

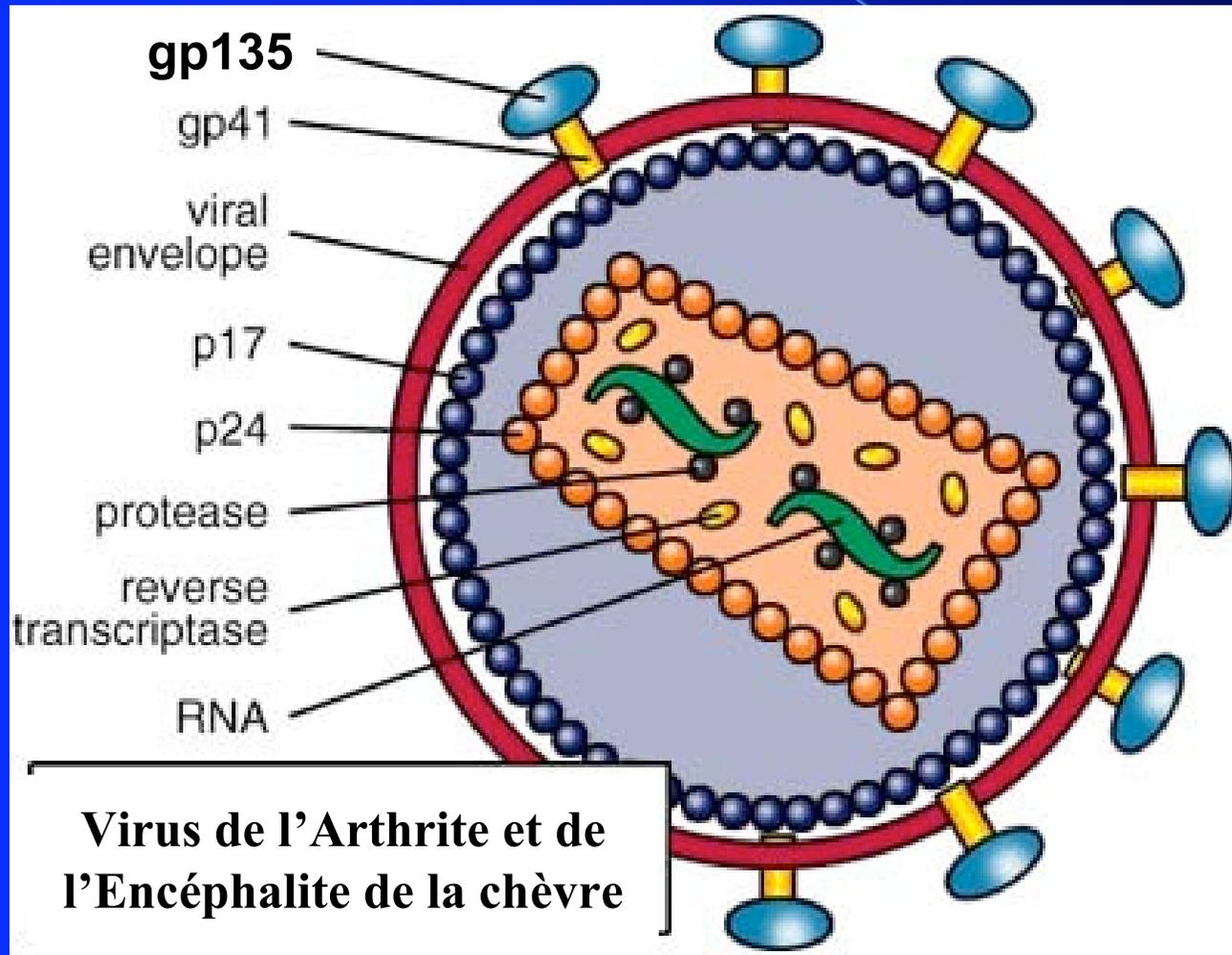
# BARRIERE D'ESPECES: EXEMPLE D'UN LENTIVIRUS CAPRIN

Yahia Chebloune

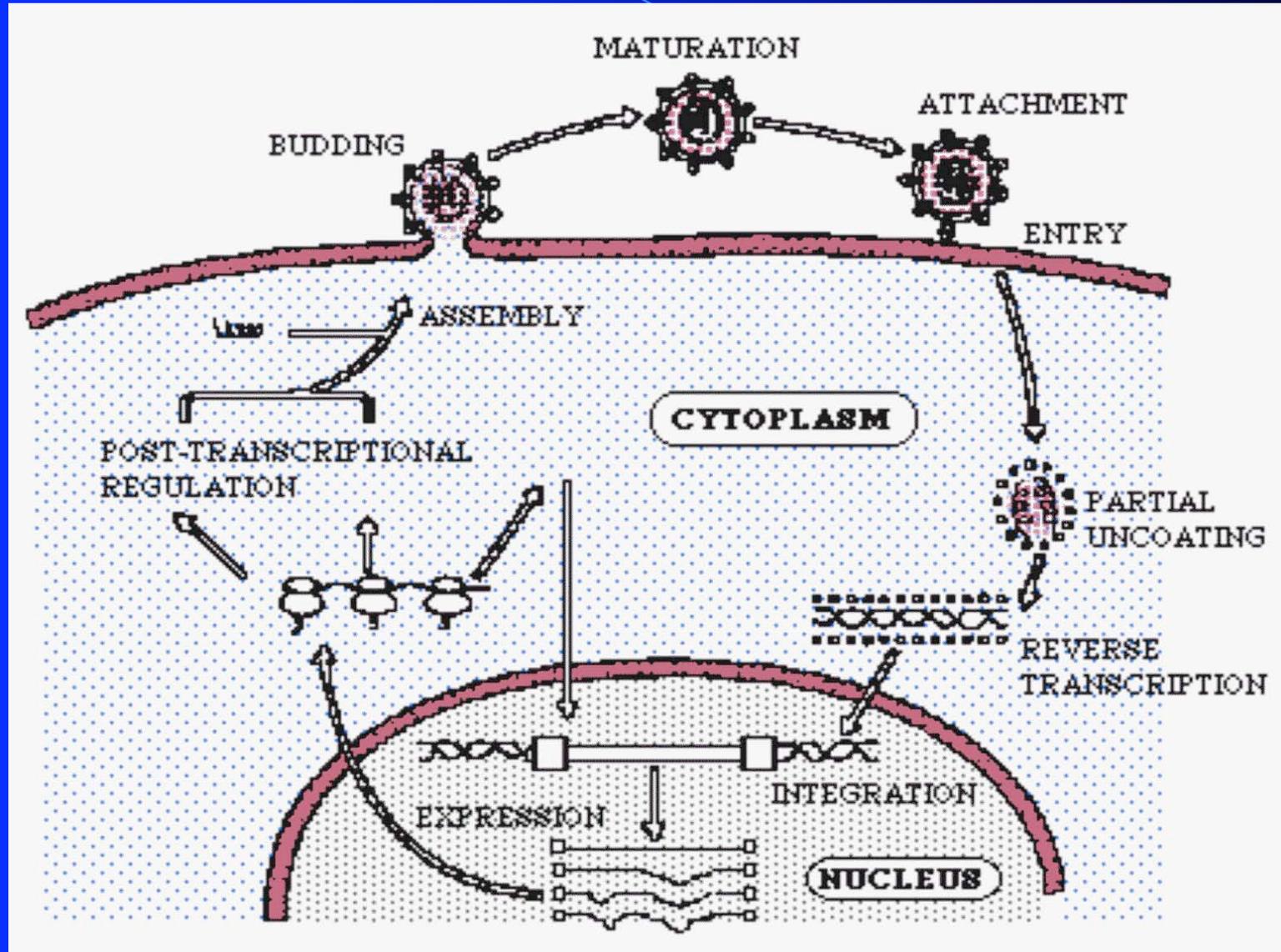


- UMR INRA-UCBL-ENVL 754
  - RETROVIRUS & PATHOLOGIE COMPAREE
  - Equipe 1: «Virologie cellulaire, moléculaire & maladies émergentes »
- Kansas University of Medical center, Kansas City, USA

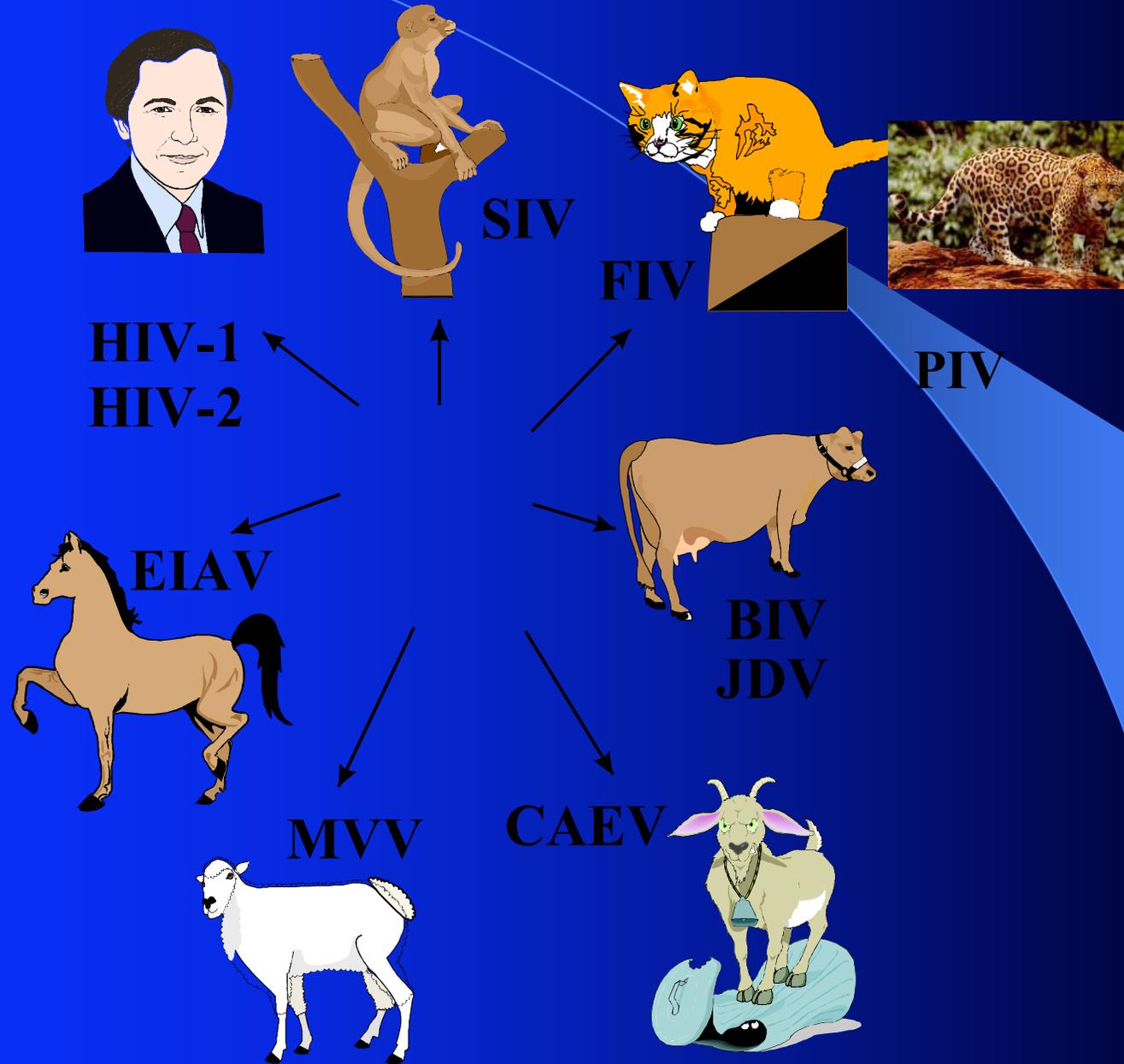
# Structure des lentivirus



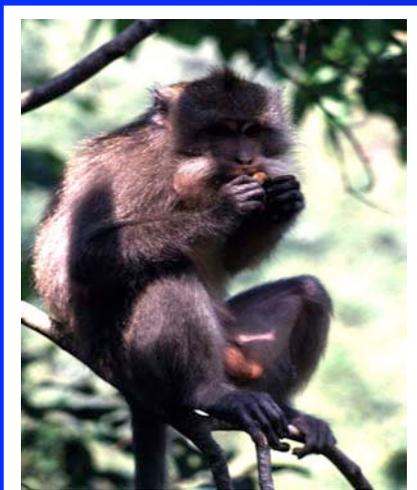
# Cycle de réplication des lentivirus



# Les lentivirus



# Franchissement de la barrière d'espèces: zoonose



VISepz  
VISsmm



VIH-1  
VIH-2

# OBJECTIF

- Développer un modèle d'étude du franchissement de la barrière d'espèce par les lentivirus qui permettrait de caractériser les propriétés des virus après leur passage chez le nouvel hôte.

- Etudes *in vitro* : cultures cellulaires

- Etudes *in vivo* : infections expérimentales et recherches des infections naturelles

# Etudes *in vivo*

- Infection expérimentale d'animaux dont les cellules sont permissives.
- Etude des propriétés de l'infection
- Etude des propriétés du virus au cours de son adaptation
- Recherche des franchissements naturels de la barrière d'espèces

# INTERET

- Meilleure connaissance du risque d'occurrence du franchissement
- Meilleure connaissance du risque d'émergence de nouvelles pathologies chez la nouvelle espèce hôte.
- Mise au point d'outils de diagnostics adaptés.

# CAEV

- Lentivirus naturel de la chèvre,
- Dans tous les troupeaux du monde
- Responsable d'arthrites et de mammites
- Pas d'immunodéficience
- Infection persistante avec réponse immune
- Macrophage mais pas lymphocyte tropique

# *Etudes in vitro*

- Susceptibilité des cellules à l'infection virale
- Réplication du virus dans les cellules du nouvel hôte
- Si restriction de la réplication, mécanismes?
- Contournement de la restriction?

# Infection (1)

		CAEV-CO	CAEV-3112
domestiques	Macrophages primaires humains	-	-
	Cellules épithéliales humaines (TE671)	-	-
	Macrophages primaires bovins	+	+
	Cellules épithéliales bovines (MDBK)	-	+
	Macrophages primaires porcins	+	+
	Cellules épithéliales porcines (IPI21)	-	+
sauvages	Lignée de macrophage canins (DH82)	-	-
	Cellules épithéliales canines (CF2TH)	+	+
	Cellules épithéliales félines (CRFK)	-	-
	Macrophages primaires de mouflon	+	+
	Macrophages primaires de cerf	+	+
	Macrophages primaires de daim	+	+
	Macrophages primaires de bouquetin	+	+
	Macrophages primaires de chevreuil	+	+

# Infection (2)

	CAEV-CO	CAEV-3112
Macrophages primaires humains	-	-
Cellules épithéliales humaines (TE671)	-	-
Cellules épithéliales félines (CRFK)	-	-
Lignée de macrophage canins (DH82)	-	-
Cellules épithéliales bovines (MDBK)	-	+
Cellules épithéliales porcines (IPI21)	-	+

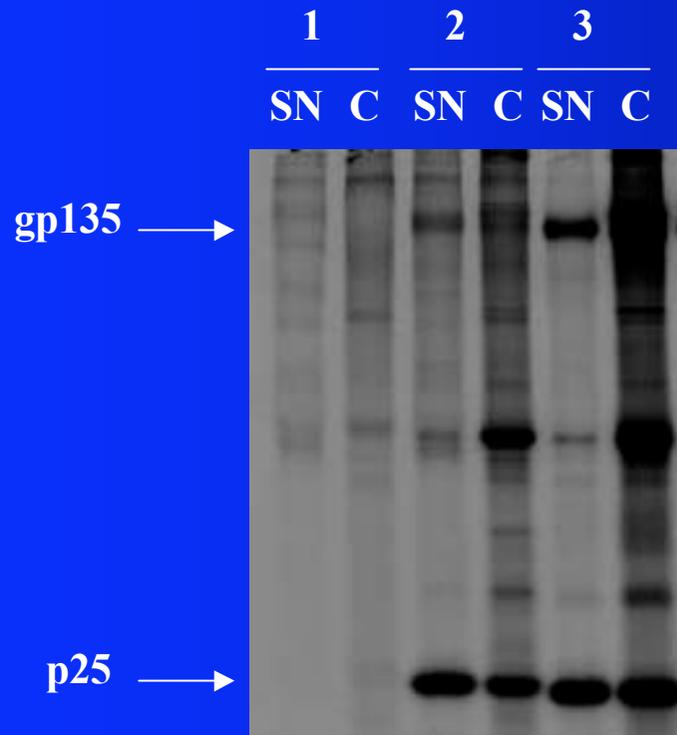
# Transfection avec CAEV-pBSCA

Lignée de cellules épithéliales humaines (TE671)	+
Lignée de cellules épithéliales bovines (MDBK)	+
Lignée de cellules épithéliales porcines (IPI21)	+
Lignée de cellules épithéliales félines (CRFK)	+
Lignée de macrophage canins (CRFK)	+

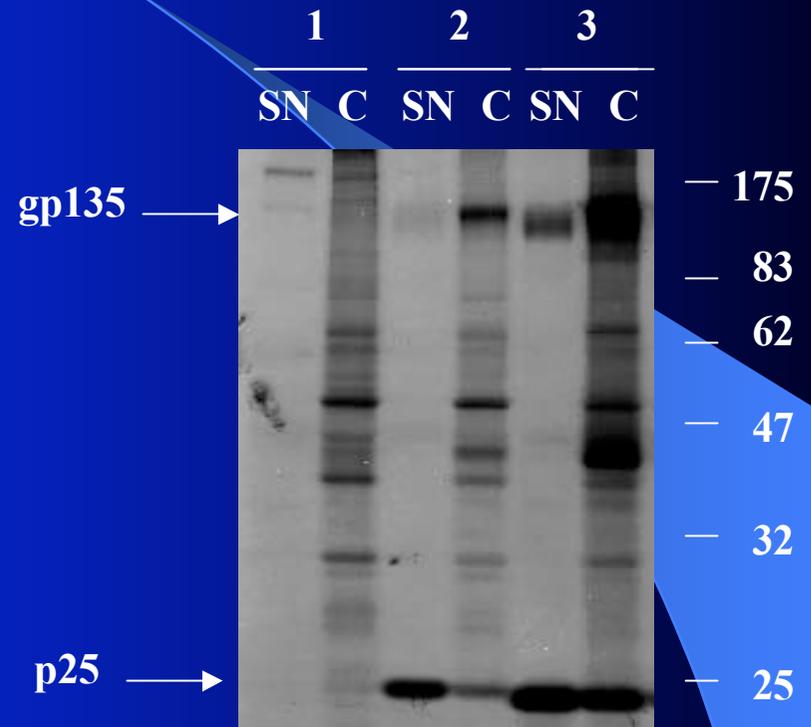
# PSEUDOTYPE DU CAEV AVEC L'ENVELOPPE DU VSV ET INFECTION DES CELLULES

	Infection avec des particules CAEV-pBSCA	Infection avec des particules CAEV-pBSCA VSV
Lignée de cellules épithéliales humaines (TE671)	-	+
Lignée de cellules épithéliales bovines (MDBK)	-	+
Lignée de cellules épithéliales porcines (IPI21)	-	+
Lignée de cellules épithéliales félines (CRFK)	-	+
Lignée de macrophage canins (CRFK)	-	+

# EXEMPLES DE PROFILES DE PROTEINE DU CAEV



**Macrophages de veaux**



**Macrophages de mouflon**

**1: macrophages non infectés**

**2 : macrophages infectés avec CAEV-pBSCA**

**3 : macrophages infectés avec CAEV-3112 (sauvage)**

**SN : supernatant**

**C : cell lysate**

# LE BLOCAGE EST SITUE A L'ENTREE

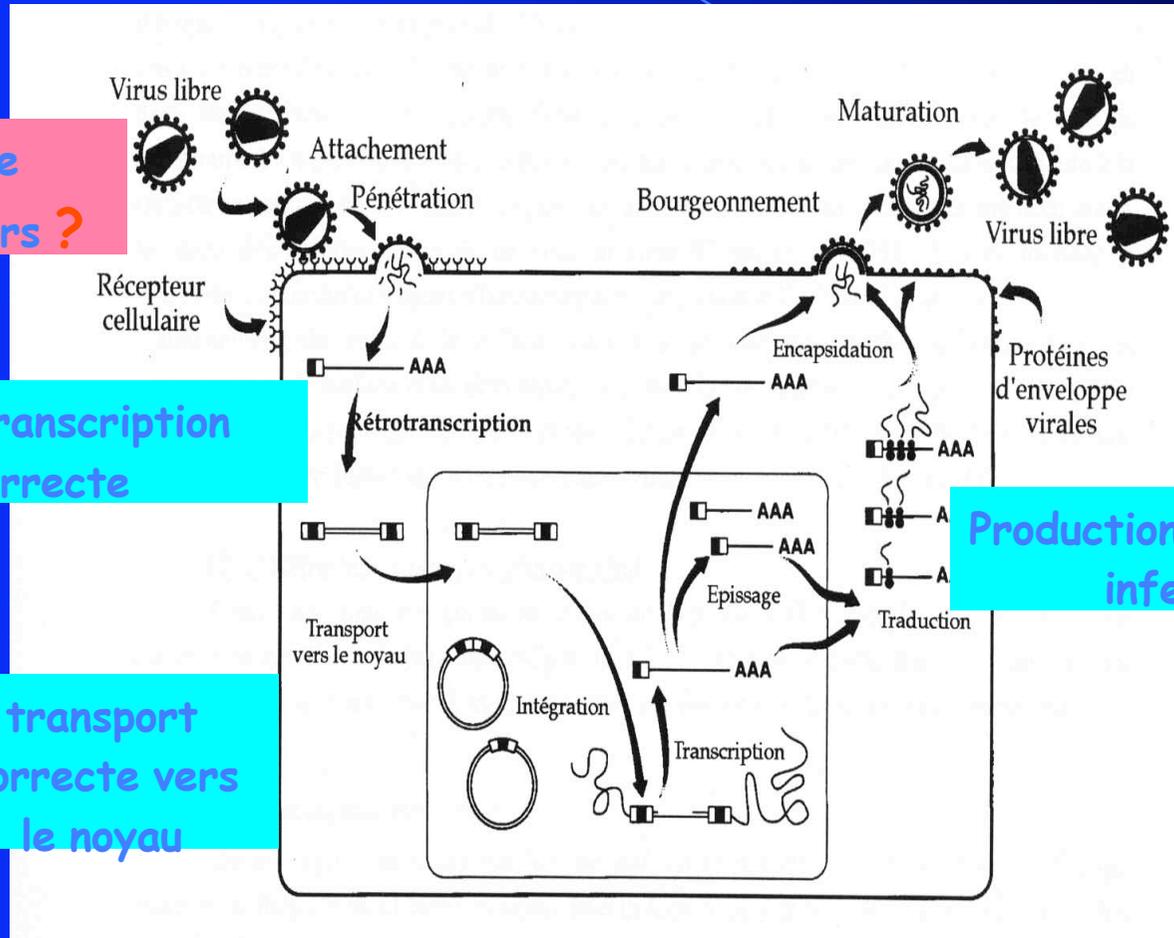
Pas de récepteurs ?

Rétrotranscription correcte

transport correcte vers le noyau

Expression correcte du provirus

Production de particules infectieuses



# CONCLUSIONS

- CAEV est doté d'un large tropisme d'espèces (Morin et al. Virologie)
- Les cellules de toutes les espèces de ruminants sauvages testées sont permissives (Guiguen et al.)
- Les cellules résistantes à l'infection sont capables de répliquer le CAEV (Mselli et al. J. Virol.)
- Seule l'absence de récepteurs fonctionnels a la surface des cellules cibles est responsable de restriction (Lenouen et al. Vir. Res., Mselli et al. J. Virol.)
- Cette restriction est contournable "pseudotype« (Lenouen et al. Vir. Res., Mselli et al. J. Virol.)

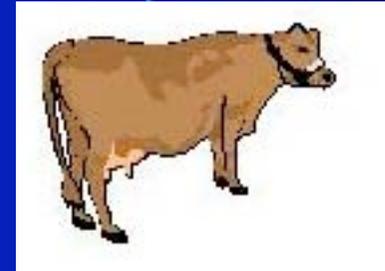
# Infections expérimentales chez des moutons, mouflons et des veaux

- 4 moutons, 3 mouflons
  - Séroconversion
  - Infection productive et **persistante**
  - Pathologie: poumons, articulation et mamelle
  - **Évolution génétique du virus**
- 3 veaux nouveau-nés
  - Séroconversion
  - Infection productive et **non persistante**
  - Pas de pathologie induite
  - **Forte réponse immune cellulaire**

# Experimental infection with CAEV



CAEV-pBSCA  
molecular clone



CAEV-3112  
field isolate

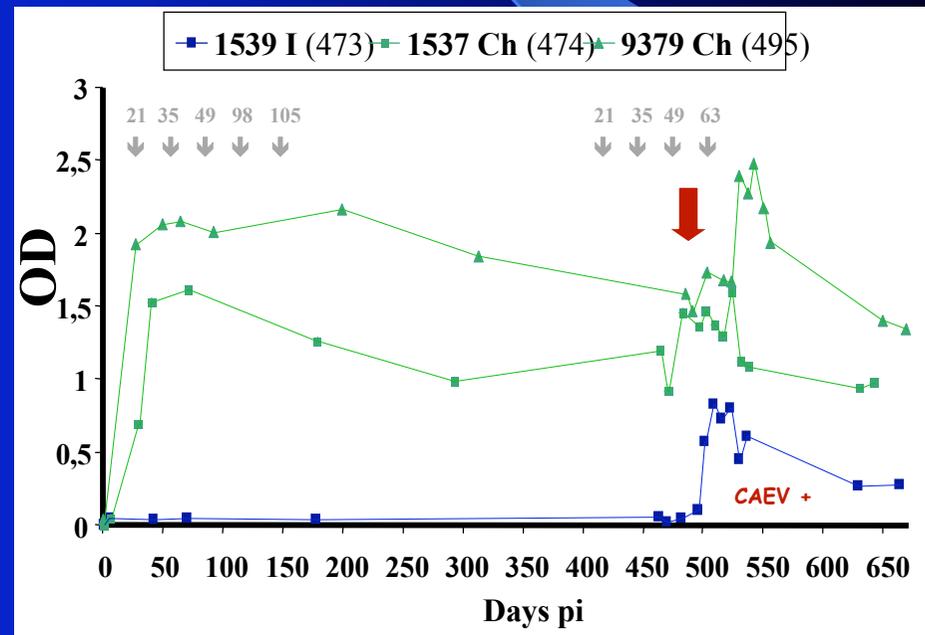
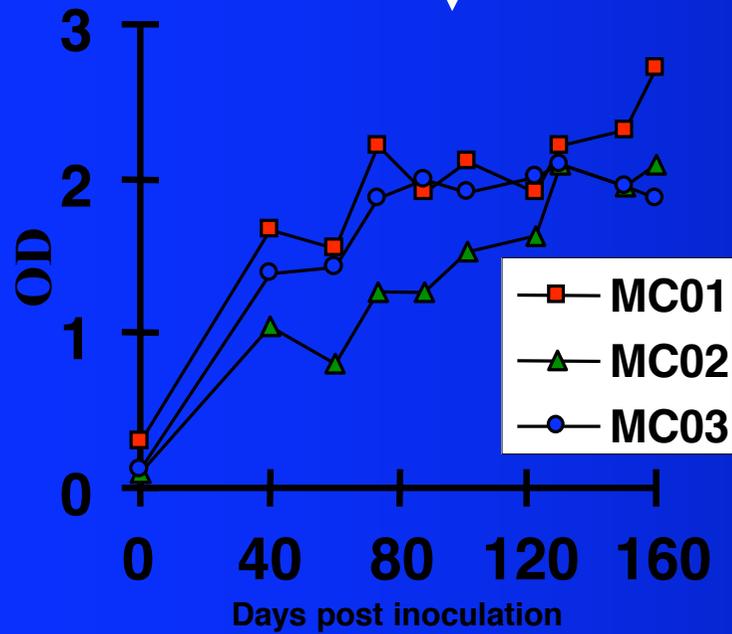
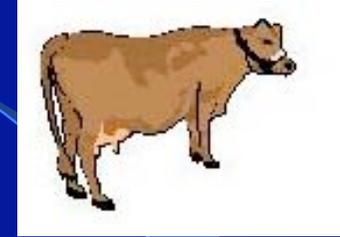
Serology

Virus isolation

Persistence  
or  
sterilization

Pathogenesis

# SEROLOGY

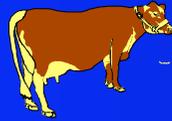


Primo-infected  
Challenged  
↓ Seroneutralization

# Evolution de l'infection

- Mouton et Mouflon infection persistante
- Virus re-isolé tout le long durant l'infection expérimentale
- Induction de pathologie typique du CAEV dans les tissus cibles

# VIRUS ISOLATION



30 to 50 ml  
blood →  → buffy coat →



Ficoll  
Ficoll

PBMC  
10 days  
in MDM



transfer in  
6 wells



coculture with  
GSM cells



MGG staining



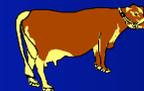
Lysate



Nested PCR

Gel electroph.

Virus persistence for  
more than 2 years

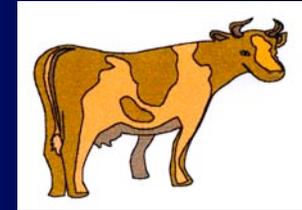


Virus persistence for  
3 to 4 months only



# Evolution de l'infection chez les veaux

## Sang



### Détection du CAEV

- Coculture
- Infectiosite
- RIPA
- Nested PCR

Weeks  
1→15

+



virus répliatif

génomme infectieux

Weeks  
16→ >54

-



**NO** virus répliatif

**NO** génomme infectieux



# Evolution de l'infection chez les veaux

## Tissus

Dérivations d'explants à partir d'organes à 2 et 6 mois post  
infection avec CAEV

Organes	2 mois pi	6 mois pi
Poumon	+	-
Rate	+	-
Ganglions	+	nd
Membrane synoviale	-	-
Moelle	-	-
Thymus	-	-
Plexus Choroïde	nd	-

Absence de signes cliniques

# CONCLUSIONS

- CAEV cause une infection productive inter-espèces chez le mouton et le mouflon (Chebloune et al., J. Gen Virol., Guiguen et al. Am. J. Vet. Res.)
- Cette infection est persistante et le virus se réplique continuellement dans le sang (Morin et al. J Virol., Guiguen et al. Am. J. Vet. Res.)
- L'infection induit des pathologies typiques du CAEV (Guiguen et al. Am. J. Vet. Res.).
- L'infection chez les veaux est productive pendant les 4 premiers mois, puis l'infection est contrôlée (Morin et al. J Virol.,)
- Il n'y a pas de pathologie induite

# Infection interespèces naturelles

- Hypothèse: CAEV peut franchir la barrière d'espèces lors de cohabitation entre chèvres infectées et ruminants de la faune sauvage.
  - Recherche de zones de cohabitations
  - Etude du CAEV des troupeaux de chèvres infectées
  - Recherche du CAEV chez les animaux en contact
  - Isolement et étude des propriétés

## AUTRES RESULTATS



- **Persistence du virus pendant toute la durée de l'expérimentation**
- **Clinique : arthrite du carpe**
- **Histologique : lésions au niveau des poumons, de la mamelle et des articulations**
- **Evolution génétique : variation par rapport à l'inoculum, évolution différente par rapport à la chèvre**



- **Bouquetin provenant du site de Modane séropositif en ELISA pour le CAEV (PCR en cours)**

## **TRAVAUX REALISES EN COLLABORATION AVEC LES PARCS NATIONAUX**

- ✓ **Etude réalisée dans le cadre du programme « cohabitation et transmission de pathogènes » Ministère de l'environnement.**
- ✓ **Recherche réalisée au niveau des parcs nationaux (Vanoise, Ecrin, Pyrénées)**
  - ✓ **Population importante d'ongulés sauvages**
  - ✓ **Troupeaux de chèvres et de moutons en libre divagation**
  - ✓ **Contacts fréquents et hybridations observées (Bouquetin/chèvre et mouflon/mouton)**

# SITE DE VALBONNAIS (Ecrins)

Hybrides

Troupeau  
de chèvres

Colonie de  
bouquetins

Séropositifs  
en ELISA CAEV  
Isolement de virus réalisé

Troupeau séropositif  
en ELISA CAEV  
Isolement de virus  
réalisé

Sérologie et isolement  
de virus réalisés sur animaux  
capturés

**Site d'Entraigues du parc  
des Ecrins (Isere 38/Rhône Alpes)**

**Hybrides**

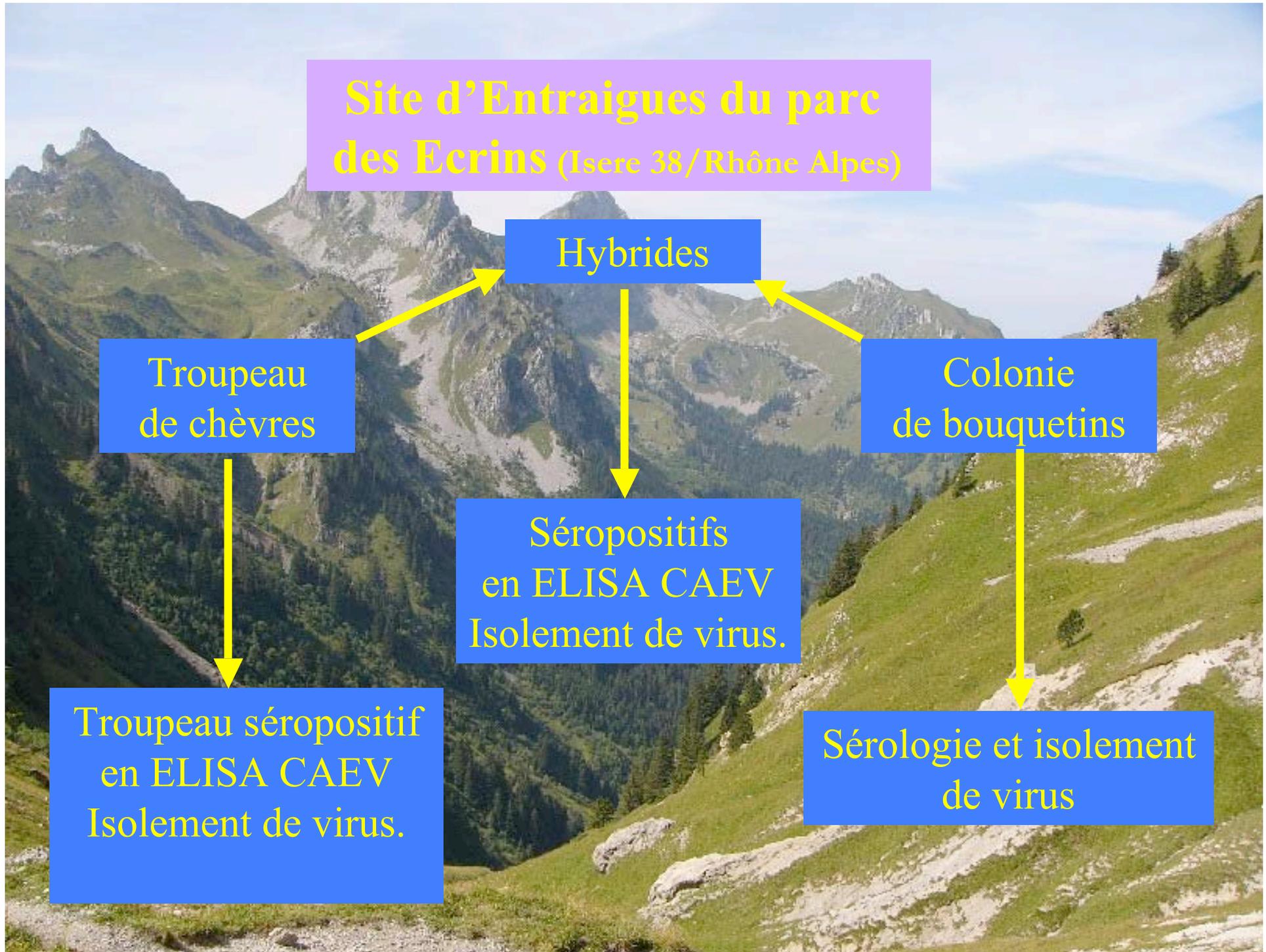
**Troupeau  
de chèvres**

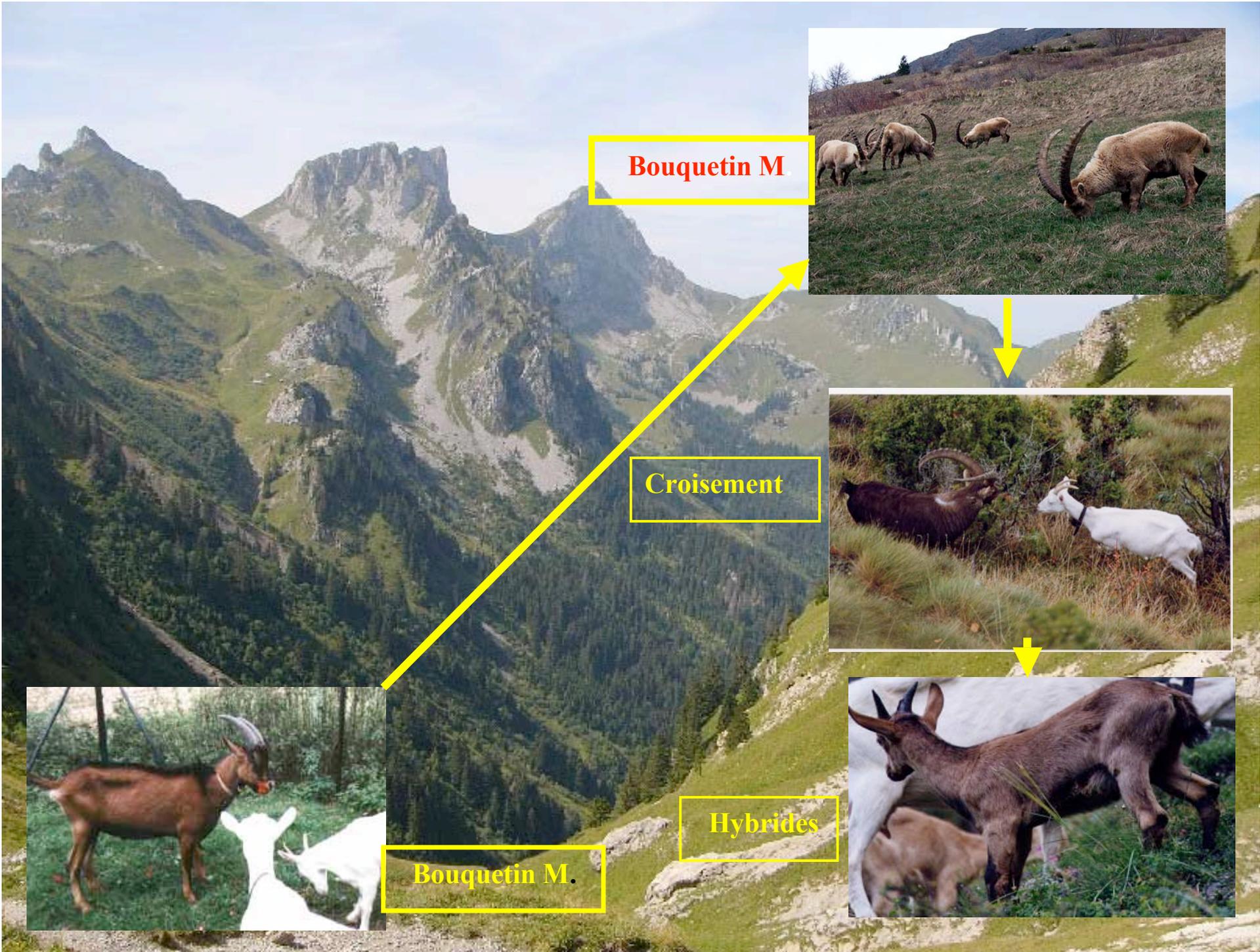
**Colonie  
de bouquetins**

**Séropositifs  
en ELISA CAEV  
Isolement de virus.**

**Troupeau séropositif  
en ELISA CAEV  
Isolement de virus.**

**Sérologie et isolement  
de virus**





**Bouquetin M.**



**Croisement**



**Hybrides**



**Bouquetin M.**



# Résultats PCR

● PCR → gag ext.

900 pb →



Nested PCR → gag int.

500 pb →



	250	260	270	280	290	300	
CAEV-Co	ACAGTAATCATGAAAGATGGGTTACTGGAA	CAAGAGG	AAAAGAAGGAAGACAAAAGAGAA				300
Bq.c7	..G...C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Bq.c8	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Bq.c11	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Bq.c12	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....A...A...				294
Bq.c20	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Bq.c21	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Bq.c22	.....C.....	.....A..G-----	.....G..GA.....G...A...				294
Ch.c5	.....C.....	.....A..-----	.....G..G..GA.....G...GA...				294
Ch.c6	.....C.....	.....A..-----	.....G..G..GA.....G...A...				294
Ch.c16	.....C.....	.....A..-----	.....G..G..GA.....G...GA...				294
Hy.c1	.....C.....	.....A..-----	.....G..GA.....G...A...				294
Hy.c3	G.....C.....	.....A..-----	.....GA.....G...A...				294
Hy.c30	.....C.....	.....A..-----	.....G..G..GA.....G...A...				294
Hy.c31	.....C.....	.....A..-----	.....G..GA.....G...A...				294
Hy2c3	.....C.....	.....A..-----	.....GA.....G...A...G				294
Hy2c5	.....C.....	.....A..-----	.....GA.....G...A...G				294
Hy2c6	.....C.....	.....G..A..-----	.....G..G..GA.....G...A...G				294
Hy2c20	.....C.....	.....A..-----	.....GA.....G...A...G				294
Hy2c21	.....C.....	.....G..A..-----	.....G..G..GA.....G...A...G				294
Hy2c22	.....C.....	.....A..-----	.....GA.....G...A...G				294
Ch2c7	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...AG..-				299
Ch2c8	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch2c9	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch2c12	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch3c13	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch3c14	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch3c15	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch3c16	.....G.....	.....G..A..G.....	.....A...GG...A...G..G..A...G				300
Ch3c17	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300
Ch3c18	..G...C.....	.....A.....	.....A...G...A...				300

Alignement des séquences (nucléotides)

	70	80	90	100	110	120	
CAEV-Co	AGLMCCQMGMRPETLQ	DAMATVIMKDG	LLEQEEKKEDKREK	EEVSFPIVVQAAG	--GRSW		118
Bq.c7	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c8	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c11	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c12	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c20	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c21	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Bq.c22	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Ch.c5	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.E.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Ch.c6	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Ch.c16	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.E.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy.c1	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy.c3	.....Q.....	.....A.T.....	.....E--R.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy.c30	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hyc.31	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy2c3	.....Q.....	.....T.....	.....E--R.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy2c5	.....Q.....	.....T.....	.....E--R.E.K.Q.	.....G.....	.....A.....	.....	116
Hy2c6	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy2c20	.....Q.....	.....T.....	.....E--R.E.K.Q.	.....G.....	.....V--	.....	116
Hy2c21	.....Q.....	.....T.....	.....E--RR.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Hy2c22	.....Q.....	.....T.....	.....E--R.E.K.Q.	.....G.....	.....	.....	116
Ch2c7	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch2c8	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch2c9	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch2c12	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c13	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c14	.....K.....	.....T.....	.....E.K.A.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c15	.....Q.....	.....V.....	.....G.ERK.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c16	.....K.....	.....T.....	.....E.K.A.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c17	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118
Ch3c18	.....K.....	.....T.....	.....E.K.....	.....G.....	.....	.....	118

Alignement des séquences (Acides amines)

# Résultat Analyse des séquences

- Le pourcentage de divergence entre les séquences du bouquetin et celle du CAEV-Co est **9.2 %**.  
Chèvre / CAEV-Co est **9.8 %**.  
Hybride / CAEV-Co est **9.5 %**.  
**Bouquetin/ Chèvre est 1.8 %.**    **Bouquetin /Hybride est 1.8 %.**  
**Chèvre / Hybride est 1.4 %**



**Ces résultats confortent la parenté génétique entre les différents virus.**

## CONCLUSIONS

- Démonstration des capacités du CAEV à causer des infections interespèces naturelles
- Démonstration de l'évolution génétique du CAEV accompagnant l'adaptation chez le nouvel hôte

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES (1)

- Les résultats des travaux in vitro montrent de grandes capacités du CAEV à franchir la Barrière d'espèces
- Les infections expérimentales confirment ces capacités in vivo
- Ces franchissements sont retrouvés dans la nature
- Disposons d'outils pour le diagnostic

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES (2)

- Etude *in vitro* des propriétés des virus chimériques CAEV/HIV CAEV/SIV (Bouzar et al. Virol.a, Bouzar et al. Virol. B)
- Etude *in vivo* des propriétés de ces virus

UMR INRA/ ENVL/ UCBL N° 754

« *Virologie Cellulaire, Moléculaire et Maladies Emergentes* »

ACKNOWLEDGMENT

**Bouzar B.**

**Mselli-Lakhal L.**

**Guiguen F.**



**Morin T.**

**Erhouma E.**

**Grezel D.**

**Fornazero C.**

**Bruyas S.**

**Alogninouwa T.**

**C.Garnier.**

**C.Galley**

**Durand J.**

**Favier C.**