

ZV000A179

Article de recherche

Formation de syncytia en culture et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV)

I. Blondin, C. Grillet et Y. Thiogane

Laboratoire de recherches sur la Pathologie des Petits Ruminants, INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, BP 31, 69752 Charbonnières Cedex, France

(accepté le 7-5-i 988)

Résumé — La capacité à former des syncytia sur diverses cultures cellulaires de chèvre et de mouton a été étudiée pour 9 souches de virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV) isolées soit à partir de lésions, soit à partir de tissu normal de chèvre. Leur composition protéique a été déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Toutes les souches de CAEV avaient une grande affinité pour les cellules de membrane synoviale de chèvre. Toutes les souches pouvaient se répliquer *in vitro* dans des monocytes de chèvres et produisaient plus de syncytia sur les cellules cultivées à 39°C. Deux souches ne formaient pas de syncytia sur les cellules de cornet nasal de chèvre. Une souche provoquait la lyse de toutes les cellules de chèvre testées et non celle des cellules de mouton. Cependant, aucune différence significative du profil électrophorétique n'a pu être observée entre ces souches.

arthrite — encéphalite — caprin — ovin — CAEV — syncytia — composition protéique — culture cellulaire

Summary — Syncytia forming activity of different caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strains in goat and sheep cell cultures. The syncytia forming activity of 9 caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strains isolated from lesions or normal goat tissue was evaluated *in vitro*. No discrepancies were seen between the structural proteins of the 9 strains by gel electrophoresis. Goat synovial membrane cells were the most susceptible to the 9 CAEV strains. Goat monocytes in culture were susceptible to all the strains tested. At 39 °C, all the strains produced more syncytial lesions. In nasal turbinate cells, 2 strains did not form syncytia; one strain induced lysis of all the goat cells used.

arthritis — encephalitis — caprine — ovine — CAEV — syncytia — protein composition

Introduction

Le virus de l'arthrite-encéphalite de la chèvre (CAEV) est un lentivirus rétroviral

vreaux des symptômes de paralysie ascendante et, chez les adultes, une arthrite évoluant chroniquement associée

centage de caprins sérologiquement positifs ne présente pas de symptômes cliniques (Narayan et al., 1980). Cette étude a pour but de relier les variations de l'expression clinique de l'infection à des différences entre les souches isolées. Nous avons donc comparé neuf souches de CAEV isolées à partir de lésions ou de tissu normal, en utilisant comme critère de différenciation la capacité de ces souches à former des syncytia sur des cultures cellulaires de chèvre et de mouton, pour savoir s'il existe une cellule-cible plus sensible au virus *in vitro*, et si l'effet cytopathogène observé en culture dépend de la nature de la cellule infectée et de l'organe d'origine.

La formation de syncytia résulte d'une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe virale et la membrane cellulaire. De plus, le réarrangement structural des glycoprotéines d'enveloppe peut expliquer la variabilité antigénique observée au sein des lentivirus. Nous avons donc étudié la structure protéique de ces souches virales par électrophorèse.

Matériel et Méthodes

Virus

Virus CAEV. Huit souches proviennent des symptômes cliniques : 6 isolées d'articulations; 2 de poumons.

Une souche est issue d'un virus qui s'est manifesté brutalement dans une lignée de cellules articulaires, plusieurs mois après l'explication (Tableau I).

La recherche d'une activité transcriptase a été effectuée et permet d'affirmer que toutes ces souches sont des rétrovirus.

Virus *maedi-visna*. La souche de référence K1 514 qui se réplique selon un cycle lytique sur des cellules de mouton et de chèvre a été utilisée.

Sérum

Un sérum de chèvre positif en test ELISA et précipitant en gélose (Vitu et al., 1982) vis-à-vis d'un antigène CAEV est utilisé pour révéler les protéines virales séparées par électrophorèse.

Cultures cellulaires

L'isolement et la propagation des virus sont effectuées en culture de membrane synoviale

Tableau I. Particularités des différentes souches de CAEV

Souche n°	Origine tissulaire	Expression du virus délai ^a (j)	Nombre de passages en culture ^b
12	Liquide articulaire	40	10
17	Articulation	28	10
18	Articulation	23	20
32	Poumon	15	3
43	Articulation	—	10
78	Articulation	41	3
80	Articulation	41	3
3.39	Poumon	—	10
3112	Articulation	90	10

^a Moment d'apparition des fusions cellulaires après la mise en culture des tissus infectés : isolement du virus.

de chèvre établie en milieu de Eagle (MEM) supplémentée avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (pénicilline 100 UI, streptomycine 100 mg/ml). Les souches virales produisent des cellules géantes multinuclées par fusion des cellules infectées. La sensibilité aux virus déterminée par l'inoculation de doses infectant les cultures de tissu (DITC₅₀) est recherchée pour différents types de cellules d'origine caprine : cellules d'articulation, cellules synoviales, cornet nasal, plexus choroïde, monocytes et plexus choroïde de mouton en culture; ces cellules ont été obtenues par explantation de tissu de fœtus ou d'animaux très jeunes. La fusion des cellules permet de déceler la présence du virus et d'effectuer des titrages en milieu liquide.

Concentration des virus

Les surnageants de culture infectée sont centrifugés 20 min à 2 000 x g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires puis filtrés sur filtre Millipore 0,45 µm. Ensuite, les virus sont concentrés par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) à 300 g/l dans du chlorure de sodium 4 M ou par centrifugation sur gradient de saccharose (1565%) sur rotor SX41 Beckmann à 4°C pendant 11 h à 36 000 x g.

Electrophorèse, Immunodétection après transfert (Western blot)

Les protéines virales sont séparées par électrophorèse verticale monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide (PAGE) en milieu dénaturant (sodium dodecyl sulfate, SDS) selon le système de Laemmli (1970) et sont révélées après transfert sur membrane de nitrocellulose par un sérum anti-CAEV (Kyche-Andersen, 1984).

Résultats

Sensibilité des différentes cellules de chèvre

Les cellules de membrane synoviale, d'articulation et de plexus choroïde de chèvre sont infectées par les différentes souches

d'un virus à l'autre. Par contre, à la dose d'inoculation utilisée (100 DITC₅₀), les cellules de cornet nasal de chèvre sont moins sensibles à 2 virus : la souche 78 bien que se répliquant, ne forme pas de syncytium et la souche 80 n'infecte pas ces cellules. Ces 2 virus n'ont subi qu'un faible nombre de passages en culture. La souche 3112 induit la formation de fusions cellulaires massives intéressant plusieurs dizaines de cellules et provoque une lyse du tapis cellulaire. Toutes les souches de CAEV se multiplient dans des monocytes en culture (5 à 7 jours), même si elles sont peu adaptées à la culture *in vitro*, sans provoquer de lésion visible.

Sensibilité des cellules de plexus choroïde de mouton

Nos souches se distinguent de la souche de référence maedi-visna K1514. En effet, cette souche provoque la formation de syncytia sur les cellules de plexus choroïde de mouton. Les diverses souches de CAEV se répliquent dans les mêmes cellules sans provoquer ni syncytia, ni lyse du tapis cellulaire.

Influence de la température

Pour toutes les souches de virus, le nombre de syncytia observé au 4^e jour d'incubation double au 6^e jour, et cela, à 37 et à 39°C, indépendamment de la nature des cellules infectées. Pour la souche 18, le nombre de foyers syncytiaux et la quantité de virus produit augmentent avec la température.

Electrophorèse : immunodétection après transfert

tern blot permet de distinguer les protéines appartenant à la nucléocapside (p14, p16, p19, p28 et p45) et les protéines constituant l'enveloppe (p70, p92 et p135). Une bande correspondant à une protéine 35 kDa apparaît régulièrement et semble être d'origine cellulaire.

Après purification par centrifugation, seules persistent les protéines de la nucléocapside. L'utilisation d'un sérum spécifique du virus visna révèle l'antigène p28 du CAEV.

Discussion

La comparaison de 9 souches de CAEV pour leur capacité à provoquer la fusion

des cellules de chèvre en culture a permis de confirmer que toutes les souches de CAEV ont une grande affinité pour les cellules de membrane synoviale de chèvre, qu'elles peuvent se répliquer dans des monocytes de chèvre en culture et qu'elles produisent plus de syncytia quand les cellules sont cultivées à 39°C.

Pour comparer les diverses souches de virus, nous avons évalué leur capacité à former des syncytia et à produire du virus dans plusieurs catégories de cellules de chèvre et de mouton. Ces critères nous ont conduit à distinguer 3 sortes de souches : les souches qui ont le même comportement sur les différents systèmes cellulaires testés et qu'on ne peut différencier les unes des autres; les souches 70 et 80, peu adaptées à la culture in vitro

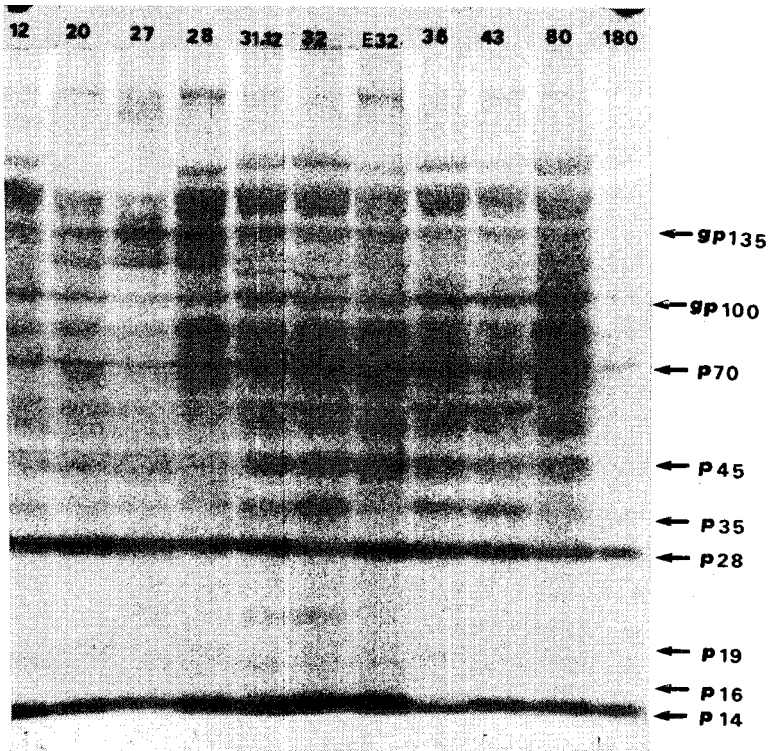


Fig. 1. Electrophorèse SIX-PAGE. Gel à 8% en bis-acwamide. Révélation par immunodétection

qui ne forment pas de syncytia sur les cellules de cornet nasal de chèvre alors que les souches adaptées produisent des fusions importantes; la souche 3112 qui se réplique selon un cycle lytique sur les cellules de chèvre et non sur les cellules de mouton. On distingue classiquement parmi les rétrovirus des petits ruminants les virus visna maedi qui provoquent la formation de syncytia et la lyse des cellules de plexus choroïde de mouton (Narayna et al., 1982; Querat et al., 1984) et les virus CAEV qui n'ont pas cette activité. Mais, Klevjer-Anderson et Cheevers (1981) et Russo (1984b) ont démontré que les souches de CAEV peuvent se répliquer dans les cellules ovines en formant des syncytia : ceci ne vaut sans doute pas pour toutes les souches dans tous les systèmes (Barban et al., 1984) et peut tenir au niveau d'adaptation de la souche considérée à la culture *in vitro*. La souche 3112 qui provoque la fusion des cellules de chèvre et la lyse du tapis cellulaire se distingue bien des autres souches isolées de lésions spécifiques de l'infection. Cette souche 3112 est la plus virulente *in vitro* et provoque des lésions lors de l'inoculation intra-articulaire chez le chevreau; elle a pour origine des tissus sains ne présentant aucune lésion apparente. Malgré son activité lytique, cette souche doit plutôt être considérée comme une souche CAEV que comme une souche maedi.

Par électrophorèse, aucune différence n'apparaît entre les souches de virus étudiés mais nous n'avons pas déterminé exactement les protéines uniquement d'origine virale : la quantité de virus n'est pas toujours suffisante et le sérum utilisé provient d'un animal séropositif qui reconnaît les protéines virales mais aussi des protéines d'origine cellulaire.

Ces résultats montrent que l'on peut

virus localisés dans les phagocytes mononucléés et qui, dans certains cas, font apparaître des signes cliniques. Chez le mouton, le rétrovirus le plus souvent rencontré est le maedi-visna dont la souche la plus connue est la souche K1514. Mais les souches responsables ou isolées de pneumonie progressive des ovins d'Amérique du Nord sont bien distinctes de la souche de référence K1514. Les souches de rétrovirus isolées chez la chèvre (pneumonie, arthrite, mammite) sont des virus de type CAEV qui sont distinctes de la souche K1514 (maedi-visna virus) mais possèdent de nombreux caractères qui les rapprochent des souches de pneumonie progressives des petits ruminants. On peut alors se demander s'il est légitime de distinguer deux groupes, maedi-visna et CAEV, parmi les rétrovirus qui infectent les ovins et les caprins.

Références

- Barban Y., Querat G., Sauze N., Filippi P., Vigne R., Russo P. & Vitu C. (1984) Lentivirus are naturally resident in latent form in long-term ovine fibroblast culture. *J. Gen. Virol.* **52**, 680-682
- Klevjer-Anderson P. & Cheevers W.P. (1981) Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* **110**, 113-119
- Kyche-Andersen J. (1984) Electrobloeting of multiple gels : a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-208
- Laemmli U.L. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Narayan O., Clements J.E., Strandberg J.D., Cork L.C. & Griffin D.E. (1980) Biological characterization of the viruses causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.* **50**, 69-79

Slow virus replication : the role of the macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. *J. Gen. Virol.* 59, 345-356

Querat G., Barban V., Sauze N., Filippi P., Russo P. & Vitu C. (1984) Highly lytic and persistent lentivirus naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J. Gen. Virol.* 52, 672-679

Russo P. (1984a) Virus de l'arthrite encéphalite caprine. *Ann. Rech. Vét.* 15, 3-6

Russo P. (1984b) Les affections à virus lents chez la chèvre. In : *Les Maladies de la Chèvre, Niort 9-11 octobre 1984*. Les Colloques de l'INRA, INRA, Paris, 28, 621-638

Vitu C., Russo P., Filippi P., Querat G. & Giaufret A. (1982) Une technique ELISA pour la détection des anticorps anti-virus maedi-visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gélose et la fixation du complément. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 469-481