virales utilisées sont : la souche internationale de référence Los Angeles (LA) du BHV 1, la souche belge Cu 1 de SHV 1 et la souche belge S14 de rotavirus bovin. Elles subissent des dilutions d'ordre 10 qui servent à inoculer en double les cellules en culture dans les plaques de 24 trous. Après une heure d'adsorption, les cellules infectées par le BHV 1 sont recouvertes de MEM (Minimum Essential Medium) contenant 5 % d'antisérum bovin anti-BHV 1 et les cellules infectées par le SHV 1 sont recouvertes de MEM contenant 1 % d'agarose. La technique d'obtention de plages de rotavirus bovin a été précédemment décrite (Dagenais *et al.*, 1981c). Après 4 à 5 jours d'incubation, les cellules sont fixées au formol et colorées au cristal violet.

Essais de réduction du nombre de plages

Prétraitement des suspensions virales

Les suspensions virales (BHV 1 : 8×10^6 unités formant plages (UFP)/ml; SHV 1 : 10^6 UFP/ml) sont mises en contact à 4°C avec différentes concentrations

d'HPA (70 mg/ml, 7 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,07 mg/ml), pendant 2 heures ou 24 heures avant les dilutions et l'infection de cellules GBK. Les suspensions virales témoins sont maintenues dans les mêmes conditions, sans addition de HPA 23.

Prétraitement des cellules

Les cellules GBK sont mises en contact, 48 heures avant infection par le BHV 1 ou le SHV 1, avec 4 dilutions de HPA 23 (750, 500, 250 et 5 µg/ml). Les suspensions virales sont diluées et sont inoculées aux cellules comme décrit plus haut. Des cellules traitées mais non infectées sont conservées comme témoin.

Essai de réduction du nombre de plages

Les systèmes virus-cellules utilisés sont: cellules GBK-BHV 1, cellules testiculaires-BHV 1, cellules GBK-SHV 1, cellules testiculaires-SHV 1, cellules MA 104-SHV 1, cellules RK 13-SHV 1, cellules MA 104-rotavirus bovin.

Le milieu MEM ajouté aux cultures de cellules après une heure d'adsorption virale renferme diverses concentrations de HPA 23 : 700, 70, 35 et 7 µg/ml. Des cellules infectées non traitées et des cellules traitées non infectées sont prises comme témoins.

Essai de traitement de lapins infectés expérimentalement par le SHV 1

Vingt-cinq lapins sont répartis en 5 lots homogènes :

groupe 1 : 5 lapins infectés par le SHV 1 au jour 0 et non traités ;

groupe 2 : 5 lapins non infectés, traités depuis le jour 0 pendant 5 jours ;

groupe 3 : 5 lapins prétraités depuis le jour -2, inoculés par le SHV 1 au jour 0 et traités jusqu'à la mort ;

groupe 4 : 5 lapins infectés par le SHV 1 au jour 0 et traités un seul jour (jour 0) ;

groupe 5 : 5 lapins infectés par le SHV 1 au jour 0 et traités jusqu'à la mort.

Au jour 0, 1 ml de suspension virale contenant 50 UFP de SHV 1 est inoculé à chaque lapin par voie intramusculaire. Le traitement consiste en l'injection sous-cutanée de 100 mg/kg de HPA 23 (solution : 10 mg/ml en PBS, pH 7,2), répartie en deux administrations quotidiennes.

Des fragments de poumons et l'encéphale sont prélevés sur chaque lapin mort. Les prélèvements sont broyés puis stockés à -70 °C, après addition de 5 % de DMSO. Le titre en SHV 1 de chaque prélèvement est déterminé par la méthode décrite, en cellules GBK.

RESULTATS

Une réduction du titre en particules infectieuses est décelée dans les suspensions virales de BHV 1 laissées 2 heures et 24 heures en contact avec 70 mg/ml de HPA 23 et dans la suspension de SHV 1 mise en contact 24 heures avec la même concentration de HPA 23 (tableau 1).

Les cellules prétraitées par le HPA 23 sont totalement détruites par les 3 concentrations supérieures (750, 500 et 250 µg/ml). A 5 µg/ml de HPA 23, aucune réduction du titre viral n'est observée.

Aucune réduction du nombre de plages n'est décelée dans les différents systèmes

TABLEAU 1. — Titre en particules infectieuses résiduelles de suspensions de BHV 1 et de SHV 1 laissée en contact pendant 2 ou 24 heures avec diverses concentrations de HPA 23.
ufp : unités formant plages.

HPA 23 mg/ml	0	0,07	0,7	7	70
24 heures					
BHV 1 ufp/ml	$7,5 \times 10^5$	$5,25 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$8,75 \times 10^5$	5×10^3
BHV 1 ufp/ml	$7,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	5×10^5	$1,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^3$
2 heures					
SHV 1 ufp/ml	$3,55 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$	5×10^3
SHV 1 ufp/ml	6×10^5	$1,2 \times 10^6$	5×10^5	10^5	$1,5 \times 10^5$

virus-cellules utilisés, quelle que soit la concentration de HPA 23. Un effet cyto-toxique est constaté en culture de cellules à la concentration de 700 µg/ml de HPA 23.

Aucune protection due au HPA 23 ne peut être mise en évidence chez les lapins infectés par le SHV 1. Certains lapins témoins sont morts et des particules infectieuses de SHV 1 ont été détectées dans l'encéphale ou les poumons.

DISCUSSION

Le HPA 23 ne présente pas d'activité *in vitro* envers le BHV 1, le SHV 1 et le rotavirus bovin. La réduction du nombre de plages observée après prétraitement des suspensions virales est due à une action désinfectante, que le HPA 23 partage évidemment avec beaucoup d'autres molécules.

L'essai de traitement de lapins infectés expérimentalement par le SHV 1 a complètement échoué. Pourtant les lapins ont été inoculés avec une très faible dose de SHV 1 ; malgré cela, même le groupe de lapins prétraités a présenté la maladie d'Aujeszky. Trois lapins témoins sont

morts et le SHV 1 a été décelé dans les poumons ou l'encéphale. Il est difficile de préciser la manière dont ces animaux se sont infectés, mais leur présence dans des cages contiguës aux cages contenant des lapins infectés plaide pour une transmission par voie aérogène ou par voie cutanée, à la faveur de lésions de la peau : ce point est peu documenté dans la littérature (Kaplan, 1969).

Certaines molécules sont actives, tout au moins *in vitro*, envers les virus étudiés : le phosphonoformate et l'acyclovir envers le SHV 1, mais dans une moindre mesure envers le BHV 1 (Schwers *et al.*, 1980 ; Thiry *et al.*, 1983), le bromovinyl-déoxyuridine envers le BHV 1 (Babiuk *et al.*, 1983) ; le sous-salicylate de bismuth envers le rotavirus bovin (Dagenais *et al.*, 1981a) ; l'interféron cloné humain (Hu-IFN_{α2}) envers le BHV 1 et le SHV 1 (Goossens *et al.*, 1983) et le rotavirus bovin (résultats non publiés). A part le Hu-IFN_{α2} et le sous-salicylate de bismuth, qui n'ont pas été testés *in vivo* contre ces virus, les substances précitées n'ont montré *in vivo* aucune efficacité, comme le HPA 23.

La médecine vétérinaire ne possède pas encore de substance antivirale utilisable

en pratique (Brochier *et al.*, 1983), même douée d'un spectre d'action limité. Les interférons semblent porter le plus de promesses : en effet, l'interféron leucocytaire humain, les interférons simien et bovin sont efficaces *in vitro* envers le rotavirus bovin (Dagenais *et al.*, 1981b) et le Hu-IFN_{α2} envers le BHV 1, le SHV 1 et le rotavirus bovin ; ce même interféron est capable de réduire de manière significative les lésions vaccinales (Wérenne *et al.*,

1983) et exerce donc une activité antivirale chez l'animal.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement la société BIOTEC S.A., Belgique, et son président, Monsieur J.-M. Delwart, d'avoir fourni le composé et d'avoir subventionné ces expériences, ainsi que le Docteur J.-C. Chermann, Institut Pasteur, Paris, pour les discussions fructueuses.

BIBLIOGRAPHIE

- ABLASHI D.V., TWARDZIK P.R., EASTON J.M., ARMSTRONG G.R., LUETZELER J., JASMIN C., CHERMANN J.C. Effects of 5-tungsto-2-antimoniate in oncogenic DNA and RNA virus-cell systems. *Eur. J. Cancer*, 1977, **13**, 713.
- BABIUK L.A., ACRES S.D., MISRA V., STOCKDALE P.H.G., de CLERCQ E. Susceptibility of Bovid herpesvirus 1 to antiviral drugs : *in vitro* versus *in vivo* efficacy of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1983, **23**, 715.
- BROCHIER B., THIRY E., WÉRENNE J., SCHWERS A., VINDEVOGEL H., PASTORET P.-P. Thérapeutique étiologique des maladies d'origine virale. *Ann. Rech. Vét.*, 1983, sous presse.
- CHERMANN J.C., SINOUSSI F.C., JASMIN C. Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase of murine oncornaviruses by ammonium-5-tungsto-2-antimoniate. *Bioch. Bioph. Res. Communic.*, 1975, **65**, 1229.
- DAGENAIS L., PASTORET P.-P., KAECKEN-BEECK A. Inhibition par le sous-salicylate de bismuth de la formation de plages du rotavirus bovin. *Ann. Méd. Vét.*, 1981a, **125**, 33.
- DAGENAIS L., PASTORET P.-P., VANDEN BROECKE C., WÉRENNE J. Susceptibility of bovine rotavirus to interferon. *Arch. Virol.*, 1981b, **70**, 377.
- DAGENAIS L., SCHWERS A., PASTORET P.-P., LEROY P. Comparison of bovine rotavirus strains by the plaque assay. *Vet. Microbiol.*, 1981c, **6**, 379.
- GOOSSENS R., SCHWERS A., VANDEN BROECKE C., DAGENAIS L., MAEN-HOUT M., DUWYN R., VAN CAMP B., PASTORET P.-P., WÉRENNE J. Sensibilité des virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovine herpesvirus 1*) et de la maladie d'Aujeszky (*Suid herpesvirus 1*) à l'interféron humain produit par des bactéries (Hu-IFN_{α2}). *Ann. Méd. Vét.*, 1983, **127**, 135.
- JASMIN C., CHERMANN J.C., HERVE G., TEZE A., SOUCHAY P., BOY-LOUSTAU C., RAYBAUD N., SINOUSSI F., RAYNAUD M. *In vivo* inhibition of murine leukemia and sarcoma viruses by the heteropolyanion 5-tungsto-2-antimoniate. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1974, **53**, 469.
- KAPLAN A.S. In : *Herpes simplex and pseudorabies viruses*. Springer-Verlag, Wien, New York, 1969, pp. 66-68.
- SCHWERS A., PASTORET P.-P., VINDEVOGEL H., LEROY P., AGUILAR-SETIÉN A., GODART M. Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *J. Comp. Pathol.*, 1980, **90**, 625.
- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY DOI-ZÉ C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M., DAGENAIS L., VINDEVOGEL H., ECTORS F. Réactivation d'un herpesvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981, **125**, 207.
- THIRY E., VINDEVOGEL H., LEROY P., PASTORET P.-P., SCHWERS A., BROCHIER B., ANCIAUX Y., HOYOIS P. *In vivo* and *in vitro* effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Ann. Rech. Vét.*, 1983, **14**, 239.
- TSIANG H., ATANASIU P., CHERMANN J.C., JASMIN C. Inhibition of rabies virus

in vitro by the ammonium-5-tungsto-2-antimoniate. *J. Gen. Virol.*, 1978, **40**, 665.

WÉRENNE J., PASTORET P.-P., VANDEN BROECKE C., SCHWERS A., GOOSSENS A., BUGYAKI L., MAENHOUDT M. Bacterially produced interferon as an antiviral in the bovine species. *In: The biology of the interferon system*, 1983, pp. 419-424, E.

De Maeyer et H. Schellekens, Elsevier Science Publishers, La Haye.

WERNER G.H., JASMIN C., CHERMANN J.C. Effect of ammonium-5-tungsto-2-antimoniate on encephalomyocarditis and vesicular stomatitis virus infections in mice. *J. Gen. Virol.*, 1976, **31**, 59.

SUMMARY

Lack of antiviral activity of HPA 23 (ammonium-5-tungsto-2-antimoniate) against infectious bovine rhinotracheitis virus, pseudorabies virus and bovine rotavirus

The antiviral effect of the heteropolyanion HPA 23 (ammonium-5-tungsto-2-antimoniate) was assayed *in vitro* against infectious bovine rhinotracheitis virus (*Bovine herpesvirus 1*, BHV 1), pseudorabies virus (*Suid herpesvirus 1*, SHV 1) and bovine rotavirus, in several cell-virus systems.

No reduction of the plaque number was observed, except when BHV 1 and SHV 1 were pretreated with 70 mg/ml HPA 23 for 2 hours (SHV 1 and BHV 1) or for 24 hours (BHV 1) before cell culture infection.

In vivo assay was performed using rabbits experimentally infected with 50 PFU of SHV 1. HPA 23 treatment (100 mg/kg/day ; 2 daily subcutaneous injections) did not protect rabbit against pseudorabies.