



HAL
open science

Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement

Carlos Travassos, Cécile Benoît, Stephen Valas, Angela da Silva, Gérard Perrin

► To cite this version:

Carlos Travassos, Cécile Benoît, Stephen Valas, Angela da Silva, Gérard Perrin. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Veterinary Research*, 1998, 29 (6), pp.579-584. hal-00902551

HAL Id: hal-00902551

<https://hal.science/hal-00902551>

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.

Courte note

Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement

Carlos Travassos^a, Cécile Benoît^a, Stephen Valas^b,
Angela da Silva^c, Gérard Perrin^{a*}

^aLaboratoire de recherches caprines, Cneva Niort, BP 3081, 79012 Niort cedex, France

^bLaboratoire rétrovirus et thérapie, Université Victor Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux cedex, France

^cDépartement de virologie, Institut de microbiologie, Université Fédérale de Rio de Janeiro, Brésil

(Reçu le 17 mars 1998 ; accepté le 25 juin 1998)

Abstract – Detection of caprine arthritis encephalitis virus in white blood mononuclear cells and semen of experimentally infected bucks. Shedding of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) was assessed in semen and blood mononuclear cells of six bucks (four boers and two saanens) experimentally contaminated with a viral strain (CAEV Cork) and on three non-infected controls. CAEV was identified by polymerase chain reaction (PCR) in blood mononuclear cells of all infected animals but only in seminal fluid and non-spermatocytic cells of one buck and in non-spermatocytic cells of another. Presence of CAEV in semen could have implications in the dissemination and control of the disease. © Inra/Elsevier, Paris.

caprine arthritis encephalitis virus / semen / buck / blood mononuclear cell

Résumé – La recherche du virus de l'arthrite encéphalite caprine virale a été réalisée dans les cellules mononucléées du sang et dans le sperme de six boucs (quatre de race Boer et deux de race Saanen), préalablement inoculés expérimentalement à l'aide d'une souche de virus (souche Cork) et de trois boucs témoins non infectés. Les résultats se sont révélés positifs par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sur les cellules mononucléées du sang de tous les animaux mais seulement sur le liquide séminal et les cellules non spermatocytiques de l'un d'entre eux et dans les cellules non spermatocytiques d'un autre. La présence de virus dans le sperme d'animaux infectés pourrait avoir des conséquences sur sa dissémination et par conséquent sur le contrôle de la maladie. © Inra/Elsevier, Paris.

virus de l'arthrite encéphalite caprine / sperme / bouc / cellule mononucléée du sang

* Correspondance et tirés-à-part
Tél.: (33) (0)5 49 79 61 28 ; fax 0549794219; e-mail: g.perrin@niort.cneva.fr

1. INTRODUCTION

Le virus de l'arthrite encéphalite caprine est un lentivirus responsable de pertes économiques importantes pour la filière caprine [6, 18]. Toutes les mesures mises en œuvre au cours de ces dernières années en vue de contrôler cette maladie ont reposé sur la maîtrise des contaminations liées à l'ingestion de colostrum contaminé, la voie orale étant considérée comme la voie de contamination la plus importante dans les conditions naturelles d'élevage [1, 4, 11]. Bien que ces procédures aient contribué à diminuer les niveaux de contamination, elles n'ont pas donné les résultats escomptés [13]. La nécessité d'expliquer ces échecs conduit aujourd'hui à rechercher d'autres sources de contamination que le colostrum [5].

En dépit de différents travaux réalisés en vue de préciser d'autres voies de transmission [1, 4, 11, 15, 16] de nombreuses inconnues persistent encore aujourd'hui en ce domaine. Parmi les voies de transmission potentielles, la transmission par voie sexuelle reste pratiquement à explorer. Pour ce faire, nous avons ainsi tenté de mettre au point et d'utiliser une technique d'amplification en chaîne par polymérase PCR [22] en vue de localiser la présence éventuelle de provirus dans les différentes fractions du sperme d'animaux expérimentalement infectés par le virus de l'arthrite encéphalite caprine

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Les animaux

Six boucs, quatre de race Boer (1, 2, 3 et 4) et deux de race Saanen (5 et 6) issus de mères indemnes d'infection par le virus de l'arthrite encéphalite caprine virale (AECV) ont été expérimentalement infectés dans les cinq premiers jours de leur vie par administration par voie intrabomasale d'un aliment d'allaitement auquel était ajouté 1 mL d'une suspension virale contenant 10^8 particules virales par mL (souche

CAEV-Cork). Des anticorps mis en évidence à l'aide d'une technique Elisa (Chekit CAEV/MVV®; Hoecht Roussel Vet, 102 route de Noisy, 93235, Romainville Cedex, France) sont apparus chez tous les animaux après une période d'environ 60 j et leur présence est demeurée constante pendant une période de deux années à l'issue de laquelle ils ont été utilisés pour rechercher la présence du virus dans leur sperme. Parallèlement, trois boucs du même âge, indemnes d'infection ont été utilisés comme animaux témoins (7, 8, 9).

2.2. Collecte et préparation des échantillons

2.2.1. Les prélèvements de sperme

Tous les échantillons de sperme dont le volume initial variait de 1 à 2 mL, ont été prélevés à l'aide d'un vagin artificiel et traités au laboratoire dans un délai n'excédant pas 4 h après la collecte. Afin de préciser la localisation du virus, le sperme a été séparé en trois fractions : le liquide séminal (LS), une fraction de cellules non spermatiques (CNS), et une fraction purifiée de spermatozoïdes (SPZ).

2.2.1.1. Le liquide séminal (LS)

Après une première centrifugation à 800 g pendant 10 min, le surnageant correspondant au liquide séminal (LS) a été prélevé puis clarifié à 5 000 g pendant 10 min. Il a ensuite été concentré par ultracentrifugation à 20 000 g pendant 2 h sur gradient de sucrose à 20 %. Le surnageant a été éliminé, le culot a été remis en suspension dans 4 mL de milieu de culture (HMEM) additionné de 8 % de DMSO et conservé à -80°C avant d'être inoculé sur des tapis cellulaires de cellules synoviales de chèvre cultivées avec du milieu nutritif (HMEM) additionné de 4 % de sérum de veau fœtal. Des subcultures ont été réalisées toutes les semaines. Dès l'apparition des syncytia ou à l'issue d'une période de culture de 8 semaines, les tapis cellulaires ont été raclés et les cellules obtenues ont été lavées par deux centrifugations à 700 g pendant 10 min dans du PBS pH 7,2 puis conservées à -80°C en vue de procéder ultérieurement à l'extraction de l'ADN.

2.2.1.2. La fraction de cellules non spermatiques (CNS), et la fraction purifiée de spermatozoïdes (SPZ)

Le culot récupéré à l'issue d'une première centrifugation (CNS et SPZ) a été dilué dans 5 mL de PBS pH 7,2 sans Ca^{++} et Mg^{++} . Cette fraction a été centrifugée (v/v) à 500 g pendant 30 min à 4 °C sur un gradient de densité 1,077 (Percol 1077; (Sigma Diagnostics ; L'isle d'Abeau Chesne, 38297 La Verpillère cedex France). La fraction riche en cellules non spermatiques située à l'interface entre les deux phases a été récoltée, lavée deux fois dans du PBS pH 7,2, centrifugée et le culot cellulaire est conservé à -80 °C, en vue de procéder ultérieurement à l'extraction de l'ADN.

Le culot de spermatozoïdes (SPZ) a été prélevé, lavé par deux centrifugations dans du PBS pH 7,2 à 700 g pendant 10 min puis purifié à l'aide d'une technique de lyse différentielle destinée à éliminer tous les autres éléments cellulaires [21].

2.2.2. Les prélèvements sanguins

Les prélèvements ont été réalisés sur des tubes de 10 mL contenant un anticoagulant (EDTA). Ils ont été centrifugés (v/v) à 400 g pendant 30 min à température ambiante sur une solution d'Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics ; L'isle d'Abeau Chesne, 38297 La Verpillère cedex, France). À l'issue de cette première phase, l'interface contenant les cellules mononucléées a été prélevé puis lavé par deux centrifugations à 250 g pendant 10 min dans du PBS pH 7,2. Le culot cellulaire ainsi récolté a été conservé à -80 °C en vue de procéder ultérieurement à l'extraction de l'ADN.

2.3. Extraction et amplification d'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit Isoquick™ (Microprobe, Bothell, WA 98021, États-Unis) conformément aux instructions du fabricant. Dans un premier temps, les cellules ont été lysées en utilisant du thiocyanate de guanidine. Après extraction, l'ADN a été précipité à l'éthanol, dissout dans une solution de TE 0,1X (Tris-HCl pH 8,1 mM ; EDTA 0,1 mM) et quantifié au spectrophotomètre. Deux fragments d'ADN de 175 pb et de 350 pb correspondant respectivement aux régions *Pol* et *Env*

ont été co-amplifiés par *nested-PCR* [2]. Les amorces externes utilisées ont été P1 (5'-ACA-GAAGAGAAATTTAAAAGG-3', nucléotides 2236 à 2255) et P2 (5'-ATCATCCATATA-TATGCCAAATTG-3', nucléotides 2712 à 2689) pour la région *Pol* et E1 (5'-AGGTAAGTA-TAAACCCAGGTAAG-3', nucléotides 6122 à 6145) et E2 (5'-ATTCTTATCTTT-TATTCCCCCATA-3', nucléotides 6962 à 6939) pour la région *Env*. Les amorces internes ont été P3 (5'-CAGGGAAGTGGAGAATGTTAAT-3', nucléotides 2357 à 2378) et P4 (5'-GGTATAGTAAAATATGCATCTCCT-3', nucléotides 2510 à 2487) pour la région *Pol* et E3 (5'-CATTGGCCTTTATGGCAAATGG-3', nucléotides 6471 à 6492) et E4 (5'-GATGTTCA-TAAAGGCCATGCTCTC-3', nucléotides 6812 à 6789) pour la région *Env*. Les positions des amorces utilisées pour amplifier les fragments subgénomiques du virus ont été celles correspondant à la séquence de la souche Cork de CAEV [17]. Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un appareil GeneAmp PCR system 9600 Perkin-Elmer. Au cours d'un premier cycle d'amplification, 1 µg d'ADN génomique a été ajouté à une solution contenant 50 µL d'un tampon 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,001 % gélatine, 200 µM déoxynucléoside triphosphate, 100 ng d'amorce externe et 1 U de Taq ADN polymérase (Ampli-Taq™, Perkin-Elmer). Au cours d'un second cycle, 5 µL ont été à nouveau amplifiés dans une même solution contenant cette fois, 100 ng d'amorce interne. La première partie de la réaction (PCR) débute par une dénaturation de 5 min à 95 °C suivie d'une série de 35 cycles constitués successivement par une nouvelle phase de dénaturation de 40 sec à 92 °C, une phase d'hybridation de 50 sec à 56 °C et une phase d'élongation d'une minute à 72 °C. La série de cycles est terminée par une nouvelle phase de 5 min à 72 °C. La deuxième partie (*nested PCR*) comporte 35 cycles composés d'une phase de dénaturation à 92 °C pendant 40 sec, une phase d'hybridation de 40 sec à 60 °C, une phase d'élongation de 40 sec à 72 °C. Cette série est terminée par une seconde phase d'élongation de 5 min à 72 °C.

Dix microlitres de la fraction amplifiée ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3 % et visualisés par transillumination à la lumière ultra violette après coloration au bromure d'éthidium.

3. RÉSULTATS

Les résultats des analyses par PCR réalisées sur les trois fractions de sperme (LS, CNS, et SPZ) et sur les cellules mononucléées du sang sont présentés dans le *tableau 1*. Les animaux ont été considérés comme positifs (+) lorsque l'une au moins des deux séquences cibles (*pol* 175 pb et *env* 350 pb) a été amplifiée. En ce qui concerne les analyses sur le sperme, les animaux ont été considérés positifs lorsque l'une au moins de trois fractions a donné un résultat positif. Dans ce cas, la séquence amplifiée a été notée.

La présence de virus dans le liquide séminal a été mise en évidence par amplification après culture cellulaire dans un échantillon (n° 1).

Sur les cellules non spermatiques nous avons détecté la présence de séquences virales sur les animaux n° 1 et n° 2. Sur l'animal n° 1 des réactions positives ont été mises en évidence à la fois sur le liquide séminal et sur les cellules non spermatiques. Aucune réaction positive n'a été observée à partir des spermatozoïdes.

Des réactions positives ont été mises en évidence sur tous les prélèvements de cel-

lules mononucléées du sang des animaux infectés, soit sur le gène *Env* seul (N° 4 et 5), soit sur le gène *Pol* seul (N° 2), soit sur les deux gènes à la fois (N° 1, 3, 6).

Aucune réaction positive n'a été enregistrée sur les témoins non infectés (N° 7, 8 et 9).

4. DISCUSSION

En raison de son extrême sensibilité, la technique PCR a été utilisée pour mettre en évidence des lentivirus dans le sperme et le sang tant chez l'homme [7, 9, 12, 20, 21] que chez l'animal [3, 8, 14] et ceci soit sous forme de cellules infectées, soit sous forme de particules virales libres. Chez l'homme les résultats révèlent des taux de détection variant de 4 % à 74 % pour les séquences d'ADN et de 37 % à 65 % pour les séquences d'ARN (RT PCR) [7, 9, 12]. À notre connaissance, la mise en évidence du virus de l'arthrite encéphalite caprine n'avait jamais été réalisée dans le sperme de bouc.

Sur les échantillons de sperme analysés, des résultats positifs ont été enregistrés sur deux animaux (n° 1 et n° 2) à partir de la fraction composée par les cellules non sper-

Tableau 1. Mise en évidence du virus de l'arthrite encéphalite caprine par PCR dans différentes fractions du sperme et dans les cellules mononucléées du sang.

Numéros des boucs infectés	Liquide séminal	Cellules non spermatiques	Spermatozoïdes	Cellules mononucléées du sang
1	+ <i>env</i>	+ <i>pol</i> / <i>env</i>	-	+ <i>pol</i> / <i>env</i>
2	-	+ <i>pol</i>	-	+ <i>pol</i>
3	-	-	-	+ <i>pol</i> / <i>env</i>
4	-	-	-	+ <i>env</i>
5	-	-	-	+ <i>env</i>
6	-	-	-	+ <i>pol</i> / <i>env</i>
Boucs non infectés				
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-

matiques. Dans le même temps, aucune réaction positive n'a été mise en évidence sur celle composée par les spermatozoïdes. Le faible nombre de résultats positifs est probablement imputable à l'absence de manifestation clinique chez les animaux examinés et à une faible charge virale. Ces observations sont conformes à celles réalisées chez les béliers infectés par un lentivirus ovin chez qui la fréquence d'isolement du virus est significativement augmentée chez les animaux présentant une leucospermie consécutive à une orchite brucellique [3].

Ces résultats posent le problème de l'éventuel mode de transmission du virus de l'AECV par voie sexuelle et plus particulièrement celui du rôle de la muqueuse génitale, et ce d'autant plus que le virus de l'arthrite encéphalite a été mis en évidence dans les cellules épithéliales d'une grande variété de tissus d'animaux infectés [2, 10]. Des observations réalisées *in vitro* avec le VIH, ont montré de plus, que des cellules épithéliales CD4-négative pouvaient être infectées par simple contact avec des cellules (macrophages) infectées [19]. Des travaux complémentaires apparaissent nécessaires pour préciser les conditions éventuelles dans lesquelles le virus de l'arthrite encéphalite caprine virale peut infecter les cellules de la muqueuse des organes génitaux et contaminer ainsi les femelles au cours de l'insémination qu'elle soit naturelle ou artificielle. En l'absence de telles informations, il convient au titre du principe de précaution de considérer la voie sexuelle comme une voie possible de transmission du virus et d'intégrer ce risque dans le cadre des opérations de contrôle et d'éradication de la maladie.

RÉFÉRENCES

- [1] Adams D.S., Klevjer-Anderson P., Carlson J.L., McGuire T.C., Gorham J.R., Transmission and control of caprine arthritis encephalitis, *Am. J. Vet. Res.* 44 (1983) 1670-1675.
- [2] Barlough J., East N., Rowe J.D., Van Hoosier K., DeRock E., Bigornia L., Rimstad E., Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats, *J. Virol. Methods* 50 (1994) 101-114.
- [3] De la Concha-Bermejillo A., Magnus-Corral S., Brodie S.J., DeMartini J.C., Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams, *Am. J. Vet. Res.* 57 (1996) 684-688.
- [4] East N.E., Rowe J.D., Dahlberg J.E., Theilen G.H., Pedersen N.C., Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection, *Small Rum. Res.* 10 (1993) 251-262.
- [5] Ellis T.M., Robinson W., Wilcox G., Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection, *Aust. Vet. J.* 60 (1987) 326-329.
- [6] Greenwood P.L., Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, *Austr. Prev. Vet. Med.* 22 (1995) 71-87.
- [7] Hamed K.A., Winters M.A., Holodny M., Katzenstein D.A., Merigan, T.C., Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen: effects of disease stage and nucleoside therapy, *J. Infect. Dis.* 167 (1993) 798-802.
- [8] Jordan H.L., Howard J., Tompkins W.A., Stoskopf S.K., Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats, *J. Virol.* 69 (1995) 7328-7333.
- [9] Krieger J.N., Coombs R.W., Collier A.C., Ross S.O., Chaloupa K., Cummings K., Murphy V.L., Corey L., Recovery of human immunodeficiency virus type 1 from semen: minimal impact of stage of infection and current antiviral chemotherapy, *J. Infect. Dis.* 163 (1991) 386-388.
- [10] Lerondelle C., Godet M., Mornex J.F., Infection of mammary epithelial cells with small ruminant lentiviruses, 3rd European workshop on ovine and caprine retroviruses, Jaca, Spain, 2-5 March, 1997.
- [11] Mackenzie R.W., Olivier R.E., Rooney J.P., A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis-encephalitis virus in an endemically infected goat herd, *N. Z. Vet. J.* 35 (1987) 184-186.
- [12] Mermin J.H., Holodny M., Katzenstein D.A., Merigan T.C., Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction, *J. Infect. Dis.* 164 (1991) 769-772.
- [13] Ministère de l'Agriculture et de la pêche, Direction générale de l'alimentation, Centre national de surveillance et d'épidémiologie des maladies caprines, Rapport d'activité, 1997.
- [14] Nash J.W., Hanson L.A., Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen, *Am. J. Vet. Res.* 56 (1995) 760-763.
- [15] Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., De Rock E., Pedersen N.C., Delayed seroconversion

- following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats, *Am. J. Vet. Res.* 54 (1993) 1858-1862.
- [16] Rowe J.D., East N.E., Thurmond M.C., Franti C.E., Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies, *Am. J. Vet. Res.* 52 (1991) 510-514.
- [17] Saltarelli M., Quérat G., Konings D.A., Vigne R., Clements J.E., Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus, *Virology* 179 (1990) 347-364.
- [18] Smith M.C., Cutlip R., Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193 (1988) 63-67.
- [19] Tan X., Pearce-Pratt R., Phillips D.M., Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission, *J. Virol.* 67 (1993) 6447-6452.
- [20] Tindall B., Evans L., Cunningham P., Mc Queen P., Hurren L., Vasak E., Mooney J., Cooper D.A., Identification of HIV in semen following primary HIV-1 infection, *AIDS* 6 (1992) 949-952.
- [21] Van Voorhis B.J., Martínez A., Mayer K., Anderson D.J., Detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid amplification technique, *Fertil. Steril.* 55 (1991) 588-594.
- [22] Von Beroldingen C.H., Blake E.T., Higuchi R., Sensabaugh G.F., Erlich H.A., Applications of PCR to the analysis of biological evidence, in: Erlich H.A. (Ed.), *PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification*, Stockton Press, New York, 1990, pp. 209-223.