

Les lentivirus des petits ruminants : importance des modèles expérimentaux pour la compréhension de leurs pathologies

P. RUSSO (1), C. VITU (1), A. HARMACHE (2), M. BOUYAC (2), C. HIÉBLOT (2),
R. VIGNE (2), M. PÉPIN (1), M. SUZAN (2)

(1) Cneva Sophia Antipolis, 105, Route des Chappes, 06410 Biot, France.

(2) INSERM U372, BP 178, 13326 Marseille Cedex 9, France

avec la collaboration de M. VIGNONI (1) ET J. M. GUIBERT (1)

RÉSUMÉ – Depuis 1980, le CNEVA Sophia Antipolis, au sein d'un groupe pluridisciplinaire formé d'équipes de l'INSERM et l'INRA et soutenu financièrement par l'ANRS, a développé des modèles d'infection expérimentale par les lentivirus chez le mouton et la chèvre. La reproduction expérimentale des lentiviroses a permis d'aborder les points suivants : optimisation d'un modèle rapide d'infection *in vivo*, étude de la pathologie néonatale, incidence des manifestations nerveuses, importance des gènes de régulation dans l'apparition des signes cliniques, étude de vaccins classiques et génétiques. Ces essais *in vivo* débouchent, grâce au matériel obtenu, sur la mise au point de techniques précoces de diagnostic : ELISA, immunoblotting, PCR. Ces travaux illustrent l'intérêt des expériences *in vivo* pour une meilleure compréhension de la pathogénie des Lentivirus en médecine animale et humaine.

Lentiviruses of sheep and goats : importance of experimental models for understanding their pathogenesis

P. RUSSO (1), C. VITU (1), A. HARMACHE (2), M. BOUYAC (2), C. HIÉBLOT (2),
R. VIGNE (2), M. PÉPIN (1), M. SUZAN (2)

Renc. Rech. Ruminants, 1994, 1, 65 – 68

SUMMARY – Since 1980's and within a multidisciplinary group supported by grants from ANRS, the CNEVA Sophia Antipolis has developed experimental models of infection by lentiviruses in sheep and goats. These models have enabled us to address the following : study of neonatal pathology, incidence of nervous signs, importance of regulatory genes in the onset of clinical signs, studies on classical and genetic vaccines. These *in vivo* experiments are allowing us to focus on early diagnostic techniques : ELISA, immunoblotting, PCR. This work illustrates the importance of *in vivo* experiments for a better comprehension of the pathogenesis of Lentiviruses in veterinary and human medicine.

INTRODUCTION

Le groupe formé par l'INSERM (U372 Marseille), l'INRA (ENV Lyon) et le CNEVA Sophia Antipolis s'intéresse aux Lentivirus des petits ruminants depuis plus de 15 années. Les Lentivirus du mouton (maedi-visna) et de la chèvre (Caprine-Arthritis-Encephalitis Virus ou CAEV) appartiennent à la famille des Rétrovirus. Nos projets de recherche sont principalement axés sur une meilleure connaissance de la pathogénie de ces virus et sur la mise au point de techniques de dépistage fiables et précoces. La découverte du HIV et de son appartenance à cette sous-famille a apporté un regain d'intérêt pour ces virus animaux, et ainsi les recherches en pathologie vétérinaire ont pu bénéficier de l'avancée et de la collaboration des équipes travaillant en pathologie humaine. Cette collaboration s'est concrétisée par un financement de notre groupe par l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS).

Chez les petits ruminants, les Lentivirus sont responsables de maladies dégénératives à évolution lente qui atteignent le système nerveux, les poumons, les articulations et la mamelle. Leurs cellules-cibles sont les cellules de la lignée monocyttaire : le maedi-visna et le CAEV infectent les monocytes et les macrophages. La réplication virale, liée à l'état de maturation et d'activation de ces macrophages est à l'origine du dysfonctionnement des cellules infectées. Cela se traduit par des réactions inflammatoires dans les différents tissus, conduisant au développement d'encéphalites, de pneumonies, d'arthrites et de mammites.

1. LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

1.1. LE MODÈLE OVIN

Le modèle ovin a été abordé dès 1980, par l'étude du pouvoir pathogène de souches prototypes de maedi-visna. Des inoculations intra-cérébrales de souches islandaises (K796, K1514) n'ont pas permis la mise en évidence de signes cliniques, même après plus de deux années d'observation (RUSSO et al, 1988). Ces résultats ont confirmé les observations du terrain sur la rareté des signes nerveux dans les élevages infectés. Par contre, les inoculations intra-trachéales ont fourni de meilleurs résultats, sans reproduire les signes cliniques de manière systématique : des agneaux inoculés avec une souche française n'ont présenté aucun signe clinique malgré son réisolement à partir des monocytes circulants et d'explants pulmonaires. Une souche sud-africaine inoculée dans des conditions semblables n'a engendré ni signes cliniques, ni isolement viral. Par contre, des travaux réalisés sur d'autres races et dans des conditions différentes ont donné des résultats plus encourageants (LERONDELLE et al, 1989). Nous avons néanmoins montré que, malgré l'absence apparente de signes cliniques, les lentivirus pouvaient avoir un effet négatif sur la croissance des jeunes (RUSSO et al, 1994).

Ces expérimentations nous ont donc conduit à envisager non plus le «modèle-maladie» mais le «modèle-infection», montrant ainsi que la reproduction du syndrome maedi-visna n'était pas aisée, qu'intervenaient des facteurs favorisants associés à une phase préclinique très longue, diffi-

cilement compatible avec des expérimentations programmées.

1.2. LE MODÈLE CAPRIN

Le modèle caprin s'est montré beaucoup plus intéressant. Le tropisme articulaire des lentivirus caprins a permis en effet d'obtenir, après inoculation intra-articulaire, une modification appréciable de l'index clinique (rapport plus grand carpe/plus petit métacarpe) en 6 à 8 semaines, durée relativement courte par rapport aux temps d'incubation du modèle ovin. De plus, ce paramètre peut être utilement complété par une numération des leucocytes du liquide synovial, permettant ainsi une approche quantitative de la réponse inflammatoire. Ce modèle bien au point nous a permis d'étudier le rôle des gènes de régulation *vif* et *tat* par l'inoculation de chevreaux à partir d'une souche de CAEV délétée dans les gènes concernés :

– le gène *vif* exprime une protéine présentant des propriétés communes avec celle produite par le même gène chez HIV. Nous avons montré que ce gène était indispensable pour obtenir une réplication *in vivo* et induire une infection virale persistante : en effet, des chèvres injectées avec un clone moléculaire de CAEV délété dans le gène *vif* n'ont présenté aucune séroconversion (HARMACHE et al, 1994c).

– en revanche, le gène *tat*, codant pour une protéine actrice du virus, ne semble pas indispensable à la réplication *in vivo* : les chèvres inoculées avec du CAEV délété dans ce gène ont présenté une invasion discrète du liquide synovial par des cellules blanches, associée à une séroconversion (HARMACHE et al, 1994b).

Ces études *in vivo* sur les gènes de régulation des Lentivirus animaux permettent donc de préciser leur capacité à induire une infection avec ou sans lésions et signes cliniques.

Une approche originale de l'inoculation a été réalisée par l'utilisation non pas de virions entiers mais d'ADN infectieux libre ou complexé à des liposomes. L'inoculation intramusculaire de ce matériel génétique entraîne une séroconversion des animaux infectés (HARMACHE et al, 1994a). L'utilisation d'ADN pour «transfecter» des chevreaux permet de travailler directement sur l'ADN viral natif, en s'affranchissant des variations génétiques de l'enveloppe souvent liées à la production du virus *in vitro*.

Ces expérimentations ont conduit à l'approche vaccinale des Lentiviroses des petits ruminants. Nous avons montré qu'une vaccination par un vaccin entier tué et adjuvé, suivie d'une épreuve virulente, conduit - contrairement aux vaccins classiques - à une exacerbation des lésions chez les animaux vaccinés ; les anticorps vaccinaux anti gp 135 apparaissant après vaccination ne semblent pas avoir de rôle protecteur et pourraient être impliqués dans ce rôle de facilitation (RUSSO et al, 1993 ; VITU et al, 1993). Ces résultats ont conduit à abandonner le vaccin à virus inactivé pour s'orienter vers des produits présentant une bonne efficacité alliée à une parfaite innocuité. Le problème, comme dans la vaccination humaine, reste complexe ; un essai de vaccination génétique (avec de l'ADN «nu») de chèvres avec un vecteur exprimant le gène *vif* est en cours d'étude.

2. APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC DES LENTIVIROSES DES PETITS RUMINANTS

Grâce aux nombreux prélèvements obtenus tout au long des infections expérimentales, nous avons pu recueillir un matériel très utile pour la mise au point et l'amélioration de tests de diagnostic, à la fois sérologique (ELISA, immunoblot) ou basés sur la réaction d'amplification génique (PCR).

2.1. TEST ELISA ET IMMUNOBLOT

2.1.1. Un test ELISA pour la sérologie du maedi-visna a été mis au point dès 1980 pendant la première expérimentation sur brebis (VITU et al., 1982). Il s'est avéré plus sensible et plus précoce que l'immunodiffusion en gélose, mais nécessitant toutefois un antigène viral très purifié (virions). Cette longue pratique du test ELISA, appliqué ensuite au CAEV, nous a permis depuis de tester différents prototypes de kits et de conseiller les fabricants pour améliorer la fiabilité de leurs réactifs.

2.1.2. L'immunoblot (western blot) a également été longuement étudié. La technique de préparation de l'antigène utilisé pour sensibiliser les membranes de support ne doit pas éliminer certains antigènes fondamentaux, en particulier les glycoprotéines de l'enveloppe virale : gp135, gp70 et gp45. Les bandes les plus fréquemment retrouvées sont : la protéine p28 de la nucléocapside accompagnée des petites protéines p16 et p14 (type visna), ou p18 et p14,5 (type CAEV). En raison de la rareté de l'antigène purifié, le western blot ne semble pas appelé à être utilisé en routine.

2.1.3. Réaction d'amplification génique (PCR). La recherche d'un test de référence nous a amenés à pratiquer l'analyse en PCR à partir des cellules des animaux infectés par le maedi-visna ou par le CAEV, après extraction de l'ADN

proviral. L'ADN proviral peut être obtenu après culture des souches isolées, ou culture de cellules cibles (membranes synoviales) : la PCR post-culture donne les meilleurs résultats; on utilise un couple d'amorces du gène pol (gène de la reverse transcriptase) permettant l'amplification des ADN des souches visna et CAEV.

Nous travaillons actuellement à un diagnostic plus direct, par amplification de l'ADN proviral obtenu à partir des cellules mononuclées du sang (monocytes). Ce diagnostic préculture est plus difficile du fait de la très faible charge virale dans ces monocytes circulants. On a donc recours à des méthodes plus longues : turbo-PCR, double amplification, nested PCR. Les amorces utilisées actuellement sont situées sur les séquences des extrémités du génome appelées LTR (Long Terminal Repeat) de l'ADN viral. L'analyse du lait a également donné des résultats positifs : l'ADN proviral se trouve alors dans les macrophages obtenus par simple centrifugation et lavage (VITU et al., 1994). La charge virale y étant plus élevée, cette technique pourrait permettre la mise au point d'un test de diagnostic. Le contrôle des produits de PCR s'est avéré indispensable par hybridation moléculaire. Ici encore, la technique est assez lourde et doit être simplifiée afin de pouvoir être utilisée à grande échelle dans l'avenir.

CONCLUSION

Les modèles expérimentaux permettent donc une meilleure compréhension de la pathologie et représentent également une précieuse réserve de «matériel biologique» pour la mise au point de nouvelles techniques de diagnostic. Tous ces résultats montrent l'intérêt du travail *in vivo* pour approfondir nos connaissances sur la pathogénie des Lentivirus et progresser vers une prophylaxie efficace. La collaboration avec la médecine humaine est une illustration de l'importance de ces modèles pour la compréhension des mécanismes complexes des Lentivirus humains et animaux.

RÉFÉRENCES

- HARMACHE A., RUSSO P., VITU C., VIGNE R., SUZAN M., 1994a. Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. May 24-29
- HARMACHE A., VITU C., RUSSO P., BOUYAC M., HIEBLOT C., PEVERI ., VIGNE R., SUZAN M., 1994b. Submitted to J. Virol.
- HARMACHE A., VITU C., RUSSO P., BOUYAC M., HIEBLOT C., VIGNE R., SUZAN M., 1994c. Conférence sur les modèles d'étude du SIDA. Paris, 2 mai
- LERONDELLE C., FLEURY C., VIALARD J., 1989. Ann. Rech. Vét. 20, 57-64
- RUSSO P., VITU C., VIGNE R., FILIPPI P., GIAUFFRET A., 1988. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., 11, 35-41
- RUSSO P., VITU C., FONTAINE JJ., VIGNONI M., 1993. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., 16, 131-136
- RUSSO P., VITU C., VIGNONI M., GUIBERT JM., 1994. 2nd European Workshop on Ovine and Caprine Lentiviruses. La Londe les Maures, Sept. 27-30
- VITU C., RUSSO P., VIGNONI M., 1993. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 16, 137-144
- VITU C., RUSSO P., FILIPPI P., VIGNE R., QUERAT G., GIAUFFRET A., 1982. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 5, 469-481
- VITU C., HARMACHE A., QUERAT G., RUSSO P., VIGNONI M., 1994. 2nd European Workshop on Ovine and Caprine Lentiviruses. La Londe les Maures, Sept. 27-30

