



HAL
open science

Réponses du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre

F Guiguen, C Lerondelle, C Favier

► To cite this version:

F Guiguen, C Lerondelle, C Favier. Réponses du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1990, 21 (3), pp.179-185. <hal-00901937>

HAL Id: hal-00901937

<https://hal.science/hal-00901937v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Réponses du chevreau à des monocytes infectés *in vitro* par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre

F Guiguen, C Lerondelle, C Favier

Laboratoire INRA, associé à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,
BP 83, 69280 Marcy-l'Étoile, France

(Reçu le 28 septembre 1989; accepté le 1^{er} décembre 1989)

Résumé — Les rétrovirus des petits ruminants sont transmis entre animaux sensibles le plus souvent par les macrophages qui sont aussi les cibles du virus. Nous avons inoculé des monocytes homologues ou autologues infectés *in vitro* avec du virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre à des chevreaux indemnes. Trois mois après l'inoculation des cellules, nous les soumettons à un traitement par la Dexaméthasone (5 mg/j tous les 2 j pendant 10 j. Avant le traitement par la Dexaméthasone, la réponse en anticorps à la suite de l'infection est plus précoce dans les conditions homologues que lorsque l'animal a reçu ses propres monocytes infectés. Pendant le traitement par la dexaméthasone, l'apparition dans le sang de monocytes producteurs de virus est régulière dans les conditions homologues mais ne se manifeste que chez 1 animal sur 3 dans les conditions autologues. Il en est de même pour les lésions d'arthrite qui interviennent 1 mois après la cure de dexaméthasone. Au moment de la contamination l'expression du virus dépend de la reconnaissance des cellules infectées par l'animal receveur.

lentivirus / petit ruminant / monocyte

Summary — *In vitro* caprine arthritis encephalitis virus infected monocytes as a source of contamination in kids. Retroviruses from small ruminants are spread between susceptible animals by mononuclear phagocytes which are also virus targets. Young seronegative goats were inoculated with *in vitro* infected monocytes producing caprine arthritis encephalitis virus (10^5 cells/animal) by intravenous route corresponding to 10^5 syncytia forming units. After 3 months the same goats received dexamethasone treatment (5 mg/animal each 2 days over a 10-day period). The observed immune response differed if the animal was infected with its own cells or with homologous cells. Before dexamethasone treatment, antibody production evaluated by gel precipitation, ELISA or western blot was delayed in autologous by comparison with homologous conditions. After dexamethasone treatment, the appearance of infectious monocytes in blood and subsequent arthritis were observed in all animals in homologous conditions and only in 1 animal out of 3 in autologous conditions. Host reaction to the infected cells determines virus expression at the time of contamination.

lentivirus / small ruminant / mononuclear phagocyte

INTRODUCTION

Chez les petits ruminants les lentivirus infectent de façon préférentielle les cellules de la lignée monocytes-macrophages (Narayan *et al*, 1982; Lairmore *et al*, 1987). Cliniquement les infections virales se manifestent par des pneumonies inter-

stitielles (Maedi), par les encéphalites (Visna), par des arthrites, et surtout par des mammites chez le mouton et chez la chèvre (Dawson, 1987).

Ces virus sont isolés à partir des macrophages bronchoalvéolaires ou des macrophages du lait (Fontaine *et al*, 1988; Lerondelle *et al*, 1989). Ils s'expriment

dans les monocytes sanguins le plus souvent au moment de la parturition (Charley *et al*, 1987). En culture, ils manifestent leur pouvoir infectieux dans les fibroblastes d'ovin et de caprin en formant des syncytia (Gendelman *et al*, 1985). La diffusion de l'infection dans les troupeaux est assurée par les macrophages du colostrum, du lait et de l'appareil respiratoire.

Afin de mieux connaître les premières étapes de la pathogénie de ces virus, nous avons transmis la maladie à des chevreaux séronégatifs à l'aide de monocytes infectés *in vitro* par du virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV).

Nous montrons qu'une infection réalisée avec des monocytes homologues est plus efficace qu'une infection mettant en jeu des monocytes autologues.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux

Huit chevreaux sevrés de souche Saanen ont été utilisés à l'âge de 2 mois. Ils provenaient d'un élevage séronégatif dans lequel aucun signe clinique pouvant évoquer l'infection n'a été décelé depuis plus de 5 ans.

Protocole expérimental

Deux chevreaux ont reçu par voie intradermique 10^4 unités formant des syncytia (UFS) de virus CAEV en émulsion (Montanide, isa 50 Seppic Paris). Deux groupes de 3 chevreaux ont reçu par voie veineuse des cellules mononuclées (5 ml par animal d'une suspension contenant 10^5 cellules/ml) infectées *in vitro* par du virus CAEV. Pour le premier groupe ces cellules provenaient des mêmes chevreaux (cellules autologues) pour le second groupe les cellules provenaient de chevreaux différents (cellules homologues). Trois mois après l'inoculation de cellules, les chevreaux ont reçu de la dexaméthasone

(Voren, Boehringer, Ingelheim) par voie intramusculaire (5 mg tous les 2 j pendant 10 j).

Le virus

La souche de virus 18 que nous avons employée a été isolée il y a 2 ans à partir des lésions articulaires d'une chèvre. Elle a été identifiée comme virus d'arthrite encéphalite par immunofluorescence avec un sérum de référence (Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires, Nice). Elle produit des syncytia en culture cellulaire et une transcriptase reverse dans le surnageant de culture 5 j après l'infection. Le virus présente au microscope électronique la morphologie classique des lentivirus. La souche 18 a subi 50 passages en culture de fibroblastes de chèvre. Le titre de virus produit est de 10^6 unités formant des syncytia (UFS) par ml de culture en 5 j à 37 °C.

Le virus a conservé son pouvoir pathogène chez la chèvre: inoculé par voie intra-articulaire il produit une arthrite en une semaine. L'inoculation par voie intra-dermique est suivie d'une séroconversion après 2 mois. L'injection de dexaméthasone entraîne l'apparition de monocytes infectieux dans le sang, suivie de manifestations d'arthrite chez plus de 50% des animaux (Charley, 1987).

Les monocytes

Les monocytes sont préparés à partir du sang périphérique des chevreaux par centrifugation (2 000 g, 25 min, 15 °C) sur un mélange de ficoll (Pharmacia, Upsala, Suède) et de Telebrix (Guerbet, Aulnay-sous-bois, France) de densité 1,08.

On obtient ainsi 2×10^6 cellules mononuclées/ml de sang. On sélectionne les cellules adhérentes au plastique (Nunc, Danemark) par incubation de la suspension cellulaire (10^6 /ml) une heure à 37 °C en milieu minimum de Eagle (MEM) sans calcium et sans sérum. Les cellules adhérentes sont cultivées pendant 4 j dans le milieu contenant 20% de sérum de chèvre dans une étuve à CO₂. À ce moment l'ensemble des cellules étalées représente 5 à 10% des cellules mises en culture. On infecte le tapis de cellules

mononuclées avec une suspension de virus de la souche 18 titrant 10^4 UFS/ml. Dans les 4 jours qui suivent l'infection le tapis de cellules ne présente pas de modification marquée à part la formation de quelques grandes cellules polynuclées : 5% des cellules contiennent plus de 5 noyaux. Les cellules sont récoltées par trypsination et mises en suspension après lavage en milieu sans sérum. La suspension cellulaire contient de 60 à 80% de monocytes et de macrophages et de 10 à 30% de lymphocytes : elle n'est pas différente de la suspension de cellules non infectées. Les phagocytes mononuclées étant les seuls supports de la multiplication du virus, nous parlons dans ce texte de suspension de monocytes infectés. Le surnageant de culture après 4 j d'infection titre entre 10^4 et 10^5 UFS/ml. Lorsqu'on recherche le virus dans les cellules lavées on obtient pratiquement un centre infectieux par monocyte présent dans la suspension.

Techniques sérologiques

La présence des anticorps contre le virus 18 a été recherchée tous les 15 j par les techniques suivantes :

— par précipitation en gélose contre l'antigène Maedi (surnageant de cultures infectées chroniquement, concentré, fourni par le Laboratoire de Maisons-Alfort du Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires (Madame Reymond), utilisé en France pour le diagnostic des infections à lentivirus des petits ruminants,

— par une technique ELISA indirecte. L'antigène est le virus 18 concentré au 1/1 000 et partiellement purifié par centrifugation (Vittu et Russo, 1988). La présence des anticorps sériques est détectée par un sérum anti-immunoglobuline de chèvre marqué à la peroxydase. Les sérums à tester sont dilués au 1/80 et sont comparés à 2 sérums de référence, l'un positif, l'autre négatif. Au-delà d'une DO seuil les sérums sont décrits comme positifs,

— par reconnaissance des protéines du *core* du virus 18 séparées par électrophorèse et transférées sur des bandelettes de nitrocellulose (Bosgiraud *et al*, 1989). Les sérums sont dilués au 1/100.

Recherche du virus

Nous avons recherché le virus dans les cellules mononuclées du sang périphérique dans les prélèvements. La suspension cellulaire est cultivée directement sur des plaques de plastique (Nunc) ou en coculture avec des fibroblastes de chèvre. Les cocultures sont propagées par trypsination pendant une période de 2 mois. On a recherché l'apparition des lésions syncytiales et la présence du virus dans le surnageant de culture.

Recherche d'anticorps cytotoxiques

Les cellules mononuclées du sang du donneur (10^5 /ml, 20 μ l) sont mises en suspension dans 60 μ l du sérum du receveur dilué au 1/100 en présence de 20 μ l de complément de lapin (représenté par du sérum de lapin non dilué). La toxicité du sérum est exprimée par le pourcentage de cellules colorées par le bleu trypan (Salmon, 1978). Nous avons ainsi comparé (5 mois après) l'activité cytotoxique du sérum de chevreau qui avait reçu ses propres monocytes infectés (autologue) avec l'activité cytotoxique du sérum du chevreau qui avait reçu les monocytes du même donneur (homologue) sur les cellules mononuclées du donneur.

RÉSULTATS

Réponses sérologiques

Les 3 animaux inoculés avec des monocytes homologues infectés *in vitro* présentaient 2 mois plus tard une séroconversion dans des conditions identiques à celle des boucs infectés par voie intradermique. En revanche, sur les 3 chevreaux qui ont reçu leurs propres monocytes infectés *in vitro* (autologues) un seul a présenté une séroconversion 2 mois après l'injection de cellules infectées. Chez les 2 autres chevreaux, les anticorps ne sont apparus

qu'après le traitement par la dexaméthasone. Les 3 épreuves sérologiques mises en œuvre : précipitation en gélose, ELISA indirect (tableau I), reconnaissance des protéines du *core* (figs 1 et 2) ont donné des résultats concordants aussi bien avec l'antigène Maedi qu'avec l'antigène CAEV (souche 18).

Isolement du virus

Dans le premier mois qui a suivi l'infection, nous avons isolé le virus après 4 subcultures à partir des monocytes de 2 chevreux : un témoin inoculé par voie intradermique et un animal inoculé avec ses propres monocytes.

Trois mois après avoir reçu les cellules mononuclées infectées par le virus, les chevreux ont été soumis à un traitement par la dexaméthasone qui révèle la présence du virus chez les animaux spontanément infectés. Pendant le traitement par la Dexaméthasone on détecte dans le

sang des monocytes produisant des syncytia dès la première coculture chez 2 animaux : chez l'un des témoins (virus intradermique) et chez l'un des chevreux qui avaient reçu des monocytes infectés homologues. Chez ces 2 animaux, on a observé dans le mois qui suit le traitement, une augmentation de la circonférence des carpes de plus de 1 cm. Aucune manifestation clinique, aucune excrétion de virus n'a été observée chez les autres animaux.

Présence d'anticorps cytotoxiques

La mortalité observée sur les cellules mononuclées du sang périphérique de 2 chevreux ayant reçu leurs propres monocytes en présence de leur propre sérum et du complément est inférieure à 5%. L'activité cytotoxique du sérum du chevreau n° 6 (receveur) pour les cellules mononuclées du chevreau n° 1 (donneur) était de 7% avant l'inoculation des monocytes infectés et de 54% après 5 mois.

Tableau I. Réponses sérologiques détectées par précipitation en gélose (Antigène Maedi) et par ELISA (antigène CAEV souche 18) chez les chevreux inoculés avec des monocytes (homologues ou autologues) infectés *in vitro* par le virus CAEV et traités par la dexaméthasone 3 mois après l'inoculation des cellules. Comparaison avec 2 chevreux infectés avec le virus par voie intradermique. (a) les sérums analysés en précipitation en gélose, et dilués au 1/80 en ELISA, donnent par comparaison avec des sérums de contrôle positif ou négatif une réponse de tout ou rien; (b) l'un des boucs qui a reçu ses propres monocytes infectés présente des anticorps avant le traitement par la dexaméthasone, (c) après le traitement par la dexaméthasone.

<i>Traitement des chevreux</i>	<i>Délai en mois après l'infection</i>			
	0	1	2	3 (c)
	Nb d'animaux positifs (a)/Nb total			
monocytes infectés				
Homologues	0/3	3/3	3/3	3/3
Autologues	0/3	0/3	1/3(b)	3/3
virus intradermique	0/2	2/2	2/2	2/2

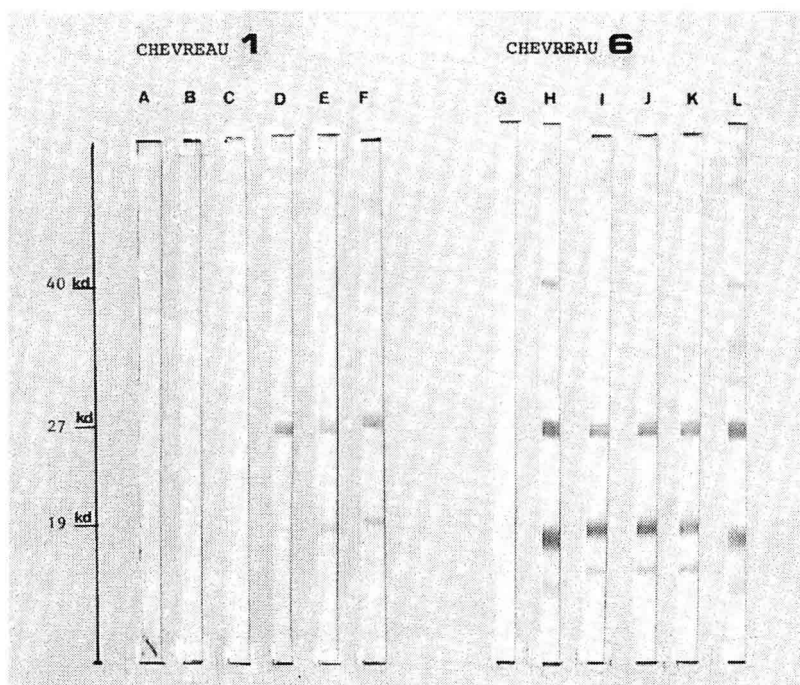


Fig 1. Comparaison par immunotransfert des réponses en anticorps contre le virus CAEV chez des chevreaux inoculés avec des monocytes soit autologues (chevreau 1) soit homologues (chevreau 6) infectés avec la même souche de virus. Antigène : virus I8, 10 µg par bande : sérum dilué au 1/100. A et G : sérums des chevreaux 1 et 6 avant inoculation des monocytes provenant du chevreau 1. B, C, D, E, F : sérums du chevreau 1 prélevés 53, 65, 80 (7), 87 (14) et 102 (29) j après injection des monocytes autologues infectés (j après le début du traitement par la Dexaméthasone). H, I, K, L : sérums du chevreau 6 prélevés 53, 63, 76 (3), 89 (16), 102 (29) j après inoculations de monocytes homologues infectés provenant du chevreau 1 (j après le début du traitement par la Dexaméthasone).

DISCUSSION

Les cellules de la lignée monocytes-macrophages sont responsables de la transmission des lentivirus chez les petits ruminants.

Notre expérience de la transmission de l'infection par injection intraveineuse de monocytes infectés *in vitro* montre l'importance de la reconnaissance par l'organisme du receveur des cellules transférées

dans la première étape de la multiplication du virus.

L'épreuve de cytotoxicité du sérum du receveur à l'égard des cellules du donneur en présence du complément est habituellement utilisée pour mettre en évidence les anticorps dirigés contre les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Nous en avons déduit que les monocytes homologues reconnus comme étrangers avaient pu être l'objet d'une activation dé-

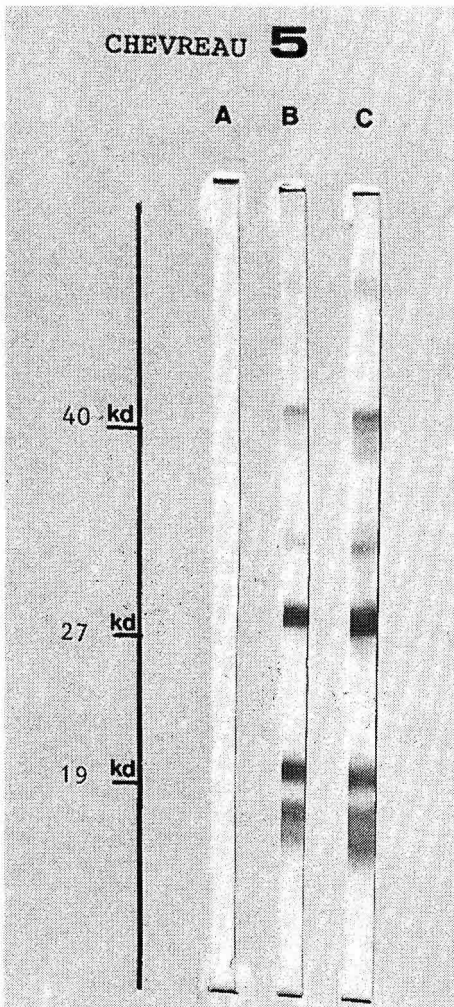


Fig 2. Réponse en anticorps détectés par immunotransfert contre des protéines du *core* du virus 18 (10 µg par bande) chez un chevreau (5) inoculé par voie intradermique avec 10^4 UFS du même virus. A: Sérum du chevreau avant l'infection, B, C : Sérums prélevés 53 et 65 j après l'infection.

réprimant le virus. Les 3 chevreaux qui ont reçu des cellules homologues produisent des anticorps contre les protéines du virus

plus vite que les 3 chevreaux qui ont été infectés avec leurs propres monocytes. Les cellules reconnues comme étrangères expriment rapidement (ou intensément) le virus qu'elles transportent et déterminent la séroconversion précoce des 3 receveurs.

Binns *et al* (1981) a montré chez le porc que les cellules d'individus histocompatibles persistent dans la circulation sanguine plus longtemps (9 j) que les cellules reconnues comme étrangères captées presque immédiatement dans la rate et le poumon. Dans notre expérience, les cellules homologues rassemblées constitueraient une meilleure source d'infection que les monocytes autologues qui resteraient plus longtemps en circulation.

La réponse immunitaire à des virus produits par des monocytes autologues représente une situation artificielle : dans les conditions naturelles, les monocytes ne sont potentiellement infectieux qu'au moment de la parturition et l'on ne met jamais en évidence de virus circulant. En injectant leurs monocytes infectés *in vitro* exprimant tous les antigènes du virus nous voulions obtenir une réponse en stimulant des lymphocytes autrement que dans l'infection spontanée : la réponse sérologique que nous observons est le résultat de l'infection et pas une réponse aux antigènes inoculés. Mais le petit nombre de cellules mises en œuvre (10^5) explique peut-être nos résultats.

Chez les receveurs de cellules autologues, les cellules infectées ne provoqueront dans 2 cas sur 3 une réponse sérologique qu'après le traitement par la Dexaméthasone.

Chez les receveurs homologues, les cellules injectées sont stimulées par la réaction allogénique, la multiplication du virus est précoce et la séroconversion a lieu rapidement comme chez les témoins inoculés par voie intradermique avec du

virus de culture. Chez ces animaux séropositifs, la dexaméthasone suscite une nouvelle multiplication du virus que nous avons mise en évidence chez un des 3 animaux par la détection de monocytes infectieux. Cette virémie s'est traduite par l'apparition d'une arthrite 21 j après dans les mêmes conditions qu'après la virémie qui accompagne la parturition.

L'épidémiologie de l'infection par les lentivirus montre le rôle des macrophages dans la transmission de la maladie.

L'infection expérimentale réalisée avec des monocytes infectés *in vitro* montre l'importance de la réponse allogénique dans la stimulation de la multiplication du virus.

RÉFÉRENCES

- Binns RM, Blakeley D, Licence ST (1981) Migration of fluoresceinated pig lymphocytes *in vivo*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 66, 341-349
- Bosgiraud C, Rucheton M, Coste J, Lemaire JM, Nicolas JA, Simeon de Buochberg M, Beaubatie L (1989) Détection d'anticorps et d'antigènes du virus de Visna-Maedi par immunotransfert. *Ann Rech Vét* 20, 187-193
- Charlety P, Foucaud C, Guiguen F (1987) Activité inhibitrice de sérums de chèvres infectées sur la formation de syncytia dus au virus de l'arthrite et de l'encéphalite. *Ann Rech Vét* 18, 245-248
- Dawson M (1987) Pathogenesis of Maedi Visna. *Vet Rec* 120, 451-454
- Fontaine MP, Lerondelle C, Guiguen F, Cadore JL (1988) Présence de virus de type Maedi dans les cellules du lavage broncho-alvéolaire du mouton. *Sci Vét Méd Comp* 90, 169-178
- Gendelman HE, Narayan O, Molineaux S, Clements JE, Ghotbi Z (1985) Slow persistent replication of lentivirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7086-7090
- Lairmore MD, Akita GY, Russel H, Demartini JC (1987) Replication and cytopathic effects of Ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlated with *in vivo* pathogenicity. *J Virol* 61, 4038-4042
- Lerondelle C, Fleury C, Vialard J (1989) La glande mammaire : organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine. *Ann Rech Vét* 20, 57-64
- Narayan O, Wolinsky JS, Clements JE, Strandberg JD, Griffin DE, Cork LC (1982) Slow virus replication : the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses in sheep and goats. *J Gen Virol* 59, 345-349
- Salmon H (1978) Specificity of pig T lymphocyte antiserum. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 129c, 571-584
- Vitu C, Russo P (1988) L'arthrite encéphalite enzootique caprine en France; Recherches épidémiologiques et expérimentales. *Comp Immunol Microb Infec Dis* 11, 27-34