

Hétérogénéité génomique dans le gène *pol* du lentivirus ovin visna-maedi

C. LEROUX, S. VUILLERMOZ, T. GREENLAND, J.F. MORNEX

Laboratoire associé de recherches sur les lentivirus chez les petits ruminants INRA et Ecole vétérinaire, Laboratoire d'immunologie et de biologie pulmonaire INSERM C.J.F. 93-08, et service de pneumologie. Hôpital Louis Pradel BP Lyon Montchat 69394 Lyon cédex 03.

Nous avons analysé 6 isolats de terrain de virus visna-maedi, obtenus à partir de macrophages alvéolaires de moutons spontanément infectés et présentant des lésions de maedi. L'ARN viral a été amplifié par RT-PCR avec des amorces spécifiques des gènes *pol* et *env*. Les fragments d'ADN obtenus ont été clonés puis séquencés. Dans *pol*, six isolats ont des séquences nucléotidiques très proches avec des taux de divergence de 3 à 10% (3 à 4% en acides aminés) lorsqu'ils sont comparés les uns aux autres, de 14 à 16% avec la souche CAEV Cork (4 à 8% en acides aminés) et de 16 à 19% avec la souche visna K1514 (11 à 13% en acides aminés). Le sixième isolat montre autant de divergence avec CAEV cork (21% en nucléotides et 13% en acides aminés) que K1514 (16% en nucléotides et 15% en acides aminés). Dans *env*, l'analyse des fragments obtenus par digestion avec différentes enzymes de restriction montre des différences entre les six isolats et avec les souches CAEV et K1514.

Genomic heterogeneity in the *pol* gene of visna-maedi virus

C. LEROUX, S. VUILLERMOZ, T. GREENLAND, J.F. MORNEX

Renc. Rech. Ruminants, 1994, 1, 77 – 80

In order to study the genomic heterogeneity among field isolates obtained from french sheep, total RNA was extracted from alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage of spontaneously infected sheep with typical maedi lesions. DNA fragments were obtained by RT PCR with different sets of primers in the *pol* and *env* genes, cloned and sequenced. In *pol*, six isolates showed closely related sequences with 3 to 10% differences the in nucleotide sequence (3 to 4% in the amino-acid sequence) when they were compared to each other. They differed by 14 to 16% from the CAEV Cork sequence (4 to 8% in amino acid sequence) and 16 to 19% from the K1514 sequence (11 to 13% in amino acid sequence). The sixth isolate was as divergent from CAEV as from K1514. Amplified products from *env* analysed by restriction enzymes showed a considerable heterogeneity.

INTRODUCTION

Les lentivirus constituent une sous famille de rétrovirus, non oncogènes. Leur génome est composé de trois gènes: *gag*, *pol* et *env*, codant, respectivement, pour les protéines de la capsid, les activités enzymatiques dont l'enzyme transcriptase inverse, les protéines de l'enveloppe et des cadres de lecture ouverts codant pour des protéines régulatrices. Ils infectent les primates: l'homme avec HIV-1 et HIV-2 (Human Immunodeficiency Virus type 1 and 2), et le singe avec SIV (Simian Immunodeficiency Virus); les petits ruminants: la chèvre avec CAEV (Caprine Arthritis Encephalitis Virus) et le mouton avec le virus visna-maedi; les bovins avec BIV (Bovine Immunodeficiency Virus); les chevaux avec EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) et le chat avec FIV (Feline Immunodeficiency Virus). Les pathologies lentivirales sont caractérisées par une période de latence clinique prolongée, une forte variabilité génétique entraînant une dérive antigénique importante et la multiplicité des tissus atteints. Ils induisent des syndromes d'immunodéficience, des lésions inflammatoires du poumon, des articulations, des glandes mammaires ou du système nerveux central. Le virus visna-maedi est responsable chez le mouton de lésions inflammatoires du poumon (maedi), du système nerveux central (visna), des glandes mammaires et des articulations. Il infecte les cellules de la lignée monocyte/macrophage. L'expression des gènes viraux est fonction de la différenciation des cellules; le cycle viral n'est complet que dans les cellules matures (GENDELMAN et al, 1986). Comme pour les autres lentivirus décrits, l'infection d'un animal est suivie d'une période de latence de quelques mois à quelques années, sans manifestation clinique de la maladie. Chez les moutons infectés spontanément ou expérimentalement, le principal organe cible est le poumon. La forme majeure de la maladie est une insuffisance respiratoire avec une dyspnée d'effort («brebis souffleuse»). Les lésions sont caractérisées par une alvéolite, des nodules lymphoïdes péribronchovasculaires, un épaississement des parois alvéolaires et une myomatose. La variabilité des lentivirus des petits ruminants a été décrite essentiellement au niveau antigénique en montrant que la spécificité des anticorps neutralisants envers les antigènes viraux était très étroite et ne permettait pas la neutralisation de virus variants (PYPER et al, 1984; CHEEVERS et al, 1991). Chez des animaux infectés expérimentalement par CAEV, il y a apparition de variants antigéniques et persistance du virus initial même en présence d'anticorps neutralisants (CHEEVERS et al, 1993) et des variations antigéniques des épitopes reconnus par les cellules T cytotoxiques (LICHTENSTEIGER et al, 1993). A ce jour, 6 séquences totales ou partielles de lentivirus des petits ruminants d'origines géographiques différentes ont été décrites: la souche de référence de visna-maedi K1514 (SONIGO et al, 1985); un lentivirus ovin d'origine sud africaine, SA-OMVV (QUERAT et al, 1990); un clone infectieux de CAEV (SALTARELLI et al, 1990); un isolat écossais de visna-maedi, EV1 (SARGAN et al, 1991); un clone moléculaire neurovirulent dérivé de K1514 (ANDRESSON et al, 1993) et une séquence partielle d'un isolat de mouton d'origine américaine (CAMPBELL et al, 1993). Leur comparaison permet de mettre en évidence

une variabilité plus importante dans le gène *env* (de l'ordre de 20 %) codant pour les glycoprotéines d'enveloppe que dans les gènes *pol* (de l'ordre de 15%) et *gag*. Il n'a pas été montré de relation entre l'évolution de la maladie et les variations antigéniques des virus visna-maedi ou CAEV. Nous avons analysé l'hétérogénéité par amplification génique et séquençage de lentivirus ovin obtenus à partir de lavages bronchoalvéolaires de 14 poumons de mouton Lacaune présentant des lésions de maedi. Dans la région du gène *pol* codant pour la reverse transcriptase, les isolats français sont plus proches entre eux que des autres souches décrites de CAEV ou de virus visna-maedi. Leur séquence est moins divergente de la séquence du CAEV américain que du virus islandais K1514.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. ORIGINE DES ANIMAUX

Quatorze prélèvements de macrophages alvéolaires de moutons Lacaune spontanément infectés par le virus visna-maedi provenant du sud de la France (Larzac) ont été analysés. Les animaux ont été sélectionnés sur des critères cliniques («Brebis souffleuses»), et par la présence de lésions pulmonaires typiques de maedi après examen anatomopathologique. L'examen histologique a permis de distinguer entre les atteintes de maedi (associant une alvéolite, une hyperplasie lymphoïde péribroncho-artérielle, un épaississement des cloisons pariéto-alvéolaires, une myomatose et une fibrose) et les lésions mineures (alvéolite) selon les critères précédemment définis (MORNEX et al, 1994). La présence de lentivirus a été confirmée par l'observation d'un effet cytopathique (formation de syncytia) dans des cocultures de macrophages alvéolaires et de fibroblastes de derme de mouton, et par détection d'une activité transcriptase inverse dans le surnageant des cocultures.

1.2. ANALYSE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ GÉNOMIQUE PAR SÉQUENÇAGE

L'ARN total a été extrait à partir de 10×10^6 macrophages alvéolaires, puis rétrotranscrit en présence d'hexanucléotides aléatoires et de reverse transcriptase du virus de leucémie murine de Moloney. Le produit de la rétrotranscription a été utilisé pour l'amplification génique par PCR avec différents couples d'amorces localisés dans les gènes *pol* et *env*. Un couple d'amorces dégénérées a été défini en comparant les séquences des souches CAEV Cork, EV1, SA-OMVV et K1514 dans la région du gène *pol* codant pour la reverse transcriptase; elles correspondent aux nucléotides 2198 à 2215 du génome complet de K1514 pour l'amorce sens, et 2672 à 2650 pour l'amorce antisens. Trois couples d'amorces ont été définis en comparant uniquement les séquences des souches EV1, SA-OMVV et K1514 dans la région du gène *env* correspondant à la partie externe de la glycoprotéine de surface. Toutes les amorces *env* sont localisées entre les nucléotides 6391 et 7842 du génome complet de K1514. Les fragments d'ADN obtenus (450 à 550 paires de bases) avec les différents couples d'amorces ont été visualisés sur gel d'agarose, analysés par digestion par des enzymes de restriction, clonés avec un système de clonage TA (InVitrogen) permettant le clonage direct des

LENTIVIRUS OVINS

	K1514	663	664	680	684	685	686	676
CAEV Cork	20,4 (13,3)	14,3 (4,4)	13,9 (4,4)	15 (5,1)	15,2 (6,3)	15,2 (4,4)	15,2 (4,4)	20,6 (12,7)
K1514	0 (0)	17,1 (11,4)	18,5 (12,6)	17,9 (14,0)	16,8 (13,3)	17,7 (13,3)	17,9 (12,7)	16,8 (15,2)

Tableau 1 : Pourcentage de divergence des séquences nucléotidiques (en caractères gras) et des séquences déduites en acides aminés (entre parenthèses) entre les isolats français de lentivirus ovins (663, 664, 680, 684, 685, 686, 676) et la souche caprine CAEV Cork ou ovine K1514.

produits de PCR et séquencés par la technique de terminaison des chaînes de Sanger. Les séquences obtenues ont été traitées sur Macintosh avec les logiciels GeneJockey™ et GeneWorks™ en utilisant la méthode d'alignement progressif.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'amplification par PCR après rétrotranscription des ARN totaux extraits des macrophages alvéolaires permet l'obtention d'un fragment d'ADN correspondant au lentivirus chez tous les animaux étudiés (14/14) présentant des lésions de maedi et pour lesquels la présence du virus a pu être détectée par des techniques virologiques de coculture et de dosage d'activité reverse transcriptase. Dans le gène *env*, seuls 8/14 isolats sont positifs en RT-PCR avec au moins l'un des couples et 2/8 isolats sont positifs avec les trois couples testés. Les produits d'amplification obtenus dans *env* sont de tailles légèrement différentes selon l'isolat considéré et légèrement supérieure à celle du fragment obtenu à partir de la souche de laboratoire K1514. La digestion enzymatique des produits de PCR obtenus dans *pol* et *env* montre des différences importantes de profils de restriction entre les 14 isolats étudiés ainsi qu'entre ces isolats et les souches publiées. Les produits d'amplification dans *pol* de 7 isolats ont été séquencés. Six isolats (663, 664, 680, 684, 685 et 686) ont des séquences nucléotidiques très proches. Il existe de 3 à 10% de divergence entre les séquences nucléotidiques de ces souches et de 3 à 4% entre les séquences protéiques déduites. En séquence d'acides aminés dans la région *pol* étudiée, ces isolats français sont plus proches de la souche caprine CAEV Cork que de la souche ovine K1514 (tableau 1). Un isolat (676) est également distant de K1514 (16,8% en nucléotides et 15,2% en acides aminés) et de CAEV Cork (20,6% en nucléotides et 12,7% en acides aminés). Pour tous les isolats, les mutations observées sont principalement des transitions (81% des mutations), avec une prédominance de transitions G/A. Les mutations nucléotidiques sont très majoritairement silencieuses et n'entraînent pas de modifications importantes de la protéine.

Dans notre étude, il a été possible de détecter de l'ARN viral dans les macrophages alvéolaires des animaux quelque soit le stade de développement de la maladie. Les macrophages alvéolaires sont la cible principale des lentivirus ovins et

caprins (ZINK et al, 1984) et la détection de virus répliquatif directement dans ces cellules permet de connaître la nature génétique du virus présent dans l'organe malade. Cette détection directe évite l'amplification du virus en culture et le biais d'une éventuelle sélection de variants présentant un avantage de répliquaison en culture comme ce qui a été décrit pour HIV-1 (MEYERHANS et al, 1989). Pour certains animaux l'absence de signal d'amplification dans le gène *env* est probablement due à une divergence trop importante entre les amorces déterminées et le génome viral. Ceci permet d'envisager une variabilité plus importantes de ces isolats au niveau du gène *env* que du gène *pol*. Les séquences analysées dans le gène *pol* montrent la parenté des isolats de terrain français analysés avec la souche caprine de référence CAEV Cork, plus particulièrement en comparant les séquences d'acides aminés déduites. L'analyse d'isolats français de lentivirus caprins pourrait permettre de comprendre les contraintes de l'espèce sur la variabilité du virus et d'aborder le déterminisme des lésions chez la chèvre ou le mouton.

REMERCIEMENTS

Soutenu par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS 227, ANRS 257); Hospices Civils de Lyon; Faculté de Médecine de Lyon; Université Claude Bernard; c.i. est bénéficiaire d'une bourse de la Fondation Marcel Mérieux.

RÉFÉRENCES

- ANDRESSON O.S., ELSER J.E., TOBIN G.J., GREENWOOD J.D., GONDA M.A., GEORGSSON G., ANDRESDOTTIR V., BENEDIKTSDOTTIR E., CARLSDOTTIR H.M., MANTYLA E.O., RAFNAR B., PALSSON P.A., CASEY J.W., PETURSSON G., 1993. *Virology*, 193, 89-105
- CAMPBELL B.J., THOMPSON D.R., WILLIAMS J.R., CAMPBELL S.G., AVERY R.J., 1993. *J. Gen. Virol.*, 74, 201-210
- CHEEVERS W., KNOWLES D., NORTON L., 1991. *J. Infect. Dis.*, 164, 679-685
- CHEEVERS W., MCGUIRE T., NORTON L., CORDERY-COTTER R., KNOWLES D., 1993. *Virology*, 196, 835-839
- GENDELMAN H.E., NARAYAN O., KENNEDY STOSKOPF S., GHOTBI Z., CLEMENTS J.E., STANLEY J., PEZESHKPOUR G., 1986. *J. Virol.*, 58, 67-74
- LICHTENSTEIGER C.A., CHEEVERS W.P., DAVIS W.C., Oct 1993. *J. Gen. Virol.*, 74, 2111-2116
- MEYERHANS A., CHEYNIER R., ALBERT J., SETH M., KWOK S., SNINSKY J., MORFELDT-MANSON L., ASKO B., WAIN-HOBSON S., 1989. *Cell*, 58, 901-910
- MORNEX J.F., LENA P., LOIRE R., COZON G., GREENLAND T., GUIGUEN F., JACQUIER M.F., CORDIER G., 1994. *Vet. Res.*, 25, 478-488
- NARAYAN O., CLEMENTS J., 1988. *J. Gen. Virol.*, 70, 1617-1639
- PYPER J., CLEMENTS J., MOLINEAUX S., NARAYAN O., 1984. *J. Virol.*, 51, 713-721
- QUÉRAT G., AUDOLY G., SONIGO P., VIGNE R., 1990. *Virology*, 175, 434-447
- SALTARELLI M., QUÉRAT G., KONINGS D.A., VIGNE R., CLEMENTS J.E., 1990. *Virology*, 179, 347-364
- SARGAN D.R., BENNET I.D., COUSENS C., ROY D., BLACKLAWS B.A., DALZIEL R.G., WATT N., MCCONNELL I., 1991. *J. Gen. Virol.*, 72, 1893-1903
- SONIGO P., ALIZON M., STASKUS K., KLATZMANN D., COLE S., DANOS O., RETZEL E., TIOLLAIS P., HAASE P., WAIN-HOBSON S., 1985. *Cell*, 42, 369-382
- ZINK M.C., JOHNSON L.K., 1994. *Virus Res.*, 32, 139-154