

Effet néfaste du lévamisole sur la trypanosomose expérimentale de la souris

par G. LIBEAU et M. PINDER

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (C. R. T. A.)
B. P. 454, Bobo-Dioulasso, République de Haute-Volta

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié l'effet du lévamisole, substance immunomodulatrice, sur la trypanosomose expérimentale de la souris. Il apparaît que le lévamisole a un effet aggravant sur le cours de l'infection en raccourcissant la période prépatente, en amplifiant le premier pic de parasitémie et en augmentant la mortalité.

INTRODUCTION

La trypanosomose africaine expérimentale est associée à une profonde dépression de la réponse immune à médiation humorale et cellulaire, contre des antigènes de nature variée. Elle est accompagnée de splénomégalie, d'hypertrophie des ganglions lymphatiques, d'une augmentation du taux des IgM circulantes, et d'une altération du nombre et de la fonction des cellules dans toutes les classes de lymphocytes. Les causes de la dépression immunitaire, principalement étudiées chez la souris, ont été attribuées à l'effet suppressif de cellules T, de macrophages ou des deux, ainsi qu'à une stimulation polyclonale exhaustive des cellules B; ces phénomènes sont analysés en détail par ROELANTS et WILLIAMS (10).

MURRAY et MORRISON (8) ont, les premiers, étudié la possibilité de réduire cette immunodépression par l'utilisation d'immuno-

stimulants. Ils ont utilisé *Corynebacterium parvum*, *Mycobacterium tuberculosis*, souche BCG et *Bordetella pertussis*. Il s'est avéré que *C. parvum* et *B. pertussis* augmentent significativement la durée de vie des souris A/J et des C57B1 quand elles sont parasitées par *T. congolense*. Des résultats similaires sont obtenus chez ces mêmes souches parasitées par *T. brucei* et pré-traitées par *C. parvum*. Ce dernier est un immunostimulant non spécifique agissant principalement sur les macrophages. Nous avons donc voulu examiner si un agent immunomodulateur exerçant son action sur les cellules T ainsi que sur les macrophages, tel que le lévamisole (12) pouvait avoir également un effet bénéfique sur le cours de la maladie.

Le lévamisole a été initialement utilisé pour ses propriétés anthelminthiques. Certaines études montrent que ce produit n'a qu'un faible potentiel immunostimulant chez les animaux normaux. Des souris immunisées avec des globules rouges de mouton subissent une immu-

nostimulation initiale puis une immunosuppression prolongée du taux d'agglutinine (9). L'étude du système réticulo-endothélial fait apparaître également une augmentation graduelle de la capacité phagocytaire en fonction de la dose (5) ou ne montre aucun effet (13). Par contre, le lévamisole employé à la dose thérapeutique est capable de restaurer les fonctions immunes chez l'homme et l'animal immunodéprimés tels, par exemple, des individus âgés ou atteints de maladies infectieuses aiguës ou chroniques (6, 12).

La présente étude est une recherche de l'effet du lévamisole sur des animaux atteints de trypanosomose. Nous avons utilisé une souche de *T. congolense* qui donne chez la souris NMRI une parasitémie de longue durée, sans toutefois que l'issue en soit mortelle. Plusieurs variétés de souris consanguines de sensibilité différente à *T. congolense* ont aussi été utilisées afin de réaliser un parallèle avec la situation rencontrée chez les bovins où la maladie peut être aiguë ou chronique, avec ou sans rémission. Les paramètres étudiés sont le profil de parasitémie, le pourcentage de souris parasitées et le temps de survie.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. SOURIS

Quatre souches de souris consanguines ont été choisies : BALB/c ; A/J ; CBA ; C57Bl/6 ; — femelles uniquement, provenant du Centre de Sélection et d'Élevage du C. N. R. S., Orléans, France. Les souris NMRI des deux sexes proviennent du Centre Muraz et de l'élevage du C. R. T. A. Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. Les souris étaient âgées de 5 à 6 mois au moment de l'expérience pour tenir compte du temps d'adaptation d'environ 2 mois que nécessitent les souris importées.

2. TRYPANOSOMES

Les souris sont infectées par un stabilat de *T. congolense* dérivant de la souche Dinderesso/80/CRTA/3 de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* initialement isolée sur chien (fig. 1). Les NMRI ont reçu 5×10^5 trypanosomes vivants après 3 passages du 1^{er} isolat sur rongeurs (stabilat 2). Les souris consanguines ont reçu la même dose, et certaines NMRI 10^5 trypanosomes de la même souche ayant subi

2 passages supplémentaires sur rat et chèvre (stabilat 4). Avant l'infection, les stabilats ont été remis en suspension et ajustés à la dilution désirée dans une solution de phosphate glucosé (P. S. G., PO_4 § 0,06 M, glucose 1 p. 100, pH 8,0) puis injectés par voie intrapéritonéale (I. P.) à raison de 0,2 ml par souris.

Souche : Dinderesso/80/C.R.T.A./3

Trypanosoma (Nannomonas) congolense

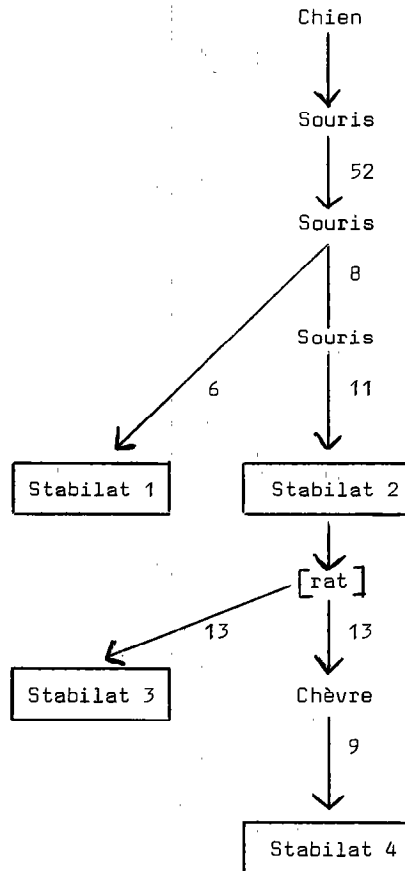


Fig. 1. Historique de *T. congolense*,

Souche Dinderesso/80/CRTA/3

3. TRAITEMENT AU LÉVAMISOLE

Le lévamisole, L-isomère du 2, 3, 5, 6-tétrahydro-6-phénylimidazo-2-1, b-thiazole (don de Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgique), est administré en I. P. et préalablement dissous dans un tampon phosphate (PO_4 § 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 6,5); la dose employée est de 2,5 mg/kg dans un volume de 0,2 ml à raison

de 2 injections par semaine ; la première coïncide avec l'inoculation du parasite. Les souris survivantes ont été traitées ainsi pendant environ 120 jours après l'inoculation. Les témoins ont reçu en I. P. le tampon phosphate.

4. PARASITÉMIE

Le sang est prélevé quotidiennement à l'extrémité de la queue. Les premiers parasites sont détectés par examen à l'état frais, puis leur dénombrement est fait par la « *Matching Method* » (4). Quarante champs au minimum sont examinés au microscope à contraste de phase (Microscope : Leitz HM Lux à un grossissement $\times 400$), la limite inférieure de détection est de 2×10^3 organismes par ml.

5. ANALYSES STATISTIQUES

Les tests de STUDENT FISHER, du X^2 ou de MANN-WHITNEY ont été utilisés de façon appropriée pour l'analyse statistique des résultats.

RÉSULTATS

1. EFFET DU LEVAMISOLE SUR LA SUSCEPTIBILITÉ DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE SOURIS VIS-A-VIS DE *T. CONGOLENSIS*

Les quatre souches de souris consanguines ainsi que les NMRI ont reçu 5×10^5 trypanosomes vivants. Elles ont été parallèlement soumises au traitement au lévamisole et comparées à un groupe témoin. Les résultats de l'expérience sont résumés dans le tableau n° I. Toutes les souris inoculées ont été parasitées et le traitement au lévamisole induit certaines modifications par rapport au groupe témoin.

Indépendamment du traitement et en se référant aux groupes témoins, le pourcentage de mortalité observé à intervalles réguliers permet de classer les groupes de souris selon leur sensibilité au trypanosome utilisé. On peut donc définir trois degrés distincts de celle-ci :

a) Le groupe de souris sensibles

Chez les BALB/c et les A/J les périodes prépatentes moyennes, c'est-à-dire le temps qui sépare

TABL. N°I-Influence du lévamisole sur le temps de survie et la parasitémie de différentes souches de souris (a).

	Traitement	Période prépatente (jour)	Jour du 1er pic	Hauteur du 1er pic (Log_{10} tryp/ml)	Nombre d'animaux vivant au jour 100	Temps de survie
BALB/c	+	$7,20 \pm 1,68$	$11,40 \pm 1,07$	$8,43 \pm 0,31$	0/10	$14,10 \pm 3,87$
	-	$6,80 \pm 1,47$	$11,90 \pm 1,10$	$8,47 \pm 0,32$	0/10	$14,10 \pm 4,22$
A/J	+	$7,23 \pm 1,69$	$13,15 \pm 1,77$	$8,72 \pm 0,32$	0/13	$16,50 \pm 5,23$ ($15,60 \pm 3,77$) (c)
	-	$8,76 \pm 1,42$	$12,76 \pm 1,30$	$8,63 \pm 0,32$	1/13	(b)
C B A	+	$12,23 \pm 2,83$	$17,15 \pm 3,78$	$8,33 \pm 0,30$	1/13	($23,11 \pm 11,70$) (c)
	-	$11,00 \pm 3,67$	$16,92 \pm 2,69$	$8,31 \pm 0,39$	5/13	($19,50 \pm 20,00$) (c)
N M R I	+	$11,50 \pm 4,24$	$17,37 \pm 5,97$	$7,96 \pm 0,56$	6/8	($88,00 \pm 80,00$) (c)
	-	$12,25 \pm 3,84$	$17,25 \pm 4,09$	$7,45 \pm 0,24$	8/8	(b)
C57BL/6	+	$10,70 \pm 4,57$	$14,00 \pm 5,35$	$5,46 \pm 0,12$	9/10	(85) (c)
	-	$20,40 \pm 17,30$	$24,80 \pm 15,51$	$5,58 \pm 0,15$	10/10	(b)

(a) moyenne arithmétique \pm écart type ; (b) durée de vie d'au moins un an.

l'inoculation de l'apparition du premier trypanosome, sont de 6,80 et 8,76 jours en moyenne. Cependant les A/J voient cette période significativement diminuer sous l'effet du traitement (7,23 jours au lieu de 8,76 ; $p < 0,05$ par le test de STUDENT FISHER).

Chez ce groupe et chez certaines des CBA, la parasitémie atteint tout de suite un niveau élevé et entraîne la mort dès le premier pic.

b) Le groupe de souris moyennement sensibles

La période prépatente, le jour et la hauteur du premier pic de parasitémie sont comparables chez les souris CBA traitées ou non au lévamisole. Dans le groupe témoin, il apparaît que certaines souris (8/13) meurent rapidement, et se comportent donc comme les BALB/c et A/J, tandis que d'autres (5/13) survivent comme les souris NMRI et C57Bl/6. Le lévamisole augmente le pourcentage de mortalité (12/13 ; $p < 0,02$ par le test du X^2).

c) Le groupe de souris peu sensibles

Chez les C57Bl/6, le traitement abrège en moyenne la période d'apparition des premiers parasites par une moindre dispersion des événements dans le temps. Il diminue significativement la période d'apparition du premier pic mais pas sa hauteur, qui est d'ailleurs faible, comparée à celle observée chez les autres souches de souris. Chez les NMRI traitées, on note une légère augmentation de la charge parasitaire durant le premier pic ($p < 0,05$ par le test du X^2). Chez les deux groupes, le profil parasitémique est constitué par une série de pics successifs séparés par des périodes où le parasite est indécélable et ceci aussi bien chez les souris traitées que chez celles qui ne le sont pas. Le lévamisole n'a pas eu d'effet décelable sur la durée de vie de ces souris malgré la longueur du traitement (120 jours).

2. EFFET DU LÉVAMISOLE SUR LES SOURIS INOCULÉES AVEC UNE FAIBLE DOSE DE *T. CONGOLENSIS*

Les résultats obtenus dans l'expérience précédente indiquaient que le lévamisole avait le pouvoir de rendre les souris plus sensibles au type de *T. congolense* employé. Afin de confirmer cette observation, nous avons étudié l'effet du

lévamisole sur des souris inoculées avec une dose de trypanosomes (10^5) connue pour donner une parasitémie patente chez seulement 60 p. 100 à 70 p. 100 des souris inoculées.

La figure 2 montre la proportion cumulative des souris parasitées en fonction du temps. Les premières souris parasitées appartiennent toujours au groupe recevant du lévamisole. L'effectif des souris devenues positives sur une période de 25 jours est significativement plus important dans le groupe traité que dans celui des témoins (chez les C57Bl/6 : $p < 0,001$ et chez les NMRI : $p < 0,0001$ par le test de MANN-WHITNEY).

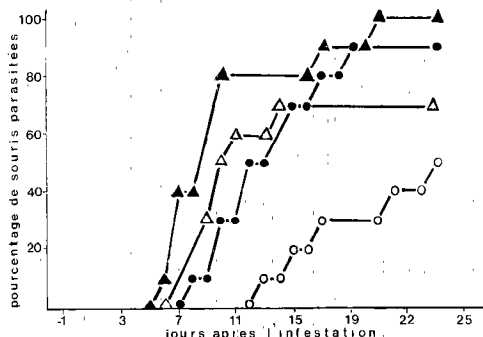


Fig 2 Effet du Levamisole sur le pourcentage de souris parasitées avec une faible dose de *Trypanosoma congolense* C57Bl traitées ▲, non traitées △, NMRI traitées ●, non traitées ○.

DISCUSSION

La présente étude examine l'effet de l'administration du lévamisole sur l'infection de souches de souris avec *T. congolense*. La différence de sensibilité des souris NMRI et des souches de souris consanguines utilisées est en accord avec celle observée par MORRISON et Collab. (7). Les résultats de cette étude montrent que, contrairement à notre attente, le lévamisole n'a pas d'effet bénéfique sur la maladie, mais plutôt un effet généralement aggravant comme le prouvent :

- l'élévation du taux de mortalité des souris CBA ;
- le raccourcissement de la période prépatente chez les souris A/J, NMRI et surtout C57Bl/6 ;
- la réduction du temps nécessaire à l'apparition du premier pic chez les souris C57Bl/6 ;
- l'amplification de ce premier pic chez les souris NMRI ;
- une certaine mortalité chez les souris

NMRI (2/8) et C57B1/6 (1/10) qui ne meurent pas en l'absence de traitement au lévamisole ;
— l'augmentation du nombre d'animaux parasités après une dose d'infection suboptimale.

L'action du lévamisole aux doses utilisées ici est de rétablir les fonctions immunes déprimées et plus spécialement celles à médiation cellulaire, en stimulant les cellules T et en accélérant la différenciation des cellules T précurseurs en lymphocytes matures (11). L'effet néfaste observé dans la trypanosomose expérimentale de la souris qui induit toujours une sévère immunosuppression (10) est donc surprenant. On peut émettre plusieurs hypothèses :

(a) — la dose et le protocole de traitement utilisés ne sont pas adéquats. Ceci est peu probable car ce sont ceux conseillés dans la littérature pour obtenir l'effet recherché (11) et nous avons d'ailleurs pris la précaution de nous adresser à un spécialiste de la question, le Dr SYMOENS (Janssen Pharmaceutica, que nous remercions), pour nous en assurer ;

(b) — le lévamisole augmenterait la multiplication, l'infectivité ou la virulence de *T. congolense* ;

(c) — la stimulation du système immunitaire chez les animaux traités au lévamisole entraînerait une augmentation des complexes immuns qui seraient une des conséquences néfastes de l'infection trypanosomienne. Dans cette optique, GASBARRE *et al.* (2) ont montré que les souris CBA/N, déficientes dans l'activation des lymphocytes B, survivent deux fois plus longtemps que les souris CBA normales après infection par *T. b. brucei*. La seule différence notable entre les deux types de souris est la moindre quantité de complexes immuns chez les CBA/N ;

(d) — il se pourrait également que l'activation du système réticulo-endothélial par le lévamisole entraîne une diminution de la charge antigénique et une moindre réponse immunitaire spécifique à la glycoprotéine de surface. A cet effet on peut rappeler que les lignées de souris bonnes productrices (B. P.) d'anticorps sélec-

tionnées par BIOZZI *et al.* ont un système réticulo-endothélial peu actif tandis que celui des mauvaises productrices (M. P.) est beaucoup plus efficace (14). Des études préliminaires faites dans notre laboratoire ont cependant montré que la souche B. P. de BIOZZI survivait mieux après une infection par le même *T. congolense* utilisé ici que la souche M. P. (M. PINDER, résultats non publiés).

D'une manière générale, il faut insister sur le fait que les mécanismes protecteurs fournis par le système immunitaire dans les trypanosomoses africaines sont très mal définis (10). Mis à part l'effet anthelminthique, on trouve peu d'informations sur l'utilisation du lévamisole dans le traitement des maladies parasitaires. Le lévamisole semble cependant augmenter la résistance à *Leishmania tropica* chez l'homme, mais pas dans les premiers temps de l'infection (1) et, associé au BCG, stimule l'immunité protectrice des souris C3H contre *Leishmania mexicana* (3).

Les observations que nous rapportons ici sur l'effet aggravant du lévamisole dans la trypanosomose expérimentale de la souris peuvent être rapprochées de l'expérience pilote de S. BERNARD (résultats non publiés) qui a trouvé que des bovins infectés par *T. vivax* et traités au lévamisole avaient une période prépatente plus courte de moitié et un pic de parasitémie de 5 à 10 fois plus important que celui des bovins non traités.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été faite avec le support de l'Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (I. E. M. V. T.), Maisons-Alfort, France, et de la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (G. T. Z.) PN 77.22275, République Fédérale d'Allemagne. Nous remercions le Dr J. SYMOENS pour le lévamisole et ses conseils d'utilisation et le Dr G. E. ROELANTS pour avoir revu le manuscrit.

SUMMARY

Deleterious effect of levamisole in experimental trypanosomiasis of the mouse

One outbred strain, NMRI, and 4 inbred strains of mice, BALB/c, A/J, CBA and C57B1/6, of widely differing susceptibilities to infection by *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*, stock Dinderesso/80/CRTA/3, were treated throughout

the course of infection with levamisole, an immunomodulating drug. Under the regime used this drug is capable of restoring depressed immune responses.

Surprisingly, levamisole was not beneficial to the course of infection. In all of the strains except BALB/c, levamisole treatment increased mortality and in three of the strains parasitaemia was enhanced.

The authors discuss possible reason for these findings which highlight the fact that the protective immune mechanisms operating in African trypanosomiasis are still poorly understood.

RESUMEN

Efecto nefasto del levamisole sobre la tripanosomiasis experimental del ratón

Se trataron con el levamisole la cepa de ratón NMRI y 4 cepas consanguíneas, BALB/c, A/J, CBA y C57B1/6, presentando varios niveles de sensibilidad para con la infección por la cepa Dinderesso/80/CRTA/3 de *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*.

Dicho producto inmunomodulator, en las condiciones utilizadas, restablece las funciones inmunes deprimidas.

Contra toda previsión, el levamisole no tuvo una influencia benéfica sobre el desarrollo de la infección sino un efecto agravante. El tratamiento con el levamisole aumenta la mortalidad en todas las cepas, salvo las BALB/c y aumenta la parasitemia en 3 de 5 cepas de ratones utilizados.

Los autores discuten de las causas posibles de los fenómenos observados que confirman que los mecanismos protectores establecidos por el sistema inmune en las tripanosomiasis africanas son todavía mal determinados.

BIBLIOGRAPHIE

1. BUTLER (P. G.). Levamisole therapy of chronic *Leishmania tropica*. *J. trop. Med. Hyg.*, 1978, **81** : 221.
2. GASBARRE (L. C.), FINERTY (J. F.), LOUIS (J. A.). Non specific immune response in CBA/N mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Parasite Immunol.*, 1981, **3** : 273-282.
3. GRIMALDI (G. F.), MORIEARTY (P. L.), HOFF (R.). *Leishmania mexicana* in C3H mice : BCG and Levamisole treatment of established infections. *Clin. exp. Immunol.*, 1980, **41** : 237-242.
4. HERBERT (W. J.), LUMSDEN (W. H. R.). *Trypanosoma brucei* : a rapid « matching » method for estimating the host's parasitaemia. *Exp. Parasitol.*, 1976, **40** : 427-431.
5. HOEBEKE (J.), FRANCHI (G.). Influence of Tetramisole and its optical isomers on the mononuclear phagocytic system. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 1973, **14** : 317-323.
6. MORIMOTO (C.), ABE (T.), HOMMA (M.). Restoration of T cell function in aged mice with long-term administration of Levamisole. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 1979, **12** : 316-322.
7. MORRISON (W. I.), ROELANTS (G. E.), MAYORWITHEY (K.), MURRAY (M.). Susceptibility of inbred strains of mice to *Trypanosoma congolense* : correlation with changes in spleen lymphocyte populations. *Clin. exp. Immunol.*, 1978, **32** : 25-40.
8. MURRAY (M.), MORRISON (W. I.). Non specific induction of increased resistance in mice to *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* by immunostimulants. *Parasitology*, 1979, **79** : 349-366.
9. RENOUX (G.), RENOUX (M.). Modulation of immune reactivity by phenylimidothiazole salts in mice immunized by sheep red blood cells. *J. Immunol.*, 1974, **113** : 779-790.
10. ROELANTS (G. E.), WILLIAMS (R. O.). African trypanosomiasis. *Critical Rev. trop. Med.*, 1981, **1** (sous presse).
11. SYMOENS (J.), DE CREE (J.), VAN BEVER (W. F. M.), JANSSEN (P. A. J.). Levamisole. in : Pharmacological and biochemical properties of drug substance, Vol. 2, Published by American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical Sciences. Washington, DC. 407-464.
12. SYMOENS (J.), ROSENTHAL (M.), DE BRABANDER (M.), GOLDSTEIN (G.). Immunoregulation with Levamisole. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1979, **2** : 49-68.
13. VERHAEGEN (H.) et al. Levamisole and the immune response. *N. Engl. J. Med.*, 1973, **289** : 1148.
14. WEINER (E.), BANDIERI (A.). Differences in antigen handling by peritoneal macrophage from the biozzi high and low responder lines of mice. *Eur. J. Immunol.*, 1974, **4** : 457-463.