

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



THESE N° 53

**LENTIVIRUS ANIMAUX
EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE
DE MOLECULES ORIGINALES SUR LE VIRUS VISNA-MAEDI.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue le 29 novembre 1995

PAR

Florence MARTHON
née le 4 mai 1970 à Brive (Corrèze)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD
Monsieur Francis COMBY - Maître de Conférences
Madame Sylvie DELEBASSEE - Maître de Conférences
Monsieur Bernard PLANCHE - Docteur en Pharmacie

- Président
- Juge
- Juge
- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE****DOYEN DE LA FACULTE :**

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS :Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences**PROFESSEURS :**

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
OUDARD Nicole	PHARMACODYNAMIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A NOTRE PRESIDENT DE JURY

Madame le Professeur Claudine BOSGIRAUD

Service de Bactériologie - Virologie - Parasitologie

En vous remerciant de l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de notre jury de thèse.

Pour la qualité de votre enseignement tout au long de nos études.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre respectueuse gratitude.

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

Madame Sylvie DELEBASSEE

Maître de Conférences

Service de Bactériologie - Virologie - Parasitologie

Pour l'aide que vous nous avez apportée tout au long de ce travail.

Pour la gentillesse avec laquelle vous nous avez toujours reçue.

Soyez assurée ici, de notre sincère reconnaissance.

A NOTRE JUGE

Monsieur Francis COMBY

Maître de Conférences

Service de Chimie Thérapeutique et de Chimie Organique

Nous vous remercions d'avoir bien voulu siéger à ce jury et prendre connaissance de notre travail.

A NOTRE JUGE

Monsieur Bernard PLANCHE

Docteur en Pharmacie à Argentat

Pour l'accueil que vous nous avez réservé, chaque été, dans votre officine.

Pour votre compétence professionnelle et vos qualités relationnelles.

Soyez remercié de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et de votre présence à

notre jury de thèse.

Nous adressons également nos remerciements

A Madame Roseline MOUZET

technicienne de laboratoire de Microbiologie.

Pour votre gentillesse et l'aide que vous nous avez apportée dans l'utilisation et l'entretien du matériel.

A Denis BAUDOT

Avec qui nous avons partagé ce travail expérimental et qui nous a soutenue ces dernières semaines.

A mes parents

A ma soeur

A David

Pour leur soutien et leurs encouragements.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : LE VIRUS VISNA-MAEDI

I - HISTORIQUE

II - EPIDEMIOLOGIE

- 1 - Répartition géographique
- 2 - Espèces affectées
- 3 - Transmission

III - VIROLOGIE

- 1 - Dimension et morphologie du virus
- 2 - Ultrastructure

- 2.1 - Nature de l'acide nucléique
- 2.2 - Organisation génomique
- 2.3 - Protéines et enzymes virales

- 2.3.1 - Protéines virales
- 2.3.2 - Enzymes virales

- 3 - Propriétés physico-chimiques
- 4 - Tropisme cellulaire
- 5 - Cycle de multiplication du virus

- 5.1 - Phase de reconnaissance, de fixation, de pénétration du virus
- 5.2 - Phase d'éclipse
- 5.3 - Phase de production virale

IV - LA MALADIE

- 1 - L'incubation
- 2 - Le tableau clinique de la maladie

- 2.1 - La forme MAEDI
- 2.2 - La forme VISNA

- 3 - Anatomo -histopathologie

- 3.1 - La forme MAEDI
 - 3.1.1 Anatomo- Pathologie
 - 3.1.2 Histologie

- 3.2 - La forme VISNA

3.2.1 - Anatomic-Pathologie

3.2.2 - Histologie

V - IMMUNOPATHOGENESE

VI - DIAGNOSTIC

- 1 - Diagnostic clinique.
- 2 - Diagnostic microbiologique.
- 3 - Diagnostics sérologiques.
- 4 - Diagnostic histologique

VII - TRAITEMENT

VIII - PROPHYLAXIE

DEUXIEME PARTIE : LES AUTRES LENTIVIRUS ANIMAUX

CHAPITRE PREMIER : LES LENTIVIRUS DES ONGULES

A - LE LENTIVIRUS CAPRIN

I - HISTORIQUE

II - EPIDEMIOLOGIE

- 1 - Répartition géographique
- 2 - Facteurs de réceptivité
 - 2.1 Facteurs intrinsèques
 - 2.2 - Facteurs extrinsèques
- 3 - Modalités de la contamination
 - 3.1 - Sources de matières virulentes
 - 3.2 - Transmission verticale
 - 3.3 - Transmission horizontale

II- VIROLOGIE

- 1 - Morphologie
- 2 - Ultrastructure
 - 2.1 Organisation génomique
 - 2.2 - Protéines virales
- 3 - Propriétés physico-chimiques
- 4 - Tropisme
- 5 - Culture-Effet cytopathique

IV - LA MALADIE**1 - Les symptômes****1.1 - La forme articulaire****1.2 - La forme nerveuse****1.3 - Les symptômes concomitants****1.3.1 - Les symptômes mammaires****1.3.2 - Les symptômes pulmonaires****2 - Les lésions****2.1 - Les lésions articulaires****2.2 - Les lésions du système nerveux****2.3 - Les lésions mammaires****2.4 - Les lésions pulmonaires****3 - Similitudes et différences avec l'infection par le virus VISNA MAEDI****3.1 L'incubation****3.2 - Les lésions****3.3 - Le pronostic****V - IMMUNOPATHOGENESE****VI - LE DIAGNOSTIC****1- Le diagnostic clinique****1.1 La forme articulaire****1.2 La forme nerveuse****2 - Le diagnostic différentiel****2.1 - Les différentes arthrites des caprins****2.2 - Les différentes affections nerveuses des chevreaux****3 - Le diagnostic expérimental****3.1 - Méthodes directes****3.2 - Méthodes indirectes****3.3 - La "Polymerase chain reaction"****VII- TRAITEMENT****VIII - PROPHYLAXIE****B - LE LENTIVIRUS EQUIN****I - HISTORIQUE****II - EPIDEMIOLOGIE**

1 - Répartition géographique**2 - Transmission****2.1 - Les différents modes de transmission****2.2 - La transmission par les insectes****2.2.1 - Les vecteurs****2.2.2 - La transmission proprement dite****2.2.3 - Caractéristiques de l'hôte****III- VIROLOGIE****1 - Le génome****2 - Tropisme****IV - LA MALADIE****1 - Les symptômes****1.1 - La forme suraiguë****1.2 - La forme aiguë ou typho-anémie****1.3 - La forme subaiguë****1.4 - La forme chronique****1.5 - La forme inapparente****2 - Les lésions microscopiques****2.1 - Au niveau des organes****2.2 - Au niveau des hématies****2.3 - Au niveau des leucocytes****V - DIAGNOSTIC****1 - Diagnostic clinique.****2 - Diagnostics sérologiques****VI - PROPHYLAXIE****CHAPITRE SECOND : LES LENTIVIRUS DES NON-ONGULES ET DES BOVINS****A - LES LENTIVIRUS SIMIENS****I - HISTORIQUE****1 - Isolement du virus chez le macaque et le mangabey****2 - Isolement du virus chez d'autres espèces simiennes****II - SEROEPIDEMIOLOGIE**

III - CLASSIFICATION DES LENTIVIRUS SIMIENS**IV - VIROLOGIE**

- 1 - Organisation génomique
- 2 - Tropicité

V - INFECTION PAR LE SIV CHEZ LE MACAQUE**1- Manifestations pathologiques**

- 1.1. - Phase aiguë ou primo-infection
- 1.2 - Phase asymptomatique
- 1.3 - Phase SIDA

2 - Diversité pathogénique des différents SIV

- 2.1 - Pathogénèse de la souche SIVsmm PBj14
- 2.2. - Pathogénèse des autres isolats SIV

VI - MISE AU POINT D'UN VACCIN**B - LE LENTIVIRUS FELIN****I - HISTORIQUE****II - EPIDEMIOLOGIE**

- 1 - Répartition géographique
- 2 - Facteurs de réceptivité et de sensibilité

- 2.1 - Facteurs extrinsèques
- 2.2 - Facteurs intrinsèques

3 - Transmission**III - VIROLOGIE**

- 1 - Morphologie
- 2 - Ultrastructure

- 2.1 - Organisation génomique
- 2.2 - Les protéines virales de structure

3 - Tropicité

- 3.1 - *In vivo*
- 3.2 - *In vitro*

- 4 - Effet cytopathique
- 5 - Action sur le système immunitaire

IV - LE SYNDROME D'IMMUNODEFICIENCE

1 - Les différents stades de l'infection

- 1.1 - Le stade I
- 1.2 - Le stade II
- 1.3 - Le stade III
- 1.4 - Le stade IV
- 1.5 - Le stade V

2 - Les pathologies associées

- 2.1 - Les affections de la cavité buccale
- 2.2 - Les affections de l'appareil respiratoire supérieur
- 2.3 - Les affections cutanées et du conduit auditif externe
- 2.4 - Les affections du tractus intestinal
- 2.5 - Les affections de l'appareil urinaire
- 2.6 - Les infections opportunistes
- 2.7 - Les autres affections
 - 2.7.1 - La pathologie nerveuse
 - 2.7.2 - La pathologie tumorale

3 - Les anomalies hématologiques**V - DIAGNOSTICS**

- 1 - Diagnostic histologique
- 2 - Diagnostics sérologiques

VI - TRAITEMENT

- 1 - Non spécifique
- 2 - Spécifique

VII - PROPHYLAXIE**C - LE LENTIVIRUS BOVIN****I - HISTORIQUE****II - EPIDEMIOLOGIE**

- 1 - Répartition géographique
- 2 - Transmission

III - VIROLOGIE

- 1 - Morphologie
- 2 - Ultrastructure

- 2.1 - Organisation génomique
- 2.2 - Protéines de structure et enzymes virales

3 - Tropisme

IV - LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES

V - ACTION SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

TROISIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES

I - CULTURE CELLULAIRE

- 1 - Nature et origine des cellules
- 2 - Entretien des cultures
 - 2.1 - Le milieu de culture
 - 2.2 - Le repiquage
 - 2.2.1 - La trypsination
 - 2.2.2 - La remise en culture

3 - Congélation - Décongélation

- 3.1 - Congélation
- 3.2 - Décongélation

II - LE VIRUS VISNA-MAEDI

- 1 - Origine
- 2 - Constitution du pool viral
- 3 - Titrage du virus
 - 3.1 - Principe
 - 3.2 - Protocole

III - LE MTT

- 1 - Structure
- 2 - Propriétés physico-chimiques
 - 2.1 - Propriétés physiques
 - 2.2 - Propriétés chimiques
- 3 - Principe de la méthode colorimétrique au MTT
- 4 - Avantages de la méthode colorimétrique au MTT

IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU MTT

1 - Les cellules

2 - Les molécules

3 - Le virus

3.1 - Souche VISNA K 796

3.2 - Souche MAEDI WLC1

4 - Incubation

5 - Coloration par la méthode au MTT

5.1 - Préparation de la solution de MTT

5.2 - Mode opératoire

6 - Lecture des densités optiques

7 - Détermination de la cytotoxicité des molécules testées

8 - Détermination de l'activité antivirale de la molécule testée

CHAPITRE SECOND : RESULTATS

I - CULTURE DU VIRUS

1 - Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP)

2 - Résultats du titrage

II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE

III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS A VIS DES SOUCHES VISNA ET MAEDI

IV - DISCUSSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

La famille des *Retroviridae* comprend trois sous-familles qui se distinguent par leur pathogénicité. On distingue :

- la sous famille des *Oncovirinae*, ou virus oncogènes, identifiés selon le néoplasme qu'ils induisent (virus leucémique, leucosique, de sarcome, de carcinome ...). On retrouve ainsi le FeLV (virus de la leucose féline), le BLV (virus de la leucose bovine), les HTLV - I et II (virus du lymphome des lymphocytes T humains).
- la sous-famille des *Spumavirinae*, virus symbiotes, provoquant une réaction légère voire nulle de la part de la cellule-hôte. Leur pathogénicité est inconnue.
- enfin la sous-famille des *Lentivirinae*, ou virus lents.

Ce concept de virus lents a été évoqué la première fois en 1954 par SIGURDSSON (151) dont les travaux portaient sur un virus ovin nommé VISNA-MAEDI. Ce dernier est ainsi devenu le premier prototype des virus de la sous-famille des *Lentivirinae*.

Quelques années plus tard, des lentivirus ont été isolés chez d'autres espèces animales (équine, bovine puis caprine). L'intérêt pour ces microorganismes s'est accru au cours des années 80, lorsque le premier lentivirus humain responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) fut découvert par le professeur MONTAGNIER à l'Institut Pasteur de Paris. Cette découverte fut suivie, très peu de temps après, par l'isolement de deux autres lentivirus responsables, eux aussi, d'un syndrome d'immunodéficience fatal chez le chat et le macaque vivant en captivité.

Tous ces lentivirus animaux ont en commun de nombreuses caractéristiques structurales, génomiques, biologiques et pathologiques. Ils constituent autant de modèles utilisés dans le but de mieux comprendre la pathogénèse et le développement des lésions organiques au cours du SIDA humain, ainsi que dans le but de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales.

Notre exposé comporte trois parties. Dans la première, nous avons fait le point sur les connaissances concernant le virus VISNA-MAEDI dont la culture nous a permis de tester l'activité antirétrovirale de plusieurs molécules originales. Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux autres lentivirus animaux découverts à ce jour. Enfin, la troisième partie présente et discute les résultats de notre expérimentation menée sur le lentivirus ovin.

PREMIERE PARTIE

LE VIRUS VISNA-MAEDI

Le virus VISNA-MAEDI est un rétrovirus de la sous-famille des *Lentivirinae* (96). Il est l'agent responsable de deux infections contagieuses affectant les ovins et les caprins. La maladie se caractérise :

- soit par une pneumonie interstitielle d'évolution lente et progressive dans la forme MAEDI (terme qui signifie "dyspnée" en islandais),
- soit par une encéphalopathie d'évolution également lente, dans la forme VISNA (terme signifiant "dépérissement"). (15)

I - HISTORIQUE

En 1923 furent décrites pour la première fois dans l'état du Montana (U.S.A.) des cas de pneumonie interstitielle chronique sévère entraînant l'épuisement puis la mort des moutons atteints (94).

Dans les années 38-39, survinrent en Islande de nombreux cas de pneumonie progressive du mouton appelée pour cette raison MAEDI (essoufflement). Des études épidémiologiques montrèrent alors que le développement de la maladie était consécutif à l'importation en 1933 de 20 béliers Karakul en provenance d'Allemagne (180). Dans les mêmes troupeaux où sévissait le MAEDI, on observa également des signes neurologiques d'encéphalite chronique. Ces troubles furent désignés par le terme VISNA (dépérissement).

Durant cette période, MAEDI et VISNA firent l'objet d'intenses études épidémiologiques, pathologiques, virologiques, et c'est en 1954 que l'Islandais SIGURDSSON (151) mit en cause une étiologie virale et définit le concept de "maladies à virus lents". Ces maladies se caractérisent en effet par une longue période d'incubation, s'étalant sur plusieurs mois voire plusieurs années, ainsi que par un développement progressif des signes cliniques.

Par la suite, la maladie fut identifiée dans de nombreux autres pays (15) :

- en Hollande notamment, où la Zwoegerziekte fut signalée la première fois en 1918 et dont les études ultérieures (cliniques, histologiques et virologiques) ont montré en 1968 qu'il s'agissait bien du MAEDI.
- aux Etats-Unis où la "maladie du mouton du Montana" fut également reconnue en 1968 comme étant due au MAEDI.

- en France où LUCAM décrivait en 1942 une pneumonie progressive du mouton landais plus communément appelé la Bouhite.
- en Allemagne et au Canada (1970), en Hongrie (1973), au Danemark et en Norvège (1974), en Suède et en Inde (1975), en Grande-Bretagne (1979), etc...

La maladie induite par le MAEDI a souvent été confondue avec l'adénomatose pulmonaire (ou pneumonie catarrhale chronique) observée en Afrique du Sud dès 1915 par MITCHELL. Cette confusion provenait apparemment du fait que certains moutons présentaient à la fois les deux maladies (35). En fait, ces deux affections sont très différentes, la première étant une maladie lymphoproliférative liée à un virus non oncogène et la deuxième, une maladie carcinomateuse.

II - EPIDEMIOLOGIE

1 - Répartition géographique

Comme nous l'avons vu dans l'historique, la répartition du virus VISNA-MAEDI est mondiale. On le rencontre sous tous les climats et pratiquement sur tous les continents : pourtant la maladie n'a jamais été décrite en Australie, malgré une population ovine très importante (109)

Dans différents pays (Danemark, Norvège, Suède, Hongrie, Canada ...) la maladie est, comme en Islande, consécutive à l'importation de moutons.

Cette affection ayant été découverte dans divers pays, elle a reçu différents noms, évoquant souvent le symptôme dominant (ainsi, en France, on a parlé de Bouhite, vieux mot du patois landais signifiant soufflet) et parfois le lieu où elle sévissait (aux USA, la première appellation a été pneumonie du mouton du Montana).

2 - Espèces affectées

Le VISNA-MAEDI est un lentivirus qui n'affecte que les ovins et les caprins (les caprins étant cependant bien moins souvent atteints que les ovins). L'homme n'est pas sensible au virus et la consommation de viande de mouton infecté ne semble pas dangereuse pour lui.

Des études sérologiques ont montré une plus forte séroprévalence ainsi qu'une incidence plus élevée des manifestations cliniques chez certaines espèces ovines (Border Leicester, Finnisch Landrace et Texel) que chez d'autres (Suffolk, Hampshire et Dorset) (180).

Plus récemment, il a été démontré que le taux d'infection dans ces deux groupes reste identique, suggérant ainsi une prédisposition génétique non pas à l'infection mais au développement des signes cliniques (83).

D'autre part, la prévalence de la maladie augmente avec l'âge de l'animal : les ovins sont plus sensibles à un âge avancé qu'au début de leur vie (2-3 ans). La présence de lésions mammaires (les mammites sont fréquemment associées aux autres symptômes de la maladie) est également plus rare chez les jeunes brebis, ce qui pourrait expliquer pourquoi elles infectent moins leur progéniture (71).

3 - Transmission

La transmission du virus VISNA-MAEDI se fait à la fois horizontalement (entre congénères) et verticalement (à la descendance).

La transmission horizontale s'effectue par l'inhalation d'exsudats respiratoires contenant le virus et/ou des cellules infectées par celui-ci. La transmission par cette voie est accrue par la coexistence d'autres agents infectieux entraînant une augmentation des sécrétions pulmonaires (le virus de l'adénomatose pulmonaire par exemple) et par les conditions d'élevage concentrant les animaux dans un endroit clos (et ce particulièrement pendant la période hivernale) (180).

A ce jour, il n'a pas été mis en évidence de transmission sexuelle du virus.

La contamination de l'agneau par le colostrum maternel renfermant des macrophages infectés, est le principal mode de transmission verticale. Elle est favorisée par l'apparition de mammite. Cependant,

l'incidence de l'infection dans le troupeau diminue lorsque l'on sépare les jeunes animaux des mères infectées, dès la naissance (20). La transmission *in utero* à travers la barrière placentaire ou par les cellules germinales est possible mais rare (34). Dans le cas d'une transmission prénatale, il semble alors que les brebis soient plus jeunes et qu'elles n'aient eu que peu de grossesses (17).

III - VIROLOGIE

C'est en 1960 que le virus VISNA est isolé pour la première fois en culture cellulaire, par SIGURDSSON et Coll., à partir du cerveau d'un mouton atteint par la maladie (152).

Quelques années plus tard, en 1964, SIGURDARDOTTIR met également en évidence un virus dans le poumon d'un animal infecté par le MAEDI (150).

1 - Dimension et morphologie du virus (174) (fig.1)

Le virus VISNA-MAEDI apparaît au microscope électronique sous la forme de particules sensiblement sphériques de 80 à 140 nm de diamètre.

Il est constitué d'un nucléoïde central de 40 nm, dense aux électrons, entouré d'une enveloppe dérivée de la membrane de la cellule hôte. Cette enveloppe externe mesure environ 6 nm d'épaisseur, et est hérissée de spicules glycoprotéiques de 8 à 12 nm de long.

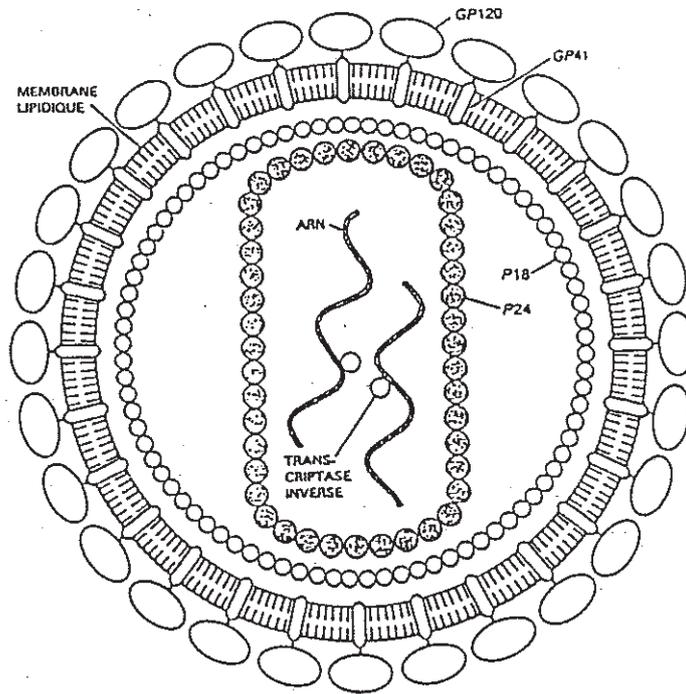


Figure 1 : représentation schématique d'un lentivirion : illustration par le HIV

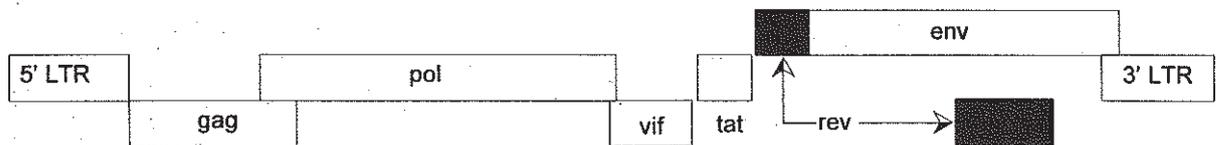


Figure 2 : organisation génomique du virus Visna-Maedi (148)

2 - Ultrastructure

2.1 - Nature de l'acide nucléique (174)

La particule virale contient deux molécules d'ARN monocaténaire :

- un composant principal ayant un coefficient de sédimentation compris entre 60 et 70 S,
- un composant mineur de faible coefficient de sédimentation (4 S).

L'ARN 60-70 S est constitué de deux sous-unités de 36 S, de séquences identiques et de poids moléculaire $3 \cdot 10^6$ daltons, associées par des liaisons non covalentes au niveau des extrémités 5'.

2.2 - Organisation génomique (fig. 2)

Les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par la complexité de leur génome.

En commun avec tous les rétrovirus, le virus VISNA-MAEDI contient les trois séquences majeures : gag, pol et env. A côté de ces gènes essentiels, il présente des cadres de lecture supplémentaires, vif, tat et rev, qui influencent l'expression génétique virale, la maturation des ARN et l'infectivité.

Les trois gènes principaux, gag, pol et env, codent pour des précurseurs qui sont ensuite clivés en protéines de structure (109). Ainsi :

- le gène gag (group associated antigen) d'environ 1350 nucléotides, code pour les protéines internes de la nucléocapside.
- le gène suivant appelé pol (polymérase), long de 3315 nucléotides, code pour les protéines virales, essentielles à la réplication et à la maturation : transcriptase-inverse, endonucléase/intégrase et protéase.

Ces deux premiers gènes se chevauchent dans le génome.

- Le gène env (enveloppe) constitue un troisième cadre de lecture de 2952 nucléotides. Ce gène code pour les deux protéines d'enveloppe (une protéine de surface SU et une protéine transmembranaire TM) nécessaires à la liaison du virus au récepteur cellulaire, à sa neutralisation et à sa fusion.

A côté de ces cadres de lecture, le génome du virus VISNA-MAEDI renferme trois petits gènes supplémentaires, codant pour des protéines régulatrices de la transcription (148, 62, 109, 161) :

- le premier de ces gènes est le gène vif (viral infectivity factor) long de 690 nucléotides. Il semble réguler l'expression virale à la fin de la réplication, pendant la formation des virions.
- le gène régulateur tat (trans activator of transcription) est situé immédiatement après vif. Il est présent chez tous les lentivirus et long de 288 nucléotides. Il code pour une protéine trans-activatrice de l'expression virale.
- enfin, le gène rev (regulator of expression of virion proteins) comprend deux séquences : l'une située en 3' du gène env et l'autre en 5' de ce même gène. Ce gène, également retrouvé chez tous les lentivirus, présent dans le noyau de la cellule infectée, code pour une protéine du noyau nécessaire à l'expression cytoplasmique des ARNm incomplètement épissés.

A chaque extrémité du génome, des séquences répétitives ou LTR (long terminal repeat) constituées de 414 paires de bases, jouent également un rôle essentiel. Elles assurent un contrôle de la transcription et de l'intégration de l'ADN au génome cellulaire. Elles contiennent aussi les signaux nécessaires à la régulation des ARNm et à l'encapsulation des ARN viraux.

2.3 - Protéines et enzymes virales (109)

2.3.1 - Protéines virales

→ Protéines d'enveloppe

- On distingue :

- une glycoprotéine de surface, gp 135 (de poids moléculaire 135000), qui détermine le tropisme cellulaire du virus. Elle porte les déterminants antigéniques qui seront les cibles des Ac neutralisants et des cellules T cytotoxiques, dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus,
- une glycoprotéine transmembranaire, gp 44 qui participerait, quant à elle, au processus de pénétration du virus dans la cellule hôte.

→ Protéines de la capsid

- Ces protéines de structure, codées par le gène gag, sont au nombre de trois : p14, p16, p27.
- La protéine majeure de cette capsid est la protéine p27, elle présente le déterminant antigénique caractéristique des lentivirus.

→ Autres polypeptides

Parmi ces derniers sont classées les protéines issues des gènes vif, tat, rev.

Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'infectiosité du virus et de l'expression génétique virale.

2.3.2 - Enzymes virales

La première enzyme est la **transcriptase inverse**, c'est à dire une ADN polymérase ARN dépendante. Cette enzyme est un constituant clé dans le cycle de réplication des rétrovirus; c'est elle qui transcrit l'ARN en ADN monocaténaire puis bicaténaire, formant ainsi un provirus, susceptible de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

Les propriétés de cette enzyme font du virus VISNA-MAEDI un lentivirus typique : en effet son activité dépend strictement de la présence dans le milieu d'un cation métallique divalent, avec une nette supériorité de l'ion Mg^{2+} par rapport à l'ion Mn^{2+} (ce dernier est au contraire nécessaire à l'activité de certains oncovirus).

La deuxième enzyme est une **protase** dont l'activité protéolytique est essentielle pour la production de virions infectieux.

La troisième enzyme possède une activité **endonucléasique / intégrasique**. Elle est capable d'introduire des coupures sur la chaîne d'ADN circulaire et participe également au mécanisme d'association du génome viral avec celui de la cellule hôte.

3 - Propriétés physico-chimiques (158)

Le virus VISNA-MAEDI est inactivé par l'éther éthylique, le chloroforme, l'éthanol, le phénol, le formaldéhyde et la trypsine.

La lumière ultra-violette lui fait également perdre sa virulence.

Assez fragile dans le milieu extérieur, il se conserve plusieurs mois à $-50^{\circ}C$. Il est inactivé en 10-15 min à $50^{\circ}C$.

Le virus est inactivé rapidement à $pH < 4,2$. L'infectiosité est relativement stable lorsque $5,1 < pH < 10$ et plus stable à un pH légèrement alcalin.

Enfin, le VISNA-MAEDI n'est ni hémadsorbant, ni hémagglutinant.

4 - Tropisme cellulaire (180,30)

Les cellules cibles du virus VISNA-MAEDI sont essentiellement les cellules de la lignée monocytes / macrophages. Au départ, seuls quelques monocytes et promonocytes issus de la moelle sont infectés : la réplication virale dans ces cellules est limitée et le virus reste sous la forme d'ADN proviral. Au cours de la maturation et de la différenciation des monocytes en macrophages, la sensibilité à l'infection est augmentée (par augmentation du nombre de récepteurs viraux) et la production de certains facteurs cellulaires stimule la transcription virale.

Cependant, s'il est clairement établi aujourd'hui que la principale cible du lentivirus ovin est bien la lignée monocyttaire, d'autres cellules peuvent également être infectées *in vivo* : c'est le cas des lymphocytes (le pourcentage de lymphocytes infectés reste malgré tout assez faible et la réplication virale au sein de ces cellules semble non productive) et de certaines cellules du système nerveux central telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes de plexus choroïdes, les astrocytes et les oligodendrocytes de la substance gliale. Le ou les récepteurs d'entrée du virus dans ces cellules ne sont pas connus. Cependant, la capacité du virus à se répliquer dans une large gamme de cellules suggère qu'il utilise, soit une molécule très commune, soit différents récepteurs.

5 - Cycle de multiplication du virus

Ce cycle présente les caractères généraux de réplication des *Rétroviridae* (56) (figure 3).

Il se divise en trois grandes étapes :

- une phase de **reconnaissance**, de **fixation** et de **pénétration du virus**,

- une phase **d'éclipse**,

- une phase de **production virale**.

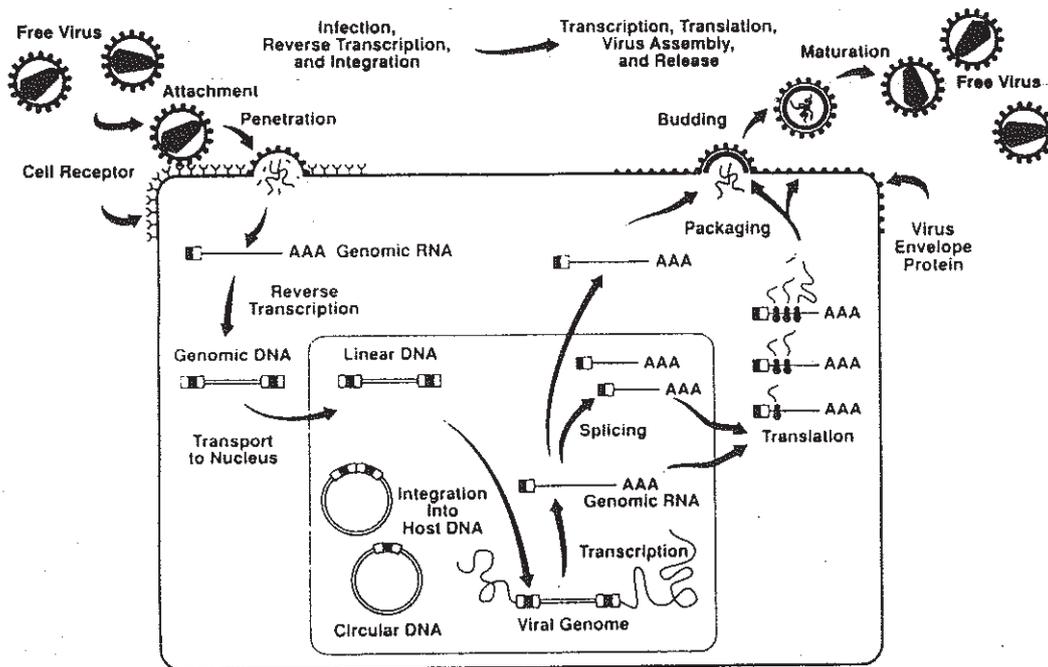


Figure 3 : cycle de répliation des lentivirus (56)

5.1 - Phase de reconnaissance, de fixation, de pénétration du virus

Le virus VISNA-MAEDI reconnaît des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible puis adhère à la surface de cette cellule par interaction entre sa glycoprotéine d'enveloppe gp 135 et le récepteur.

Puis le virus pénètre dans la cellule par un phénomène de pinocytose : sa capside est dégradée, libérant ainsi le nucléoïde dans le cytoplasme.

5.2 - Phase d'éclipse

Dans le cytoplasme, après décapsidation, l'ARN parental est transcrit en ADN grâce à une ADN polymérase ARN dépendante (ou transcriptase inverse). Le matériel génétique du lentivirus VISNA-MAEDI est constitué de deux molécules simples brin d'ARN et chacune des molécules génomiques est associée à une molécule de transcriptase inverse.

Il y a formation d'un hybride ARN-ADN qui sert de modèle à la synthèse d'un ADN bicaténaire, transporté dans le noyau. Cet ADN linéaire va alors s'intégrer au génome de la cellule hôte par l'intermédiaire de son endonucléase : l'ADN viral ainsi associé à l'ADN cellulaire est transmis aux cellules filles lors de la mitose, permettant ainsi la propagation du virus, à l'abri des défenses de l'hôte. On parle alors de provirus et cette phase de latence peut se poursuivre jusqu'à ce que des facteurs extérieurs ou des signaux physiologiques induisent la reprise de la transcription.

A la faveur d'une activation, le virus va donc se "réveiller" : la transcription peut commencer, donnant d'une part un ARN viral monocaténaire et d'autre part un ARN messager qui, lié aux polyribosomes cytoplasmiques, sera traduit en différentes protéines virales.

5.3 - Phase de production virale

A la fin de la synthèse protéique, les différents constituants viraux s'assemblent autour des molécules d'ARN génomique.

Cet ensemble migre ensuite vers la membrane cytoplasmique, et le virion est expulsé par bourgeonnement, hors de la cellule.

IV - LA MALADIE

Sur le plan clinique, trois caractéristiques de la maladie sont essentielles :

- l'incubation est très longue,
- parmi les animaux infectés, très peu développent des signes cliniques,
- les animaux qui extériorisent la maladie évoluent inexorablement vers la mort.

1 - L'incubation

Dans les conditions naturelles, il est difficile de chiffrer avec exactitude la durée précise de l'incubation. Cependant, les signes cliniques de la forme MAEDI n'apparaissent jamais avant l'âge de 3 ou 4 ans et ceux de la forme VISNA avant l'âge de 2 ans (15).

2 - Le tableau clinique de la maladie

2.1 - La forme MAEDI (180, 140, 122)

Les premiers signes sont d'abord discrets et peu évocateurs : l'éleveur constate que son animal manque de vigueur et qu'il présente une toison en mauvais état.

Apparaît ensuite une gêne respiratoire à l'effort ; la fréquence respiratoire est anormalement élevée et l'évolution se fait progressivement vers une polypnée permanente, observée même au repos.

Cette évolution est totalement apyrétique. Le jetage est absent et la toux sèche inconstante. Malgré un bon appétit, l'animal devenu cachectique ne se lève plus et succombe en anoxie, généralement à la suite de surinfections bactériennes.

La phase clinique peut durer plusieurs mois, parfois plus d'une année (en moyenne 3 à 8 mois). L'évolution fatale est notablement accélérée en cas de gestation, d'allaitement ou de maladies intercurrentes, microbiennes ou parasitaires.

2.2 - La forme VISNA (15)

Elle est définie comme une leucoencéphalite enzootique ovine, maladie démyélinisante lente, à évolution toujours fatale.

Comme pour la forme MAEDI, on note au départ une altération de l'état général. Le mouton traîne à l'arrière du troupeau et tombe parfois sans raison. Une légère anomalie de la démarche s'observe au niveau du train postérieur, lorsque l'animal est amené à trotter.

Progressivement la faiblesse des membres postérieurs s'accroît et la perte de poids s'accroît. Le phénomène est souvent plus marqué d'un côté, et l'animal laisse le membre atteint traîner vers l'arrière.

On observe parfois un tremblement au niveau des lèvres et des muscles faciaux, et les mammites sont des complications observées quelquefois chez les brebis.

La parésie progresse lentement vers une paralysie complète. L'état général de l'animal se détériore inéluctablement.

L'évolution clinique, là aussi apyrétique, dure de quelques semaines à plus d'un an.

La mort survient après une période de coma.

3 - Anatomo -histopathologie

3.1 - La forme MAEDI

3.1.1 Anatomo- Pathologie (140)

A l'ouverture de la cage thoracique du mouton, le signe le plus frappant est l'augmentation considérable du volume et du poids (multiplié par 2 ou 3) des poumons.

Ces derniers présentent une couleur homogène gris-jaunâtre ou gris-bleuté. Ils ne s'affaissent pas : leur consistance est ferme mais garde une certaine élasticité (on parle de "consistance de caoutchouc").

La trachée et les grosses bronches demeurent normales. Les ganglions lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux sont par contre, nettement hypertrophiés, pâles, oedémateux et de coupes homogènes.

3.1.2 Histologie (180, 104)

L'examen histologique révèle une pneumonie interstitielle avec hyperplasie lymphoïde. Les cloisons interalvéolaires sont épaissies et infiltrées par des cellules mononuclées, surtout des lymphocytes. L'hyperplasie lymphoïde concerne tout le poumon, mais elle est plus marquée au voisinage des bronches et des bronchioles.

Des altérations identiques (infiltration de cellules mononuclées, formation de manchons périvasculaires) ont également été observées au niveau des mamelles de brebis infectées.

3.2 - La forme VISNA

3.2.1 - Anatomico- Pathologie

Dans la plupart des cas, on n'observe aucune lésion macroscopique. Cependant, lorsque la maladie évolue sur une longue période, on peut noter une atrophie musculaire très importante sur un des membres postérieurs, voire sur les deux.

3.2.2 - Histologie (180, 53)

Les lésions sont celles d'une démyélinisation et d'une destruction de la substance blanche dans le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Elles ont été décrites en détail par SIGURDSSON et Coll., surtout sur des sujets atteints de la maladie expérimentale. Ces lésions sont tout d'abord de nature inflammatoire puis dégénérative.

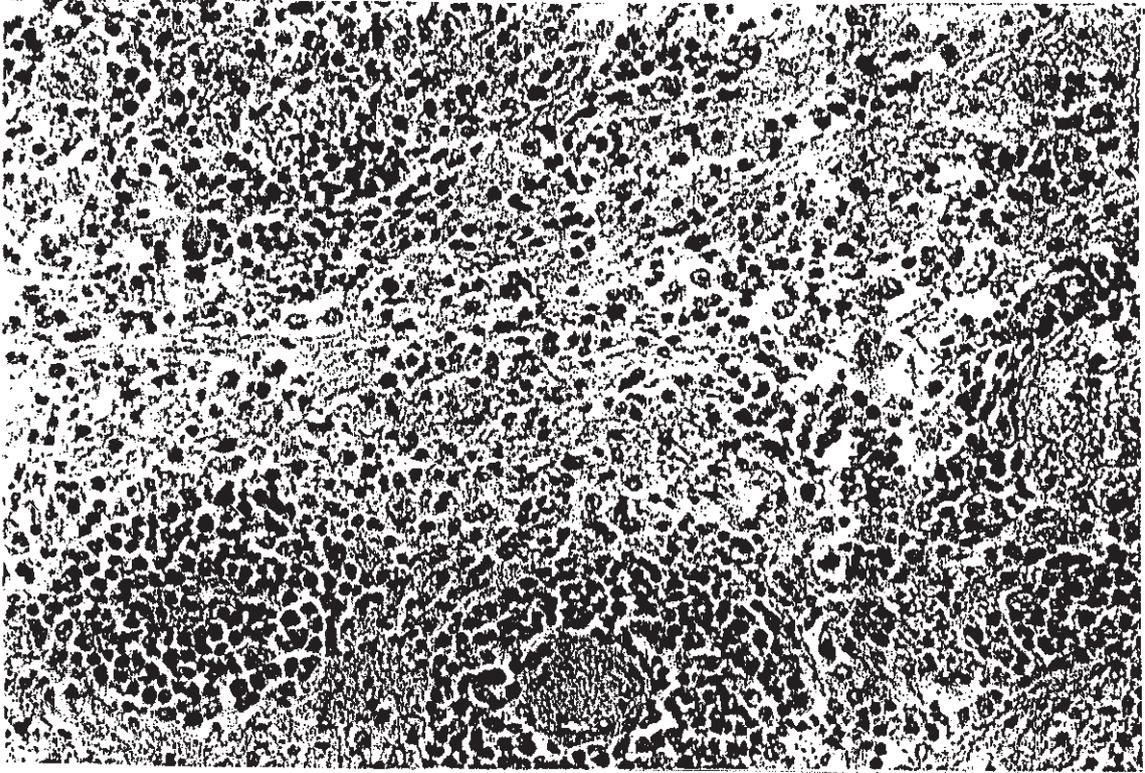


Figure 4 : intense inflammation de la substance blanche cérébrale (54)

La lésion primaire paraît se situer sur la névroglie. L'inflammation progresse avec régularité, partant de l'épendyme (ventricules cérébraux, aqueduc de Sylvius, canal épendymaire de la moelle) pour s'étendre ensuite en profondeur dans le parenchyme où l'infiltration lymphocytaire s'accompagne d'astrocytose (fig.4).

Dans les stades avancés, c'est la démyélinisation, puis la destruction de la substance blanche de l'encéphale, du bulbe, de la moelle qui domine. Certaines zones de démyélinisation montrent, en leur centre, une nécrose de liquéfaction.

Avant même l'apparition des premiers symptômes, on observe dans le liquide céphalo-rachidien et le liquide épendymaire, une pleïocytose prononcée (40 à 2000 cellules mononuclées / ml avec essentiellement des lymphocytes).

V -IMMUNOPATHOGENESE (180, 54))

Un grand nombre d'animaux infectés ne présente pas de taux d'anticorps détectable ou alors une réponse humorale tardive. Ceci est lié à la capacité du virus à rester latent dans les cellules hôtes immatures. En l'absence d'expression virale antigénique, l'organisme est en effet incapable de détecter le virus, la moelle joue donc le rôle d'un réservoir de virus qui déverse continuellement dans le sang périphérique des monocytes infectés, lesquels se retrouvent par chimiotactisme au niveau des tissus cibles. Quand les cellules deviennent matures dans ces tissus, le système immunitaire de l'animal est exposé à l'antigène viral : cependant les anticorps produits n'entraînent pas la disparition du virus ni une amélioration des signes cliniques et ceci semble en partie s'expliquer par le fait que la propagation du virus d'une cellule à l'autre est plus rapide que la cinétique de neutralisation.

D'un autre côté, les cultures cellulaires comme les études *in vivo* démontrent que l'interaction entre les macrophages infectés et les lymphocytes se traduit par la production d'un interféron LV-IFN. Cet interféron induit l'expression d'antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité sur les macrophages : ceci augmente la présentation d'antigènes viraux aux lymphocytes T helper qui sécrètent alors une grande variété de cytokines pro-

inflammatoires. Ces cytokines possèdent une activité chimiotactique vis à vis des monocytes et des lymphocytes du sang périphérique et contribuent donc à l'intense inflammation dans les tissus affectés.

VI - DIAGNOSTIC

1 - Diagnostic clinique.

Il est souvent difficile compte tenu de la superposition dans un même troupeau de pathologies d'étiologies diverses (parasitaires, bactériennes ou virales).

Ainsi la forme MAEDI peut être confondue avec d'autres affections cachectisantes présentant également des symptômes pulmonaires (140) :

- l'adénomatoze pulmonaire se différencie par la présence de râles humides; le jetage non purulent est abondant, la toux est grasse et la fièvre a un caractère constant.
- la tuberculose ovine, la strongylose, les broncho-pneumonies infectieuses et les mycoplasmoses sont aussi des pathologies pulmonaires. L'examen clinique est généralement insuffisant pour les différencier du MAEDI.

Le même risque de confusion existe avec la forme VISNA dont les manifestations nerveuses ne sont pas typiques :

- la forme paralytique de la "tremblante" (autre maladie virale des petits ruminants), est ainsi pratiquement impossible à distinguer du VISNA sans examen histologique.
- la coenurose (ou tournis) peut être difficile à distinguer du VISNA si les vésicules de coenure ont une localisation médullaire : dans ce cas apparaît également une paralysie progressive.
- de nombreuses maladies bactériennes peuvent aussi avoir des complications nerveuses. C'est le cas de la forme encéphalitique de la listériose : cependant son évolution rapide et d'autres signes cliniques (avortements, diarrhées..) permettent de faire la distinction assez facilement.

2 - Diagnostic microbiologique.

L'analyse microbiologique classique permet d'évaluer la part de responsabilité revenant aux parasites et/ou aux micro-organismes, dans la survenue des symptômes pulmonaires ou nerveux.

Quant à l'isolement du virus à partir d'un organe de mouton malade, il s'agit d'une procédure longue. Il est donc préférable de recourir aux tests sérologiques, rapides et relativement fiables.

3 - Diagnostics sérologiques.

Trois tests sont généralement utilisés :

- le test d'immunodiffusion sur gélose,
- le test ELISA,
- et plus rarement le test d'immunofluorescence indirecte.

Le test ELISA est plus spécifique et plus sensible. Les nouveaux kits mis au point permettent de limiter le nombre de résultats équivoques et donc le nombre de tests de confirmation nécessaires (179).

Cependant le faible coût de la technique IDG, associé à sa simplicité d'exécution en fait un test de choix dans la plupart des laboratoires vétérinaires. Le principe est basé sur un phénomène de diffusion en gélose puis sur la réaction de précipitation entre l'antigène et l'anticorps provenant du sérum à tester.

4 - Diagnostic histologique

C'est au cours d'examens histologiques que la différence essentielle entre la maladie MAEDI et l'adénomatose pulmonaire peut être mise en évidence. Les lésions microscopiques induites par le MAEDI sont caractéristiques d'une pneumonie interstitielle avec hyperplasie

lymphoïde. La formation adénomateuse résulte, elle, d'une hypertrophie de l'épithélium des bronches et des alvéoles ; à la lecture des coupes, on a l'image d'un adénocarcinome (140). Ce type de diagnostic permet également de différencier la forme VISNA de la "tremblante". En effet le type de lésions et leur répartition dans le système nerveux central sont totalement différents : il s'agit pour la "tremblante" de lésions de dégénérescence, sans phénomène inflammatoire.

VII - TRAITEMENT

Il n'existe pour le moment aucun traitement spécifique de la maladie même si de nombreuses molécules sont testées sur ce lentivirus.

Une étude menée tout d'abord *in vitro* à partir de cellules de plexus choroïdes de mouton infectées par le virus VISNA, a ainsi récemment démontré la capacité de la PMEA [9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine] à inhiber la réplication du virus. Ce résultat a été confirmé *in vivo* chez les agneaux infectés expérimentalement et traités pendant six semaines : en effet, l'isolement du virus s'est avéré plus difficile, le nombre de cellules mononuclées dans le liquide céphalo-rachidien moins important, et l'examen histologique n'a pas mis en évidence de lésions inflammatoires sévères. De plus, le traitement n'a occasionné aucun effet secondaire significatif (160).

Cependant, si les dérivés nucléosidiques font, à l'heure actuelle, l'objet de recherches intensives et si leur activité antirétrovirale potentielle est testée sur les lentivirus animaux (et notamment sur le virus VISNA-MAEDI), c'est avant tout en vue d'une application au traitement de l'immunodéficience humaine induite par le VIH.

VIII - PROPHYLAXIE

La prophylaxie médicale est pour l'instant inexistante. Les tentatives de vaccination menées jusqu'ici ont échoué. Le virus, inactivé par la chaleur, le formol ou l'éthanolamine, additionné

ou non d'un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium et inoculé à des moutons, induit ainsi la formation d'anticorps précipitants qui ne protègent pas les animaux (35).

La prophylaxie sanitaire s'avère donc essentielle et c'est dès 1978 que les autorités anglaises ont inclus dans leur règlement d'importation de reproducteurs ovins, une clause relative à la maladie VISNA-MAEDI. En France (38), la maladie n'étant pas légalement reconnue contagieuse, la prophylaxie sanitaire résulte d'une démarche volontaire de la part des éleveurs, et l'application des différentes mesures sanitaires se limite généralement aux troupeaux ovins de sélection (destinés à la reproduction). Ces mesures comprennent, tout d'abord, l'abattage des animaux malades. D'autre part, le mode de transmission horizontale de la maladie, par voie respiratoire justifie la séparation des animaux séropositifs de leurs congénères indemnes.

L'isolement des moutons infectés est cependant difficilement réalisable : il implique une vigilance accrue de la part des éleveurs ainsi qu'un bâtiment adapté ; pour les petits exploitants la solution la plus simple et la moins onéreuse est souvent l'abattage pour la boucherie, des quelques animaux infectés ne présentant pas encore les signes cliniques de la maladie. L'action prophylactique la plus facile à mettre en oeuvre et permettant, de plus, de réduire de façon significative l'incidence de l'infection au sein du cheptel, consiste à séparer les agneaux de leur mère dès la naissance, avant léchage et allaitement (180). L'élevage "artificiel" permet ainsi d'éviter la transmission verticale du virus par le colostrum ou le lait.

DEUXIEME PARTIE

LES AUTRES LENTIVIRUS ANIMAUX

La sous-famille des *Lentivirinae*, rétrovirus non oncogènes transmis par voie exogène, peut-être divisée en deux groupes :

- les lentivirus des ongulés, affectant le mouton, la chèvre ou le cheval. Les lésions qu'ils provoquent chez leur hôte sont la conséquence d'une surstimulation du système immunitaire qui aboutit à une pathologie inflammatoire chronique.

- les lentivirus des non-ongulés, affectant les primates et les chats. Ces virus induisent un syndrome d'immunodéficience entraînant toujours, à plus ou moins long terme, la mort de l'animal. Le lentivirus bovin qui a fait l'objet de relativement peu d'études, est rattaché à ce groupe même si tous les stades relatifs à un syndrome d'immunodéficience n'ont pas été décrits chez cet animal.

Cette partie de l'exposé a donc été divisé en deux chapitres, visant à différencier le type de pathologie induite en fonction du lentivirus incriminé.

CHAPITRE PREMIER

LES LENTIVIRUS DES ONGULES

A - LE LENTIVIRUS CAPRIN

I - HISTORIQUE

Une affection caprine est décrite pour la première fois en 1974, sous le nom de leucoencéphalomyélite virale. CORK et Coll. observent alors chez des chevreaux âgés de 2 à 4 mois et issus de troupeaux du nord-ouest des Etats-Unis, une paralysie afebrile accompagnée de lésions nerveuses proches de celles occasionnées par le virus VISNA (32).

D'autres formes de la maladie, affectant essentiellement les animaux adultes sont décrites à partir de 1980 : arthrites chroniques, mammites. On parle dès lors de syndrome ou de complexe arthrite-encéphalite caprine (CAEC) pour les auteurs français, et de caprine arthritis-encephalitis (CAE) pour les anglo-saxons.

L'origine virale de la maladie est confirmée en 1980 :

- par l'isolement de l'agent pathogène (110). Il s'agit d'un lentivirus proche du virus VISNA-MAEDI et nommé Caprine Arthritis-Encéphalitis Virus (CAEV),
- puis par la reproduction expérimentale de la maladie.

II - EPIDEMIOLOGIE

1 - Répartition géographique

Le CAEC est une maladie cosmopolite, observée dans le monde entier.

Dans de nombreux pays comme les Etats-Unis, le Canada, l'Australie, la Norvège, la Suisse, l'Allemagne, la Suède, les enquêtes sérologiques dénombrent des taux de séropositivité élevés, de l'ordre de 80% (3).



La France n'est pas épargnée : un test effectué en 1986 sur 98 élevages de la région Rhône-Alpes (premier producteur de fromage de chèvre en France) révèle que 78% des chèvres adultes et 56% des chevrettes présentent des réactions sérologiques positives (100). Il semble donc que les pays pratiquant un élevage laitier intensif soient les plus touchés; pourtant, certains, probablement en raison de circuits d'importation différents ou limités, sont moins atteints : c'est le cas de la Grande-Bretagne et de la Nouvelle-Zélande (134).

D'autres pays sont peu ou pas touchés :

- l'Espagne (59), l'Italie (4), l'Algérie (1), la Tunisie (14), où des sérologies positives n'ont été détectées qu'à la suite de l'importation d'animaux de race Alpine, en provenance de France,
- l'Autriche (141), la Turquie (21), le Mexique, le Pérou (3) où les taux de séropositivité sont compris entre 0 et 10% et le Brésil (70) où le virus a été isolé récemment.

Cependant, il faut noter que, si les taux de séropositivité peuvent être très élevés dans les pays pratiquant l'élevage intensif, l'expression clinique de la maladie a une prévalence moindre et le taux de morbidité reste assez faible, généralement inférieur à 25%.

2 - Facteurs de réceptivité

2.1 Facteurs intrinsèques

Il s'agit des facteurs de risque inhérents à l'animal.

L'âge : les jeunes caprins sont plus facilement contaminés car ils sont susceptibles d'ingérer le colostrum et le lait des mères infectées. Les chevreaux ne sont pas physiologiquement plus réceptifs à l'infection, mais sont simplement plus fréquemment en contact avec le virus.

Le sexe : tant que les animaux sont soumis aux mêmes conditions d'élevage, les pourcentages de séropositivité relatifs aux deux sexes sont identiques (100).

La race : l'étude de ce facteur reste difficile. En effet, on admet généralement que les races sélectionnées sont plus réceptives que les races locales (172). Cependant, ces races sélectionnées appartiennent aux élevages entretenant le plus de relations avec l'extérieur et

donc plus exposées à l'introduction du virus; c'est ainsi que les races caprines Saanen, Alpine, Angora, Nubienne et Toggenburg, sont plus sensibles à l'infection. Il existerait de plus, une prédisposition génétique au développement de la maladie (39).

2.2 - Facteurs extrinsèques

Il s'agit des facteurs de risque liés à l'environnement de l'animal.

La traite mécanique des chèvres représente ainsi un important facteur d'exposition à l'infection.

Quant aux facteurs favorisant le développement de la maladie, on peut distinguer ceux intervenant dans l'apparition de la forme nerveuse et ceux impliqués dans la manifestation de l'arthrite :

- c'est ainsi que le pic de chevreaux malades s'étale entre mars et août. Cependant le caractère saisonnier de la forme nerveuse ne peut pas être évoqué de façon certaine. En effet cette période succède au chevrotage où les chevreaux sensibles sont nombreux (113).
- les principaux facteurs de risque pour l'arthrite ont été davantage étudiés et sont :
 - une contamination précoce : le taux de chevrettes séropositives est en effet une indication du risque d'apparition de la maladie (100),
 - les articulations qui travaillent trop (l'animal se perche fréquemment) ou qui souffrent (le sol est dur ou irrégulier, les onglons sont mal taillés) (100),
 - le stress physiologique (gestation, lactation) ou climatique (quand surviennent des variations brutales) (9),
 - les maladies intercurrentes,
 - les déséquilibres alimentaires,
 - et les techniques d'élevage (les animaux malades appartiennent plutôt aux élevages intensifs qu'aux élevages traditionnels) (3).

3 - Modalités de la contamination

3.1 - Sources de matières virulentes

La principale source est représentée par le lait et le colostrum (172).

Le sang périphérique constitue aussi un matériel virulent ainsi que les sécrétions urogénitales, le sperme, la salive, les sécrétions bronchiques et les fèces.

3.2 - Transmission verticale

La période néonatale constitue la période de risque maximum durant laquelle le chevreau se contamine par ingestion de colostrum et de lait d'une mère infectée. Le colostrum renferme des anticorps dirigés contre le CAEV mais ces anticorps ne sont pas neutralisants et ne préviennent donc pas l'infection par le virus (134).

Par contre, différentes expérimentations semblent démontrer l'absence de contamination *in utero*. En effet, aucun des chevreaux nés par césarienne et séparés immédiatement de leur mère infectée, ne présente une séroconversion ou des signes cliniques.

De plus, les embryons résultant de la fécondation d'une chèvre séropositive par un bouc séropositif et transplantés à des receveuses séronégatives ont donné naissance à des chevreaux séronégatifs dont les mères porteuses sont également restées séronégatives (176).

3.3 - Transmission horizontale (125)

Le lait, vecteur de contamination des jeunes, est également impliqué dans la contamination entre adultes par l'intermédiaire d'installations de traite mécanique mal réglées et mal entretenues. Il s'agirait là de la principale voie de contamination des chèvres adultes.

La transmission indirecte par le sang resté sur une aiguille hypodermique, sur du matériel chirurgical ou zootechnique (pince à tatouer) existe aussi même si le CAEV n'est présent que dans quelques monocytes circulants.

La possibilité d'une contamination indirecte par l'eau d'abreuvement ou les aliments souillés, si elle n'est pas exclue, est peu probable; en effet la résistance du virus dans le milieu extérieur est très faible.

La transmission en milieu confiné, par inhalation de sécrétions nasales ou bronchiques contaminées est possible. Cependant ce mode de transmission est rare et disparaît dans le pâturage.

Enfin la transmission par le sperme n'a jamais été démontrée. Ainsi, les chèvres seronégatives saillies par des boucs contaminés sont restées indemnes, tout comme leur progéniture.

II- VIROLOGIE

1 - Morphologie

Le virus de l'arthrite encéphalite caprine est morphologiquement proche du virus VISNA-MAEDI.

Les cellules infectées libèrent les virions par bourgeonnement cytoplasmique. Leur maturation se poursuit dans le milieu extracellulaire, donnant naissance à des particules de 90 à 130 nm de diamètre, dont le nucléoïde est souvent condensé en forme de barre.

Ces virions sont groupés en amas.

2 - Ultrastructure

2.1 Organisation génomique (149, 138, 139, 62) (fig.5)

Elle s'apparente de très près à celle du virus VISNA-MAEDI. En effet, à côté des gènes caractéristiques (gag, pol, env) codant pour les protéines de structure, on retrouve les trois gènes de régulation (vif, tat et rev) présents dans le génome du lentivirus ovin.

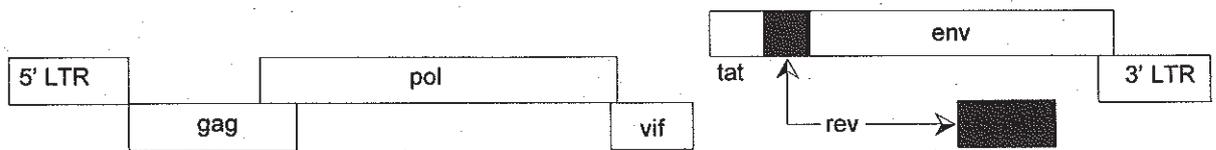


Figure 5 : organisation génomique du CAEV (149)

L'ensemble de ces gènes est encadré par deux régions terminales ou LTR d'organisation structurale identique. Ces LTR, indispensables à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire, présentent de nombreuses séquences homologues avec les LTR du virus VISNA-MAEDI ainsi que des dimensions semblables.

2.2 - Protéines virales

La structure protéique du CAEV a fait l'objet de nombreuses études. Au total 12 protéines structurales ont été dénombrées.

Les principales sont (28) :

- la glycoprotéine gp 135, protéine d'enveloppe, qui dériverait d'un précurseur p90 glycosylé en gp 150 avant réarrangement moléculaire. C'est l'interaction entre cette protéine de surface et le récepteur cellulaire qui permet l'infection (73).
- et la protéine p28, protéine majeure du core ; ces deux protéines induisent la formation d'anticorps précipitants utilisés pour le diagnostic en immunodiffusion sur gélose.

3 - Propriétés physico-chimiques

Le virus est sensible à la chaleur : ainsi le chauffage du colostrum de chèvres infectées, à 56°, pendant 1 heure, permet de réduire considérablement l'infectivité du virus tout en préservant les immunoglobulines maternelles (123).

Le CAEV est également sensible aux UV.

4 - Tropisme

Le CAEV, comme le virus VISNA-MAEDI, a un tropisme marqué pour les cellules de la lignée monocytes/macrophages. Il infecte les cellules précurseurs de la lignée; l'ADN s'intègre au génome cellulaire et le provirus ainsi formé entre dans une phase de latence. Le cycle complet de la réplication se poursuit dans les macrophages différenciés (30), notamment dans les cellules

microgliales qui, comme pour le HIV-1 ou le SIV, constituent une cible privilégiée et dans les cellules synoviales (12).

5 - Culture-Effet cytopathique

La mise en culture de ce virus peut se faire sur la plupart des cellules d'origine caprine. Toutefois la réplication est plus intense sur les cellules synoviales, qu'elles soient prélevées chez des foetus ou chez des adultes. La culture de cellules microgliales peut également être utilisée pour observer l'infection du CAEV *in vitro* et notamment pour étudier l'interaction entre le virus et les cellules du système nerveux central (12).

L'effet cytopathique du virus se traduit par des cellules très vacuolisées et la formation de syncytia en plusieurs semaines (134).

IV - LA MALADIE

1 - Les symptômes (51)

Cette affection est très polymorphe dans ses manifestations cliniques. (figure 6)

Elle touche les adultes chez qui elle se manifeste par des troubles articulaires, pulmonaires ou mammaires. Cliniquement, les jeunes sont plus rarement atteints : lorsque c'est le cas, il s'agit d'atteintes nerveuses.

1.1 - La forme articulaire

Elle affecte les animaux adultes de deux ans et plus (125). Cependant, dans les élevages fortement atteints, il a déjà été décrit des chevrettes âgées de 4 à 5 mois, présentant de l'arthrite (172).

Généralement, plusieurs animaux sont atteints, au sein d'un même élevage.

Les articulations les plus touchées sont, par ordre décroissant :

- les carpes,

- les jarrets,
- les grassets,
- et les autres articulations dans une moindre mesure.

En fait, toutes les membranes synoviales peuvent être touchées : celles des articulations, mais aussi celles des gaines et bourses tendineuses. Ainsi, en fin d'évolution notamment, on observe parfois un gonflement des bourses atloïdiennes et supra-épineuses (125).

Le carpe est presque toujours la première articulation atteinte cliniquement. Il subit une augmentation de volume, d'où l'appellation de "gros genou" employée par les éleveurs pour désigner la maladie.

Les articulations atteintes sont grosses, quelquefois chaudes, et douloureuses à la palpation ; cette douleur semble augmentée par temps froid. Leur consistance est le plus souvent diminuée (il s'agit alors d'un hygroma ou kyste du tissu conjonctif sous-cutané) mais peut, au contraire, être augmentée (les gaines et tendons sont alors partiellement calcifiés).

Ces différentes altérations font que l'amplitude des mouvements est réduite, et entraînent d'abord une légère boiterie chez l'animal. L'évolution est inégale selon les individus : la raideur chez certaines chèvres, peut persister pendant plusieurs années; d'autres chèvres sont rapidement bloquées, ne peuvent plus se tenir debout, se déplacent sur les carpes ou restent en décubitus sternal.

Dans la majorité des cas, l'évolution de la maladie est lente et insidieuse. Au début, le retentissement sur l'état général est faible : amaigrissement, troubles cutanés, ... Puis la perte de poids devient plus importante ; l'animal a du mal à se déplacer, donc à se nourrir et devient sujet aux surinfections. Cependant, hormis dans les rares cas extrêmes où le décubitus sternal est permanent, la mortalité est faible.

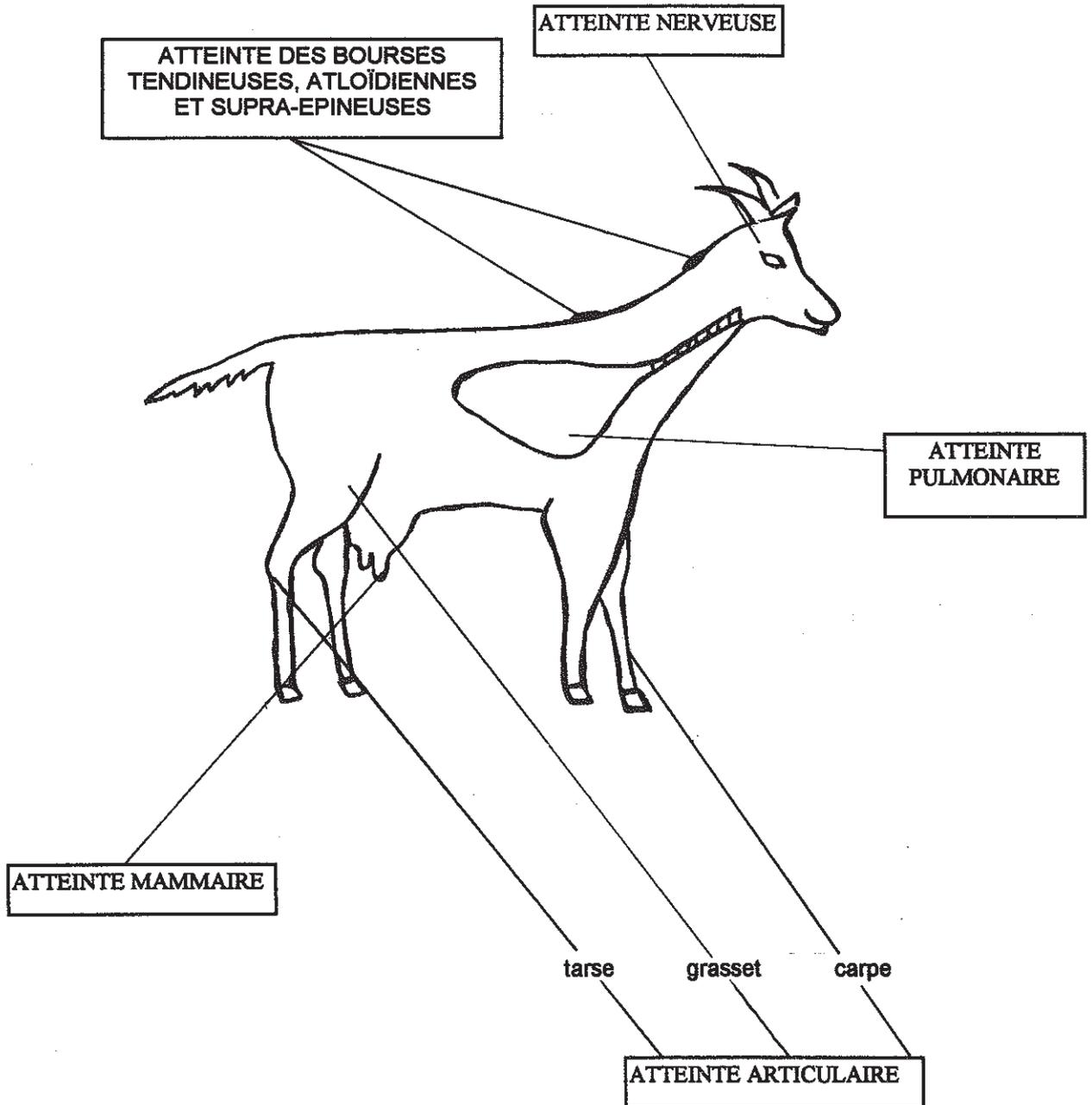


Figure 6 : schéma des principaux organes cibles lors de l'infection par le CAEV

1.2 - La forme nerveuse

Elle affecte essentiellement les animaux jeunes, entre 2 et 4 mois, même si dans de rares cas, des symptômes nerveux ont été observés chez des chèvres adultes atteintes d'arthrite chronique en fin d'évolution .

Les symptômes sont ceux d'une paralysie progressive ascendante. Ils s'expriment d'abord par une faiblesse discrète du train postérieur, que l'on peut rendre plus évidente en forçant l'animal à marcher. Une ataxie, puis une parésie apparaissent sur un membre postérieur, gagnent l'autre et finissent par atteindre l'ensemble du train postérieur. C'est ensuite le train antérieur qui est à son tour touché (134).

L'évolution est le plus souvent apyrétique, sauf si l'animal contracte une surinfection secondaire. Au début de la maladie, l'appétit est conservé et les chevreaux lèvent la tête pour essayer de téter. Mais l'évolution est rapide et l'animal meurt dans un délai de 4 - 5 jours à un mois (124).

1.3 - Les symptômes concomitants

1.3.1 - Les symptômes mammaires

Il s'agit de mammites entraînant une induration au niveau des mamelles, d'où le terme de "Pis de bois" utilisé par les éleveurs français (125).

L'induration apparaît le plus souvent 1 à 3 jours avant la mise bas (125) et touche plutôt les primipares (134). Elle peut être nodulaire ou diffuse, avec une tendance à s'étendre à l'ensemble du pis.

S'il n'y a pas de mammite bactérienne associée, l'animal ne paraît pas malade. Cependant, la production de lait se trouve fortement diminuée, voire inexistante.

La guérison n'est jamais totale : si elle a lieu, elle est souvent unilatérale ce qui entraîne un pis déséquilibré.

1.3.2 - Les symptômes pulmonaires (134)

Ils ne sont observés que chez des animaux adultes présentant déjà une arthrite ou chez des chevreaux souffrant d'encéphalite.

Chez l'adulte, après une phase subclinique, apparaît une pneumonie interstitielle chronique : la respiration est rapide lors d'efforts modérés et évolue vers la dyspnée au repos. Chez le jeune, les symptômes pulmonaires se traduisent par une toux.

2 - Les lésions

2.1 - Les lésions articulaires

Les lésions articulaires visibles à l'autopsie peuvent être divisées en deux catégories (125) :

- les lésions inflammatoires avec oedème des tissus mous péri-articulaires, hyperplasie systématique des synoviales articulaires et tendineuses, et augmentation du volume de liquide synovial.
- et les lésions dégénératives, plus tardives, caractérisées alors par une diminution de la quantité de liquide synovial, par des plages de dégénérescence et de nécrose tissulaires et tendineuses, par la minéralisation de ces plages, par l'érosion du cartilage articulaire et par la présence d'ostéophytes.

L'étude histologique met en évidence une infiltration des membranes et tissus, par des cellules inflammatoires à large prédominance lymphoplasmocytaire. Lors des phases d'inflammation aiguë, la concentration cellulaire dans le liquide synovial est de l'ordre de 1000 à 20000 cellules/mm³ (au lieu de 100 à 500 pour un liquide synovial normal) dont 90% sont des cellules mononuclées.

2.2 - Les lésions du système nerveux

Elles ne sont pas décelables lors de l'autopsie.

L'examen microscopique révèle une réaction inflammatoire non suppurative dans la substance blanche; la substance grise ne semble en effet lésée que dans les cas les plus graves et les plus évolués. On peut observer la formation de manchons périvasculaires de cellules mononuclées (lymphocytes essentiellement mais aussi macrophages et plasmocytes) ainsi qu'un phénomène de démyélinisation préservant toutefois les axones (113).

2.3 - Les lésions mammaires

L'examen macroscopique permet d'expliquer l'induration observée cliniquement : elle résulte d'une fibrose des tissus mammaires.

Au microscope, on observe une infiltration lymphocytaire du parenchyme mammaire. Ce phénomène inflammatoire ressemble donc à ceux observés au niveau des articulations et du système nerveux.

Les formations lymphoïdes étant adjacentes aux canaux lactifères, elles jouent un rôle important d'un point de vue épidémiologique et expliquent le rôle capital joué par le lait et le colostrum dans la transmission du virus.

2.4 - Les lésions pulmonaires

A l'autopsie, les poumons ne s'affaissent pas et restent fermes. En fonction du stade d'évolution, leur poids peut être multiplié par 2 ou 3. Leur coloration gris-rose est plus ou moins uniforme. Ce sont les lobes diaphragmatiques qui sont les plus atteints (134).

L'histologie révèle le développement d'une pneumonie interstitielle avec hyperplasie lymphoïde péri-bronchiolaire. Cette hyperplasie touche l'épithélium et les septa et s'accompagne parfois de fibrose des parois (43).

3 - Similitudes et différences avec l'infection par le virus VISNA-MAEDI

3.1 L'incubation

La forme arthritique de la maladie ne touche que des animaux adultes. Son évolution est longue, progressive, insidieuse, ce qui est caractéristique des Lentivirus et du virus VISNA-MAEDI en particulier.

La forme nerveuse affecte, au contraire, des animaux jeunes âgés de 2 à 4 mois. Comme l'anémie infectieuse des chevaux, elle peut être fatale très rapidement et constitue ainsi une exception parmi les maladies lentivirales.

3.2 - Les lésions

L'étude histologique de l'articulation de l'adulte malade révèle une lésion inflammatoire identique à celle observée dans l'arthrite du mouton infecté par le virus VISNA-MAEDI et dans l'arthrite rhumatoïde humaine (111).

De même, de nombreux auteurs signalent la similitude entre les lésions nerveuses occasionnées par le CAEV (infiltration lymphocytaire et phénomène de démyélinisation) et celles décrites chez le mouton infecté par le VISNA ou chez l'homme atteint d'encéphalite post-infectieuse (32).

Enfin, les lésions mammaires sont similaires à celles observées chez les brebis contaminées par le virus VISNA-MAEDI. Les lésions pulmonaires sont également semblables : cependant, dans le cas du virus MAEDI, on observe un exsudat protéique dans la lumière alvéolaire, ce qui n'est pas le cas dans le CAEC.

3.3 - Le pronostic

Quelle que soit la forme (pulmonaire ou nerveuse) induite par le virus VISNA-MAEDI, le pronostic vital de l'animal est mauvais, et l'évolution de la maladie se fait inexorablement vers la mort.

Dans le cas du CAEV en revanche, si la forme encéphalomyélitique des chevreaux est mortelle, la forme arthritique des adultes a un bon pronostic, ceci en dépit du caractère évolutif et irréversible de la maladie : en effet seuls les animaux en décubitus permanent et surinfectés vont mourir.

V - IMMUNOPATHOGENESE (180, 111, 99)

Il s'agit d'un mécanisme analogue à celui décrit pour le virus VISNA-MAEDI. Le virus est latent dans les cellules précurseurs et la réplication est initiée quand ces cellules se différencient. Au cours de la réplication, la production de cytokines spécifiques entraîne la migration des cellules infectées, du sang périphérique vers les tissus cibles à travers l'endothélium vasculaire. Il est probable que les cytokines induites par d'autres agents infectieux tels que des bactéries, des mycoplasmes ou des protozoaires peuvent renforcer ce processus chimiotactique. Dans les tissus, l'interaction entre macrophages et lymphocytes entraîne une cascade de réactions inflammatoires avec tout d'abord la production de l'interféron LV-IFN : cet interféron qui induit l'expression des Ag de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité par les macrophages est un facteur essentiel dans l'initiation et l'amplification de la réponse lymphoproliférative de l'hôte. Au niveau des lésions inflammatoires du système nerveux central comme au niveau des articulations, on constate une prédominance de lymphocytes CD8 et seulement un petit nombre de lymphocytes CD4.

VI - LE DIAGNOSTIC

1- Le diagnostic clinique (cf symptômes)

1.1 La forme articulaire

L'âge des animaux doit être pris en considération : ce sont généralement les chèvres adultes qui sont touchées.

A la palpation, l'articulation (le carpe en général) est douloureuse, chaude et de consistance variable. Mais c'est surtout son augmentation de volume et sa déformation associées à une légère boiterie qui attirent initialement l'attention. Cependant, il n'est pas toujours facile d'apprécier correctement un "gros genou", notamment chez les mâles; le diagnostic n'est donc confirmé qu'après le calcul d'un index clinique (100) selon la formule :

$I = \text{circonférence du plus grand carpe} - \text{circonférence du plus petit métacarpe}$ (exprimé en cm)

si $I < 6$ cm : l'animal est considéré comme sain

si $6 < I < 7$ cm : l'animal est considéré comme douteux

si $I > 7$ cm : l'animal est considéré comme malade

1.2 La forme nerveuse

Elle semble rare en France ou du moins peu diagnostiquée.

Ce sont les chevreaux entre 2 et 4 mois qui sont atteints. Ils présentent une paralysie progressive ascendante. Divers autres symptômes d'atteinte nerveuse sont visibles selon la zone lésée : torticolis, oscillations de la tête, déficits proprioceptifs, réflexes inconstants (134).

2 - Le diagnostic différentiel

2.1 - Les différentes arthrites des caprins

L'arthrite du CAEC doit être différenciée des mono ou polyarthrites post-traumatiques et septicémiques provoquées par différents germes. En effet, ces dernières touchent de façon sporadique, aussi bien les chevreaux que les animaux adultes. Il faut notamment ne pas exclure le risque d'une brucellose.

Les polyarthrites "banales" à staphylocoques, streptocoques, colibacilles, les arthrites à chlamydies (*Chlamydia psittaci*) et les polyarthrites à mycoplasmes affectent également les caprins mais touchent presque exclusivement les jeunes animaux.

2.2 - Les différentes affections nerveuses des chevreaux

En ce qui concerne la forme nerveuse, l'examen clinique est insuffisant pour poser un diagnostic de certitude. En effet, de nombreuses pathologies du chevreau se traduisent par une parésie ou une paralysie du train postérieur :

- une myopathie entraînant une faiblesse musculaire et des troubles respiratoires,
- une carence en cuivre,
- un abcès intervertébral,
- une coccidiose...

3 - Le diagnostic expérimental

3.1 - Méthodes directes

Il s'agit des seuls diagnostics de certitude, car beaucoup d'animaux sont des porteurs sains et restent parfois négatifs aux épreuves de diagnostic indirect.

La première méthode consiste à mettre en évidence le virus par visualisation électronique.

C'est une technique délicate et tributaire des conditions d'obtention des prélèvements.

Une autre technique consiste à mettre en évidence l'effet cytopathogène du virus en culture cellulaire.

Dans les deux cas, il s'agit de méthodes longues et coûteuses qui ne permettent pas un diagnostic de routine.

3.2 - Méthodes indirectes

Quatre techniques peuvent être utilisées :

- la fixation du complément,
- l'immunofluorescence indirecte,
- l'immunodiffusion en gélose (IDG),
- et le test ELISA.

L'IDG est le test le plus couramment utilisé. Ce test, d'emploi et de lecture facile, de faible coût, semble ne pas révéler de faux positifs. Il engendre par contre des faux négatifs notamment dans les cas évolués ainsi qu'à l'approche de la mise bas (134). En outre, les résultats sont différents selon que l'on recherche l'anticorps anti p28 ou l'anticorps anti gp 135, avec une sensibilité plus grande pour ce dernier (2).

Le test ELISA est également utilisé. Comme l'IDG, il ne semble pas révéler de faux positifs; les faux négatifs sont, de plus, moins nombreux (134). Il s'agit d'un test plus sensible, plus spécifique, plus rapide et plus fiable.

Dans son plan d'éradication, la Nouvelle-Zélande l'a d'ailleurs choisi comme test de référence. Le test ELISA, s'il utilise d'ordinaire le sérum des animaux, peut également détecter les anticorps dans le lait de chèvre avec une sensibilité et une spécificité similaires (105).

Quel que soit le test choisi, il faut rappeler que :

- le test positif témoigne de la présence d'anticorps mais ne permet en aucun cas de dire que la chèvre exprime la maladie,
- certains tests peuvent donner des faux-négatifs,

- l'intensité de la réaction antigène-anticorps n'est pas proportionnelle à la sévérité des signes cliniques.

3.3 - La "Polymerase chain reaction" (PCR)

La séroconversion des caprins peut être retardée de plusieurs mois après leur infection naturelle par le CAEV. On peut logiquement penser que cette caractéristique du CAEV a un impact direct sur les enquêtes épidémiologiques et qu'elle perturbe les différents programmes d'éradication (qui utilisent les méthodes sérologiques pour détecter les animaux infectés) (132).

Une autre technique de diagnostic peut être utilisée. Il s'agit de la PCR qui permet de détecter l'infection et qui est basée sur la détection du génome viral par amplification génique. L'ADN proviral intégré dans les cellules mononuclées du sang périphérique, du liquide synovial ou du lait peut ainsi être recherché après amplification *in vitro* (131,11). Cette technique reste malgré tout réservée à la recherche.

VII- TRAITEMENT

Il n'existe aucun traitement spécifique. Il s'agit plutôt de traitements palliatifs, destinés à augmenter le confort de l'animal. Ils s'adressent uniquement aux adultes arthritiques et en particulier aux bonnes laitières dont on veut conserver un niveau de production élevé ; dans le cas de la forme nerveuse, la mise en place d'un traitement est inutile.

L'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, type phénylbutazone, est le plus souvent conseillée. Cependant, malgré le rapprochement des cures et l'augmentation des posologies, l'effet thérapeutique diminue.

Les anti-inflammatoires stéroïdiens de par leur effet inhibiteur de la lactation et leur action immunodépressive, sont à proscrire.

VIII - PROPHYLAXIE

Il n'existe pour le moment aucun vaccin pour prévenir l'infection par le CAEV. En effet, le virus n'induit pas d'immunisation protectrice après des injections de virus inactivé et purifié, de virus vivant atténué, d'extraits viraux (glycoprotéines d'enveloppe) ou de cellules infectées. Dans certains cas, au contraire, l'apparition des signes cliniques est plus précoce et les lésions plus sévères (109, 27, 137, 171).

En l'absence de tout traitement et de toute prophylaxie médicale, l'accent doit être porté sur la prophylaxie sanitaire.

La mise en place d'un programme d'éradication est difficile et coûteuse. Elle n'est donc proposée que dans les exploitations où l'élevage est intensif. Pour les élevages traditionnels nombreux dans notre pays et comptant souvent moins de dix animaux, la solution la moins onéreuse est, en effet, l'abattage et le remplacement du cheptel tout entier.

Comme c'est le cas dans la prévention de l'infection par le virus VISNA-MAEDI, la première précaution est de séparer dès la mise bas, les nouveaux nés de leur mère (100). Les chevreaux sont alors nourris avec du colostrum puis du lait provenant, soit de chèvres âgées n'ayant jamais présenté de séroconversion, soit de vaches appartenant à un élevage indemne de leucose bovine. Une autre technique consiste à chauffer le colostrum de chèvres séropositives, au bain-marie à 56°C et pendant une heure (123).

Une autre mesure de précaution est de commencer la traite par les animaux séronégatifs et de veiller tout particulièrement au nettoyage quotidien et à l'entretien de la machine à traire (vérification bisannuelle).

Le matériel chirurgical et les pinces à tatouer doivent être rigoureusement nettoyés et désinfectés entre chaque animal. L'emploi d'aiguilles à usage unique permet également de limiter les risques de contamination.

Toute pratique favorisant la promiscuité entre les animaux (étables surpeuplées, concours agricoles, ...) est à éviter et l'introduction de nouveaux animaux dans le troupeau doit être surveillée.

Enfin une taille régulière des onglons associée à des mesures visant à limiter les traumatismes (empêcher les chèvres de se percher, éviter les pentes et les sols trop durs, ...) peut retarder l'apparition de l'arthrite chez les adultes infectés.

B - LE LENTIVIRUS EQUIN

I - HISTORIQUE

L'anémie infectieuse équine (AIE) ou fièvre des marais, décrite pour la première fois en 1843 par LIGNEE, fut reconnue comme une pathologie virale dès le début du siècle (169). Elle a été, pendant de nombreuses années, responsable de pertes économiques importantes et reste parfois encore un véritable fléau pour la population équine.

De nombreuses difficultés, comme la mise en place d'essais *in vitro* et de tests sérologiques fiables, sont apparues au cours des premières recherches sur la maladie.

Au début des années 70, les chercheurs japonais, travaillant sur des cultures leucocytaires découvrent la dérive antigénique du virus chez des chevaux atteints de signes chroniques de la maladie (85). C'est également en 1970 que COGGINS et Coll. décrivent un test sérologique, l'AGID test (Agar Gel Immunodiffusion test) qui devient, malgré son relatif manque de sensibilité, un test de référence dans le monde entier (31).

En 1984, les connaissances sur l'AIE prennent un nouvel intérêt : le Professeur Luc MONTAGNIER découvre en effet, qu'un sérum de cheval contenant des anticorps anti-AIE reconnaît la principale protéine du core d'un virus isolé d'un malade atteint de lymphadénopathie persistante (101). Le LAV (Lymphadenopathy-Associated Virus) est aujourd'hui reconnu comme le HIV (Human Immunodeficiency Virus) et l'espoir des chercheurs est que les découvertes relatives à l'une ou l'autre des maladies (AIE ou SIDA) concourent à une meilleure connaissance des deux.

II - EPIDEMIOLOGIE

1 - Répartition géographique

La répartition du virus est mondiale. Cependant, l'incidence de l'AIE varie en fonction des saisons et des climats. Elle est en effet plus fréquente dans les régions chaudes et humides (comme la

Louisiane) et en période d'activité maximale des insectes piqueurs. Actuellement, on constate dans la plupart des pays une diminution du nombre d'animaux malades ou de sérologies positives.

Cependant, le pourcentage de chevaux testés reste faible (moins de 10% de la population équine aux Etats-Unis); les chevaux ne faisant jamais l'objet d'examen vétérinaire constituent donc un réservoir de virus important, assurant la pérennité de la maladie (81).

2 - Transmission

2.1 - Les différents modes de transmission

La transmission *in utero* du virus a été occasionnellement décrite mais aucune preuve n'existe pour suggérer une réelle transmission verticale, par les cellules germinatives.

La transmission de contact semble possible puisque le virus est retrouvé dans les sécrétions et les fèces des chevaux fortement infectés : cependant il s'agirait d'un mode de transmission anecdotique (79).

La transmission du virus par le sperme n'a pas été mise en évidence.

En fait, la source principale de virus étant le sang des animaux infectés, la contamination s'effectue presque exclusivement par l'intermédiaire de l'homme (l'éleveur ou le vétérinaire) ou d'un vecteur hématophage :

- en ce qui concerne la transmission de l'infection par du matériel contaminé (que ce soit du matériel chirurgical tel que des seringues hypodermiques, des sondes stomacales..., ou du matériel de monte tel que le mors ou les étriers), il est important de souligner la capacité du virus à conserver son infectiosité pendant plusieurs jours (81). L'utilisation d'un même équipement chez plusieurs chevaux, sans règles d'hygiène strictes, augmente donc de façon sensible le risque de contamination.
- la transmission par les insectes se fait par l'intermédiaire de leurs pièces buccales. Le virus ne se multipliant pas dans les cellules du vecteur, il s'agit là encore d'une transmission mécanique.

2.2 - La transmission par les insectes

2.2.1 - Les vecteurs

Les insectes incriminés dans la transmission de l'AIE sont tous des diptères appartenant pour la plupart à la famille des *Tabanidae* (*Tabanus fuscicostatus*, *Chrysops flavidus*, ...) mais aussi à la famille des *Muscidae* (*Stomoxys calcitrans*, ...) (81).

Les Tabanides ou taons sont des diptères moyens ou grands, volant très rapidement. On les trouve dans toutes les régions où vivent les grands vertébrés, ruminants et équidés, dont ils sont les ectoparasites. Les régions les plus envahies sont celles qui jouissent de températures moyennes élevées et qui possèdent des bois et de l'eau (nécessaire à la plupart des taons durant leur vie larvaire). Seules les femelles sont vulnérantes et leur comportement est dit telmophage. L'insecte provoque une abrasion de la peau grâce à des pièces buccales courtes et trapues, à mouvements latéraux et l'écoulement du sang est favorisé par la présence d'une substance anticoagulante dans la salive.

Les taons sont vecteurs de nombreux autres germes pathogènes tels que des bactéries (*Bacillus anthracis* ou bactérie du charbon), des rickettsies (*Anaplasma marginale*) des protozoaires (*Trypanosoma evansi*) et quelques helminthes.

Les stomoxes sont également responsables de la transmission du virus de l'AIE. *Stomoxys calcitrans*, également appelé "mouche charbonneuse" est retrouvée de façon très commune de juillet à octobre sur les murs ensoleillés des étables et des écuries ; ses attaques sont particulièrement violentes durant l'après midi, quand il fait chaud (60).

La transmission par un moustique a été décrite une fois sans pouvoir être reproduite expérimentalement (175).

2.2.2 - La transmission proprement dite

Pour que la transmission ait lieu, le vecteur doit être interrompu lors de son repas sur l'animal infecté. Dans le but de terminer son repas sanguin, il est alors susceptible de contaminer un hôte sain qui se trouve à proximité.

L'interruption du repas est la condition *sine qua none* à la transmission du virus. C'est pour cette raison que d'autres vecteurs hématophages tels que les tiques (accrochées fermement à leur hôte) et les moustiques (dont la piqûre, peu douloureuse, ne dérange pas le cheval) ne représentent pas une réelle menace dans la propagation de la maladie (79). Les taons sont fréquemment interrompus dans leur repas non seulement à cause de la douleur importante qu'ils infligent mais aussi en raison de leur grande taille et de leur vol bruyant qui attirent l'attention du cheval. Les plus petits (chrysops), du fait d'un appétit moindre, recherchent plus rarement un deuxième hôte : ce phénomène semble cependant compensé par leur forte présence dans la nature (81).

Le site de piqûre joue également un rôle important : les espèces se nourrissant communément sur la tête ou sur le cou de l'animal, sont rarement délogées par des mouvements de pattes ou de queue.

2.2.3 - Caractéristiques de l'hôte

L'âge des chevaux est important :

- les poulains subissent moins de 3% des attaques de taons (47). Leur taille et leur couleur expliquent en partie ce phénomène. En effet, la perception visuelle semble être à l'origine de la localisation de plusieurs hôtes potentiels; le choix d'un animal résulte ensuite de différentes qualités : la production de CO₂ par l'hôte (qui représente un stimulus pour la plupart des insectes hématophages), la température du corps et l'humidité dégagée par l'animal.
- les chevaux âgés ou infirmes sont au contraire des proies privilégiées pour les Tabanides. Affaiblis, ils peuvent rester sans réagir à la morsure

simultanée de plusieurs dizaines de mouches : le risque de transmission de la maladie à des hôtes sains est alors très faible.

De nombreuses études ont également démontré une transmission prépondérante si le donneur est en phase aiguë de la maladie : d'une part la virémie est élevée (de l'ordre de 10^6 /ml) d'autre part l'animal est très sensible et conserve sa capacité à chasser le vecteur indésirable vers un deuxième hôte. Au cours de la phase chronique de l'AIE, la transmission n'est pas systématique : la virémie est plus faible et l'animal, prostré, perd ses réflexes de défense (81).

III- VIROLOGIE

1 - Le génome

Comme les autres lentivirus, l'EIAV compte dans son génome des gènes codant pour des protéines de structure et des gènes codant pour des protéines de régulation.

Ainsi, l'organisation du gène gag est semblable à ce qui est observé avec le virus VISNA-MAEDI. Ce gène code pour les protéines p11, p15 et p26 (qui représente la protéine majeure du core). La partie COOH- terminale du gène, code pour une petite protéine supplémentaire appelée p9 (81).

Le gène pol code pour les enzymes virales. La reverse-transcriptase, la protéase et l'endonucléase/intégrase présentent des séquences similaires avec celles des virus de l'immunodéficience humaine (81, 145). Leur activité est également analogue à celle des enzymes des autres lentivirus, même si des différences semblent exister au niveau de l'activité protéolytique de la protéase, vis-à-vis de certains peptides (166).

Le gène env d'une longueur de 2577 nucléotides, code pour les protéines d'enveloppe : la gp90, protéine hautement glycosylée de surface et la gp45, protéine faiblement glycosylée transmembranaire (81).

En ce qui concerne les gènes de régulation, seuls les gènes tat et rev sont retrouvés dans le génome de l'EIAV. La protéine Tat, de structure hélicoïdale, se localise de façon prépondérante dans le cytoplasme et possède une activité transactivatrice des LTR (156, 135). La protéine Rev a également

été mise en évidence : cependant, si sa fonction régulatrice post-transcriptionnelle est comparable à celle observée avec les autres lentivirus, l'organisation de ses acides aminés ne présente pas d'homologie avec les autres protéines Rev (48).

Enfin, les LTR du génome de l'EIAV sont plus petits que ceux des autres lentivirus. Ces séquences répétitives ne comptent en effet que 305 paires de bases, contre 414 pour le virus VISNA-MAEDI, 376 pour le CAEV ou 634 pour le HIV (81).

2 - Tropisme

In vivo, la réplication du virus ne semble se faire que dans les macrophages matures, dans des tissus tels que la rate, les poumons ou le foie. Aucune réplication n'est observée dans les monocytes circulants qui servent seulement de réservoir au virus (97).

La culture du virus se fait essentiellement à l'aide des cellules de la lignée continue Equine dermis (93). Il s'agit de cellules chroniquement infectées permettant la réplication du virus et ce sans destruction des cellules, contrairement à l'effet cytopathogène du virus lors de l'utilisation de culture de macrophages de chevaux infectés ou en infectant des macrophages de chevaux sains.

IV - LA MALADIE

1 - Les symptômes (33, 163, 74)

L'AIE est une maladie polymorphe, caractérisée par différentes formes (suraiguë, aiguë, ...) dont le classement est fonction de la nature et de la vitesse d'apparition des symptômes.

La variation de l'évolution clinique d'un cheval à l'autre, s'explique par leur capacité individuelle à réagir face à l'infection, ainsi que par la virulence de l'inoculum.

1.1 - La forme suraiguë

Cette forme rare se rencontre chez les jeunes chevaux ou après un traitement immunodépresseur.

Elle aboutit à une mort brutale du cheval, suite à un syndrome fébrile et septicémique.

On constate une congestion généralisée et une hypertrophie des organes hématopoïétiques; cependant il n'y a pas d'anémie.

1.2 La forme aiguë ou typho-anémie

L'apparition des symptômes est très rapide avec :

- une fièvre brutale, dépassant 40°C pendant plusieurs jours;
- un abattement extrême de l'animal : il est amaigri, se déplace difficilement et s'essouffle vite;
- un faciès "tétanique" : la tête est immobile, les naseaux dilatés;
- une coloration ivoire de la muqueuse conjonctive : l'oeil a un aspect humide, brillant, huileux (on parle "d'oeil gras" de Delafond);
- des foyers hémorragiques : des pétéchies apparaissent notamment au niveau de la muqueuse buccale;
- une hépatomégalie et une splénomégalie;
- des troubles de la coagulation;
- une myocardite dégénérative avec des troubles du rythme, une tachycardie,...
- un syndrome gastro-intestinal avec entérite et colique;
- d'autres complications telles qu'une insuffisance rénale, une néphrite, qui expliquent la formation d'oedèmes.

L'anémie est modérée : de 3 à 5 millions de globules rouges/mm³ (la norme étant de 6 à 9 millions/mm³).

L'animal peut mourir en 10 à 30 jours et ce avant toute séroconversion.

1.3 La forme subaiguë

Prolongation d'un syndrome aigu ou survenant d'emblée, cette forme présente une évolution plus lente. Cependant les symptômes sont mieux prononcés avec :

- une succession d'épisodes fébriles (pendant un à sept jours) et de retours à la normale,
- une cachexie importante,
- un état de prostration,
- des oedèmes au niveau des membres et de l'abdomen,
- une atteinte cardiaque.

L'anémie est très marquée et la mort de l'animal peut survenir en 2 à 3 mois.

1.4 - La forme chronique

La forme chronique, d'installation progressive, est caractérisée par une cachexie et une anémie très prononcée (seulement 1 à 2 millions de globules rouges/mm³). Ces périodes de relative accalmie clinique sont entrecoupées de phases de récurrence au cours desquelles les signes de la maladie sont exacerbés et le décès possible.

Si le cheval ne meurt pas, l'évolution se fait vers l'esacement puis la disparition des accès fébriles et vers le portage asymptomatique.

1.5 - La forme inapparente

Cette forme peut exister d'emblée ou faire suite aux formes précédentes. Elle se caractérise alors par une reprise de poids et une absence de signes cliniques pendant des mois voire des années.

Durant cette phase de latence, le virus se maintient à l'état de provirus au sein de l'acide nucléique des macrophages, échappant ainsi au mécanisme immunitaire.

Les chevaux asymptomatiques constituent une importante source d'infection pour les autres. Leur faible menace individuelle (la virémie est inférieure à celle constatée lors des épisodes fébriles) est compensée par la menace collective que représente leur nombre : en effet, 90% des animaux infectés sont des porteurs sains de la maladie (81).

2 - Les lésions microscopiques

2.1 Au niveau des organes

Ces lésions sont essentiellement présentes au niveau du système réticulohistiocytaire (foie, rein, rate, ...) et leur importance est fonction du nombre et de l'intensité des accès fébriles :

On peut observer :

- une infiltration de lymphocytes et de macrophages au niveau hépatique, avec une accumulation d'hémosidérine (produit de dégradation des globules rouges),
- la présence dans la rate hypertrophiée d'hématies en voie de destruction et d'hémosidérine,
- une myocardite,
- une glomérulonéphrite, due au dépôt dans le rein de complexes virus-anticorps fixant le complément.

Les cellules chargées d'hémosidérine se retrouvent donc au niveau d'un grand nombre d'organes (foie, rein, moelle osseuse, ...) mais aussi du sang circulant. Cette accumulation de fer est due à la destruction prématurée des hématies et à une moindre utilisation du fer plasmatique.

2.2 - Au niveau des hématies

Il y a modification de forme (poikilocytose) et de taille (macrocytose) des hématies. Cependant le taux d'hémoglobine et la régénération médullaire ne sont pas affectés : il s'agit donc d'une anémie périphérique hémolytique macrocytaire normochrome.

L'hémolyse est à la fois intravasculaire et extravasculaire.

C'est la présence de la fraction C3 du complément à la surface des hématies, liée à la réaction Ag-Ac qui aboutit à une diminution de la durée de vie des globules rouges, par lyse cellulaire ou phagocytose par les macrophages.

2.3 - Au niveau des leucocytes

On observe la formation de sidéroleucocytes c'est à dire de macrophages contenant de l'hémosidérine (provenant des hématies phagocytées).

La détermination du taux de sidéroleucocytes est utilisée pour compléter le diagnostic.

Au cours de l'AIE, ce taux est supérieur à 7 sidéroleucocytes pour 100 000 leucocytes.

Il est d'ailleurs augmenté lors des crises aiguës et peut atteindre alors 100 à 1000 éléments pour 100 000 leucocytes.

V - DIAGNOSTIC

1 - Diagnostic clinique.

L'anémie infectieuse équine ne présente pas de symptôme caractéristique, ce qui rend le diagnostic clinique difficile.

La maladie devra être suspectée dès lors que le propriétaire du cheval constate une baisse de forme inexplicable de l'animal, un amaigrissement progressif et des épisodes fébriles intermittents.

D'autres signes tels que l'anémie, l'hépatomégalie, la splénomégalie, les pétéchies sur les muqueuses ... doivent également alerter le vétérinaire. Cependant, diverses étiologies (virales, bactériennes ou parasitaires) peuvent expliquer de tels symptômes. Il est donc important d'établir un diagnostic différentiel, en sachant toutefois que l'AIE peut coexister avec d'autres infections.

2 - Diagnosics sérologiques (33, 146)

La confirmation ou l'infirmité de la maladie s'effectue actuellement au moyen du test d'immunodiffusion en gélose de COGGINS (appelé également AGID test aux USA). Il s'agit d'une méthode de diagnostic spécifique, relativement sensible, rapide (exécutée en 24 h) et standardisée (il existe des kits de diagnostic). L'antigène utilisé est la protéine interne p26 obtenue à partir d'extraits de rate de chevaux malades en phase aiguë ou à partir de cultures cellulaires du virus. Ce test est en fait uniquement qualitatif mais il permet, en plus du diagnostic, d'effectuer le dépistage des infections latentes : en effet, les anticorps précipitants qui apparaissent dans un délai maximum de 2 mois après l'infection, persistent à vie dans le sérum des chevaux contaminés. Si le test de COGGINS s'avère négatif malgré la présence de symptômes suspects, il est prudent de refaire une sérologie 3 semaines à un mois plus tard : en effet les anticorps peuvent ne pas être encore apparus.

Si le test de COGGINS est le test de référence dans le monde entier, la technique ELISA peut également être utilisée. Il s'agit d'une méthode rapide (réponse en 15 minutes) mais responsable à la fois de faux positifs et de faux négatifs.

VI- PROPHYLAXIE

Du fait de la dérive antigénique du virus, les tentatives de vaccination menées jusque-là, à l'aide de virus atténué, de virus inactivé ou de sous-unités virales glycoprotéiques, ont montré leur limite (80). Au contraire, les tentatives de vaccination avec un vaccin recombinant exprimant la glycoprotéine d'enveloppe gp90, ont non seulement échoué mais se sont également traduites par une augmentation de la réplication virale et par une exacerbation des signes cliniques après l'inoculation de souches hétérologues (173). Le même phénomène a été observé lors de tentatives d'immunisation avec des sous-unités virales de nature glycoprotéique (80).

La prévention de l'AIE repose donc uniquement sur la prophylaxie sanitaire : celle-ci est fondée sur le dépistage des chevaux malades mais aussi des porteurs sains. En France, depuis 1936, l'anémie infectieuse équine est reconnue par la loi comme une maladie contagieuse et, de ce fait, est soumise à réglementation.

Ainsi l'importation de chevaux ne peut se faire que si deux tests de COGGINS effectués à deux mois d'intervalle sont négatifs. Il en est de même pour l'introduction dans un troupeau indemne, de chevaux provenant d'exploitations infectées. Il est recommandé, par ailleurs, que les chevaux séronégatifs issus d'élevages dont le statut n'est pas clairement connu, soient placés en quarantaine pendant 45 à 60 jours (délai maximum de conversion sérologique) : si les résultats sérologiques restent négatifs, les animaux peuvent alors être introduits dans l'élevage.

Lorsqu'un foyer d'AIE est découvert, un certain nombre de mesures est imposé par l'arrêté du 23 septembre 1992 :

- les animaux malades sont abattus,
- les animaux infectés, mais porteurs sains, sont séquestrés, marqués au feu des lettres AI sur l'épaule gauche, puis abattus dans un délai fixé par le directeur des services vétérinaires,
- les poulains issus de mères infectées sont considérés comme potentiellement infectés jusqu'à obtention d'une sérologie négative (le test n'est réalisé que trois mois minimum après le sevrage car il y a persistance d'anticorps colostraux d'origine maternelle),
- les aiguilles et seringues employées doivent être à usage unique et le matériel utilisé chez plusieurs chevaux doit être soigneusement désinfecté quand il n'est pas détruit,
- les locaux d'hébergement doivent être à la fois désinfectés et désinsectisés,
- enfin, une enquête épidémiologique destinée à détecter l'origine ou à prévenir la propagation de la maladie doit être mise en oeuvre dans les effectifs équins reliés épidémiologiquement aux animaux et/ou à l'établissement déclaré infecté.

Toutes ces mesures (examens de laboratoire, désinfection des exploitations, ...) sont coûteuses et l'abattage des animaux représente une perte financière considérable pour les éleveurs (même si des aides financières sont accordées par l'Etat). Cependant, cette réglementation sanitaire stricte représente aujourd'hui le seul moyen d'éradiquer la maladie.

Ces mesures draconiennes ne s'imposent malheureusement pas dans tous les pays et notamment aux Etats-Unis où un grand nombre de chevaux reste non testé et où l'apparence saine de certains chevaux infectés n'incite pas les propriétaires à l'abattage de leurs animaux (143). Le réservoir de virus que constituent ces chevaux, associé à la difficulté de mise au point d'un vaccin en raison de la variabilité des déterminants antigéniques, assurent ainsi la pérennité de l'infection au sein de la population équine.

CHAPITRE SECOND
LES LENTIVIRUS DES NON-ONGULES
ET DES BOVINS

A - LES LENTIVIRUS SIMIENS

I - HISTORIQUE

1 - Isolement du virus chez le macaque et le mangabey

En 1985, un nouveau rétrovirus fut isolé à partir de lymphocytes infectés chez quatre macaques rhésus (*Macaca mulatta*). Les animaux, élevés en captivité au centre de primatologie de Nouvelle-Angleterre, présentaient des signes cliniques semblables à ceux du SIDA de l'homme (infections opportunistes multiples, diarrhée, cachexie, lymphopénie ...). Ce virus simien, de morphologie lentivirale caractéristique, initialement appelé STLV-III, est désigné aujourd'hui sous le nom de SIVmac (Simian Immunodeficiency Virus of macaque) (36).

En 1986, le SIV fut à nouveau isolé à partir de macaques mais aussi de singes mangabey élevés ensemble au centre Delta, en Louisiane. Le virus, baptisé SIVsm (SIV from sooty mangabey), provenait d'animaux asymptomatiques (108).

Par la suite, le SIVmac a été isolé dans de nombreux centres de primatologie et chez différentes espèces de macaques développant des symptômes analogues à ceux observés chez le macaque rhésus (*M. nemestrina*, *M. arctoides* et *M. fascicularis*). Le SIVsm a également été isolé dans d'autres centres mais chez des animaux apparemment sains; une exception est pourtant à souligner, avec l'isolat SIVsm - PBJ14 responsable d'une maladie fatale en 1 à 2 semaines.

2 - Isolement du virus chez d'autres espèces simiennes

Différentes espèces de singes verts d'Afrique, les vervets (*Cercopithecus pygerythrus*), les grivets (*C. aethiops aethiops*), les singes sabeus (*C. aethiops sabeus*) et les singes tantalus (*C. tantalus*), sont chacune infectées par un virus SIVagm différent (SIV from African Green Monkey), ce qui révèle une grande complexité évolutive parmi les lentivirus simiens (82, 106).

Les singes de Sykes (*Cercopithecus mitis*), phylogénétiquement proches des singes verts sont également infectés par un virus dénommé SIVsyk distinct des SIVagm (44).

Enfin, le SIV a pu être isolé à partir de singes originaires d'Afrique Centrale tels que les mandrills (SIVmnd) et les chimpanzés (SIVcpz) (168, 72).

II - SEROEPIDEMIOLOGIE (65)

Après la découverte de plusieurs virus SIV chez des singes vivant en captivité, différentes études ont été menées pour déterminer la prévalence de l'infection dans le milieu naturel.

Pour le moment, l'infection naturelle par le virus de l'immunodéficience simienne n'a été démontrée que chez des primates africains et en particulier chez les singes verts : en effet, plusieurs études épidémiologiques montrent que 30 à 50% de ces singes, capturés à l'état sauvage, sont séropositifs.

Au contraire, les espèces asiatiques comme les macaques ou les singes du Nouveau Monde (singe écureuil, ouistiti) ne semblent pas infectés dans leur habitat naturel.

Toutes ces données suggèrent que le macaque n'est pas un hôte naturel du SIV et que les infections observées en captivité résultent d'une transmission interspécifique initiale. Le SIVmac isolé au centre Delta résulterait ainsi d'une transmission mangabey asymptomatique-macaque lors d'une expérience de laboratoire.

III - CLASSIFICATION DES LENTIVIRUS SIMIENS (65)

Actuellement les lentivirus de primates sont classés en 5 groupes distincts.

Cette classification est tout d'abord basée sur les espèces animales concernées. On distingue ainsi :

- le groupe SIVsm des singes sooty mangabey,
- le groupe SIVagm des singes verts d'Afrique,
- le groupe SIVmnd des singes mandrills,
- le groupe SIVcpz des chimpanzés,
- et le groupe SIVsyk des singes de Sykes.

Certaines de ces classes se subdivisent à leur tour en fonction de parenté phylogénétique entre les virus et notamment en fonction de l'analogie de leur gène gag et pol : (fig.7)

- le groupe SIVsm inclut ainsi les virus SIVmac (isolés de macaques en captivité) comme le virus de l'immunodéficience humaine HIV-2. On suppose en effet que le virus HIV-2 résulte d'une transmission interspécifique du virus SIVsm d'un sooty mangabey infecté naturellement puis d'une évolution vers un sous-groupe distinct adapté à l'homme.
- le groupe SIVagm est également divisé en fonction des différentes espèces infectées (vervets, grivets, tantalus et sabaesus).
- enfin, le groupe SIVcpz comprend le virus HIV-1. L'origine de l'HIV-1 est encore incertaine; cependant la présence d'un virus fortement apparenté au HIV-1 chez des chimpanzés sauvages, suggère là encore une évolution du virus après une transmission interspécifique.

IV - VIROLOGIE

1 - Organisation génomique (65, 167, 154)

Les lentivirus simiens ont une organisation génomique similaire. (fig.8)

En plus des trois gènes rétroviraux caractéristiques gag, pol et env, tous ces virus comptent des gènes courts supplémentaires qui sont des gènes de régulation : on retrouve les gènes vif, tat et rev (présents également dans le génome des lentivirus d'ongulés) ainsi que le gène vpr (virus protein R) et le gène nef (negative factor). Le produit du gène vpr, retrouvé dans le virion mature agirait à une étape précoce de la vie du virus. Le gène nef, quant à lui, aurait à la fois un rôle inhibiteur sur l'expression du génome viral et un rôle dans l'induction de la réplication dans les cellules CD4 à l'état de latence.

Le groupe SIVcpz/HIV-1 comprend un gène particulier : vpu. Le groupe SIVmac/SIVsm/HIV-2 compte également un gène supplémentaire appelé vpx (virus protein X) et dont l'analogie avec le gène vpr laisse supposer qu'il proviendrait d'une duplication de ce gène.

2 - Tropisme (133)

Le SIV est tropique pour les cellules CD4+ et infecte *in vivo* les lymphocytes T4, les monocytes, les divers types de macrophages tissulaires et les cellules dendritiques qui constituent un réservoir majeur pour le virus au début de l'infection (26). La réplication productive du SIV est préférentiellement détectée dans les organes lymphoïdes et notamment dans les macrophages, les lymphocytes et les cellules folliculaires dendritiques de ganglions en phase hyperplasique.

In vitro, la réplication du SIV est productrice en culture lymphocytaire. Le SIVmac se réplique ainsi dans les lymphocytes de macaque et dans une moindre mesure dans les lymphocytes de l'homme (seules certaines lignées lymphocytaires CD4+ sont permissives), du gibbon, du chimpanzé et du babouin.

V - INFECTION PAR LE SIV CHEZ LE MACAQUE

Les différents isolats de SIV n'induisent pas de symptomatologie caractéristique chez leurs hôtes naturels (la souche SIVsmm - PBj14 représente une exception puisqu'elle s'avère rapidement létale chez le macaque et pathogène chez son hôte naturel, le sooty mangabey). Cependant les différentes pathologies qu'ils entraînent chez le macaque ont permis de fournir un modèle animal très intéressant pour comprendre la physiopathologie du SIDA humain.

Dans tous les cas, il est important de se rappeler que l'infection induite chez le macaque n'est qu'un modèle animal artificiel et non une maladie sévissant au sein de cette population de primates, dans son habitat naturel.

1- Manifestations pathologiques

L'évolution de l'infection SIV chez le macaque se déroule généralement sur une durée moyenne entre 1 et 3 ans et comprend trois grandes phases :

- une phase aiguë,
- une phase asymptomatique,
- et une phase SIDA.

1.1. - Phase aiguë ou primo-infection

Elle survient dans les deux ou trois semaines suivant l'inoculation intraveineuse du virus et précède la séroconversion.

Elle se caractérise par l'apparition d'une fièvre, de rashes cutanés, d'une diarrhée et d'une lymphadénopathie. L'animal est léthargique, anorexique et son état général est globalement altéré.

Sur le plan hématologique, on peut observer une leucopénie transitoire ainsi qu'un pic virémique au bout de deux semaines.

1.2 - Phase asymptomatique

Après la phase aiguë, l'animal entre dans une phase asymptomatique durant laquelle la réponse immunitaire se met en place et les anticorps dirigés contre le virus apparaissent.

Cette phase peut durer de quelques mois à plusieurs années et le singe infecté donne l'apparence d'être en bonne santé. La lymphadénopathie, caractérisée par un gonflement des ganglions lymphatiques et viscéraux au cours de la primo-infection, peut perdurer : cependant on observe la plupart du temps une phase d'involution.

Au niveau hématologique, on constate une diminution continue du taux de lymphocytes CD4 circulants avec un maintien du taux de lymphocytes CD8. La virémie, quant à elle, est très faible.

1.3 - Phase SIDA

Elle peut apparaître quelques mois ou quelques années après l'inoculation expérimentale.

Elle se caractérise par une diminution des anticorps (notamment ceux dirigés contre la nucléocapside), par un effondrement du taux de lymphocytes CD4 circulants et par une augmentation de la virémie.

L'involution des ganglions se poursuit vers une phase terminale de déplétion folliculaire et paracorticale (66). Les autres organes lymphoïdes tels que la rate évoluent de façon similaire et une atrophie thymique est fréquemment observée en phase terminale.

Les diarrhées associées à une perte de poids, représentent le symptôme le plus courant du syndrome d'immunodéficience chez le macaque. Ces diarrhées sont souvent associées à des bactéries pathogènes mais se produisent également en l'absence d'infections opportunistes. En effet, les macrophages et les lymphocytes T du tractus intestinal représentent une cible pour le SIV dès la phase de primo-infection et seraient impliqués dans les phénomènes de malabsorption (64).

L'atteinte du système immunitaire entraîne bien sûr l'apparition d'infections opportunistes, souvent identiques à celles observées dans le SIDA humain. On retrouve ainsi l'infection à cytomégalovirus disséminée (CMV), la pneumonie à *Pneumocystis carinii*, les candidoses buccales et oesophagiennes, les infections à mycobactéries ...

A côté du syndrome diarrhéique et des infections opportunistes, les atteintes du système nerveux sont fréquentes (147). Les lésions, de type inflammatoire, sont présentes dans la moelle épinière et le cerveau, particulièrement au niveau de la substance blanche : on observe une infiltration de cellules mononuclées, avec une majorité de monocytes/macrophages. Une différence entre les encéphalites relatives à l'HIV et au SIV, porte sur l'intensité des lésions inflammatoires (les infiltrats périvasculaires semblent plus marqués dans le cas du SIV); l'inflammation des méninges est aussi plus fréquente chez le singe. Des lésions de démyélinisation peuvent également être occasionnellement détectées dans la substance blanche.

L'état d'immunodéficience favorise aussi l'apparition de lymphomes, dont certains sont associés au virus d'Epstein-Barr. Le sarcome de Kaposi, autre type de cancer associé au SIDA, n'est pas retrouvé dans le modèle simien.

2 - Diversité pathogénique des différents SIV

2.1 - Pathogénèse de la souche SIVsmm PBj14 (50, 49)

La souche SIVsmm PBj14 représente le plus virulent des lentivirus de primates identifié à ce jour.

C'est un lentivirus atypique, capable de provoquer un syndrome diarrhéique très sévère et la mort de l'animal dans les 7 à 14 jours qui suivent l'inoculation. Il s'agit d'un virus unique de par sa capacité répliquative et ses propriétés d'activation cellulaire.

Le syndrome aigu induit par cette souche virale présente quelques caractéristiques communes avec la phase aiguë induite par le HIV-1, mais la différence entre leur évolution respective semble liée à la vitesse de réplication du SIVsmm PBj14 et au fort taux de virus qui s'accumule par la suite dans les tissus lymphoïdes. Le signe pathologique le plus prononcé lors de cette infection est en effet une hyperplasie lymphoïde extensive, particulièrement marquée au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Il y a à la fois activation et prolifération lymphocytaire avec libération de cytokines créant une inflammation sévère.

2.2. - Pathogénèse des autres isolats SIV (65)

Les autres isolats SIV induisent également une immunodéficience chez le macaque infecté expérimentalement mais la rapidité d'évolution de la maladie varie de façon significative en fonction des souches inoculées (même si celles-ci appartiennent au même sous-groupe et sont donc génétiquement proches).

Le délai avant qu'apparaisse le syndrome d'immunodéficience permet de définir trois grands types d'isolats :

- les isolats dits rapides. Les animaux infectés meurent généralement dans les 3 à 6 mois qui suivent l'inoculation. Dans ce cas particulier, les animaux ne développent pas de réponse immunitaire et on ne retrouve pas ou peu d'anticorps spécifiques anti-SIV. Le taux de lymphocytes CD4 circulants s'effondre rapidement et on observe également une diminution du taux de lymphocytes CD8 et de lymphocytes B. Parmi ces souches "rapides" on peut citer le SIVmac239 ou le SIVsmE543P. Ce type d'évolution rapide n'est observé que de façon exceptionnelle chez les humains, dans quelques cas de SIDA pédiatrique.

- les isolats intermédiaires (SIVsmE660). Les macaques infectés meurent dans les 12 mois qui suivent l'inoculation. Dans ce cas, les anticorps sont détectables mais apparaissent assez tardivement. Le taux de lymphocytes CD4 diminue mais le taux de lymphocytes CD8 est généralement maintenu. On note une thrombocytopénie sévère : ce phénomène semble s'expliquer par la destruction des plaquettes (par formation d'immuns-complexes) plutôt que par un défaut de production médullaire. On a également constaté que parmi les singes infectés par ce type d'isolats, certains développaient, en plus des caractéristiques infections opportunistes et atteintes neurologiques, des thromboses artérielles pulmonaires; ce phénomène n'est pas encore expliqué et un possible mécanisme de coagulation intravasculaire disséminée est envisagé.

- enfin, les isolats lents (SIVmac1A11, SIVsmF236) responsables d'une longue période de latence de 2 à 5 ans. Les animaux infectés restent en bonne santé pendant des années. Ils développent une forte réponse immunitaire et leurs taux de lymphocytes CD4, CD8 et B restent stables. La répartition du virus au niveau tissulaire est également différente. Ainsi, le virus SIVmac1A11 n'est retrouvé ni au niveau du système nerveux central, ni au niveau du thymus : or l'infection de cet organe et des ganglions lymphatiques en général, constitue un élément clé dans l'induction de l'immunosuppression et donc de la progression de la maladie (86).

Cependant, si certaines souches semblent effectivement plus rapides dans leur capacité à induire le syndrome d'immunodéficience, d'autres facteurs doivent être pris en compte, notamment la coexistence d'autres infections lors de l'expérimentation ou la réponse individuelle de chaque animal face à l'inoculation : en effet, la capacité de l'hôte à limiter la propagation du virus au niveau des cellules des ganglions lymphatiques semble déterminer la vitesse de progression de la maladie (25).

VI - MISE AU POINT D'UN VACCIN

Du fait de la similitude des pathologies induites par le HIV et le SIVmac, le macaque constitue un modèle particulièrement bien adapté aux études de développement d'un vaccin contre le SIDA.

Les différentes recherches menées à l'heure actuelle confirment l'effet protecteur d'un vaccin à virus entier inactivé par le formol; ce type de vaccin entraîne la formation d'anticorps neutralisants mais ne semble induire cette immunité humorale que sur une courte période.

Des tentatives de vaccination avec des protéines virales recombinantes (glycoprotéines d'enveloppe et/ou protéines de capside) sont également menées. Les résultats qui découlent de telles expériences vont dans le même sens. En effet, si ces vaccinations n'induisent qu'une immunité faible ou incomplète, elles réduisent la charge virale plasmatique, ce qui permet de retarder l'apparition des signes cliniques de la maladie.

En conclusion, nous pouvons remarquer que si le macaque infecté expérimentalement représente le modèle animal le plus proche de l'infection humaine par le HIV, si certains parlent même de "gold standard" (58), l'intérêt de l'étude *in vivo* et *in vitro* des autres lentivirus (et notamment du lentivirus félin, responsable lui aussi d'un syndrome d'immunodéficience comparable en bien des points au SIDA humain) ne doit pas être minimisé. Ceci est renforcé par le fait que l'utilisation de primates est limitée à un petit nombre de centres de recherche, compte tenu de la rareté de ces animaux (et donc de considérations éthiques) mais aussi en raison des difficultés de manipulation et du coût élevé de telles expériences.

B - LE LENTIVIRUS FELIN

I - HISTORIQUE

La découverte du virus de l'immunodéficience féline est assez récente puisque c'est en 1987 que ce virus a été isolé pour la première fois par le docteur PEDERSEN à l'Université de Davis (Californie) (121).

Dans une chatterie comprenant une quarantaine de chats, tous indemnes de FeLV (virus leucémogène félin), plusieurs animaux étaient morts et quelques uns présentaient des signes cliniques évoquant une immunodéficience : infections chroniques, diarrhée, anorexie, perte de poids. Suspectant une maladie infectieuse, PEDERSEN inocula à des chatons du sang ou du plasma provenant des animaux infectés. A partir des lymphocytes des chats inoculés, il isola alors un virus qui provoquait en culture un effet cytopathique caractéristique des lentivirus et dont la morphologie s'apparentait également à celle des lentivirus. Du fait d'un tropisme lymphocytaire T important, ce nouveau virus fut baptisé Féline T Lymphotropic Virus.

Peu de temps après, il fut isolé au Royaume-Uni (61) puis au Japon (76) et par la suite dans de nombreux pays. Baptisé initialement FTLV, le virus est actuellement appelé FIV (Féline Immunodeficiency Virus).

II - EPIDEMIOLOGIE

1 - Répartition géographique

La répartition du FIV est mondiale. Suite à son identification aux Etats-Unis, il a, en effet, été détecté dans tous les pays où des enquêtes sérologiques ont été menées.

Cependant, les situations épidémiologiques varient beaucoup d'un pays à l'autre. Ainsi, le Japon compte le plus fort taux d'infection (77) alors que ce taux est très bas dans des pays comme la Suisse ou l'Autriche (91, 84). A l'intérieur même des pays, le taux d'infection est différent selon les

régions : il varie par exemple en Autriche de 1 à 6 % (84). On remarque aussi en France que dans les grandes villes comme Paris, le taux d'infection est plus bas que dans des petites villes où les chats sortent dans les jardins (102).

2 - Facteurs de réceptivité et de sensibilité

2.1 - Facteurs extrinsèques

Le mode de vie de l'animal est un facteur très important. En effet, les chats tenus à l'intérieur sont beaucoup moins exposés au risque d'infection que les chats errants ou que les chats libres de sortir (102).

Le statut clinique a également une incidence importante. Il apparaît ainsi que les chats coinfectés par le FIV et le FeLV (autre rétrovirus félin à l'origine d'une immunodéficiency), développent des signes cliniques plus graves et meurent plus rapidement que les chats infectés par le FIV seul. Différentes hypothèses ont été avancées sur une interaction possible au niveau immunitaire, cellulaire, intracellulaire ou sur la production de virions mixtes contenant le génome et les protéines des deux virus. Cependant ce phénomène de potentialisation de la maladie n'est pas clairement élucidé (119, 13).

2.2 - Facteurs intrinsèques

- **le sexe** : les mâles sont en moyenne deux fois plus touchés par l'infection. Ceci s'explique davantage par le comportement bagarreur des mâles (plus sujets de ce fait aux morsures infectantes) que par une réelle prédisposition de sexe.

- **la race** : les chats de gouttière semblent plus touchés que les chats de race (77). Mais, ici aussi, ce fait est lié plus au mode de vie qu'à un effet génétique : en effet, les chats de race sont souvent élevés à l'intérieur de la maison ou en enclos fermé.

- **l'âge** : ce sont les chats de plus de 5-6 ans qui sont les plus touchés (178). Cependant, cette prévalence plus forte semble davantage s'expliquer par la longue période de latence du virus.

D'autre part, il existe une protection passive chez les chatons nés de mère infectée : ils acquièrent par le colostrum des anticorps anti-FIV d'origine maternelle (la placentation, de nature endothélio-choriale, n'autorise par contre qu'un faible passage d'anticorps) (88). Cette protection ne semble efficace que les sept premières semaines de la vie du chaton (24).

3 - Transmission

La transmission sexuelle du virus n'a pas été démontrée...

La transmission *in utero* semble possible mais très rare. En effet CALANAN a détecté le virus chez un chaton nouveau-né : cette contamination verticale semble s'expliquer par le fait que la mère, fortement virémique, ait été infectée lors de la gestation et avec une dose massive de virus (22).

Il en est de même pour la transmission du virus par les sécrétions lactées. Ce mode de contamination s'avère exceptionnel mais a été décrit lors d'une expérience au cours de laquelle du lait de chattes fortement infectées était administré à des chatons nouveau-nés (144).

En fait, la transmission de la maladie se fait essentiellement par la salive qui, comme le sang total ou le plasma, constitue une source de virus (178). Cependant, contrairement au virus FeLV pour lequel le simple contact ou le léchage sont suffisants, la transmission du FIV nécessite plutôt une inoculation, en l'occurrence une morsure. De plus, il semble y avoir une corrélation entre le statut clinique de l'animal et la concentration virale dans la salive : ainsi, les chats cliniquement atteints "excrèteraient" davantage de virus que ceux encore au stade asymptomatique et seraient par conséquent plus dangereux (177).

III - VIROLOGIE

1 - Morphologie (178)

Elle est semblable à celle des autres lentivirus.

Au microscope électronique, les virions matures apparaissent en effet sous la forme de particules sphériques ou ellipsoïdes de 105 à 125 nm de diamètre et la capsid conique entoure, là encore, un nucléide dense aux électrons.

L'enveloppe virale, quant à elle, est caractérisée sur sa face externe par les glycoprotéines de surface gp 95 et transmembranaire gp 40, qui permettent l'attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte.

2 - Ultrastructure

2.1 - Organisation génomique

Le génome du FIV contient 9472 paires de bases et porte les trois gènes caractéristiques de la famille des rétrovirus (157) :

- le gène gag codant pour les protéines de matrice, de capsid et de nucléocapsid,
- le gène pol codant pour les enzymes virales,
- le gène env codant pour les glycoprotéines d'enveloppe.

A chaque extrémité 5' et 3' de l'ADN proviral, on retrouve les séquences LTR. Constituées de 355 paires de bases, elles ont une longueur similaire à celles des lentivirus d'ongulés (VISNA-MAEDI, CAEV et EIAV) mais inférieure à celle des lentivirus de primates (HIV et SIV) (157).

Plusieurs petits ORF supplémentaires, correspondant aux gènes de régulation de la réplication virale, se retrouvent dans le génome du FIV. Ainsi, le premier ORF, situé immédiatement après le codon stop du gène pol, correspond au gène vif. De même, le deuxième ORF coïncide par sa localisation et sa taille ainsi que par la propriété transactivatrice de son produit au gène tat du VISNA. Enfin le gène rev, un des plus

importants systèmes de régulation chez les lentivirus, a également été caractérisé chez le FIV. Trois autres courts ORF peuvent être observés dans la région codante de env, mais leur fonction exacte reste à préciser (165, 174, 126).

2.2 - Les protéines virales de structure

Les protéines de la nucléocapside sont au nombre de trois et résulteraient du clivage d'un précurseur protéique de 55 KDa. On distingue la protéine p7, la p15 et la p24, protéine majeure du core qui présente une forte homologie avec la protéine p24 du HIV (42, 95).

Les protéines d'enveloppe sont au nombre de deux. Le gène env code en effet pour un précurseur protéique gp 145 qui est clivé ultérieurement pour donner une protéine de surface gp95 et une protéine transmembranaire gp40 (115).

3 - Tropisme

Le HIV présente un tropisme spécifique pour les lymphocytes CD4 périphériques, entraînant leur déplétion progressive et un inversement du rapport CD4/CD8. Des observations similaires ont été rapportées pour le FIV (41) et ont conduit à une étude poussée du tropisme du FIV.

3.1 - *In vivo* (45, 19)

Le FIV infecte principalement les lymphocytes T (L_T) porteurs du récepteur de surface CD4. Cependant si cette sous-population lymphocytaire représente la cible prépondérante du FIV, celui-ci infecte également les L_T CD8 (lymphocytes cytotoxiques et suppresseurs) et les lymphocytes B.

Le tropisme cellulaire du FIV concerne également les membres de la lignée myéloïde que sont les monocytes et les macrophages.

3.2 - *In vitro*

In vitro, le FIV se réplique dans une culture primaire de lymphocytes périphériques totaux (stimulés par la concanavaline A et par l'interleukine-2), dans des lignées cellulaires T- lymphoblastoïdes (178), dans des clones lymphocytaires CD4 et CD8 (18) ainsi que dans les macrophages péritonéaux (stimulés par *Saccaromyces cerevisiae*) (19) et dans une lignée fibroblastique de rein de chat (178).

4 - Effet cytopathique

On observe :

- un processus de dégénérescence à caractère ballonnisant,
- la formation de syncytia,
- et une étape finale de lyse cellulaire, signe de la pathogénicité élevée du virus.

C'est au niveau des L_T CD4 que l'on observe la répllication la plus forte et l'ECP le plus important (162).

5 - Action sur le système immunitaire

L'action du virus sur le système immunitaire se traduit par une diminution significative du taux de lymphocytes CD4 et une augmentation du taux de lymphocytes CD8 cytotoxiques, entraînant une inversion du rapport CD4/CD8 (116, 41). Le mécanisme de déplétion du taux de CD4 n'est pas clairement élucidé. On peut penser que les anticorps fixant le complément et les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent la glycoprotéine d'enveloppe exprimée à la surface des cellules infectées, qu'ils s'y fixent et qu'ils entraînent la destruction cellulaire avant même que n'ait lieu la cytolysse virale. De même, les cellules porteuses du virus excrètent dans le milieu extracellulaire un certain nombre de molécules de gp95 capables de se fixer à la surface des L_T CD4 sains : ces cellules, bien que non infectées, deviennent ainsi, à leur tour, la cible du système immunitaire.

La réponse immunitaire de type humorale se traduit quant à elle par une nette augmentation des Ac dirigés contre la protéine majeure de capsid (p24), au fur et à mesure que s'installe l'infection. Ces

anticorps, s'ils ne sont pas protecteurs, jouent un rôle pronostic important puisque leur taux s'effondre quand l'animal passe de la phase de portage asymptomatique au stade SIDA.

IV - LE SYNDROME D'IMMUNODEFICIENCE

1 - Les différents stades de l'infection

1.1 - Le stade I

Le stade I correspond à la phase aiguë de l'infection. Les chatons infectés expérimentalement développent en quelques semaines un ensemble de signes évoquant un syndrome mononucléosique : hyperthermie, neutropénie et hypertrophie ganglionnaire (178).

La mortalité à ce stade est très faible, inférieure à 10% (120). L'organisme est relativement peu affecté et ce stade passe généralement inaperçu aux yeux des propriétaires de chats domestiques. Ces chats récupèrent la plupart du temps très bien et entrent alors dans la phase asymptomatique, tout en restant potentiellement contagieux.

1.2 - Le stade II

C'est le stade de porteur asymptomatique. Après avoir "guéri" de la phase initiale, les chats restent des porteurs sains du virus pendant 5 à 6 ans, voire plus.

La modalité de passage du stade II au stade III n'est pas connue de façon certaine mais il semble probable que la coexistence d'autres infections, et notamment celle induite par le FeLV, favorise ce passage.

1.3 - Le stade III

Au cours de ce stade la lymphadénopathie réapparaît et se généralise. Cette phase peut durer quelques mois.

1.4 - Le stade IV

Le stade avant-coureur du stade terminal, ou pré-SIDA, dure quelques mois. Il est caractérisé par l'apparition d'infections chroniques, d'origine bactérienne essentiellement. Outre leur caractère chronique et récidivant, ces infections deviennent, avec le temps, de plus en plus réfractaires aux traitements classiques. Les appareils principalement touchés sont la cavité buccale, l'appareil respiratoire supérieur, le tube digestif et la peau. L'animal maigrit et on note également des perturbations hématologiques avec anémie, neutropénie et lymphopénie (75).

1.5 - Le stade V

Le stade terminal SIDA voit l'émergence d'infections opportunistes variées conduisant inexorablement l'animal à la mort en 1 à 6 mois (75). Il peut s'agir de la toxoplasmose, de la gale notoédrique, de coccidioses, de candidoses ...

Les symptômes généraux associés sont graves : fièvre, émaciation, anorexie, léthargie et parfois troubles nerveux (103, 127).

2 - Les pathologies associées

2.1 - Les affections de la cavité buccale (77)

La cavité buccale est la plus fréquemment atteinte. En effet, environ la moitié des animaux infectés développent des signes d'inflammation de la cavité orale. Ce sont des infections chroniques progressives, impliquant aussi bien les gencives, les tissus périodontaux, les joues que la langue. Ces lésions inflammatoires durent souvent pendant des mois et finissent par entraîner une anorexie sévère chez l'animal.

Il semble que ces infections soient des indicateurs sensibles d'un problème d'immunodéficience chez les chats.

2.2 - Les affections de l'appareil respiratoire supérieur

L'atteinte de l'appareil respiratoire supérieur, bien que moins fréquente que celle de la cavité orale, est cependant un des signes prédominants de l'infection par le FIV. Elle se manifeste essentiellement par le développement d'une rhinite chronique avec ou sans conjonctivite associée (177).

2.3 - Les affections cutanées et du conduit auditif externe

Les otites externes sont fréquentes ainsi que les dermatites chroniques (provoquées en général par une prolifération staphylococcique) et les abcès (résultant de morsures ne guérissant pas) (77).

2.4 - Les affections du tractus intestinal

Les chats souffrent d'entérite chronique caractérisée par des diarrhées, accompagnées d'amaigrissement, de déshydratation et parfois de vomissements.

Cette atteinte intestinale entraîne une forte mortalité. (177).

2.5 - Les affections de l'appareil urinaire

Elles sont assez rares. On peut cependant constater chez certains chats infectés le développement de cystites chroniques (177).

2.6 - Les infections opportunistes

L'apparition d'infections opportunistes chez les chats infectés par le FIV est le reflet clinique de l'action immunosuppressive du virus.

Parmi les infections opportunistes les plus courantes, on constate la gale notoédrique généralisée ainsi que la toxoplasmose. Mais l'immunodéficiência induite par le FIV peut également se traduire par l'aggravation de certaines pathologies habituellement bénignes.

2.7 Les autres affections

2.7.1 - La pathologie nerveuse

Certains chats infectés par le FIV présentent des troubles d'ordre neurologique (127). Ces signes accompagnent parfois le syndrome d'immunodéficience typique (avec pathologie chronique et infections opportunistes) mais ils sont quelquefois la seule manifestation de la maladie.

L'atteinte du système nerveux par le virus se manifeste par des tics de la face, un comportement agressif, des tentatives pour se cacher, une diminution de la vision et de l'audition ainsi qu'une perturbation du sommeil (67, 127, 129).

Cette atteinte nerveuse n'est pas la traduction d'infections secondaires telles que la toxoplasmose mais résulte bien de l'action du virus au niveau du système nerveux central (le virus peut être isolé à partir du LCR de chats infectés) (40).

2.7.2 - La pathologie tumorale

Des lymphosarcomes ont parfois été décrits chez des chats infectés par le FIV mais FeLV négatifs. Ces tumeurs se localisent dans les cavités nasales, l'intestin, le rein ou la rate (46).

3 - Les anomalies hématologiques

Les désordres hématologiques sont fréquents chez les chats infectés.

Dans la phase initiale de l'infection, la leucopénie traduit une importante neutropénie. Dans la phase terminale d'immunodéficience, cette leucopénie est liée à une neutropénie et/ou une lymphopénie.

L'anémie est également assez courante.

La thrombocytopénie est un phénomène plus rare (63).

V - DIAGNOSTICS

Si l'examen clinique de l'animal peut amener le vétérinaire à suspecter une immunodéficience, il est insuffisant pour poser un diagnostic de certitude.

1 - Diagnostic histologique

Le virus agissant de façon directe sur le système lymphoïde et le cerveau, les lésions sont localisées à ce niveau.

Dans les noeuds lymphatiques, on peut observer une hyperplasie folliculaire (116), dans la rate hypertrophiée une infiltration plasmocytaire et dans le foie et les poumons des manchons périvasculaires de cellules mononuclées (178).

Cette accumulation périvasculaire, sous forme d'infiltration diffuse ou de nodules, se retrouve également au niveau du cerveau (127).

2 - Diagnostics sérologiques

Trois tests sont généralement utilisés :

- le test d'immunofluorescence indirect,
- le test Western-Blot ou d'immuno-empreinte,
- et le test ELISA.

Le test d'immunofluorescence indirecte est peu employé. En effet il est difficile à interpréter et nécessite le recours à une autre technique en cas de résultats douteux.

Le Western-Blot test est une méthode de référence qui permet de visualiser les complexes immuns formés entre les Ac du sérum à tester et les protéines du virus préalablement séparées par électrophorèse. Cependant cette méthode n'est pas appliquée dans tous les laboratoires et n'est généralement utilisée que pour confirmer ou infirmer un résultat douteux.

Le test ELISA permet de détecter les Ac dirigés contre la protéine p24 du virus. Du fait de sa facilité et de sa rapidité d'exécution (il existe des kits de diagnostic) et en raison de sa spécificité et de sa

bonne sensibilité (il existe parfois des faux négatifs et des faux positifs), il s'agit de la technique la plus couramment utilisée à l'heure actuelle.

VI - TRAITEMENT

1 - Non spécifique

Le vétérinaire doit combattre les infections secondaires et opportunistes surajoutées qui tendent à accélérer l'évolution de la maladie vers son échéance fatale.

Dans un premier temps, le chat répond assez bien au traitement antibiotique et/ou antiparasitaire. Cependant, très vite, du fait de la détérioration inexorable du système immunitaire, ces traitements deviennent inefficaces.

2 - Spécifique

L'AZT (3'azido-2', 3' didéoxythimidine) inhibe la réplication du FIV en culture cellulaire. Cependant son utilisation chez des chats infectés est décevante en comparaison aux résultats obtenus *in vitro*. Ainsi l'ensemble des chats traités par l'AZT pendant 29 jours et infectés expérimentalement le lendemain de la mise en place du traitement, est devenu virémique, séropositif et a développé une lymphadénopathie ; une anémie a également été constatée chez les animaux traités par de fortes doses d'AZT (153).

La DDC (didéoxycytidine), composé nucléosidique inhibiteur de la réserve transcriptase, a également été administrée, sous forme phosphorylée, à des chats infectés. Les résultats *in vivo* et *in vitro* semblent ici concorder car dans les deux cas la réplication du virus au sein des macrophages est diminuée (92).

D'autres substances ont été testées. Cependant, à l'heure actuelle, aucune d'elles ne représente un traitement spécifique fiable, utilisable en pratique courante.

VII - PROPHYLAXIE

Si plusieurs vaccins existent déjà pour lutter contre le FeLV, la diversité antigénique du virus de l'immunodéficience féline empêche la mise au point d'une vaccination efficace (114, 69, 68).

La prophylaxie sanitaire n'est pas réglementée et consiste en quelques conseils donnés aux propriétaires de chats et basés sur les observations épidémiologiques :

- la castration des mâles permet de diminuer leur agressivité envers leurs congénères et leur tendance au vagabondage,
- le risque d'infection est moindre si les chats sont maintenus à l'intérieur,
- les propriétaires de chats positifs doivent, de même, veiller à ce que leur chat ne sorte pas.

Le FIV entraîne chez les chats infectés expérimentalement ou naturellement une pathologie dont la chronologie des signes cliniques et biologiques est très similaire à celle observée dans l'infection humaine par le HIV. De ce fait, et en raison d'une manipulation aisée, d'un prix de revient modéré des expériences et de la grande disponibilité des chats, l'infection féline par le FIV est considérée comme un modèle animal prometteur.

C - LE LENTIVIRUS BOVIN

I - HISTORIQUE

C'est à la fin des années 60, au cours des recherches intensives menées aux Etats-Unis sur l'agent étiologique de la leucose enzootique bovine, que trois rétrovirus bovins furent isolés :

- le virus leucémogène bovin (ou BLV, Bovine Leukemia Virus) appartenant à la sous-famille des Oncovirus et responsable de cette leucose, maladie légalement contagieuse,
- le virus syncytial bovin (ou BSV, Bovine Syncytial Virus) appartenant à la sous-famille des Spumavirus et semble-t-il non pathogène,
- et le virus de l'immunodéficience bovine (ou BIV, Bovine Immunodeficiency Virus), qui nous intéresse ici, du fait de son appartenance à la sous-famille des Lentivirus. L'attention avait été portée sur une vache laitière gestante (R-29) de race Holstein et âgée de huit ans dont le taux de globules blancs était élevé et dont l'état physique empirait de façon régulière. Après le vêlage, l'évolution se fit vers l'amaigrissement, l'affaiblissement puis la mort de l'animal. L'examen des tissus ne mit pas en évidence la présence de tumeurs, caractéristique de la leucose bovine. Le virus isolé présentait la morphologie typique des autres lentivirus (VISNA-MAEDI et EIAV) et son inoculation à de jeunes veaux entraîna les mêmes lésions que celles observées chez la vache R-29 (170).

La désignation du lentivirus bovin par le terme BIV est en fait assez récente et résulte des travaux de GONDA et Coll. (57) qui ont mis en évidence la relation étroite entre ce virus et le HIV.

II - EPIDEMIOLOGIE

1 - Répartition géographique (58, 155, 98, 107)

Les données séroépidémiologiques récentes sur le BIV semblent indiquer que sa répartition est mondiale.

Cependant les situations épidémiologiques varient d'un pays à l'autre voire même au sein d'un pays. C'est le cas aux Etats-Unis : ainsi les sérums testés à partir d'animaux dont les élevages sont situés dans les états du nord ou de l'est, sont rarement positifs; au contraire près de 4% des sérums testés dans le sud et le sud-ouest du pays, s'avèrent positifs. Des pourcentages nettement plus élevés ont pu être constatés dans certains troupeaux du sud (Louisiane, Mississippi, ...); cependant des animaux séropositifs étaient coinfecteds par le BLV.

D'autres études sérologiques ont détecté le BIV aux Pays Bas, en Suisse, en Allemagne, au Canada, au Costa Rica, au Venezuela et en Nouvelle-Zélande.

Toutes les études ont été menées jusqu'ici avec la même souche virale (R-29) comme source antigénique. Il est donc possible que de faibles réactions positives traduisent en fait l'existence de souches mutantes.

2 - Transmission

Le BIV est transmis expérimentalement par l'inoculation intraveineuse de sang total ou de cellules infectées.

Les modes de transmission naturelle du virus ont été peu étudiés. Ainsi la transmission verticale du virus, *in utero* ou à la naissance, n'a pas été démontrée même si la détection du virus dans le lait permet de suspecter une transmission lors de l'allaitement (112). De même, les tentatives d'explication de la transmission horizontale du virus, reposent sur les connaissances concernant les autres lentivirus: réutilisation du matériel contaminé (vaccination du troupeau avec la même aiguille, ...), mauvaise hygiène des trayeuses électriques ou des instruments impliqués dans des procédures invasives (comme le fait de décorner les animaux). Une plus forte séroprévalence de l'infection au sein des troupeaux laitiers semble toutefois incriminer les conditions et techniques d'élevage associées (58).

Il ne semble pas que les arthropodes hématophages soient impliqués dans la transmission du virus comme c'est le cas pour l'EIAV mais aussi le BLV.

III - VIROLOGIE

1 - Morphologie

La morphologie du BIV est typiquement celle d'un lentivirus et son diamètre est compris entre 110 et 130nm (55) (fig.9).

Cependant la présence de spicules à la surface de l'enveloppe virale; correspondant à la présence de glycoprotéines d'enveloppe est rarement observée en comparaison aux autres lentivirus (52). Ceci est d'ailleurs confirmé par le manque de protéines de surface dans la plupart des préparations virales purifiées (130).

2 - Ultrastructure

2.1 - Organisation génomique (fig.10)

Le génome du virus de l'immunodéficience bovine compte 8960 paires de bases.

Il comprend bien sûr les gènes gag, pol et env codant pour les protéines de structure et classiquement rencontrés chez tous les rétrovirus.

Il est également délimité par la présence en chacune de ses extrémités de séquences LTR comparables à celles des autres lentivirus et impliquées ici aussi dans la régulation de la transcription virale.

La région centrale du génome comprend plusieurs petits gènes régulateurs supplémentaires. Les gènes vif, tat, rev, upw et upy s'apparentent ainsi, de par leur localisation et la fonction de leur produit aux gènes vif, tat, rev, vpr, vpu et vpx des lentivirus de primates. Un autre gène, appelé tmx et chevauchant l'extrémité 3' du gène env ainsi que la région U3 du LTR, a été identifié et présente une analogie avec le gène nef des lentivirus de primates.

Au sein des lentivirus de non-primates, le génome du BIV, qui compte au total 9 gènes, est considéré comme le plus complexe.

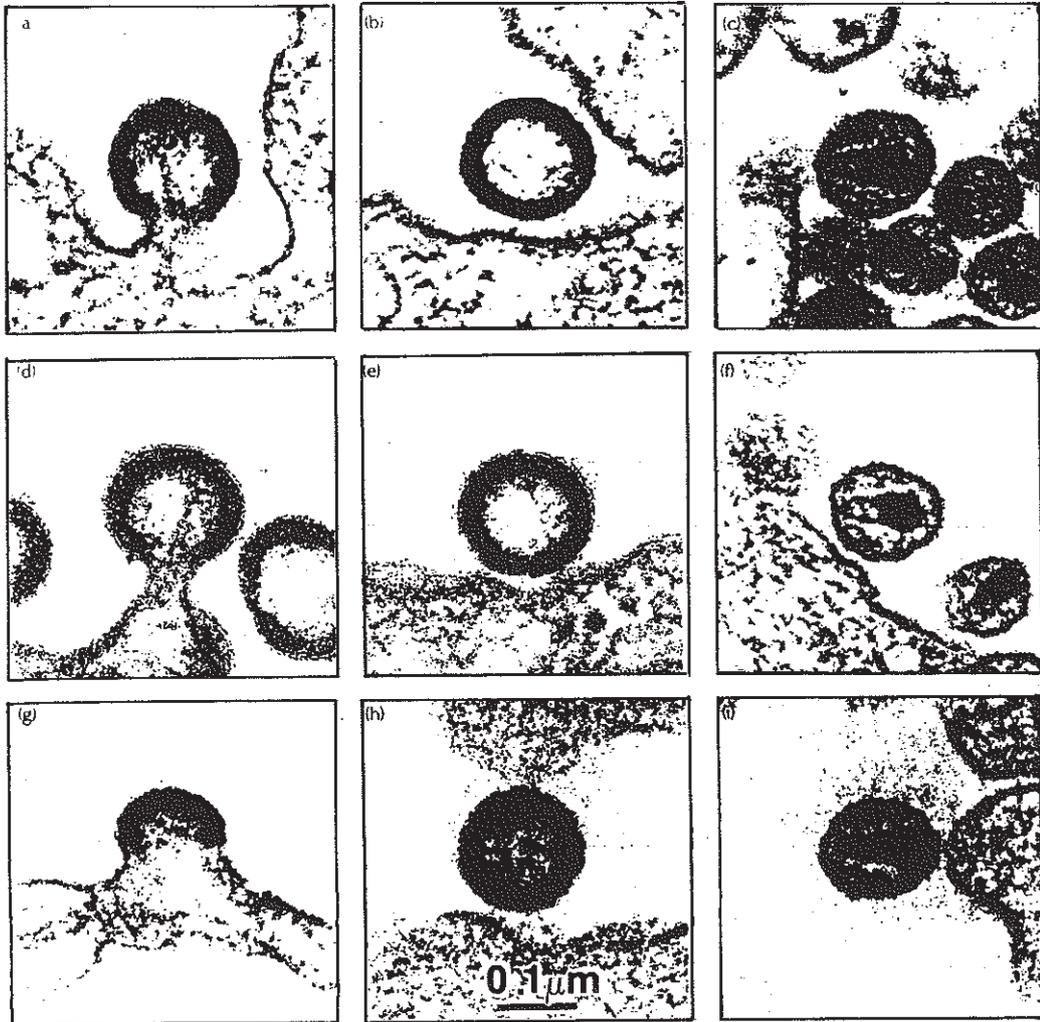


Figure 9 : ultrastructure et morphogénèse du BIV (a, b, c),
du HIV (d, e, f) et du SIV (g, h, i) (55)

2.2 - Protéines de structure et enzymes virales (fig.11)

Dans le cas du BIV, il existe trois produits majeurs du gène gag, résultant du clivage d'un précurseur p53 : il s'agit des protéines p16, p26 et p7 qui sont respectivement les protéines de matrice, de capsid et de nucléocapsid.

Le gène pol code pour les trois enzymes virales : reverse-transcriptase, protéase et intégrase.

Enfin le gène env code pour la glycoprotéine de surface gp100 et pour la glycoprotéine transmembranaire gp45. Comme c'est le cas avec les autres lentivirus, la glycoprotéine de surface, appelée également SU représente le récepteur viral; la glycoprotéine transmembranaire ou TM est quant à elle suspectée d'être responsable de l'effet cytopathogène du virus, c'est à dire de sa capacité à induire des syncytia.

3 - Tropisme

In vitro, le tropisme du BIV est assez large. En effet le virus peut se répliquer dans des cellules fibroblastiques (où son effet cytopathique se traduit par la fusion puis la mort des cellules) et dans des cultures de cellules bovines d'origines diverses (rate, cerveau, poumons, plexus choroïdes, thymus, reins ou membranes synoviales) (57). D'autres cellules d'espèces animales différentes, telles que les cellules embryonnaires épithéliales de lapin ou les cellules de thymus de chien ont également pu être infectées (16).

In vivo, les cellules cibles du virus sont les cellules de la lignée monocytes/macrophages préférentiellement à la lignée lymphocytaire (23).

IV - LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES (58)

La conséquence d'une infection naturelle par le BIV sur la santé des bovins n'est pas clairement connue et ceci pour deux raisons :

- d'une part l'élevage bovin correspond à une production animale avec un fort turnover : or la période d'incubation des lentivirus est généralement longue et peut s'étaler sur plusieurs années.
- d'autre part la majorité des animaux est coïnfectée par le virus leucémogène bovin responsable de la leucose bovine.

Une étude menée en Louisiane au sein d'un troupeau fortement infecté à la fois par le BIV et le BLV n'a fourni que peu de renseignements sur l'aspect clinique de la maladie. Les animaux se caractérisaient tous par une certaine apathie et beaucoup révélaient des infections cutanées résistant aux traitements antibiotiques et antiparasitaires traditionnels. L'étude histologique a permis de mettre en évidence la formation de manchons périvasculaires non suppuratifs au niveau des tissus cérébraux : ces lésions, signes d'une méningoencéphalite virale, étaient semblables à celles observées par VAN DER MAATEN chez la vache Holstein R-29.

Quelques informations supplémentaires proviennent de l'infection expérimentale de jeunes veaux. Plusieurs études ont ainsi démontré une lymphocytose transitoire ainsi qu'une lymphadénopathie sans autre signe clinique caractéristique. Chez les animaux sacrifiés, les examens macroscopiques ont révélé de larges ganglions lymphatiques sous cutanés, et les examens microscopiques ont mis en évidence une hyperplasie folliculaire des centres germinaux. Comme chez les animaux naturellement infectés, la présence de manchons périvasculaires cérébraux non suppuratifs a été détectée; cependant d'autres études sont nécessaires pour comprendre la signification de telles lésions chez des animaux en bonne santé.

V - ACTION SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Là encore, l'action du virus sur la fonction immunitaire n'est pas clairement élucidée. Les études menées sur des animaux infectés expérimentalement n'ont pas mis en évidence d'immunosuppression, le rapport CD4/CD8 n'est pas modifié et les différentes fonctions monocytaires (phagocytose, chimiotactisme ...) ne semblent pas ou peu altérées. Cependant cette conservation de l'activité des monocytes semble davantage liée à une faible charge virale plutôt qu'à l'incapacité du BIV à entraîner des altérations (136).

En fait, beaucoup de questions concernant le BIV restent pour le moment sans réponse. Les effets à long terme d'une infection naturelle ou expérimentale ne sont pas connus; si le parallèle peut être fait entre l'infection par le BIV et l'infection par le HIV en ce qui concerne l'apparition précoce de la lymphadénopathie et de la lymphocytose, les autres symptômes associés à un syndrome d'immunodéficience n'ont pas été démontrés. Cependant différentes caractéristiques du virus, comme sa réplication dans les macrophages, la complexité de son génome ou sa capacité à se développer en culture cellulaire de lapins peuvent laisser penser qu'il s'agit là encore d'un modèle lentiviral intéressant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques ou vaccinales. De même, si la taille du bovin n'en fait pas un modèle satisfaisant pour mener des études *in vivo*, l'infection expérimentale de lapins par le BIV (avec apparition là aussi d'une lymphadénopathie, d'une réponse humorale rapide et persistante et d'une réplication virale active au niveau des macrophages) peut être réalisée facilement et permettre ainsi de mieux comprendre les mécanismes de la maladie et les interactions entre le virus et le système immunitaire de l'hôte.

TROISIEME PARTIE
TRAVAIL EXPERIMENTAL

Le vaste fléau que représente le SIDA humain explique la mobilisation des pays industrialisés en matière de rétrovirologie.

Une sélection est devenue nécessaire parmi le très grand nombre de molécules synthétisées chaque année dans le monde entier, une minorité d'entre-elles se révélant réellement efficaces contre la réplication du HIV.

Le virus VISNA-MAEDI, bien que non-immunosuppresseur, représente ainsi un modèle lentiviral intéressant qui permet de présélectionner *in vitro* les molécules les plus efficaces en mesurant le pourcentage de viabilité des cellules qu'il infecte, par une méthode colorimétrique.

La dernière partie de notre travail a donc consisté à rechercher l'activité antivirale de différents composés sur la réplication du virus VISNA-MAEDI. Dans un premier chapitre, nous exposerons le matériel et les méthodes employés au cours de nos expérimentations. Un deuxième chapitre présentera les résultats obtenus au cours de ce travail expérimental; l'intérêt potentiel des différentes molécules originales testées sera ensuite discuté.

CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES

I - CULTURE CELLULAIRE

1 - Nature et origine des cellules

Ce sont des **cellules fibroblastiques primaires**, issues de plexus choroïde de mouton (membranes richement vascularisées situées au niveau des deux ventricules cérébraux) qui sont utilisées comme support pour la culture du virus VISNA-MAEDI.

Ces cellules primaires ont été choisies pour deux raisons essentielles :

- d'une part, le virus VISNA a un tropisme pour le système nerveux central et pour les plexus choroïdes en particulier. La culture *in vitro* de ces cellules permet ainsi de reconstituer un environnement cellulaire proche des conditions naturelles.
- d'autre part, ces cellules une fois infectées produisent un titre élevé de virus.

Une autre particularité des fibroblastes est leur capacité, contrairement à beaucoup d'autres types cellulaires, à conserver leur morphologie en culture. Au microscope optique inversé (NIKON), les cellules apparaissent mononuclées, fusiformes, avec des prolongements cellulaires caractéristiques et leur richesse en organites cytoplasmiques témoigne de leur grande activité métabolique.

2 - Entretien des cultures

Les cellules de PC (plexus choroïde) sont entretenues à l'étuve (JOUAN IG150) à 37°C, sous 5% de CO₂ en atmosphère humide. Ce sont des cellules fragiles, à durée de vie limitée.

2.1 - Le milieu de culture

Le milieu de culture est le **DMEM**, milieu nutritif de base, auquel est ajouté 10% de sérum de veau foetal (SEROMED® Biochrom KG).

Le DMEM est reconstitué à partir des produits suivants :

- MEM (SIGMA) -----	9,7 g
- eau distillée -----	890 ml
- HEPES (SIGMA) -----	4,76 g
- bicarbonate de sodium (SIGMA) -----	1 g
- acides aminés non essentiels (SIGMA) ----	10 ml
- hydroxyde de sodium 1 N -----	6 ml

Ces différents composants sont mélangés à l'aide d'un agitateur magnétique à barreau. La solution obtenue, ajustée à un pH de 7,4, est filtrée stérilement (Sterivex - GV, MILLIPORE) et répartie dans des flacons stériles. Le pH de la préparation finale après filtration est de 7,2 et le DMEM est conservé au réfrigérateur à +4°C.

La concentration assez élevée de SVF (Serum de Veau Foetal), s'explique par le fait que les fibroblastes, compte tenu de leur importante activité mitotique, exigent des facteurs mitogènes.

Le milieu de culture doit être changé régulièrement, tous les 2 ou 3 jours.

2.2 - Le repiquage

Les cellules fibroblastiques, issues des explants de PC, sont des **cellules adhérentes**, qui ont la propriété de s'étaler en monocouche sur la paroi du flacon de culture (CORNING USA).

Il faut éviter de maintenir la culture à pleine confluence; sinon, les cellules vont se chevaucher, réduisant la surface d'échange avec le milieu, et dépérir.

Dès que les cellules recouvrent la totalité du support qui leur est offert, le repiquage devient nécessaire et constitue une étape essentielle dans l'entretien de la culture cellulaire.

Ce repiquage se fait en moyenne tous les 4 jours. Les cellules de PC peuvent théoriquement subir une quinzaine de passages, mais ce nombre varie avec l'explant; pour que les conditions de viabilité cellulaire soient maximales, nous nous limitons au laboratoire, à 8 générations de subcultures.

2.2.1 - La trypsination

C'est l'étape de **détachement des cellules** de leur support.

Dans un premier temps, le flacon est vidé de son milieu de culture.

Le tapis cellulaire est ensuite rincé avec 2 ml d'une **solution saline de trypsine à 0.05% (p/v) et d'EDTA disodique à 0,02%** (SEROMED® Biochrom KG). Cette solution est isotonique et tamponnée, de pH 7,4, sans calcium ni magnésium.

Un deuxième rinçage est effectué avec 3 ml de la solution trypsine/EDTA. Environ 10% de cette solution est conservée, de façon à recouvrir le tapis cellulaire d'un léger film. L'ensemble est incubé à 37° pendant quelques minutes (en général 3 mn et jamais plus de 10). A la sortie de l'étuve, le fait de taper avec la main sur les parois du flacon peut faciliter le détachement cellulaire. Ce détachement est observé au microscope optique inversé.

Lorsque le tapis cellulaire est détaché, on ajoute 5 ml de milieu de culture, et les cellules sont dispersées par aspirations et refoulements successifs.

2.2.2 - La remise en culture

On effectue tout d'abord un comptage des cellules. Pour cela, une goutte de suspension cellulaire est déposée sur une cellule de Malassez (PRECISS France). Cette suspension cellulaire est ensuite dédoublée voir détriplée et répartie dans des boîtes de culture aux dimensions appropriées. Dans chaque boîte, du milieu de culture avec 10% de SVF (qui va de plus inhiber l'activité enzymatique de la trypsine) est rajouté.

L'incubation se fait à 37°C.

A partir du moment où les cellules adhèrent à nouveau, c'est-à-dire dans les 24h qui suivent, le milieu peut être changé.

3 - Congélation - Décongélation

3.1 - Congélation

Après quelques subcultures, on dispose d'une quantité suffisante de cellules; celles ci peuvent être congelées et constituer ainsi une réserve.

Les cellules, une fois trypsinées, sont mises en suspension dans un milieu de culture (DMEM) contenant 10% de SVF et 10% de DMSO (SDS, Peypin, France). La concentration cellulaire doit être de 1 à $1,5 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Chaque cryotube renfermant environ 1,5 ml de suspension, est placé à -70°C dans un récipient permettant une chute de température progressive, avant d'être conservé dans l'azote liquide.

3.2 - Décongélation

La suspension cellulaire doit être rapidement décongelée. Pour cela, les cryotubes sont placés dans un bain-marie.

Le contenu d'un tube est vidé dans une petite boîte de culture de 25 cm² (ou deux tubes dans une boîte moyenne de 75 cm²).

Du milieu de culture, DMEM et 10% de SVF, est rajouté afin d'obtenir un volume final suffisant.

L'incubation à 37°C est de 24h avant un changement de milieu.

II - LE VIRUS VISNA-MAEDI

1 - Origine

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé deux souches virales :

- **la souche VISNA K796**, souche de référence, fournie par le Laboratoire Central Vétérinaire de Maisons-Alfort. En 1960, SIGURDSSON l'a isolée d'un mouton atteint d'encéphalite.

- **la souche MAEDI WLC1**, d'origine américaine, également fournie par le Laboratoire Central de Maisons-Alfort, et isolé par CUTLIP à partir d'un mouton atteint de pneumonie progressive.

Ces deux souches sont conservées au congélateur, à -70°C , sous forme d'aliquotes de surnageants de cultures cellulaires infectées.

2 - Constitution du pool viral

Elle se fait à partir d'un tapis de cellules de PC arrivé à 80% de la confluence.

Dans un premier temps, le flacon est vidé de son milieu de culture et rincé avec le **milieu de base** (DMEM) afin d'éliminer le sérum de veau foetal qui inhibe le développement du virus.

On ajoute ensuite un volume de 2 ml de surnageant de culture infectée par le virus, pour un tapis cellulaire de 75 cm^2 (0,5 à 1 ml pour un tapis de 25 cm^2).

Après un temps d'incubation d'une heure à 37°C , le surnageant est rejeté et remplacé par 10 ml de **milieu de survie** (DMEM et 2% de sérum de veau foetal) dans le cas d'un flacon de 75 cm^2 (5 ml s'il s'agit d'un flacon de 25 cm^2).

L'incubation à 37°C est prolongée jusqu'à l'apparition de l'ECP; le surnageant est récolté puis centrifugé (JOUAN CR312) pendant 10 mn, à 1600 tours/min et à $+4^{\circ}\text{C}$, de façon à éliminer les débris cellulaires en suspension. Il est alors congelé à -70°C .

Du milieu de survie (10 ou 5 ml) est réintroduit dans le flacon.

Cette dernière opération est répétée jusqu'à épuisement du tapis cellulaire, qui se produit généralement en une dizaine de jours.

3 - Titration du virus

3.1 - Principe

Déterminer le titre infectieux d'une suspension virale signifie dénombrer par unité de volume, les particules virales capables d'infecter des cellules permissives.

Le virus est titré selon une microméthode mise au point par LARROUTUROU (87) et basée sur l'effet cytopathique caractéristique du virus VISNA-MAEDI.

3.2 - Protocole

Après typisation d'un tapis cellulaire à confluence, les cellules sont dénombrées sur cellule de Malassez; la suspension cellulaire est alors ajustée à $2 \cdot 10^5$ cellules/ml avec du DMEM additionné de 5% de SVF. 50 μ l de la suspension finale sont disposés dans chacune des cupules d'une plaque de 96 puits à fond plat (FALCON, Becton Dickinson Labware, USA).

Des **dilutions décimales du virus à titrer** sont préparées dans du milieu de base en suivant une progression géométrique de raison 10 et en changeant de pipette à chaque dilution. 50 μ l de chacune d'elles sont disposés dans une série de 8 cupules, contenant déjà les cellules. Deux séries de puits sont réservées : l'une au témoin cellules (cellules non infectées additionnées de 50 μ l de milieu nutritif dans chaque puits), l'autre au virus non dilué.

La concentration cellulaire finale est de 10^4 cellules/puits. Le pourcentage en SVF est de 2,5% ce qui est suffisant pour assurer l'adhérence et la croissance des cellules dans la plaque, sans toutefois ralentir le développement du virus.

Avant d'être portée à l'étuve, la microplaque est recouverte d'un film plastique adhésif. Ceci est destiné à prévenir l'évaporation du contenu des puits et à éviter une éventuelle contamination microbienne entre les puits.

Le temps d'incubation est fixé à 6 jours (temps nécessaire pour obtenir un titre viral maximal) à une température de 37°C et sous 5% de CO₂. Passé ce délai, les surnageants sont éliminés par aspiration.

Afin de mieux apprécier l'ECP viro-induit au microscope inversé, on effectue **une coloration au May-Grünwald/Giemsa** de la façon suivante :

- mettre 100 µl de réactif May-Grünwald (MERK) dans chacun des puits de la microplaque, replacer le couvercle pour éviter toute évaporation et attendre 3 minutes,
- jeter le contenu des puits et rincer à l'eau courante,
- introduire ensuite dans chaque puits 100 µl de réactif de Giemsa (Société chimique POINTET GIRARD, France) dilué au 1/20 dans l'eau et laisser en contact durant au moins 30 minutes, 60 minutes de préférence,
- enfin, jeter le contenu de la microplaque et rincer à l'eau courante.

Après coloration, la plaque est observée au microscope inversé. Le nombre de cupules positives (+), c'est à dire présentant au moins un **syncytium**, est évalué, en prenant comme référence négative le témoin cellules.

Le titre infectieux du virus est ensuite calculé selon la méthode de REED et MUENCH (18, 8). Il est exprimé en dose infectante à 50% en culture tissulaire (DICT 50 ou TCID 50 en anglais) par millilitre. Cette DICT 50 est calculée selon une formule statistique, après avoir déterminé les dilutions encadrant le point 50% :

$$\text{DICT } 50 = 10^{-\left[-\log \text{dil. sup} + \frac{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - 50\%}{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - \% \text{ dil. inf. à } 50\%} \right]}$$

- où
- **dil. sup.** correspond à la dilution supérieure au point 50%
 - **% dil. sup. à 50%** correspond au pourcentage de réponses positives cumulées, pour la dilution supérieure au point 50%.
 - **% dil. inf. à 50%** correspond au pourcentage de réponses positives cumulées, pour la dilution inférieure au point 50%.

III - LE MTT

Au cours de notre travail expérimental, nous avons évalué l'activité antivirale de molécules originales à partir d'un test colorimétrique utilisant le MTT.

1 - Structure

Le sel de tétrazolium MTT ou bromure de 3- (4,5- diméthylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphényltétrazolium est un composé organique dont la structure dérive de celle des tétrazoles (142).

Cette structure se caractérise par un noyau insaturé à cinq sommets, composé d'un carbone et de quatre atomes d'azote dont un quaternaire chargé positivement.

2 - Propriétés physico-chimiques

2.1 - Propriétés physiques

Le MTT se présente sous la forme d'une poudre **jaune** soluble dans l'eau. Il est sensible aux acides, à la lumière et à l'humidité; il est donc conservé dans un récipient hermétique et opaque, à une température comprise entre 0 et 5°C.

De par sa structure chimique à doubles liaisons conjuguées, il absorbe fortement dans l'ultra-violet : cependant cette propriété optique n'a-trouvé jusqu'à présent, aucune application.

2.2 - Propriétés chimiques

La réduction du MTT provoque une ouverture du cycle : le produit de la réaction est un composé neutre, coloré en **bleu-violet**, appelé **formazan** (142) (fig.12).

Le formazan est facilement soluble dans les solvants organiques et les lipides.

3 - Principe de la méthode colorimétrique au MTT

Le MTT, composé organique coloré en jaune, est réduit dans les **cellules métaboliquement actives**, donc vivantes, par des déshydrogénases mitochondriales, en un composé cristallisé bleu-violet : le formazan.

Cette modification chimique s'accompagne d'un changement du spectre d'absorption, caractérisé dès lors par une bande d'absorption dans le visible, et deux bandes dans l'UV.

Les cristaux violets de formazan, insolubles dans l'eau, sont donc solubilisés dans un solant organique approprié qui stoppe, de plus, la réaction colorée. La solution ainsi formée, est analysée spectrophotométriquement. **L'absorbance lue est proportionnelle à la quantité de formazan produite, elle même proportionnelle au nombre de cellules vivantes (37).**

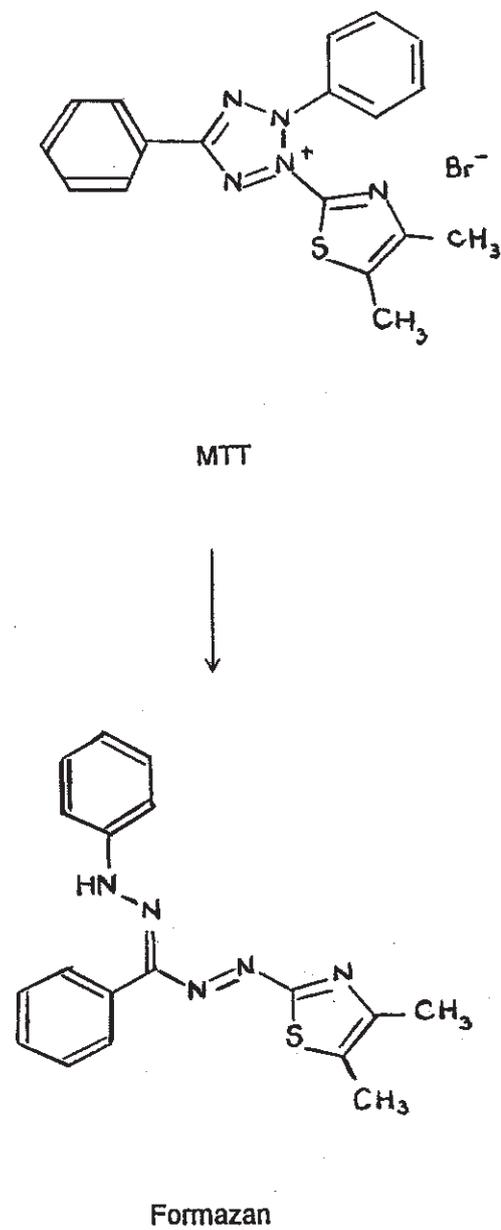


Figure 12 : structure chimique du MTT et de son formazan

4 - Avantages de la méthode colorimétrique au MTT

Les principaux avantages de la méthode au MTT sont :

- sa **simplicité** de mise en oeuvre,
- sa **sécurité** puisqu'elle ne fait intervenir aucun isotope radioactif. Cependant le manipulateur doit savoir que le MTT est une substance toxique dont l'inhalation, l'ingestion ou même le contact avec la peau, peut être dangereuse,
- sa capacité à être **automatisée** grâce à des pipettes multicanaux, des diluteurs, des distributeurs contrôlés par microprocesseur (117) et des lecteurs de DO reliés à un système informatique (89),
- son **adaptabilité**. Elle est très souvent rencontrée en cancérologie et en immunologie, aussi bien dans des tests de prolifération, que d'activation ou de cytotoxicité cellulaire,
- enfin et surtout la **rapidité** et la facilité de la lecture des résultats qui est effectuée automatiquement grâce à un lecteur pour microplaque.

IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU MTT

(fig.13)

1 - Les cellules

Après trypsination, les cellules adhérentes cultivées dans un flacon de 75 cm² sont ajustées à 2.10⁵ cellules/ml dans du milieu de base additionné de SVF. Ce SVF doit permettre la survie de la culture cellulaire tout en évitant l'inhibition du virus; c'est pourquoi on l'emploie à une concentration finale de 5%.

100 µl de suspension cellulaire sont ensuite distribués dans une microplaque de 96 puits à fond plat. Les 8 puits de la dernière colonne ne sont pas remplis; il représenteront les blancs, lors de la lecture des densités optiques.

2 - Les molécules

Il s'agit de **molécules originales** (fournies par le laboratoire de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de Limoges) que nous avons testées par rapport à l'activité d'un autre dérivé nucléosidique : la DDC (fig.14).

Chaque molécule à tester se présente sous la forme d'une poudre qu'il faut solubiliser dans un solvant approprié et de façon à obtenir une concentration initiale généralement de l'ordre de 4 à $9 \cdot 10^{-3}$ mol/l. La solution ainsi préparée, est filtrée stérilement sur membrane de porosité 0,22 μ m puis conservée par précaution à l'abri de la lumière et de la chaleur.

A partir de la solution initiale, 9 dilutions sont préparées extemporanément dans du milieu de base en suivant une géométrie de raison 2 (tableau 1). Il est important de changer l'embout de la pipette (Pipetman, GILSON) et d'homogénéiser au Vortex (JANKE et KENKUL, IKA^R LABORTECHNIK) après chaque dilution.

25 μ l de chaque dilution sont ensuite déposés dans les 8 puits d'une colonne : cette manipulation débute par l'avant dernière colonne (qui est remplie de la plus forte dilution) et se termine par la deuxième colonne (remplie de la solution-mère).

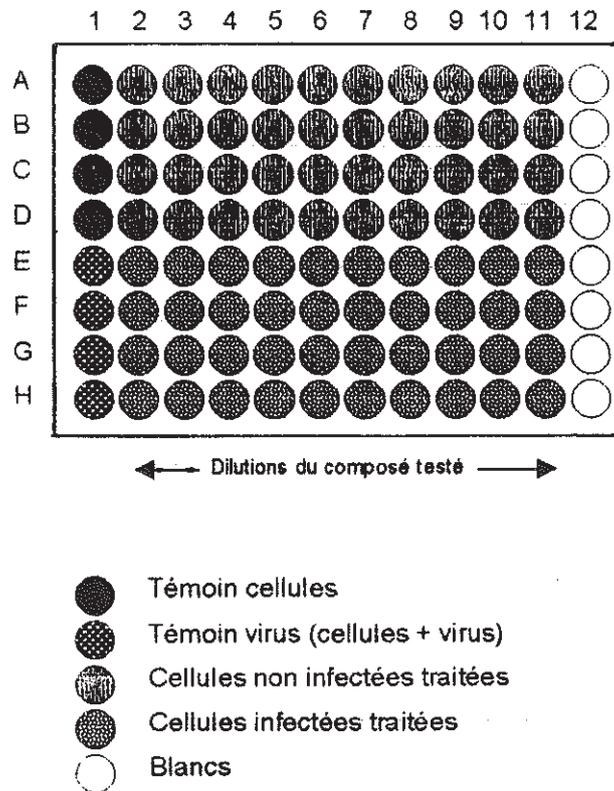
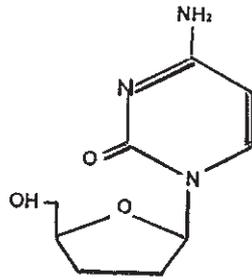
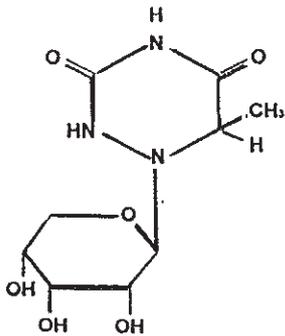
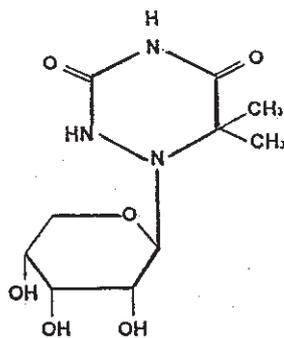
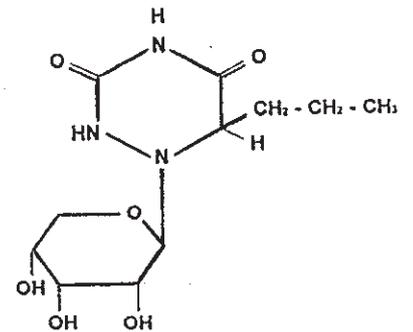
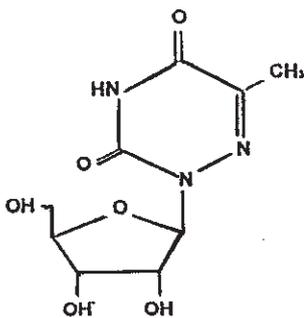


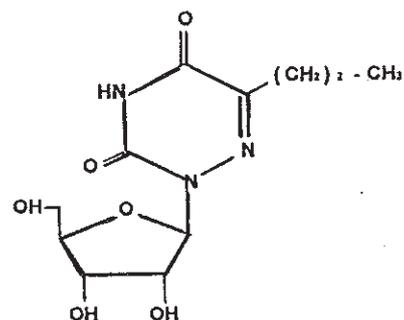
Figure 13 Organisation de la microplaque de 96 puits à fond plat



Didéoxycytidine (DDC)

6-(β-D-ribofuranosyl)-6-aza-
3-méthyl-5,6-dihydrouracile
(JD 86)6-(β-D-ribofuranosyl)-6-aza-
5,5-diméthyl-5,6-dihydrouracile
(JD 87)6-(β-D-ribofuranosyl)-6-aza-
5-propyl-5,6-dihydrouracile
(JD 88)

6-aza-5-méthyl-uridine (JD 75)



6-aza-5-propyl-uridine (JD 84)

Figure 14 : structure chimique de la DDC et des molécules originales testées

MOLECULES	PM	SOLVANT	[SOL. MERE]	RAISON DILUTION	CONCENTRATION FINALE
JD 86	261	EAU	4 mM	2	→ 1,3 μ M
JD 87	275		5 mM	2	→ 1,62 μ M
JD 88	289,88	STERILE	5,5 mM	2	→ 1,79 μ M
JD 75	259,2	EAU	9 mM	2	→ 2,93 μ M
JD 84	287,2	STERILE	9 mM	2	→ 2,93 μ M
DDC	211,2	EAU STERILE	5 mM	2	→ 1,62 μ M

PM : poids moléculaire

[SOL.MERE] : concentration de la solution mère

Tableau 1 : molécules à tester : préparation des solutions mères et de leurs dilutions

3 - Le virus

3.1 - Souche VISNA K 796

La multiplicité d'infection devant être de 0,5 DICT 50 par cellule, le pool de départ est dilué au 1/8. Le volume de suspension virale nécessaire est alors de **25 µl** pour chaque puits à infecter, c'est à dire tous les puits de la moitié inférieure de la plaque.

3.2 - Souche MAEDI WLC1

Pour obtenir une multiplicité d'infection de 0,5 DICT 50 par cellule, le volume de suspension virale pure nécessaire pour infecter chaque puits devrait être de 30 µl. Cependant suite aux essais menés avec différents volumes de suspension (de 20 à 75 µl), la valeur de 30 µl s'avère insuffisante et doit être réajustée à **50 µl**.

4 - Incubation

Après avoir complété le volume de tous les puits à 150 µl pour le virus VISNA et à 175 µl pour le virus MAEDI avec du DMEM, la microplaque est protégée par un film plastique puis incubée pendant respectivement **5 et 9 jours** à 37°C et sous 5% de CO₂.

5 - Coloration par la méthode au MTT

5.1 - Préparation de la solution de MTT

Le MTT (SIGMA chimie) est dissout dans du tampon phosphate (PBS) (BIOMERIEUX SA. France) à **6mg/ml**.

La solution jaune obtenue est filtrée stérilement (MILLEX GV) afin d'éliminer la petite quantité de résidu insoluble présent dans certains lots de MTT. Elle peut être conservée pendant un mois à condition d'être tenue à l'abri de la lumière et de la chaleur (+4°C).

5.2 - Mode opératoire

25 µl de MTT sont distribués dans chaque puits (exception faite des blancs) à l'aide d'une Finnpiquette (Finnpiquette Stepette, LAB SYSTEMS, Finlande).

La plaque est alors **incubée** à 37°C pendant trois heures. Au cours de ce temps, les cellules vivantes réduisent le sel de tétrazolium en formazan.

Le surnageant est ensuite éliminé par aspiration avec une pipette multicanaux.

Le solvant alors utilisé pour dissoudre les cristaux violets de formazan est le **DMSO** (diméthyl sulfoxyde) (29) ajouté dans les 96 puits à raison de 100 µl/puits. Cette addition est suivie d'une étape d'agitation mécanique (Fressinet, France) pendant 20 minutes et à l'abri de la lumière.

6 - Lecture des densités optiques

Celle-ci doit être faite rapidement après l'agitation des plaques, à l'aide d'un lecteur ELISA (62).

Le formazan présente des caractéristiques spectrales variables selon la nature du solvant utilisé. Le formazan provenant de la métabolisation du MTT par les cellules vivantes, et dissout dans le DMSO, absorbe au maximum entre 550 et 560 nm (6, 128). La lecture des DO se fait donc à une longueur d'onde de **540 nm**, en utilisant comme blancs les huit puits de la plaque ne renfermant que 100 µl de DMSO.

7 - Détermination de la cytotoxicité des molécules testées

Elle se fait en calculant le **pourcentage de viabilité** des cellules au contact de la substance à tester par rapport au témoin cellules, selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{DO (cell. + mol.)} \times 100}{\text{DO (cell.)}}$$

où - DO (cell. + mol.) représente la DO moyenne calculée pour les cellules au contact de la molécule testée.

- DO (cell.) représente la DO moyenne calculée pour le témoin cellules.

Les essais étant répliqués 4 fois par microplaque, les DO moyennes sont obtenues en faisant la moyenne des 4 DO lues pour chaque dilution de substance.

Les pourcentages de viabilité ainsi calculés pour chacune des concentrations de la molécule, sont représentés graphiquement.

La **concentration cytotoxique 50 (CC 50)** est définie comme la concentration de la molécule testée qui abaisse de 50% le nombre de cellules viables par rapport au témoin cellules. Sa valeur est déterminée à partir de l'équation de la droite de régression linéaire.

8 - Détermination de l'activité antivirale de la molécule testée

Elle se fait en calculant le **pourcentage de viabilité des cellules infectées traitées**, par rapport au témoin cellules selon la formule :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)} \times 100}{\text{DO (cell.)}}$$

- où
- DO (cell. + mol. + virus) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées infectées
 - DO (cell.) représente la DO moyenne calculée pour le témoin constitué de cellules non traitées et non infectées.

Les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus pour chacune des dilutions permettent d'établir une sigmoïde effet-dose, reflétant l'efficacité du composé testé.

On déterminera également le **pourcentage de protection cellulaire** relatif à chaque dilution et calculé selon la formule proposée par PAUWELS (117).

$$\% \text{ de protection cellulaire} = \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)} - \text{DO (cell. + virus)}}{\text{DO (cell.)} - \text{DO (cell. + virus)}} \times 100$$

La représentation graphique du pourcentage de protection cellulaire en fonction de la dose, permet de déterminer à partir de la droite de régression linéaire, la concentration conférant 50% de protection : on parle de **concentration inhibitrice 50** ou de **CI 50**. Cette CI 50 permet ainsi d'exprimer l'activité antivirale de la molécule.

Selon certains auteurs, cette formule ne tient pas compte de l'effet indépendant de la drogue sur les cellules, qu'il soit activateur ou inhibiteur (10). Une autre formule du pourcentage de protection a donc été proposée :

$$\% \text{ de protection cellulaire} = \left[1 + \frac{\text{DO (cell. + mol. + virus)} - \text{DO (cell. + mol.)}}{\text{DO (cell.)} - \text{DO (cell. + virus)}} \right] \times 100$$

- où
- DO (cell. + mol. + virus) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées infectées.
 - DO (cell. + mol.) représente la DO moyenne calculée pour les cellules traitées mais non infectées.
 - DO (cell.) et DO (cell. + virus) représentent les DO moyennes calculées respectivement pour le témoin cellules et le témoin virus.

CHAPITRE SECOND : RESULTATS

Au cours de notre travail expérimental, nous nous sommes donc intéressés à deux séries de dérivés nucléosidiques en vue de déterminer leur éventuelle activité antirétrovirale sur le virus VISNA-MAEDI. La DDC a également été testée et nous servira de molécule de référence.

I - CULTURE DU VIRUS

1 - Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP)

Lorsque le virus se développe dans les cellules de PC, il entraîne des modifications morphologiques typiques visibles au microscope optique inversé.

Ces changements apparaissent dès le troisième jour après la contamination des cellules *in vitro*. On observe d'abord des cellules réfringentes, volumineuses, multinuclées, qui prennent ensuite une forme étoilée avec de nombreux prolongements filiformes : on parle alors de syncytia, qui peuvent présenter jusqu'à 20 noyaux disposés en "fer à cheval" et très nettement mis en évidence par la coloration au May-Grünwald/Giemsa. Au bout de 6 à 8 jours après l'infection, les cellules se lysent et le tapis cellulaire est détruit.

Nous avons observé que l'ECP induit par la souche MAEDI se développe moins rapidement que celui induit par la souche VISNA et ceci malgré une réplication analogue des deux souches.

2 - Résultats du titrage

La souche VISNA que nous avons utilisée a une DICT 50 de $10^{-5,23}$, soit un titre de $3,4 \cdot 10^6$ DICT 50/ml.

A titre d'exemple, nous avons représenté les résultats inhérents au virus MAEDI. Le nombre de cupules positives observées au microscope inversé est rapporté dans le tableau 2. Leur nombre pour chaque dilution de virus nous a permis de situer le point 50% et de définir, de part et d'autre de ce point, les pourcentages de réponses positives cumulées (tableau 3).

Nous avons calculé la DICT 50 à partir de la formule énoncée dans le paragraphe II.3.2 du chapitre premier. Par cette méthode, nous avons trouvé pour le pool de virus MAEDI, une DICT de $10^{-4,2}$ soit un titre de $3,17 \cdot 10^5$ DICT 50/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/
B	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	/
C	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	/
D	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/
E	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/
F	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/
G	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	/
H	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	/

Tcell Virus 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ 10⁻⁵ 10⁻⁶ 10⁻⁷ 10⁻⁸ 10⁻⁹
 pur <-----dilutions du virus----->

[-] pas d'effet cytopathique
 [+] apparition d'au moins 1 syncytium

Dilutions du virus	Nombre de cupules		Cumul des cupules		Cupules positives cumulées	
	Positives	Négatives	Positives	Négatives	Taux	%
10 ⁻¹	8	0	29	0		
10 ⁻²	8	0	21	0		
10 ⁻³	8	0	13	0	13/13	100%
10 ⁻⁴	5	3	5	3	5/8	62,5%
10 ⁻⁵	0	8	0	11	0/11	0%

Tableaux 2 et 3 : Détermination du titre infectieux du MAEDI selon REED et MUENCH

II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE

L'évaluation de la cytotoxicité d'une substance est basée sur la détermination de sa CC 50, c'est-à-dire de la concentration qui diminue de 50% la viabilité cellulaire par rapport au témoin cellules.

De toutes les molécules testées, aucune ne s'est avérée cytotoxique aux concentrations utilisées, exception faite de la molécule JD 88. Cette molécule présente en effet une toxicité vis-à-vis des cellules de PC et sa CC 50, calculée au cours des différents essais, est comprise entre 178 et 283 μM (fig. 21 et 23).

En ce qui concerne les autres substances, la CC 50 n'a pu être déterminée, et nous pouvons seulement dire que sa valeur est supérieure à la plus forte concentration moléculaire testée : nous avons ainsi utilisé une concentration maximale de 833 μM pour la DDC, 666 μM pour la JD 86, 833 μM pour la JD 87, 1500 μM pour la JD 75 et enfin 1500 μM pour la JD 84 (tableau 4).

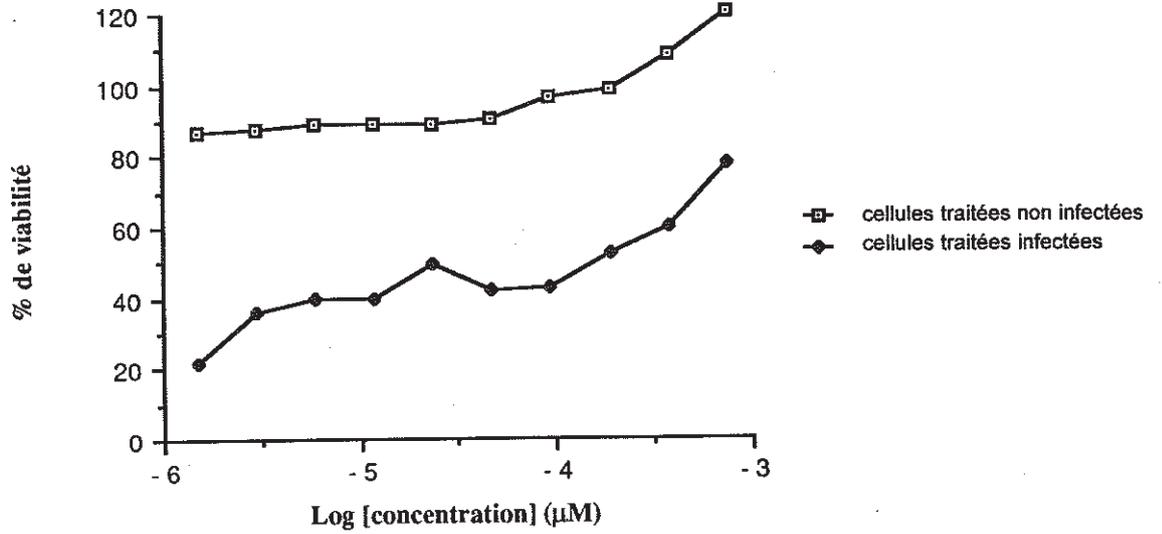


figure 15 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 86 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

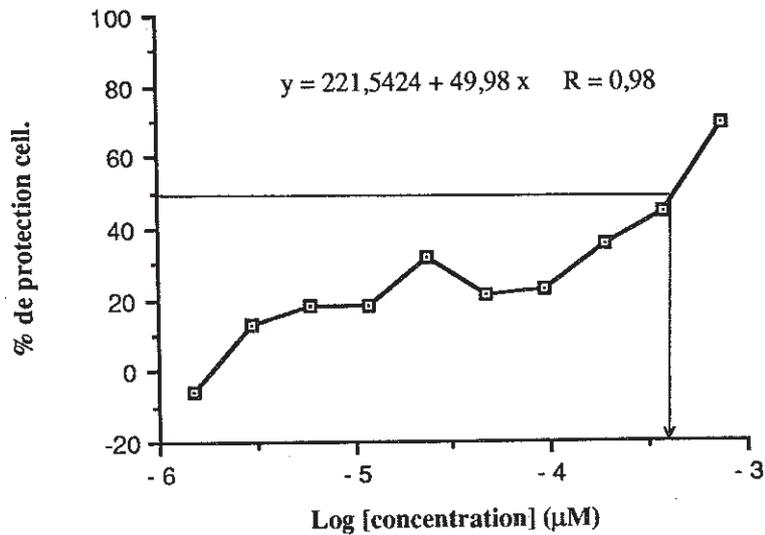


figure 16 : activité antivirale de la molécule JD 86 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

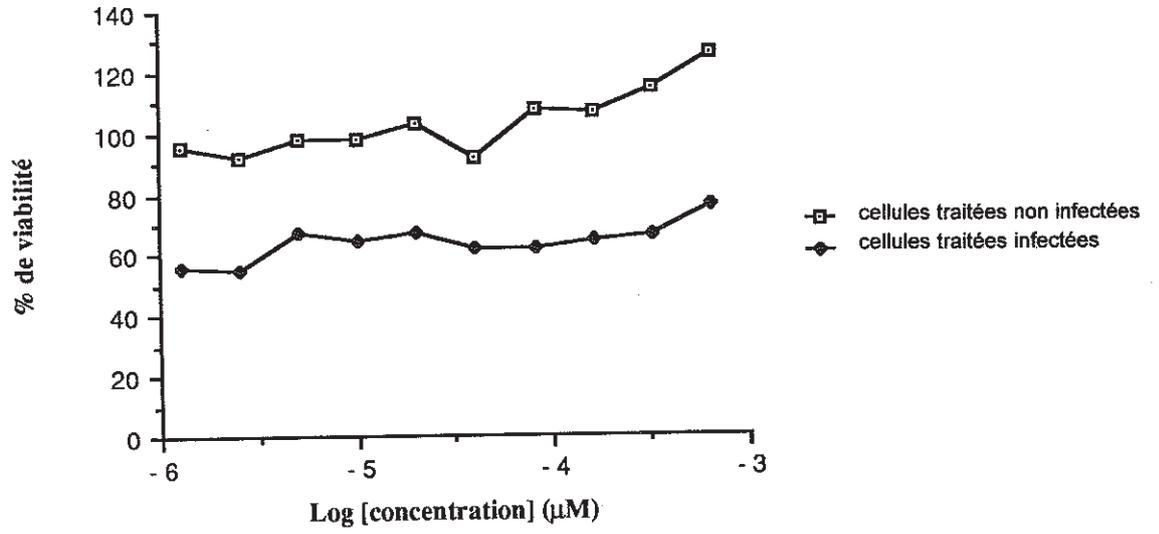


figure 17 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule **JD 86** sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus **MAEDI**.

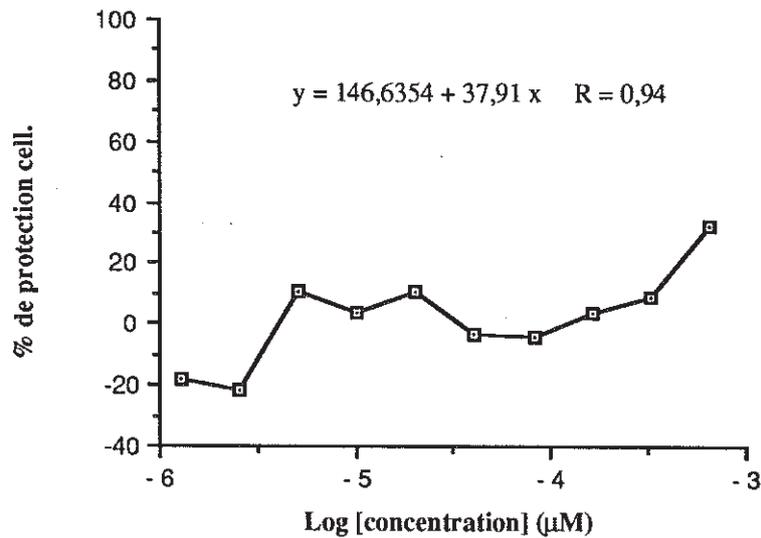


figure 18 : activité antivirale de la molécule **JD 86** sur la souche **MAEDI**, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

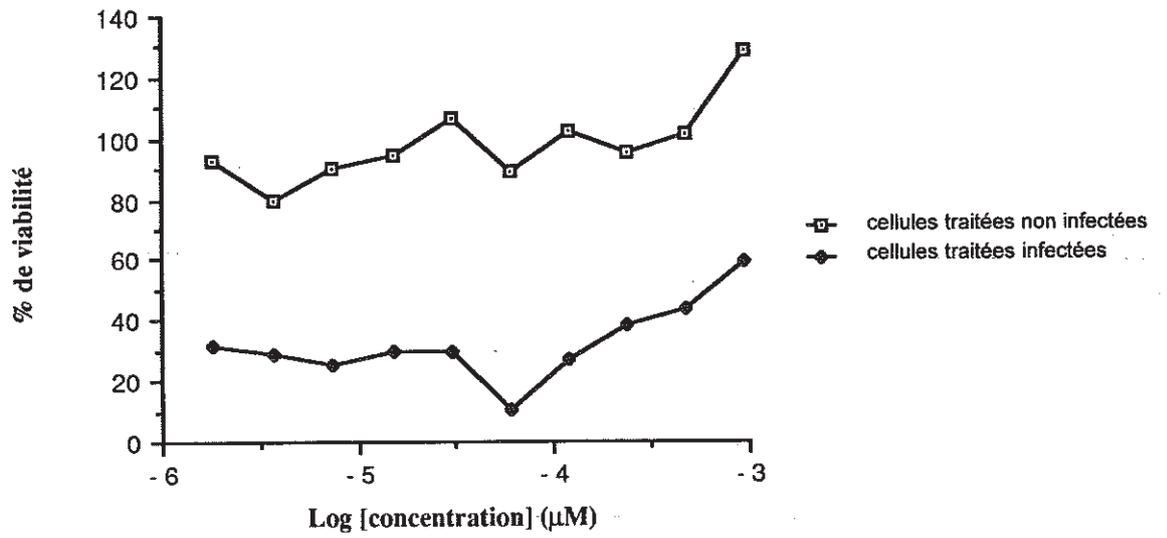


figure 19 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 87 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

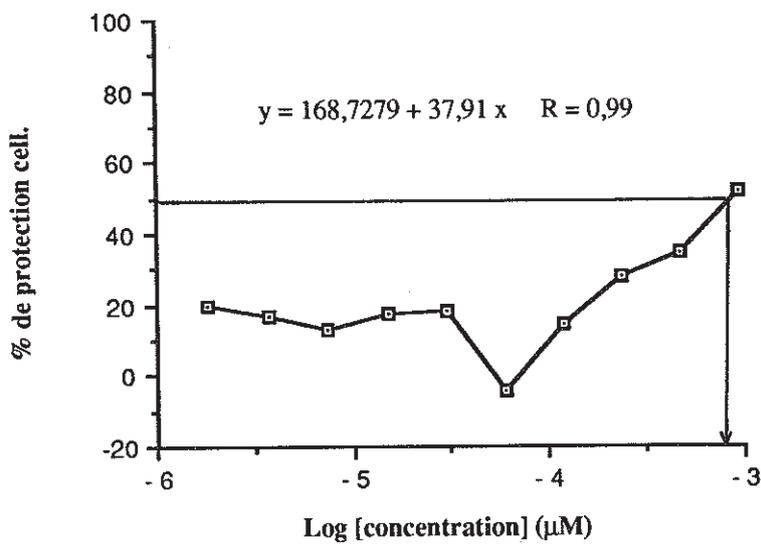


figure 20 : activité antivirale de la molécule JD 87 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

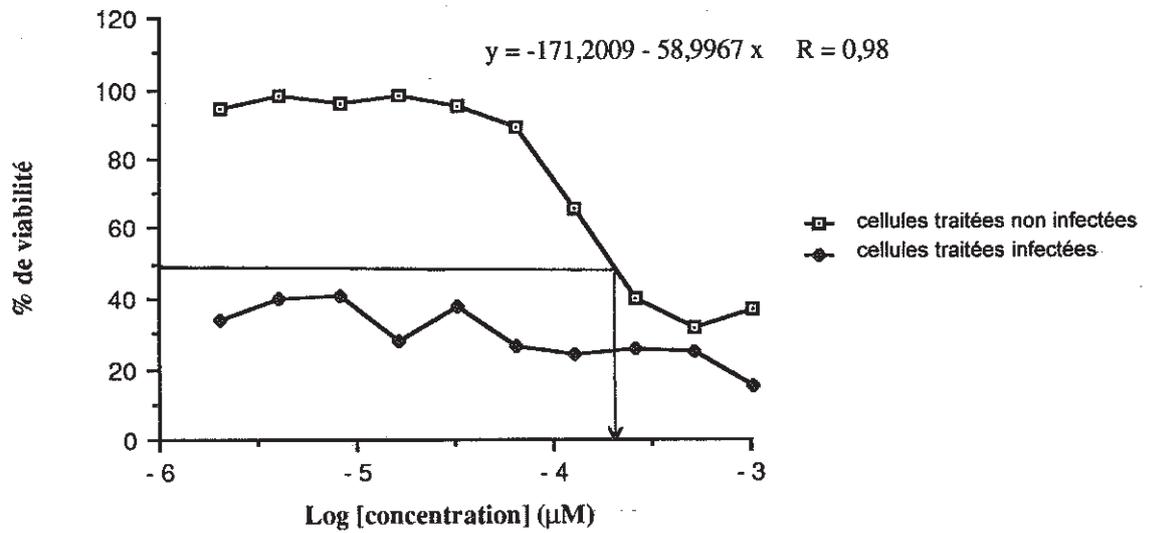


figure 21 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 88 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

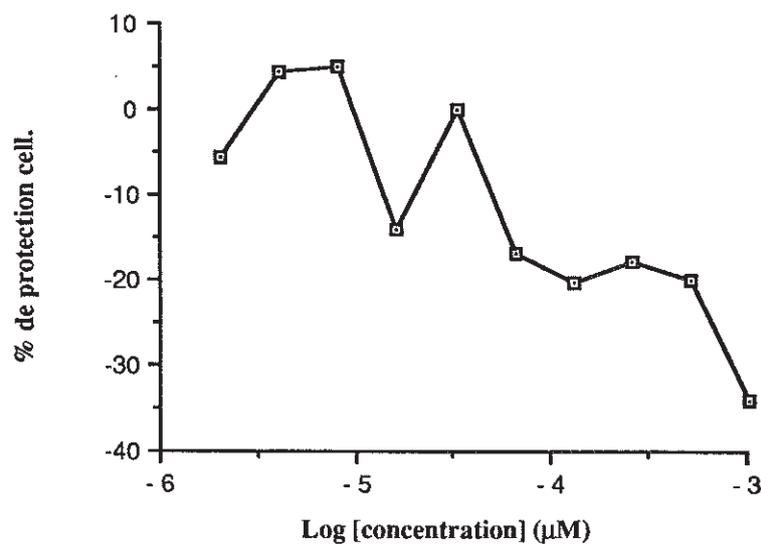


figure 22 : activité antivirale de la molécule JD 88 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

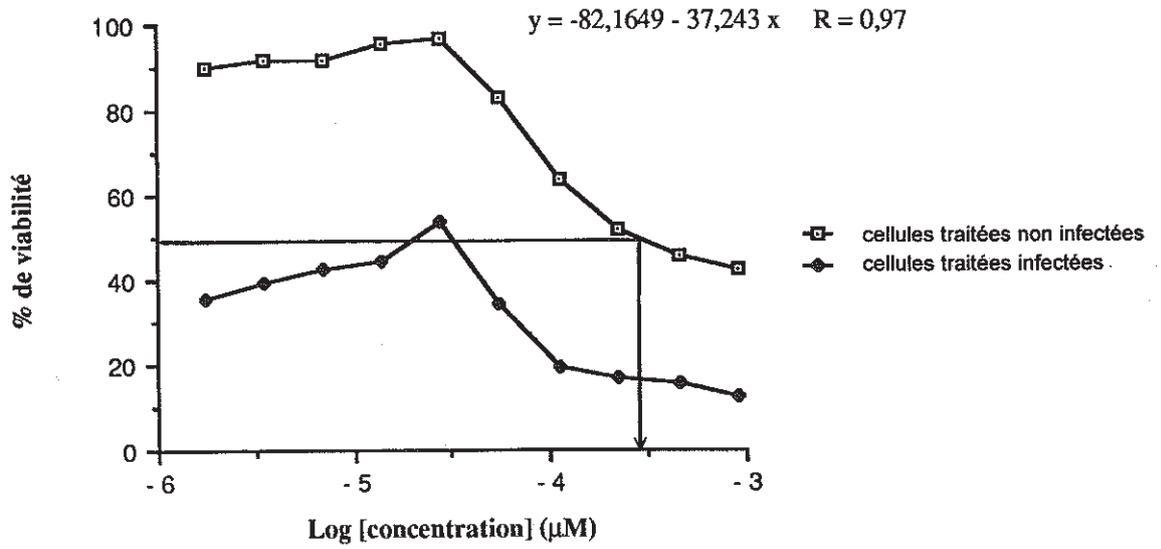


figure 23 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 88 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI.

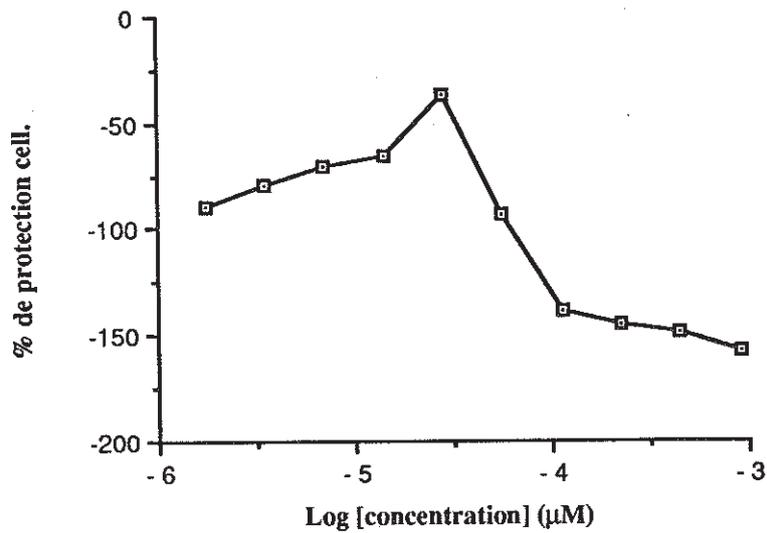


figure 24 : activité antivirale de la molécule JD 88 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

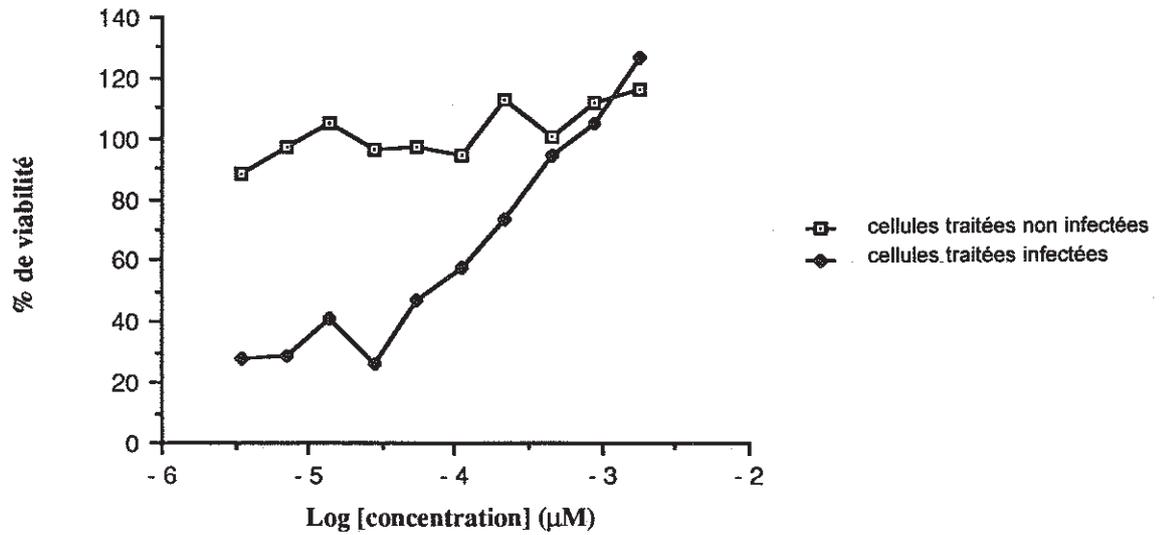


figure 25 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 75 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

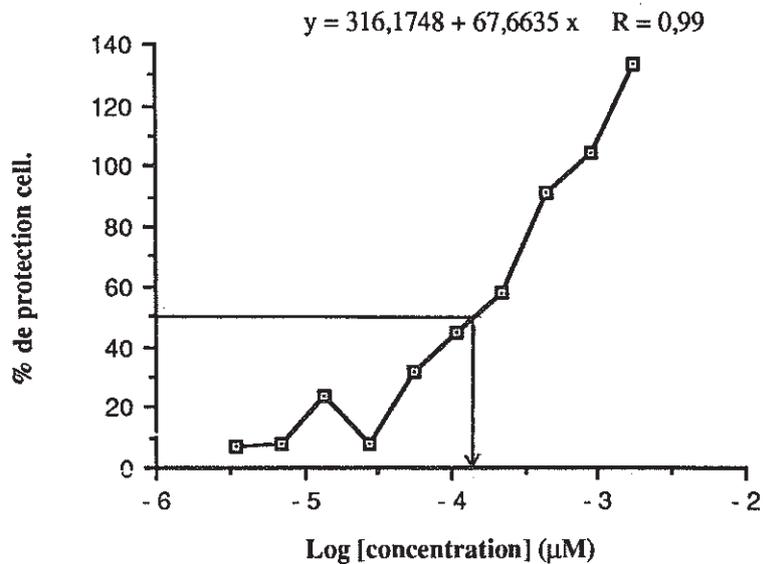


figure 26 : activité antivirale de la molécule JD 75 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

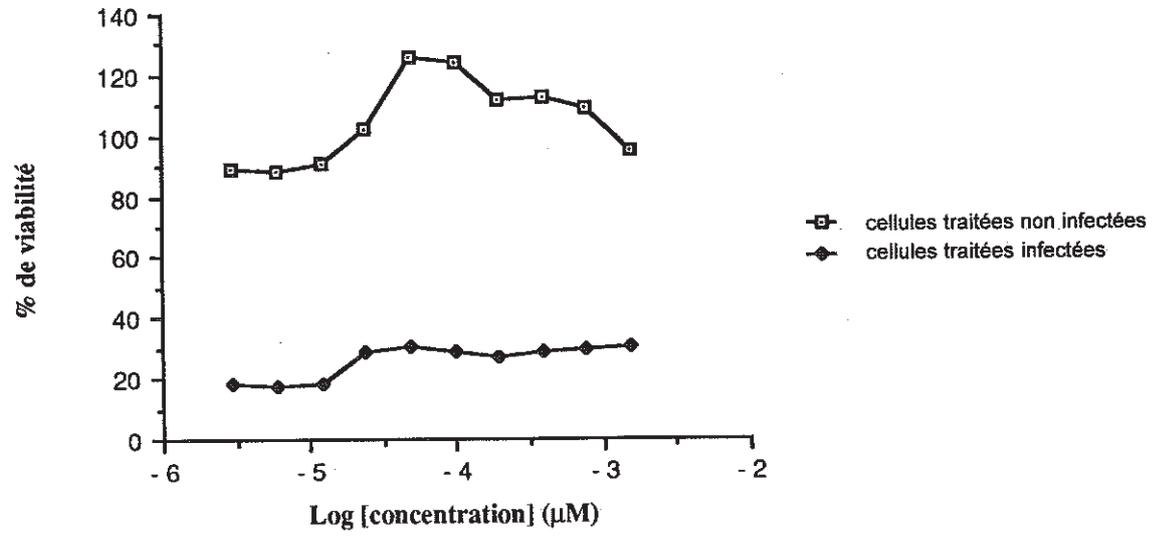


figure 27 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 75 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI.

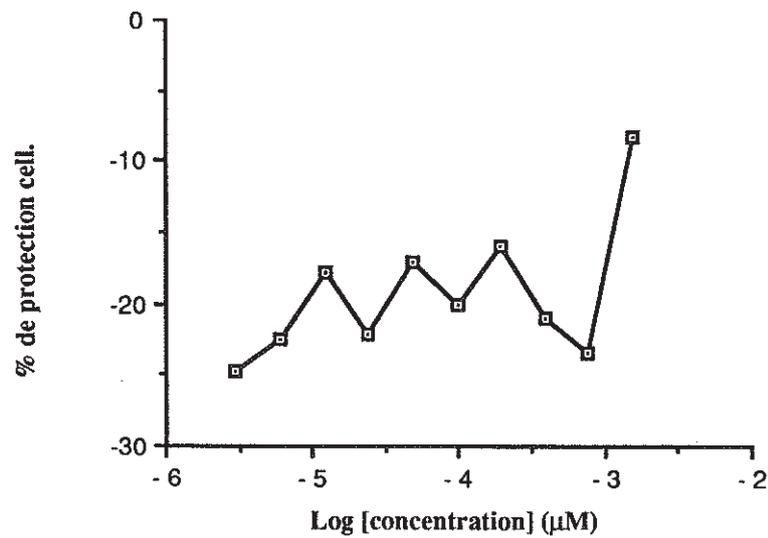


figure 28 : activité antivirale de la molécule JD 75 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

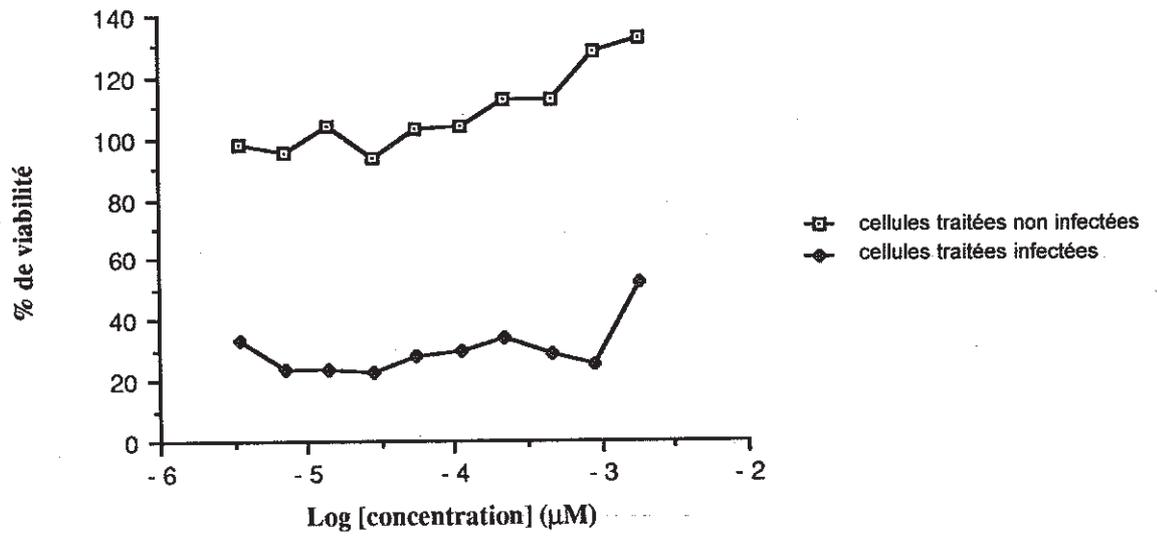


figure 29 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 84 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

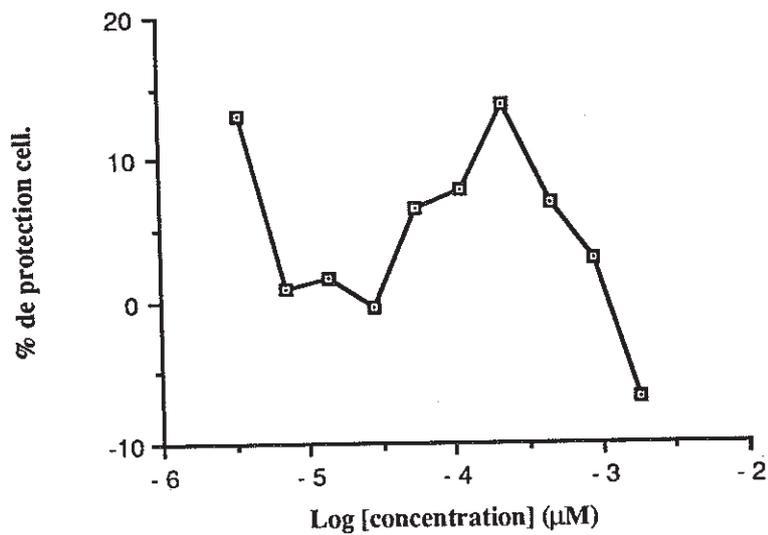


figure 30 : activité antivirale de la molécule JD 84 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

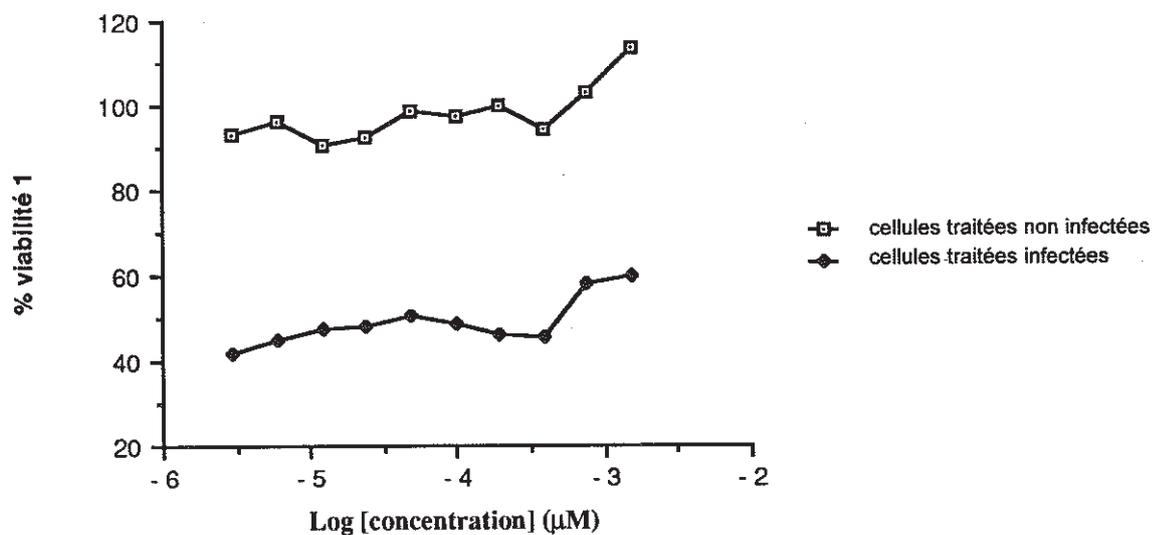


figure 31 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule **JD 84** sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus **MAEDI**.

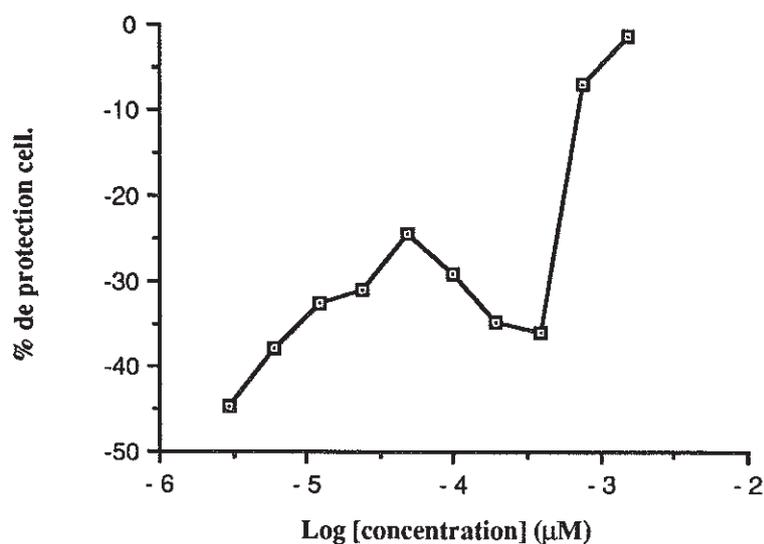


figure 32 : activité antivirale de la molécule **JD 84** sur la souche **MAEDI**, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

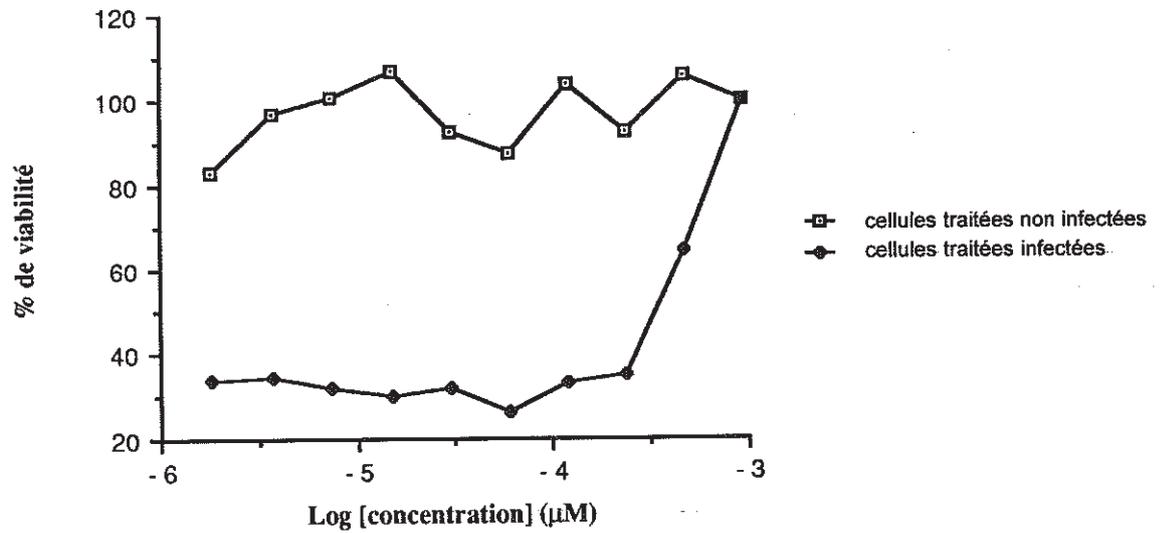


figure 33 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule DDC sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA.

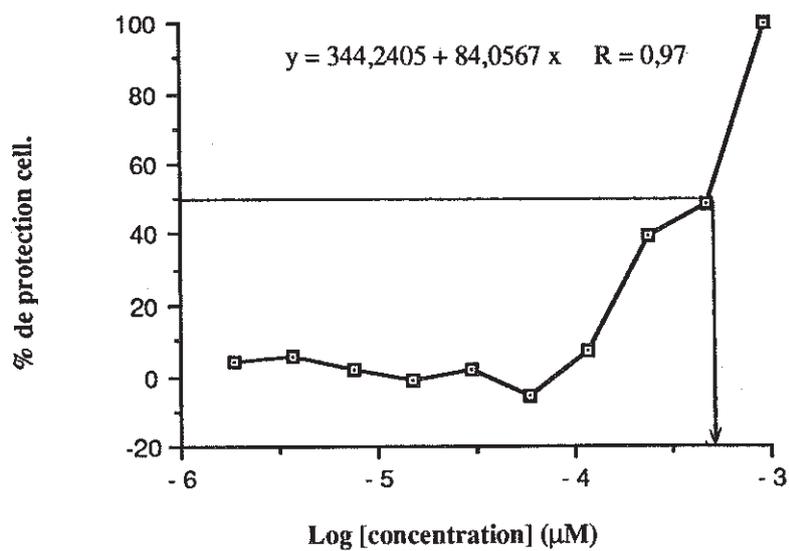


figure 34 : activité antivirale de la molécule DDC sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

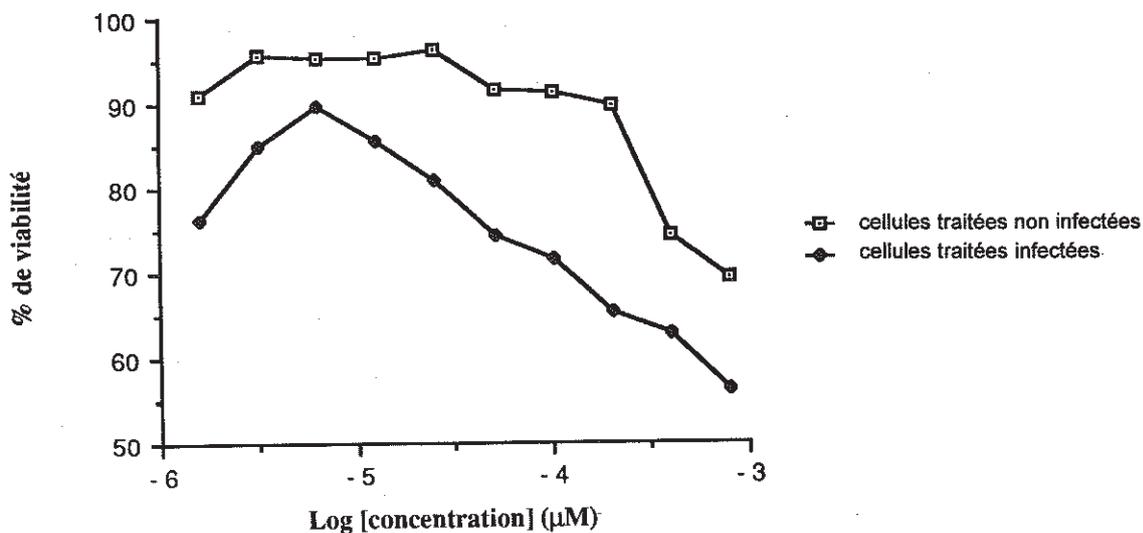


figure 35 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule DDC sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI.

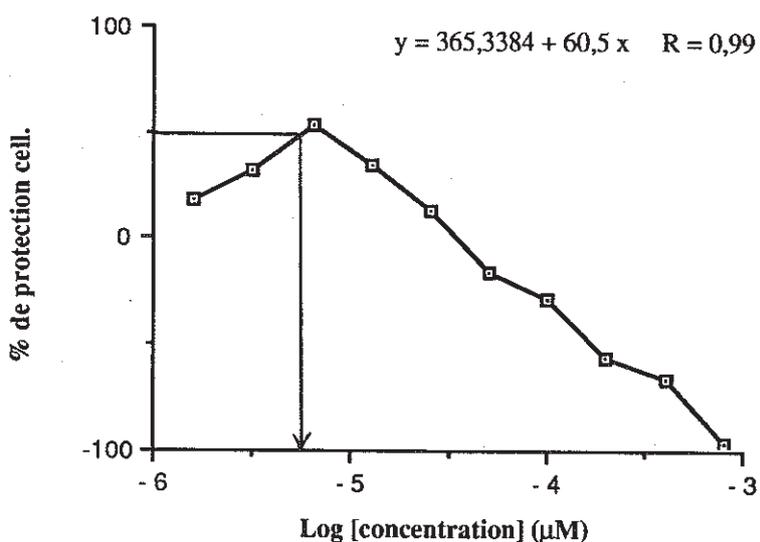


figure 36 : activité antivirale de la molécule DDC sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS.

	CC 50	CI 50	CI 50
		VISNA	MAEDI
JD 86	> 666 μM	370 μM	-
JD 87	> 833 μM	738 μM	non testée
JD 88	178 à 283 μM	-	-
JD 75	> 1500 μM	116 μM	-
JD 84	> 1500 μM	-	-
DDC	> 833 μM	315 μM	6,1 μM

Tableau 4 : tableau récapitulatif des valeurs de CC 50 et de CI 50 déterminées pour 6 molécules testées sur des cellules de PC infectées par le virus VISNA ou le virus MAEDI



III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS-A-VIS DES SOUCHES

VISNA ET MAEDI

Pour chaque molécule, nous avons établi une représentation graphique de la viabilité des cellules infectées traitées, qui reflète l'activité antivirale. La représentation graphique du pourcentage de protection cellulaire nous permet quant à elle, de définir la valeur de la CI 50 (fig. 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36).

Comme le montrent les figures 22, 24, 30, 32, les molécules JD 88 et JD 84 n'exercent aucune protection. Nous avons observé cette absence d'effet antiviral sur le virus VISNA comme sur le virus MAEDI.

La molécule JD 87 a été testée uniquement sur le virus VISNA. Elle ne protège les cellules que faiblement avec une CI 50 = 738 μ M. Cette molécule originale a été synthétisée en petite quantité, ce qui ne nous a pas permis de réaliser un essai sur le virus MAEDI.

Sur le virus VISNA, la molécule JD 86 montre une protection cellulaire qui augmente de façon régulière avec la concentration moléculaire : la CI 50 est de 370 μ M. Avec la souche MAEDI, la molécule ne protège pratiquement pas, même à des doses élevées.

La protection induite par la molécule JD 75, des cellules infectées par le virus VISNA, croît régulièrement avec la concentration moléculaire : cette molécule commence à être efficace dès les faibles concentrations (CI 50 = 116 μ M).

Par contre, aucune protection n'est observée avec le virus MAEDI.

La DDC protège les cellules du virus VISNA à des concentrations élevées et la CI 50 est de 315 μ M. La protection vis-à-vis du virus MAEDI n'est présente qu'à de faibles concentrations (CI 50 = 6,1 μ M).

Tous ces résultats sont regroupés dans le tableau 4.

IV - DISCUSSION

A l'heure actuelle seules trois molécules sont utilisées dans le traitement de l'infection par le VIH comme thérapeutique antivirale :

- l'AZT, 3'-azido-2', 3'-didéoxythymidine (ou zidovudine, RETROVIR)
- la DDC, 2', 3'-didéoxycytidine (ou zalcitabine, HIVID)
- et la DDI, 2', 3'-didéoxyinosine (ou didanosine, VIDEX)

Ces trois composés sont des analogues nucléosidiques dont l'action consiste en une inhibition sélective de la transcriptase inverse, enzyme spécifique des rétrovirus.

Parmi ces trois composés, la DDC nous a servi de molécule de référence. Nos résultats avec le virus VISNA et le virus MAEDI montrent son absence de toxicité aux concentrations moléculaires testées. Nous sommes ainsi en accord avec les données bibliographiques : THORMAR et Coll. (159) qui ont évalué la cytotoxicité de la DDC sur des cellules de PC de mouton par comptage avec un compteur Coulter, ont en effet déterminé une CC 50 > 100 µM.

La DDC est également décrite comme le composé nucléosidique le plus efficace *in vitro* en tant qu'inhibiteur de la réplication du virus VISNA-MAEDI. THORMAR et Coll, ont ainsi déterminé une CI 50 de 0,02 µM avec le virus VISNA et des résultats sensiblement identiques avec le virus MAEDI. Au cours de ses travaux, LARROUTUROU (87) confirme l'effet antiviral de cette molécule avec des valeurs de CI 50 respectivement égales à 0,30 µM et 0,28 µM avec les virus VISNA et MAEDI. Ces résultats divergent de ceux que nous avons obtenus au cours de nos expérimentations : l'activité antivirale de la DDC s'est en effet manifestée à des concentrations moléculaires beaucoup plus élevées.

Il est important de souligner que notre **protocole expérimental** diffère de ceux utilisés par THORMAR et LARROUTUROU (tableau 5).

- Le mode de lecture que nous avons choisi est en effet la méthode colorimétrique au MTT. Nous avons choisi cette méthode en raison de sa fiabilité, de sa facilité d'exécution et de sa rapidité ; elle permet d'évaluer en même temps la cytotoxicité et l'activité antivirale de la substance.

	Cellules		Traitement Inf. virale	Souche virale	Multiplicité d'infection	Incubation	% protect. déterminé par	Utilisation d'AB
	PC 6.10 ³ /puits	Tapis adhérent						
THORMAR (159)	PC 6.10 ³ /puits	Tapis adhérent	en même temps	Visna K 796	0,05	6 j	Inh. ECP / MGG	OUI
LARROUTUROU (87)	PC 2.10 ⁵ /puits	Tapis adhérent	en même temps	Visna K 796	0,15	6 j	Inh. ECP / MGG	OUI
NOTRE PROTOCOLE	PC 2.10 ⁵ /puits	cell. en suspension	en même temps	Visna K 796	0,5	5 j	altération viab. cell. / MTT	NON

Tableau 5 : comparaison de trois protocoles d'évaluation d'activité antivirale

- inf. : infection
- % protect. : pourcentage de protection cellulaire
- A B : antibiotiques
- PC : cellules de plexus choroïdes de mouton
- Inh. : inhibition
- viab. cell. : viabilité cellulaire

Au contraire la détermination de l'effet cythopathogène par la technique au MGG, utilisée par THORMAR et LARROUTUROU, est une méthode laborieuse basée sur l'observation au microscope de la formation de syncytia; elle est donc assez subjective et sujette à des erreurs. Ceci explique pourquoi l'utilisation de la technique au MTT tend à se généraliser lors des recherches de molécules à visée antirétrovirale.

- Initialement le nombre de cellules par puits est plus faible dans le protocole de THORMAR. Cependant, ces cellules sont laissées 4 ou 5 jours à l'étuve avant d'être infectées par le virus; elles ont donc le temps d'adhérer et de se multiplier.

- La technique au MGG nécessite une multiplicité d'infection plus faible de façon à dénombrer correctement les syncytia.

- Tous les résultats étant calculés en référence à des témoins cellules, l'emploi ou non d'antibiotiques n'a pas d'influence.

A côté de la DDC, nous avons testé deux séries de composés. Nos résultats avec le virus VISNA et le virus MAEDI montrent une reproductibilité des courbes de viabilité cellulaire traduisant la **cytotoxicité de la molécule**. Nous observons ainsi une absence de toxicité des molécules JD 86, JD 87, JD 75 et JD 84. Nos résultats s'accordent avec les données bibliographiques puisque JD 75 et JD 84 sont des analogues de l'uridine et ces composés sont toujours décrits comme peu toxiques.

Les molécules de la série **JD 86, JD 87, JD 88** sont des analogues nucléosidiques qui diffèrent entre eux par les substituants en position 5 de l'hétérocycle triazinique. Ils sont composés d'une base cyclique à six sommets possédant trois hétéroatomes d'azote en position 1, 3 et 6 et deux fonctions cétone en 2 et 4. Cette structure rappelle les bases pyrimidiques. L'hétérocycle est également relié à un sucre à six sommets, un β -D-ribose par son azote en position 6.

Avec JD 86 et JD 87, présentant respectivement un et deux groupements méthyle sur le carbone 5, nous n'observons aucune toxicité aux concentrations testées sur les virus VISNA et MAEDI. Cette toxicité est marquée avec la greffe d'un groupement propyle dans le cas de la molécule JD 88 avec une CC 50 variant de 178 μ M à 283 μ M.

En ce qui concerne **l'activité antivirale de ces composés**, elle est totalement inexistante pour JD 88 et très faible pour JD 86 et JD 87 avec des CI 50 respectivement de 370 et 738 μM . Compte tenu des valeurs élevées de CI 50 et donc d'un indice de sélectivité (CC 50/CI 50) insuffisamment important, l'intérêt de tels composés dans une stratégie antivirale est négligeable. A titre d'exemple, THORMAR obtient une CI 50 de 19 μM avec l'AZT et de 0,15 μM avec la DDI (159).

Les deux composés **JD 75** et **JD 84** présentent une analogie marquée avec l'uridine, nucléoside spécifique de l'ARN. Ils s'en distinguent par la présence d'un atome d'azote supplémentaire en position 6 et, en ce qui concerne la molécule JD 84, par la nature du groupement en 5. Le sucre fixé sur l'azote en 1 est un β -D-ribofuranose. Nous pouvons donc parler de la 6-aza-5-méthyl-uridine pour la molécule JD 75 et de la 6-aza-5-propyl-uridine pour la molécule JD 84.

Ces substances qui ne diffèrent entre elles que par leur groupement en 5 (un méthyle pour la molécule JD 75 et un propyle pour la molécule JD 84) n'exercent aucune action toxique vis-à-vis des cellules de PC et seule JD 75 présente une activité antivirale intéressante vis-à-vis du virus VISNA avec une CI 50 = 116 μM . Nous pouvons rapprocher notre résultat de celui obtenu par LARROUTUROU (87) avec une molécule fortement apparentée, la 6-aza-5,6-dihydro-5-méthyl-uridine dont la CI 50 était de 109 μM avec le virus VISNA. La différence entre ces deux molécules réside dans l'existence d'une insaturation en 5-6 qui ne semble modifier ni l'efficacité, ni la toxicité de la molécule : la valeur de la CI 90 de 424 μM obtenue par LARROUTUROU s'accorde également avec la CI 90 de 454 μM que nous obtenons avec la JD 75 (fig 26).

Peu de références dans la littérature bibliographique font mention des **composés actifs *in vitro* sur le virus VISNA** et encore moins sur **le virus MAEDI**. Celles-ci montrent cependant une concordance de la réponse des deux souches face à une activité antirétrovirale (87, 159). Ceci s'explique par leur réplication analogue, bien que l'effet cytopathique induit par le virus MAEDI se développe moins rapidement que pour la souche VISNA, et que les deux virus soient responsables de pathologies différentes. Pourtant, au cours de notre travail, nous avons constaté des résultats parfois contradictoires. En effet, si l'inefficacité de certaines molécules (JD 88 et JD 84) s'observe à la fois vis-à-vis du virus VISNA et du virus MAEDI, l'efficacité de la molécule JD 75 constatée avec la souche VISNA n'apparaît pas avec la souche MAEDI. De même l'efficacité de la molécule JD 86 n'a pu être déterminée vis-à-vis du virus MAEDI. La faible quantité de JD-87 dont nous avons disposé,

ne nous a pas permis de déterminer la capacité de protection de cette molécule vis-à-vis du MAEDI et donc de confirmer ou d'infirmer la faible efficacité qui a été observée avec le virus VISNA.

En fait nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes avec la souche MAEDI qui, rappelons le, présente un titre infectieux inférieur à celui de la souche VISNA utilisée. Au cours de certaines manipulations, nous avons ainsi constaté de faibles différences entre les DO relatives aux cellules non infectées traitées et les DO relatives aux cellules infectées traitées. Or un minimum de diminution des DO de 50% est nécessaire pour pouvoir apprécier l'efficacité d'un composé antiviral (29). Les faibles différences que nous avons observées peuvent s'expliquer par la lenteur du virus MAEDI à induire un effet cytopathique et par son titre infectieux moindre. Nous avons cependant tenté de minimiser ces inconvénients en prolongeant le temps d'incubation à 9 jours et en augmentant le volume de suspension virale dans chaque cupule. La durée de 9 jours représente une limite au delà de laquelle les cellules meurent. Un autre facteur doit être pris en compte : l'activité déshydrogénase des cellules peut persister un certain temps après la mort des cellules et ainsi être responsable en partie des fortes DO relatives aux cellules infectées traitées.

En ce qui concerne la molécule JD 75, seule molécule originale pour laquelle nous avons pu mettre en évidence à la fois une absence de toxicité cellulaire et une certaine activité antivirale, il serait intéressant d'évaluer son action sur la transcriptase inverse pour confirmer son mécanisme d'action.

Enfin, nous pouvons conclure en disant que la recherche de l'activité antivirale de ces six molécules s'est faite à partir de cellules primaires, plus sensibles à l'infection et plus difficiles à entretenir que les cellules de lignée. Il est bien connu pour le VIH qu'en fonction du type de cellules utilisées, la réponse face à l'infection peut être différente et ceci est à l'origine de variations dans les résultats.

CONCLUSION

Devant l'ampleur du SIDA, l'intérêt pour les lentivirus animaux s'est accru depuis quelques années et leur étude approfondie a permis de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques communes.

Ils sont responsables de maladies chroniques dégénératives, d'installation progressive après une période d'incubation généralement longue. L'anémie infectieuse des chevaux, l'encéphalite des chevreux et le SIDA pédiatrique sont des exceptions parmi les maladies lentivirales, car elles peuvent être fatales dans les mois qui suivent l'infection. La pathogénèse n'est pas encore complètement élucidée mais le développement des lésions se fait par l'intermédiaire du système immunitaire de l'hôte.

La lignée monocytes/macrophages représente *in vivo* la principale cible cellulaire pour les lentivirus des ongulés (VISNA-MAEDI, CAEV, EIAV, BIV). Le tropisme cellulaire des lentivirus de primates et du lentivirus félin se fait préférentiellement vers les lymphocytes CD 4.

En ce qui concerne les cibles tissulaires, tous les lentivirus ont un tropisme nerveux et la leucoencéphalite du chevreau, bien que moins démyélinisante, s'apparente à celle provoquée par le HIV. L'apparition d'une lymphadénopathie est également fréquente, non seulement avec les virus de l'immunodéficience (HIV, SIV, FIV, et BIV) mais aussi avec le lentivirus ovin. Les poumons représentent une autre atteinte organique (HIV, MAEDI, CAEV, SIV, FIV); les lésions de pneumonie interstitielle lymphoïde associées à la forme MAEDI et caractérisées par des infiltrations de lymphocytes et de macrophages, sont semblables à celles du SIDA.

L'observation des lentivirus au microscope électronique met en évidence des particules extracellulaires sensiblement sphériques présentant une capsidie condensée et des spicules en forme de T ou de Y à la surface de l'enveloppe. Tous ces lentivirus ont la propriété de produire des variants antigéniques et sont, en règle générale, de pauvres inducteurs d'anticorps neutralisants.

Les similitudes entre les lentivirus sont renforcées par leur relation génétique. Le génome lentiviral est constitué de deux molécules d'ARN simple-brin, polyadénylées, longues de 8000 à 10000 paires de bases et associées à leurs extrémités par des liaisons non covalentes.

Les séquences nucléotidiques des génomes lentiviraux codent pour trois précurseurs des protéines structurales : gag, pol, env.

- La plus grande conservation nucléotidique se retrouve au niveau du gène pol codant pour la transcriptase inverse, ce qui a permis de tracer un arbre phylogénétique. Cet arbre montre que les virus VISNA-MAEDI, CAEV et FIV sont plus étroitement liés entre eux qu'avec les lentivirus humains et simiens. Ces deux groupes ont divergé précocément du BIV et de l'EIAV.
- Au contraire, une grande diversité est retrouvée au niveau du gène env, qui est porteur des épitopes antigéniques et responsable de la liaison au récepteur membranaire. Les glycoprotéines de surface du virus VISNA-MAEDI et du CAEV ont une taille supérieure à celle des autres lentivirus.
- Une bonne conservation du gène gag est également observée. Ce gène code pour trois protéines de capsid (dont l'une peut être clivée en deux polypeptides de faible poids moléculaire) et des similitudes significatives sont relevées dans les séquences d'acides aminés des protéines majeures de core.

A la différence des autres rétrovirus, les lentivirus sont capables de coder des protéines supplémentaires régulatrices de la réplication virale. Leur nombre varie en fonction du lentivirus considéré, mais les protéines transactivatrices Tat et Rev sont toujours présentes. Le génome de l'EIAV est le plus simple avec ces deux polypeptides et le génome des lentivirus de primates est le plus complexe avec 8 voire 9 gènes régulateurs.

Le virus VISNA-MAEDI et le HIV diffèrent du point de vue de leurs cibles, de leurs récepteurs cellulaires et de leurs pathologies. Ils ont cependant en commun de nombreuses caractéristiques réplicatives, génétiques et pathogénétiques et présentent des sensibilités analogues à l'inhibition *in vitro* (même s'il est difficile de comparer les effets inhibiteurs de ces deux lentivirus du fait de la différence de support cellulaire). Le virus VISNA-MAEDI peut donc servir comme modèle animal *in vitro* pour le criblage de nouveaux agents antiviraux en vue de présélectionner les composés actifs qui seront par la suite évalués sur la réplication du HIV.

Au cours de notre travail expérimental, parmi les six molécules originales que nous avons testées, la 6-aza-5-méthyl-uridine (JD 75) émerge comme le candidat le plus intéressant contre la réplication

du virus VISNA-MAEDI. Ce dérivé non toxique de l'uridine apparaît donc comme un inhibiteur potentiel de la réplication *in vitro* de l'HIV, et pourrait faire l'objet d'études sur différents types de cellules humaines.

A l'heure actuelle, des quantités innombrables de molécules sont synthétisées et testées *in vitro* chaque année. Très peu d'entre elles s'avèrent efficaces. Ces molécules appartiennent à différentes familles, notamment celle des analogues nucléosidiques, et sont classées selon leur mécanisme d'action. L'effet inhibiteur de ces molécules s'exerce à différents niveaux de la réplication. Dans le traitement de l'infection par le HIV, l'orientation actuelle se fait donc vers la mise en place de polythérapies, dont le but est une action complémentaire des substances utilisées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - **ACHOUR M.A., AZIZEN S., GHEMMAM Y. and MAZARI B.**
Arthrite-encéphalite caprine en Algérie.
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 1994, 47 (2), 159-161.

- 2 - **ADAMS D.S. and GORHAM J.R.**
The gp 135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology.
Res. Vet. Sci., 1986, 40, 157-160.

- 3 - **ADAMS D.S., OLIVER R.E., AMEGHINO E., DEMARTINI J.C., VERWOERD D.W., HOUWERS D.J., WAGHELA S., GORHAM J.R., HYLLSETH B., DAWSON M., TRIGO F.J. and Mc GUIRE T.C.**
Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection.
Vet. Rec., 1984, 115, 493-495.

- 4 - **AGRIMI P., BRACA G., LEGROTTAGLIE R., RENZONI G., TACCINI E. and TOLARI F.**
Arthrite-encefalite delle capre. Ricerche virologiche ed osservazioni anatomo-cliniche.
Summa, 1986, 3, 95-100.

- 5 - **AHMAD S., LOHMAN B., MARTHAS M., GIAVEDONI L., EL AMAD Z., HAIGWOOD N.L., SCANDELLA C.J., GARDNER M.B., LUCIW P.A. and YILMA T.**
Reduced virus load in rhesus macaques immunized with recombinant gp 160 and challenged with simian immunodeficiency virus.
AIDSRes. Hum. Retroviruses, 1994, 10 (2), 195-204.

- 6 - **ALLEY M.C., SCUDIERO D.A., MONKS A., HURSEY M.L., CZERWINSKI M.J., FINE D.L., ABBOTT B.J., MAYO J.G., SHOEMAKER R.H. and BOYD M.R.**
Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay.
Cancer Res., 1988, 48, 584-601.

- 7- **ALTMAN F.P.**
Tetrazolium salts and formazans.
In : *Progress in histochemistry and cytochemistry*.
Stuttgart, Allemagne : Gustav Fischer Verlag, 1976, p.29.
- 8 - **ARDOIN P.**
Techniques de base. Virologie et diagnostic virologique.
Paris : Ed. Maloine S.A., 1983.
- 9 - **ASSO J., GUIGUEN F. and LERONDELLE C.**
Induction de l'expression du virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre chez les animaux séropositifs.
S.T.A.L., 1990, 15, 101-103.
- 10 - **AYISI N.K., GUPTA S.V. and QUALTIERE L.F.**
Modified tetrazolium-based colorimetric method for determining the activity of anti-HIV compounds.
J. Virol. Methods, 1991, 33, 335-344.
- 11 - **BARLOUGH J., EAST N., ROWE J.D., VAN HOOSEAR K., DE ROCK E., BIGORNIA L. and 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, 1994, 50, 101-113.
- 12 - **BASZLER T.V., HARWOOD W.G., LESTER K.L., DAVIS W.C. and KNOWLES D.P.**
Characterization of caprine microglial cells and *in vitro* infection with caprine arthritis-encephalitis lentivirus.
Lab. Invest., 1994, 70 (6), 933-943.

- 13 - **BEEBE A.M., FAITH T.G., SPARGER E.E., TORTEN M., PEDERSEN N.C. and DANDEKAR S.**
Evaluation of *in vivo* and *in vitro* interactions of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus.
AIDS, 1994, 8 (7), 873 - 878.
- 14 - **BEL-KAHLA A., TAINURIER D. and ZAIEN B.**
Apparition du syndrome arthrite-encéphalite dans un troupeau de chèvres en Tunisie.
Rev. Med. Vet., 1991, 142, 111-113.
- 15 - **BOUCHARD N., LARENAUDIE B., and REMOND M.**
Le Visna du mouton.
Bull. Soc. Vet. Prat. de France, 1980, 64 (9), 755-772.
- 16 - **BOUILLANT A.M., RUCKERBAUER G.M. and NIELSEN K.H.**
Replication of the bovine immunodeficiency-like virus in diploid and aneuploid cells : permanent latent and virus-productive infections *in vitro*.
Res. Virol., 1989, 140, 511-529.
- 17 - **BRODIE S.J., de la CONCHA-BERMEJILLO A., KOENIG G., SNOWDER G.D. and DEMARTINI J.C.**
Maternal factors associated with prénatal transmission of ovine lentivirus.
J. Inf. Dis., 1994, 169 (3), 653-657.
- 18 - **BROWN W.C., BISSEY L. and LOGAN K.S.**
Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes.
J. Virol, 1991, 65, 3359-3364.

- 19 - **BRUNNER D. and PEDERSEN N.C.**
Infection of peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* with feline immunodeficiency virus.
J. Virol., 1989, 63, 5483-5488.
- 20 - **BULGIN M.S.**
Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats.
Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract., 1990, 6, 691-704.
- 21 - **BURGU I., AKCA Y., ALKAN F., OZKUL A., KARAOGLU T. and CABALAR M.**
Antibody prevalence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in goats in Turkey.
DTW. Dtsh. Tierärztl. Wochenschr., 1994, 101 (10), 390-391.
- 22 - **CALLANAN J.J., HOSIE M.J. and JARRET O.**
Transmission du virus de l'immunodéficience féline de la mère au chaton.
Vet. Rec., 1991, 128, 332 - 333.
- 23 - **CARPENTER S., MILLER L.D., ALEXANDERSEN S., WHETSTONE C.A.,
VAN DER MAATEN M.J., VIUFF B., WANNEMUEHLER Y., MILLER J.M. and ROTH J.A.**
Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus.
J. Virol, 1992, 66, 1074-1083.
- 24 - **CAZABAN C.**
Contribution à l'étude du virus de l'immunodéficience féline (FIV). L'infection expérimentale par le FIV de chatons nés de mères séropositives.
(Thèse vétérinaire, Lyon, 1993, 99 p).

- 25 - **CHAKRABARTI L., CUMONT M.C., MONTAGNIER L. and HURTREL B.**
Variable course of primary simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes : relation to disease progression.
J. Virol., 1994, 68 (10), 6634-6643.
- 26 - **CHAKRABARTI L., ISOLA P., CUMONT M.C., CLAESSENS-MARIE M.A., HURTREL M., MONTAGNIER L. and HURTREL B.**
Early stages of simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes. Evidence for high viral load and successive populations of target cells.
Am. J. Pathol., 1994, 144 (6), 1226-1237.
- 27 - **CHEEVERS W.P., KNOWLES D.P., Mc GUIRE T.C., BASZLER T.V. and HULLINGER G.A.**
Caprine arthritis-encéphalitis lentivirus (CAEV) challenge of goats immunized with recombinant vaccinia virus expressing CAEV surface and transmembrane envelope glycoproteins.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1994, 42 (3-4), 237-251.
- 28 - **CHEEVERS W.P., STEM T.A., KNOWLES D.P. and Mc GUIRE T.C.**
Precursor polypeptides of caprine arthritis-encéphalitis lentivirus structural proteins.
J. Gen. Virol., 1988, 69, 675-681.
- 29 - **CHEVALERIAS D.**
Adaptation de la méthode colorimétrique au sel de tétrazolium à l'évaluation de la viabilité des cellules infectées par le virus Visna.
(Thèse Pharm. Limoges, 1995).
- 30 - **CLEMENTS J.E., ZINCK M.C., NARAYAN O. and GABUZDA D.H.**
Lentivirus infection of macrophages.
Immunol. Ser., 1994, 60, 589-600.

- 31 - **COGGINS L. and NORCROSS N.L.**
Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia.
Cornell Vet., 1970, 60, 330-335.
- 32 - **CORK L.C., HADLOW W.J., CRAWFORD T.B., GORHAM J.R. and PIPER R.C.**
Infectious leukoencephalomyelitis of young goats.
J. Inf. Dis., 1974, 129, 134-141.
- 33 - **CRUCIERE C.**
L'anémie infectieuse des équidés : virologie, pathogénie et diagnostic sérologique.
Pratique Vétérinaire équine, 1983, 3, 99-101.
- 34 - **CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. and JACKSON T.A.**
Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus.
Am. J. Vet. Res., 1981, 42, 1795-1797.
- 35 - **CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D., SCHMERR M.J.F. and BROGDEN K.A.**
Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep.
Vet. Microbiol., 1988, 17, 237-250.
- 36 - **DANIEL M.D., LETVIN N.L., KING N.W., KANNAGI M., SEGHAL P., HUNT R.D., KANKI P.,
ESSEX M. and DESROISIERS R.C.**
Isolation of a T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques.
Science, 1985, 228, 1201-1204.
- 37 - **DENIZOT F. and LANG R.**
Rapid colorimétric assay for cell growth and survival. Modifications to the tétrazolium dye
procedure giving improved sensitivity and reliability.
J. Immunol. Methods, 1986, 89, 271-277.

- 38 - **DION F.**
Mise en place et évolution de la prophylaxie du visna-maedi en France
Le Point Vétérinaire, 1991, 23 (139), 39-51.
- 39 - **DOLF G. and RUFF G.**
A DNA fingerprinting band associated with the susceptibility to CAE virus-induced arthritis in goats.
Br. Vet. J., 1994, 150 (4), 349-353.
- 40 - **DOW S.W., POSS M.L. and HOOVER E.A.**
Feline Immunodeficiency Virus infects cat central nervous system.
J. Vet. Int. Med., 1990, 4 (2), 109.
- 41 - **DUA N., REUBEL G., MOORE P.F., HIGGINS J. and PEDERSEN N.C.**
An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1994, 43 (4), 337-355.
- 42 - **ELDER J., SCHNÖLZER M. and HASSELKUS-LIGHT C.**
Identification of the proteolytic processing sites within the gag and pol polyproteins of feline immunodeficiency virus.
J. Virol., 1993, 67, 1869-1876.
- 43 - **ELLIS T.M., ROBINSON W.F. and WILCOX G.E.**
The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encéphalitis virus.
Aust. Vet. J., 1988, 65, 69-73.

- 44 - **EMAU P., Mc CLURE H.M., ISAHAKAI M., ELSE J.G., and FULTZ P.N.**
Isolation from African Syke's monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human
an simian immunodeficiency viruses.
J. Virol., 1991, 65, 2135-2140.
- 45 - **ENGLISH R.V., JOHNSON S.M. and DOUGLAS D.H.**
In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus.
J. Virol., 1993, 67, 5175-5186.
- 46 - **FEDER B. H. and HURVITZ A.I.**
Feline Immunodeficiency Virus infection in 100 cats and association with lymphoma.
J. Vet. Int. Med., 1990, 4 (2), 110.
- 47 - **FOIL L.D., STAGE D., ADAMS W.V. and ISSEL C.J.**
Observations of tabanid feeding on mares and foals.
Am. J. Vet. Res., 1985, 46, 1111-1113.
- 48 - **FRIDELL R.A., PARTIN K.M., CARPENTER S. and CULLEN B.R.**
Identification of the activation domain of equine infectious anemia virus rev.
J. Virol., 1993, 67 (12), 7317-7323.
- 49 - **FULTZ P.N.**
SIV smm Pbj14 : an atypical lentivirus.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1994, 188, 65-76.
- 50 - **FULTZ P.N. and ZACK P.M.**
Unique lentivirus-host interactions : SIV smm PB j14 infection of macaques.
Virus Res., 1994, 32 (2), 205-225.

- 51 - **GANTER M.**
Clinical aspect of caprine arthritis and encephalitis.
Tierarztl. Prax., 1993, 21 (6), 517-520.
- 52 - **GELDER BLOM H.R., ÖZEL M. and GHEYSEN D.**
Morphogenesis and fine structure of lentiviruses.
In : *Animal models in AIDS*.
Amsterdam : Elsevier, 1990, 1-26
- 53 - **GEORGSSON G.**
Neuropathologic aspects of lentiviral infections.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1994, 724, 50-67.
- 54 - **GEORGSSON G., TORSTEINSDOTTIR S., PETURSSON G., PALSSON P.A.
and ANDRESSON O.**
Role of the immune response in Visna, a lentiviral central nervous system disease of sheep.
In : *Animal models of HIV and other retroviral infections*
S. Karger, Basel, 1993, 183-195.
- 55 - **GONDA M.A.**
Bovine immunodeficiency virus.
AIDS, 1992, 6, 759-776.
- 56 - **GONDA M.A. and OBERSTE M.S.**
AIDS - The human immunodeficiency virus : molecular and structural aspects of its biology.
In : *Control of Virus Diseases*.
New York : E. Kurstak ed., 1992, 3-31.

- 57 - **GONDA M.A., BRAUN M.J., CARTER S.G., KOST T.A., BESS J.W., ARTHUR L.O. and VAN DER MAATEN M.J.**
Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus.
Nature, 1987, 330, 388-391.
- 58 - **GONDA M.A., LUTHER D.G., FONG S.E. and TOBIN G.J.**
Bovine immunodeficiency virus : molecular biology and virus-host interactions.
Vir. Res. 1994, 32, 155-181.
- 59 - **GONZALES L., GELABERT J.L., MARCO J.C. and SAEZ de OCARIZ C.**
Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain.
Vet. Rec., 1987, 120, 102-109.
- 60 - **GRASSE P.P. and DOUMENC D.**
Abrégé de Zoologie.
Paris : Masson, 1993, tome I, 220-224.
- 61 - **HARBOUR D.A., WILLIAMS P.D., GRUFFYD-JONES T.J., BURBRIDGE J. and PEARSON G.R.**
Isolation of a T- lymphotropic lentivirus from a persistently domestic cat.
Vet. Record, 1988, 122, 84-86.
- 62 - **HARMACHE A., BOUYAC M., AUDOLY G., HIEBLOT C., PEVERI P., VIGNE R. and SUZAN M.**
The Vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle.
J. Virol., 1995, 69 (6), 3247-3257.

63 - **HART S.W. and NOLTE I.**

Hemostatic disorders in feline immunodeficiency virus - seropositive cats .

J. Vet. Intern. Med. , 1994, 8 (s), 355-362.

64 - **HEISE C., MILLER C.J., LAKNER A. and DANDEKAR S.**

Primary acute simian immunodeficiency virus infection of intestinal lymphoid tissue is associated with gastrointestinal dysfunction.

J. Infect. Dis., 1994, 169 (5), 1116-1120.

65 - **HIRSCH V.M. and JOHNSON P.R.**

Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses.

Virus Res., 1994, 32, 183-203.

66 - **HIRSCH V.M., ZACK P.M., VOGEL A.P. and JOHNSON P.R.**

Simian immunodeficiency virus infection of macaques: end-stage disease is characterized by widespread distribution of DNA in tissues.

J. Inf. Dis., 1991, 163, 976-988.

67 - **HOPPER C.D., SPARKES A.H., GRUFFYDD-JONES T.J., CRISPIN S.M., MUIR P., HARBOUR R.A. and STOKES C.R.**

Clinical and laboratory findings in cats infected with Feline Immunodeficiency Virus.

Vet. Rec., 1989, 125 (13), 341-346.

68 - **HOSIE M.J.**

The development of a vaccine against feline immunodeficiency virus.

Br. Vet. J., 1994, 150 (1), 25-39.

- 69 - **HOSIE M.J., OSBORNE R., YAMAMOTO J.K., NEIL J.C. and JARRETT O.**
Protection against homologous but non heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccines.
J. Virol., 1995, 69 (2), 1253-1255.
- 70 - **HOTZEL I., BASTOS E. de S., RAVAZZOLO A.P. and MOOJEN V.**
Caprine arthritis-encéphalitis virus : isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil.
Braz. J. Med. Biol. Res., 1993, 26 (11), 1175-1179.
- 71 - **HOUWERS D.J.**
Ovine lentivirus infections (maedi-visna, zwoergerziekte). Aspects of immunology, pathology, epidemiology and control.
Thèse 8.12.1988. Université d'Utrecht
- 72 - **HUET T., CHEYNIER R., MEYRHANS A., ROELANTS G. and WAIN-HOBSON S.**
Genetic organisation of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1.
Nature, 1990, 345, 356-359.
- 73 - **HULLINGER G.A., KNOWLES D.P., Mc GUIRE T.C. and CHEEVERS W.P.**
Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells.
Virology, 1993, 192 (1), 328-331.
- 74 - **IDOUX E.**
A propos de quelques pathologies infectieuses équine. Traitement et prophylaxie.
(Thèse Pharm., Clermond-Ferrand, 1993, 174p).
- 75 - **ISHIDA T. and TOMADA I.**
Clinical staging of Feline Immunodeficiency Virus infection.
Jap. J. Vet. Sci., 1990, 52, 645-648.

- 76 - **ISHIDA T., WASHIZU T., TORIYABE K. and MOTOYOSHI S.**
Detection of feline T - lymphotropic virus infection in japanese domestic cats.
Jap. J. Vet. Sci., 1988, 50 (1), 39-44.
- 77 - **ISHIDA T., WASHIZU T., TORIYABE K., MOTOYOSHI S., TOMODA I. and PEDERSEN N.C.**
Feline Immunodeficiency Virus infection in cats of Japan.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1989, 194 (2), 221-225.
- 78 - **ISRAEL Z.R., EDMONSON P.F., MAUL D.H., O'NEIL S.P., MOSSMAN S.P., THIRIART C., FABRY L., VAN OPSTAL O., BRUCK C. and BEX F.**
Incomplete protection, but suppression of virus burden, elicited by subunit simian immunodeficiency virus vaccines.
J. Virol., 1994, 68(3), 1843-1853.
- 79 - **ISSEL C.J. and FOIL L.D.**
Studies on equine infectious virus. Transmission by insects.
J.A.V.M.A., 1984, 184 (3), 293-297.
- 80 - **ISSEL C.J., HOROHOV D.W., LEA D.F., ADAMS J.R., HAGIUS S.D., Mc MANUS J.M., ALLISON A.C. and MONTELARO R.C.**
Efficacy of Inactivated Whole-virus and Subunit vaccines in preventing infection and disease caused by Equine Infectious Anemia Virus.
J. Virol., 1992, 3398-3408.
- 81 - **ISSEL C.J., RUSHLOW K., FOIL L.D. and MONTELARO R.C.**
A perspective on Equine Infectious Anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis.
Vet. Microb., 1988, 17, 251-286.

- 82 - **JIN M.J., HUI H., ROBERTSON D.L., MULLER M.C., BARRE-SINOUSI F., HIRSCH V.M., ALLAN J.S., SHAW G.M., SHARP P.M. and HAHN B.H.**
Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from west African green monkeys.
EMBO J., 1994, 13 (12), 2935-2947.
- 83 - **JOHNSON L.K., MEYER A.L. and ZINK M.C.**
Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, virus rescue and PCR.
Clin. Immunol. Immunopathol., 1992, 65, 254-260
- 84 - **KÖHL S. and SCHLLER W.**
Serological survey for Felina Immunodeficiency Virus among cats in Austria.
Wiener tierärztliche monatschrift, 1989, 76 (6), 185-189.
- 85 - **KONO Y., KOBAYASI K., FUKUNAGA Y.**
Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses.
Arch. Virol., 1973, 41, 1-10.
- 86 - **LACKNER A.A., VOGEL P., RAMOS R.A., KLUGE J.D. and MARTHAS M.**
Early events in tissues during infection with pathogenic (SIV mac 239) and nonpathogenic (SIV mac 1A11) molecular clones of simian immunodeficiency virus.
Am. J. Pathol., 1994, 145 (2), 428-439.
- 87 - **LARROUTUROU S.**
Activité *in vitro* de substances antirétrovirales contre le virus Visna-Maedi. Evaluation de plusieurs méthodes.
(Thèse Doct. Pharm., Limoges, 1993, n°302B).

- 88 - **LAURENT - STEINER S.**
L'immunité maternelle chez des chatons issus de mères infectées par le virus de l'immunodéficience féline et le virus leucémogène félin.
Mémoire de D.E.A. Ecologie microbienne, 1992.
- 89 - **LEMAITRE M., and ZERIAL A.**
Méthodes permettant le criblage et l'évaluation *in vitro* d'activités inhibitrices de la réplication du V.I.H.
Revue française des laboratoires, 1990, 216, 43-50.
- 90 - **LERONDELLE C.**
L'infection de la mamelle par le virus de l'arthrite encéphalite caprine (CAEV).
Sci. Vet. Med. Comp., 1988, 90, 139-143.
- 91 - **LUTZ H., LEHMAN R., WINKLER G., KOTTWITZ B., DITTMER A., WOLFENSBERGER C. and ARNOLD P.**
Feline Immunodeficiency Virus in Switzerland : clinical and epidemiological features in comparaison with Feline Leukemia Virus and Feline Coronavirus.
Schweizer archiv für tierheilkunde, 1990, 132 (5), 217-225.
- 92 - **MAGNANI M., ROSSI L., FRATERNALE A., SILVOTTI L., QUINTAVALLA F., PIEDIMONTE G., MATTEUCI D., BALDINOTTI F. and BENDINELLI M.**
Feline immunodeficiency virus infection of macrophages ; *in vitro* and *in vivo* inhibition by dideoxycytidine-5'-triphosphate-loaded erythrocytes.
AIDS Res. Hum. Retrovir., 1994, 10 (9), 1179-1186.
- 93 - **MALMQUIST W.A., BARNETT D. and BECVAR C.S.**
Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line.
Arch. Virol., 1973, 42, 361-370.

- 94 - **MARSH H.**
Progressive pneumonia in sheep
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1923, 62, 458-473.
- 95 - **MATSUO K., NISHINO Y. and KIMURA T.**
Highly conserved epitope domain in major core protein p24 is structurally similar among human, simian and feline immunodeficiency virus.
J. Gen. Virol., 1992, 73, 2445-2450.
- 96 - **MATTHEWS R.E.F.**
Classification et nomenclature des virus.
Paris : Masson ed., 1980
- 97 - **MAURY W.**
Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus.
J. Virol., 1994, 68 (10), 6270-6279.
- 98 - **Mc NAB W.B., JACOBS R.M. and SMITH H.E.**
A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and associations between test results, production records and management practices.
Can. J. Vet. Res., 1994, 58 (1), 36-41.
- 99 - **MDURVWA E.G., OGUNBIYI P.O., GAKOU H.S. and REDDY P.G.**
Pathogenic mechanisms of caprine arthritis-encephalitis virus.
Vet. Res. Commun., 1994, 18 (6), 483-490.
- 100 - **MONICAT F.**
Facteurs de risque des arthrites des caprins.
In : *Compte-rendu d'enquête Ecopathologie.*
Centre d'écopathologie de Lyon, 1988.

- 101 - **MONTAGNIER L., DAUGUET C., AXLER C., CHAMARET S., GRUEST J., NUGEYRE M.T., REY F., BARRE-SINOUSI F. and CHERMANN J.C.**
A new type of retrovirus isolated from patients presenting with lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndrome : structural and antigenic relatedness with EIA virus.
Ann. Virol. (Inst. Pasteur), 1984, 135, 119-134.
- 102 - **MORAILLON A.**
L'infection du chat par le Feline Immunodeficiency Virus en France, des précisions.
Ann. Med. Vet., 1989, 133 (3), 221-222.
- 103 - **MORAILLON A.**
L'infection du chat par le virus de l'immunodéficience féline.
Rec. Med. Vet., 1990, 166, 593-599.
- 104 - **MORNEX J.F., LENA P., LOIRE R., COZON G., GREENLAND T., GUIGEN F., JACQUIER M.R. and CORDIER G.**
Lentivirus-induced interstitial lung disease : pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus.
Vet. Res., 1994, 25, 478-488.
- 105 - **MOTHA M.X. and RALSTON J.C.**
Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk.
Vet. Microbiol., 1994, 38 (4), 359-367.
- 106 - **MULLER M.C., SAKSENE N.K., NERRIENET E., CHAPPEY C., HERVE V.A., DURAND J.P., LEGAL-CAMPODONICO P., LANG M.C, DIGOUTTE J.P., GEORGES A.L., GEORGES-COURBOT M.C., SONIGO P. and BARRE-SINOUSI F.**
Simian immunodeficiency viruses from central and Western Africa : evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys.
J. Virol., 1993, 67, 1227-1235.

- 107 - **MULUNEH A.**
Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany.
Zentralbl. Veterinarmed. B., 1994, 41 (10), 679-684.
- 108 - **MURPHEY-CORB M., MARTIN L.N., RANGAN S.R.S., BASKIN G.B., GORMUS B.J., WOLF R.H., ANDES W.A., WEST M. and MONTELARO R.C.**
Isolation of a HTLV-III related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys.
Nature, 1986, 321, 435-437.
- 109 - **NARAYAN O. and CLEMENTS J.E.**
Biology and pathogenesis of lentivirus.
J. Gen. Virol., 1989, 70, 1617-1639.
- 110 - **NARAYAN O., CLEMENTS J.E., STRANDBERG J.D., CORK L.C. and GRIFFIN D.E.**
Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats.
J. Gen. Virol., 1980, 50, 69-79.
- 111 - **NARAYAN O., ZINK M.C., GORELL M., Mc ENTEE M., SHARMA D. and ADAMS R.**
Lentivirus induced arthritis in animals.
J. Rheumatol., 1992, 32 (19), 25-32.
- 112 - **NASH J.W., HANSON L.A. and ST CYR COATS K.**
Detection of bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction.
Am. J. Vet. Res., 1995, 56 (4) 445-449.

- 113 - **NORMAN S. and SMITH M.C.**
Caprine arthritis-encephalitis : review of the neurologic form in 30 cases.
J.A.V.M.A, 1983, 182, 1342-1345.
- 114 - **OSBORNE R., RIGBY M., SIEBELINK K., NEIL J.C. and JARRETT O.**
Virus neutralization reveals antigenic variation among feline immunodeficiency virus isolates.
Gen. Virol., 1994, 75 (12), 3641-3645.
- 115 - **PANCINO F., FOSSATI I. and CHAPPEY C.**
Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins.
Virology, 1993, 192, 659-662.
- 116 - **PARODI A.L., FEMENIA F., MORAILLON A., CRESPEAU F. and FONTAINE J.J.,**
Histopathological changes in lymph nodes of cats experimentally infected with the feline immunodeficiency virus (FIV)
J.Comp. Pathol., 1994, 111 (2) , 165-174.
- 117 - **PAUWELS R., BALZARINI J., BABA M., SNOECK R., SCHOLS D.,
HERDEWIJN P., DESMYTER J. and DE CLERQ E.**
Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds.
J. Virol. Methods, 1988, 20, 309-321.
- 118 - **PAYMENT P. and TRUDEL M.**
Manuel de techniques virologiques.
Paris : Ellipses, 1989, p31.

- 119 - **PEDERSEN N., TORTEN M., RIDEOUT B., SPARGER E., TONACHINI T., LUCIW P.A., ACKLEY C., LEVY N. and YAMAMOTO J.K.**
Feline Leukemia Virus infection as a potentiating cofactor for primary and secondary stages of experimentally induced Feline Immunodeficiency Virus infection.
J. Virol., 1990, 64 (2), 598-606.
- 120 - **PEDERSEN N.C.**
Feline retrovirus infections. Developments in biological standardization.
Prog. An. Retrov. , 1990, 72, 149-155.
- 121 - **PEDERSEN N.C., HO E.W., BROWN M.L. and YAMAMOTO J.K.**
Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome.
Science, 1987, 235, 790-793.
- 122 - **PEKELDER J.J., VEENINK G.J., AKKERMANS J.P., Van ELDIK P., ELVING L. and HOUWERS D.J.**
Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs.
Vet. Rec., 1994, 134, 348-350.
- 123 - **PERETZ G., BUGNARD F. and CALAVAS D.**
Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis.
Vet. Res., 1994, 25 (2), 322-326.
- 124 - **PERRIN G., POLACK B. and GUERRAULT P.**
Cas clinique : encéphalomyélite du jeune caprin.
Point Vet., 1985, 17, 585-586.

- 125 - **PERRIN G., POLACK B., MONICAT F., FLECHE-SEBAN C., RUSSO P., VITU C., ASSO J. and SAVEY M.**
Maladie des gros genoux de la chèvre (CAEV) : connaissances actuelles.
Point Vet., 1988, 20, 521-523.
- 126 - **PHILLIPS T., LAMONT C. and KONINGS D.**
Identification of the rev transactivation and rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus.
J. Virol., 1992, 66, 5464-5471.
- 127 - **PHILLIPS T.R, PROSPERO-GARCIA O., PUAOI D.L., LERNER D.L., FOX H.S., OLMSTED R.A., BLOOM F.E., HENRIKSEN S.J. and ELDER J.H.**
Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection
J. Gen. Virol., 1994, 75, 979-987.
- 128 - **PLUMB J.A., MILROY R. and KAYE S.B.**
Effects of the ph dependence of 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay.
Cancer Res., 1989, 49, 4435-4440.
- 129 - **PROSPERO-GARCIA O., HEROLD N., PHILLIPS T.R., ELDER J.H., BLOOM F.E. and HENRIKSEN S.J.**
Sleep patterns are disturbed in cats infected with Feline Immunodeficiency Virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91 (26), 12947-12951.
- 130 - **RASMUSSEN L., GREENWOOD J.D., and GONDA M.A.**
Expression of bovine immunodeficiency-like virus envelope glycoproteins by a recombinant baculovirus in insect cells.
Virology, 1992, 186, 551-561.

- 131 - **REDDY P.G., SAPP W.J. and HENEINE W.**
Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction.
J. Clin. Microbiol., 1993, 31 (11), 3042-3043.
- 132 - **RIMSTAD E., EAST N.E., TORTEN M., HIGGINS J., DE ROCK E. and PEDERSEN N.C.**
Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats.
Am. J. Vet. Res., 1993, 54 (11), 1858-1862.
- 133 - **RINGLER D.J., WYAND M.S., WALSH D.G., MACKEY J.J., CHALIFOUX L.V., POPOVIC M. MINASSIAN A.A, SEHGAL P.K., DANIEL M.D. and DESROSIERS R.C.**
Cellular localization of simian immunodeficiency virus in lymphoid tissues.
Am. J. Pathol., 1989, 134, 373-383.
- 134 - **ROBINSON W.F. and ELLIS T.M.**
Caprine arthritis-encephalitis virus infection : from recognition to eradication.
Aust. Vet. J., 1986, 63, 237-241.
- 135 - **ROSIN - ARBESFELD R., MASHIAM P., WILLBOLD D., ROSCH P., TRONICK S.R., YANIV A. and GAZIT A.**
Biological activity and intracellular location of the Tat protein of equine infectious anemia virus.
Gene., 1994, 150 (2), 307-311.
- 136 - **ROVID A.H., CARPENTER S. and ROTH J.A.**
Monocyte function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1995, 45 (1-2), 31-43.

137 - RUSSO P., VITU C., FONTAINE J.J. and VIGNONI M.

Caprine arthritis-encephalitis : trial of an adjuvant vaccine preparation. Clinical and virological study.

Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis., 1993, 16 (2), 131-136.

138 - SALTARELLI M.J., SCHOBORG R., GDOVIN S.L. and CLEMENTS J.E.

The CAEV tat gene trans-activates the viral LTR and is necessary for efficient viral replication.

Virology, 1993, 197 (1), 35-44.

139 - SALTARELLI M.J., SCHOBORG R., PAVLAKIS G.N. and CLEMENTS J.E.

Identification of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and its cis-activating Rev-responsive element.

Virology, 1994, 199 (1), 47-55.

140 - SAVEY M., PARODI A.L., ESPINASSE J. and KIENER T.

Aspects cliniques et anatomo-pathologiques du Maedi chez les ovins en France.

Le point Vétérinaire, 1982, 14 (66), 47-52.

141 - SCHOPF K. and SCHONBAUER M.

Serologische erhebungsuntersuchung über die verbreitung der Caprinen Arthritis-Encephalitis (CAE) in Tirol.

Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 1990, 77, 249-252.

142 - SEIDLER E.

The tetrazolium - Formazan system : design and histochemistry.

Prog. Histochem. Cytochem., 1991, 24, 1-86.

143 - SELLON D.C.

Equine infectious anemia.

Vet. Clin. North. Am. Equine Pract., 1993, 9 (2), 321-336.

- 144 - **SELLON R.K., JORDAN H.L, KENNEDY - STOSKOPF S., TOMPKINS M.B. and TOMPKING W.A.**

Feline immunodeficiency virus can be experimentally transmitted via milk during acute maternal infection.

J. Virol, 1994, 68 (S), 3380-3385

- 145 - **SHAHARA BANY M., RICE N.R. and HIZI A.**

Expression and mutational analysis of the reverse transcriptase of the lentivirus equine infectious anemia virus.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 196 (2), 914-920.

- 146 - **SHANE B.S., ISSEL C.J. and MONTELARO R.C.**

Enzyme linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody.

J. Clin. Microbiol., 1984, 19, 351-355.

- 147 - **SHARER L.R.**

Neuropathology and pathogenesis of SIV infection of the central nervous system.

Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis., 1994, 72, 133-145.

- 148 - **SHOBORG R.V. and CLEMENTS J.E.**

The Rev protein of Visna virus is localized to the nucleus of infected cells.

Virology, 1994, 202, 485-490.

- 149 - **SHOBORG R.V., SALTARELLI M.J. and CLEMENTS J.E.**

A rev protein is expressed in caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) - infected cells and is required for efficient viral replication.

Virology, 1994, 202, 1-15.

- 150 - **SIGURDARDOTTIR B. and THORMAR H.**
Isolation of viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi.
J. Inf. Dis., 1964, 114, 55-60.
- 151 - **SIGURDSSON B., PALSSON P.A. and TRYGGVADOTTIR A.**
Transmission experiments with Maedi.
J. Inf. Dis., 1953, 166-175.
- 152 - **SIGURDSSON B., THORMAR H. and PALSSON P.A.**
Cultivation of Visna virus in tissue culture.
Arch. Ges. Virusforsch, 1960, 10, 368.
- 153 - **SMYTH N.R., BENNETT M., GASKELL R.M., Mc CRACKEN C.M., HART C.A. and
HOWE J.L.**
Effect of 3' azido-2',3'-deoxythymidine (AZT) on experimental feline immunodeficiency virus
infection in domestic cats.
Res. Vet. Sci., 1994, 57 (2), 220-224.
- 154 - **SPINA C.A., KWOH T.J., CHOWERS M.Y., GUATELLI J.C. and RICHMAN D.D.**
The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication
from primary quiescent CD4 lymphocytes.
J. Exp. Med. 1994, 179 (1) , 115-123.
- 155 - **ST CYR COATS K., PRUETT S.R., NASH J.W. and COOPER C.R.**
Bovine immunodeficiency virus : incidence of infection in Mississippi dairy cattle.
Vet. Microbiol., 1994, 42 (2-3), 181-189.

- 156 - **STICHT H., WILLBOLD D., BAYER P., EJCHART A., HERRMANN F., ROSIN ARBESFELD R., GAZIT A., YANIN A., FRANCK R. and ROSCH P.**
Equine infectious anemia virus Tat is a predominantly helical protein.
Eur. J. Biochem., 1993, 218 (3), 973-976.
- 157 - **TALBOTT R.L., SPARGER E.E., LOVELACE K.M., FITCH W.M., PEDERSEN N.C., LUCIW P.A. and ELDER J.H.**
Nucleotid sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 5743-5747.
- 158 - **THORMAR H.**
A comparison of visna and maedi viruses, in physical, chemical and biological properties.
Res. Vet. Sci., 1965, 6, 117-129.
- 159 - **THORMAR H., BALZARINI J., HOLY A., JINDRICH J., ROSENBERG I., DE SER Z., DESMYTER J. and DE CLERCQ ERIK**
Inhibition of Visna virus replication by 2', 3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs
Antimicrobial Agents and chemotherapy, 1993, 2540-2544.
- 160 - **THORMAR H., GEORGSSON G., PALSSON P.A., BALZARINI J., NAESENS L., TORSTEINSDOTTIR S., de CLERCQ E.**
Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine on visna virus infection in lambs : a model for *in vivo* testing of candidate anti-human immunodeficiency virus drugs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92 (8), 3283-3287.
- 161 - **TILEY L.S., BROWN P.H., SY L., MAIZEL J.V., CLEMENTS J.E. and CULLEN B.R.**
Visna virus encodes a post transcriptional regulator of viral structural gene expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 7497-7501.

- 162 - **TOCHIKURA T.S., HAYES K.A., CHENEY C.M., TANABE-TOCHIKURA A., ROJKO J.L., MATHES L.E. and OLSEN R.G.**
In vitro replication and cytopathogenicity of the feline immunodeficiency virus for feline T4 thymic lymphoma 3201 cells.
Virology, 1990, 179, 492-497.
- 163 - **TOMA B.**
L'anémie infectieuse des équidés.
Le Point Vétérinaire, 1991, 23 (139), 719-725.
- 164 - **TOMONAGA K., MIYAZAWA T. and SAKURAGI J.I.**
The feline immunodeficiency virus ORF-A gene facilitates efficient viral replication in established T-cell lines and peripheral blood lymphocytes.
J. Virol., 1993, 67, 5889-5895.
- 165 - **TOMONAGA K., NORIMINE J. and SKIN J.I.**
Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity.
J. Virol., 1992, 66, 6181-6185.
- 166 - **TOZSER J., FRIEDMAN D., WEBER I.T., BLAHA I. and OROSZLAN S.**
Studies on the substrate specificity of the proteinase of equine infectious anemia virus using oligopeptide substrates.
Biochemistry, 1993, 32 (13), 3347-3353.
- 167 - **TRISTEM M., MARSHALL C., KARPAS A. and HILL F.**
Evolution of the primates viruses : evidence from vpx and vpr.
EMBO J., 1992, 11 (9), 3405-3412.

- 168 - **TSUJIMOTO H., HASEGAWA A., MAKI N., FUKASAWA M., MIURA T., SPEIDEL S., COOPER R.W., MORIYAMA E.I., GOJOBORI T. and HAYAMI M.**
Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill.
Nature, 1989, 341, 539-541.
- 169 - **VALLEE H. and CARRE H.**
Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval.
C.R. Acad. Sci., 1904, 139, 331-333.
- 170 - **VAN DER MAATEN M.J., BOOTHE A.D. and SEGER C.L.**
Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis.
J. Natl. Cancer Inst., 1972, 49, 1649-1657.
- 171 - **VITU C., RUSSO P. and VIGNONI M.**
Caprine arthritis-encephalitis : trial of an adjuvant vaccine preparation. Study of the antibody reponse.
Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis., 1993, 16 (2), 137-144.
- 172 - **VITU C., RUSSO P., VIGNONI M. and DELOR V.**
L'arthrite-encéphalite enzootique caprine en France : recherches épidémiologiques et expérimentales.
Comp. Immu. Microbiol. Inf. Dis., 1988, 11, 27-34.
- 173 - **WANG S.Z., RUSHLOW K.E., ISSEL C.J., COOK R.F., COOK S.J., RAABE M.L., CHONG Y.H., COSTA L. and MONTELARO R.C.**
Enhancement of EIAV replication and disease by immunization with a baculovirus-expressed recombinant envelope surface glycoprotein.
Virology, 1994, 199 (1), 247-251.

- 174 - **WEILAND F. and BRUNS M.**
Ultrastructural studies on maedi-visna virus.
Arch. Virol., 1980, 64, 277-285.
- 175 - **WILLIAMS D.L., ISSEL C.J., STEELMAN C.D., ADAMS W.V. and BENTON C.V.**
Studies with equine infectious anemia virus : Transmission attempts by mosquitoes.
Am. J. Vet. Res., 1981, 42, 1469-1473.
- 176 - **WOLFE D.F., NUSBAUM K.E., LAUERMAN L.H., MYSINGER P.W., RIDELL M.G,
PUTNAM M.R., SHUMWAY L.S. and POWE T.A.**
Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus.
Theriogenology, 1987, 28, 307-316.
- 177 - **YAMAMOTO J.K., HANSEN H., HO E.W., MORISHITA T.Y., OKUDA T., SAWA T.R.,
NAKAMURA R.M. and PEDERSEN N.C.**
Epidemiological and clinical aspects of Feline Immunodeficiency Virus infection in cats from
the continental United-States and Canada and possible mode of transmission.
J.Am. Vet. Med. Assoc., 1989, 194 (2), 213-220.
- 178 - **YAMAMOTO J.K., SPARGER E., HO E.W., ANDERSEN P.R., O'CONNOR T.P.,
MANDELL C.P., LOWENSTINE L., MUNN R. and PEDERSEN N.C.**
Pathogenesis of experimentally induced Feline Immunodeficiency Virus infections in cats.
Am. J. Vet. Res., 1988, 498 (8), 1246 - 1258.
- 179 - **ZANONI R.G., VOGT H.R., POHL B., BOTTCHER J., BOMMELI W.
and PETERHANS E.**
An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small ruminant lentiviruses.
Zentralbl Veterinarmed B., 1994, 41 (10), 662-669.

180 - ZINCK M.C. and JOHNSON L.K.

Pathobiology of lentivirus infections in sheep and goats.

Vir. Res., 1994, 32, 139-154.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIE	Anémie infectieuse équine
ARN	Acide ribonucleique
AZT	2', 3'-didéoxythymidine = azido-thymidine
BIV	Bovine immunodeficiency virus
BLV	Bovine leukemia virus
CAEC	Complexe arthrite-encéphalite caprine
CAEV	Caprine arthritis-encephalitis virus
CC 50	Concentration cytotoxique à 50%
Cell.	Cellule
CI 50	Concentration inhibitrice à 50%
CMV	Cytomegalovirus
DDC	Didéoxycytidine
DDI	Didéoxyinosine
DICT	Dose infectante à 50% en culture tissulaire
DMEM	Double milieu essentiel minimum
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
ECP	Effet cytopathique = effet cytopathogène
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EIAV	Equine infectious anemia virus
ELISA	Enzyme - linked - immuno - sorbent - assay
FeLV	Feline leukemia virus
FIV	Feline immunodeficiency virus
IDG	Immunodiffusion sur gélose
Kda	Kilodalton
LAV	Lymphadenopathy associated virus
LT	Lymphocyte T

LTR	Long terminal repeat
MEM	Milieu essentiel minimum
μ M	Micromolaire = micromoles/ml
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
nm	Nanomètre
ORF	Open reading frame
PC	Plexus choroïde
PCR	Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate (laurysulfate de sodium)
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience humaine acquise
SIV	Simian immunodeficiency virus
SVF	Serum de veau foetal
TCID 50	50 % tissue culture infectious dose
UV	Ultra-violet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

**TABLE DES TABLEAUX
ET DES FIGURES**

TABLEAUX

		PAGES
Tableau 1 :	molécules à tester : préparation des solutions mères et de leurs dilutions	121
Tableaux 2 et 3 :	détermination du titre infectieux du MAEDI selon REED et MUENCH	128
Tableau 4 :	tableau récapitulatif des valeurs de CC 50 et de CI 50 déterminées pour les 6 molécules testées sur des cellules de PC infectées par le virus VISNA ou le virus MAEDI	141
Tableau 5 :	comparaison de trois protocoles d'évaluation d'activité antivirale	144

FIGURES

	PAGES
Figure 1 : représentation schématique d'un lentivirion : illustration par le HIV	21
Figure 2 : organisation génomique du virus VISNA-MAEDI	21
Figure 3 : cycle de réplication des lentivirus	27
Figure 4 : intense inflammation de la substance blanche cérébrale	32
Figure 5 : organisation génomique du CAEV	46
Figure 6 : schéma des principaux organes cibles lors de l'infection par le CAEV	50
Figure 7 : représentation schématique de la relation phylogénétique entre les cinq groupes de lentivirus de primates	77
Figure 8 : organisation génomique des lentivirus de primates	77
Figure 9 : ultrastructure et morphogénèse du BIV (a, b, c), du HIV (d, e, f) et du SIV (g, h, i)	100
Figure 10 : comparaison entre l'organisation génomique du BIV et de l'HIV-1	102
Figure 11 : représentation schématique du BIV	102
Figure 12 : structure chimique du MTT et de son formazan	116
Figure 13 : organisation de la microplaque de 96 puits à fond plat	119
Figure 14 : structure chimique de la DDC et des molécules originales testées	120
Figure 15 : courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 86 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	130
Figure 16 : activité antivirale de la molécule JD 86 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	130

Figure 17 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 86 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI	131
Figure 18 :	activité antivirale de la molécule JD 86 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	131
Figure 19 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 87 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	132
Figure 20 :	activité antivirale de la molécule JD 87 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	132
Figure 21 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 88 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	133
Figure 22 :	activité antivirale de la molécule JD 88 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	133
Figure 23 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 88 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI	134
Figure 24 :	activité antivirale de la molécule JD 88 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	134
Figure 25 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 75 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	135
Figure 26 :	activité antivirale de la molécule JD 75 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	135
Figure 27 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 75 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI	136
Figure 28 :	activité antivirale de la molécule JD 75 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	136
Figure 29 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 84 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	137
Figure 30 :	activité antivirale de la molécule JD 84 sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	137

Figure 31 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule JD 84 sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI	138
Figure 32 :	activité antivirale de la molécule JD 84 sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	138
Figure 33 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule DDC sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus VISNA	139
Figure 34 :	activité antivirale de la molécule DDC sur la souche VISNA, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	139
Figure 35 :	courbes de viabilité cellulaire : effet de la molécule DDC sur les cellules de PC non infectées ou infectées par le virus MAEDI	140
Figure 36 :	activité antivirale de la molécule DDC sur la souche MAEDI, exprimée par le pourcentage de protection cellulaire d'après la formule de PAUWELS	140

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	14
PREMIERE PARTIE : LE VIRUS VISNA-MAEDI	16
<u>I - HISTORIQUE</u>	17
<u>II - EPIDEMIOLOGIE</u>	18
1 - Répartition géographique	18
2 - Espèces affectées	19
3 - Transmission	19
<u>III - VIROLOGIE</u>	20
1 - Dimension et morphologie du virus	20
2 - Ultrastructure	22
2.1 - Nature de l'acide nucléique	22
2.2 - Organisation génomique	24
2.3 - Protéines et enzymes virales	24
2.3.1 - Protéines virales	24
2.3.2 - Enzymes virales	24
3 - Propriétés physico-chimiques	25
4 - Tropicité cellulaire	25
5 - Cycle de multiplication du virus	28
5.1 - Phase de reconnaissance, de fixation, de pénétration du virus	28
5.2 - Phase d'éclipse	28
5.3 - Phase de production virale	28
<u>IV - LA MALADIE</u>	29
1 - L'incubation	29
2 - Le tableau clinique de la maladie	29
2.1 - La forme MAEDI	29
2.2 - La forme VISNA	30
3 - Anatomie -histopathologie	30
3.1 - La forme MAEDI	30
3.1.1 Anatomie- Pathologie	31
3.1.2 Histologie	31
3.2 - La forme VISNA	31

3.2.1 - Anatomo- Pathologie	31
3.2.2 - Histologie	31
<u>V - IMMUNOPATHOGENESE</u>	33
<u>VI - DIAGNOSTIC</u>	34
1 - <u>Diagnostic clinique.</u>	34
2 - <u>Diagnostic microbiologique.</u>	35
3 - <u>Diagnostics sérologiques.</u>	35
4 - <u>Diagnostic histologique</u>	35
<u>VII - TRAITEMENT</u>	
	36
<u>VIII - PROPHYLAXIE</u>	36
DEUXIEME PARTIE : LES AUTRES LENTIVIRUS ANIMAUX	38
<u>CHAPITRE PREMIER : LES LENTIVIRUS DES ONGULES</u>	40
<u>A - LE LENTIVIRUS CAPRIN</u>	41
<u>I - HISTORIQUE</u>	41
<u>II - EPIDEMIOLOGIE</u>	41
1 - <u>Répartition géographique</u>	41
2 - <u>Facteurs de réceptivité</u>	42
2.1 Facteurs intrinsèques	42
2.2 - Facteurs extrinsèques	43
3 - <u>Modalités de la contamination</u>	44
3.1 - Sources de matières virulentes	44
3.2 - Transmission verticale	44
3.3 - Transmission horizontale	44
<u>II- VIROLOGIE</u>	45
1 - <u>Morphologie</u>	45
2 - <u>Ultrastructure</u>	45
2.1 Organisation génomique	45
2.2 - Protéines virales	47
3 - <u>Propriétés physico-chimiques</u>	47
4 - <u>Tropisme</u>	47
5 - <u>Culture-Effet cytopathique</u>	48

<u>IV - LA MALADIE</u>	48
<u>1 - Les symptômes</u>	48
1.1 - La forme articulaire	48
1.2 - La forme nerveuse	51
1.3 - Les symptômes concomitants	51
1.3.1 - Les symptômes mammaires	51
1.3.2 - Les symptômes pulmonaires	52
<u>2 - Les lésions</u>	52
2.1 - Les lésions articulaires	52
2.2 - Les lésions du système nerveux	53
2.3 - Les lésions mammaires	53
2.4 - Les lésions pulmonaires	53
<u>3 - Similitudes et différences avec l'infection par le virus VISNA MAEDI</u>	
3.1 - L'incubation	54
3.2 - Les lésions	54
3.3 - Le pronostic	55
<u>V - IMMUNOPATHOGENESE</u>	55
<u>VI - LE DIAGNOSTIC</u>	56
<u>1- Le diagnostic clinique</u>	56
1.1 La forme articulaire	56
1.2 La forme nerveuse	56
<u>2 - Le diagnostic différentiel</u>	57
2.1 - Les différentes arthrites des caprins	57
2.2 - Les différentes affections nerveuses des chevreaux	57
<u>3 - Le diagnostic expérimental</u>	57
3.1 - Méthodes directes	57
3.2 - Méthodes indirectes	58
3.3 - La "Polymerase chain reaction"	59
<u>VII- TRAITEMENT</u>	59
<u>VIII - PROPHYLAXIE</u>	60
<u>B - LE LENTIVIRUS EQUIN</u>	61
<u>I - HISTORIQUE</u>	61
<u>II - EPIDEMIOLOGIE</u>	61

1 - <u>Répartition géographique</u>	61
2 - <u>Transmission</u>	62
2.1 - Les différents modes de transmission	62
2.2 - La transmission par les insectes	63
2.2.1 - Les vecteurs	63
2.2.2 - La transmission proprement dite	64
2.2.3 - Caractéristiques de l'hôte	64
III- <u>VIROLOGIE</u>	65
1 - <u>Le génome</u>	65
2 - <u>Tropisme</u>	66
IV - <u>LA MALADIE</u>	66
1 - <u>Les symptômes</u>	66
1.1 - La forme suraiguë	67
1.2 - La forme aiguë ou typho-anémie	67
1.3 - La forme subaiguë	68
1.4 - La forme chronique	68
1.5 - La forme inapparente	68
2 - <u>Les lésions microscopiques</u>	69
2.1 - Au niveau des organes	69
2.2 - Au niveau des hématies	69
2.3 - Au niveau des leucocytes	70
V - <u>DIAGNOSTIC</u>	70
1 - <u>Diagnostic clinique.</u>	70
2 - <u>Diagnostics sérologiques</u>	71
<u>VI- PROPHYLAXIE</u>	71
<u>CHAPITRE SECOND : LES LENTIVIRUS DES NON-ONGULES ET DES BOVINS</u>	73
<u>A - LES LENTIVIRUS SIMIENS</u>	74
<u>I - HISTORIQUE</u>	74
1 - <u>Isolement du virus chez le macaque et le mangabey</u>	74
2 - <u>Isolement du virus chez d'autres espèces simiennes</u>	74
<u>II - SEROEPIDEMIOLOGIE</u>	75

<u>III - CLASSIFICATION DES LENTIVIRUS SIMIENS</u>	75
<u>IV - VIROLOGIE</u>	76
1 - Organisation génomique	76
2 - Tropisme	78
<u>V - INFECTION PAR LE SIV CHEZ LE MACAQUE</u>	78
1- <u>Manifestations pathologiques</u>	78
1.1. - Phase aiguë ou primo-infection	79
1.2 - Phase asymptomatique	79
1.3 - Phase SIDA	79
2 - <u>Diversité pathogénique des différents SIV</u>	80
2.1 - Pathogénèse de la souche SIVsmm Pbj14	80
2.2. - Pathogénèse des autres isolats SIV	81
<u>VI - MISE AU POINT D'UN VACCIN</u>	83
<u>B - LE LENTIVIRUS FELIN</u>	84
<u>I - HISTORIQUE</u>	84
<u>II - EPIDEMIOLOGIE</u>	84
1 - <u>Répartition géographique</u>	84
2 - <u>Facteurs de réceptivité et de sensibilité</u>	85
2.1 - Facteurs extrinsèques	85
2.2 - Facteurs intrinsèques	85
3 - <u>Transmission</u>	86
<u>III - VIROLOGIE</u>	87
1 - <u>Morphologie</u>	87
2 - <u>Ultrastructure</u>	87
2.1 - Organisation génomique	87
2.2 - Les protéines virales de structure	88
3 - <u>Tropisme</u>	88
3.1 - <i>In vivo</i>	88
3.2 - <i>In vitro</i>	89
4 - <u>Effet cytopathique</u>	89
5 - <u>Action sur le système immunitaire</u>	89
<u>IV - LE SYNDROME D'IMMUNODEFICIENCE</u>	90

1 - <u>Les différents stades de l'infection</u>	90
1.1 - Le stade I	90
1.2 - Le stade II	90
1.3 - Le stade III	90
1.4 - Le stade IV	91
1.5 - Le stade V	91
2 - <u>Les pathologies associées</u>	91
2.1 - Les affections de la cavité buccale	91
2.2 - Les affections de l'appareil respiratoire supérieur	92
2.3 - Les affections cutanées et du conduit auditif externe	92
2.4 - Les affections du tractus intestinal	92
2.5 - Les affections de l'appareil urinaire	92
2.6 - Les infections opportunistes	92
2.7 - Les autres affections	93
2.7.1 - La pathologie nerveuse	93
2.7.2 - La pathologie tumorale	93
3 - <u>Les anomalies hématologiques</u>	93
<u>V - DIAGNOSTICS</u>	94
1 - <u>Diagnostic histologique</u>	94
2 - <u>Diagnostiques sérologiques</u>	94
<u>VI - TRAITEMENT</u>	95
1 - <u>Non spécifique</u>	95
2 - <u>Spécifique</u>	95
<u>VII - PROPHYLAXIE</u>	96
<u>C - LE LENTIVIRUS BOVIN</u>	97
<u>I - HISTORIQUE</u>	97
<u>II - EPIDEMIOLOGIE</u>	97
1 - <u>Répartition géographique</u>	98
2 - <u>Transmission</u>	98
<u>III - VIROLOGIE</u>	99
1 - <u>Morphologie</u>	99
2 - <u>Ultrastructure</u>	99

2.1 - Organisation génomique	99
2.2 - Protéines de structure et enzymes virales	101
3 - <u>Tropisme</u>	101
<u>IV - LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES</u>	103
<u>V - ACTION SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE</u>	103
TROISIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	105
CHAPITRE PREMIER : MATERIELS ET METHODES	107
<u>I - CULTURE CELLULAIRE</u>	107
1 - Nature et origine des cellules	107
2 - Entretien des cultures	107
2.1 - Le milieu de culture	108
2.2 - Le repiquage	108
2.2.1 - La trypsination	109
2.2.2 - La remise en culture	109
3 - <u>Congélation - Décongélation</u>	110
3.1 - Congélation	110
3.2 - Décongélation	110
<u>II - LE VIRUS VISNA-MAEDI</u>	111
1 - <u>Origine</u>	111
2 - <u>Constitution du pool viral</u>	111
3 - <u>Titrage du virus</u>	112
3.1 - Principe	112
3.2 - Protocole	112
<u>III - LE MTT</u>	114
1 - <u>Structure</u>	114
2 - <u>Propriétés physico-chimiques</u>	114
2.1 - Propriétés physiques	114
2.2 - Propriétés chimiques	115
3 - <u>Principe de la méthode colorimétrique au MTT</u>	115
4 - <u>Avantages de la méthode colorimétrique au MTT</u>	117

<u>IV - EVALUATION DES DIFFERENTES MOLECULES PAR LE TEST AU MTT</u>	117
<u>1 - Les cellules</u>	117
<u>2 - Les molécules</u>	118
<u>3 - Le virus</u>	122
3.1 - Souche VISNA K 796	122
3.2 - Souche MAEDI WLC1	122
<u>4 - Incubation</u>	122
<u>5 - Coloration par la méthode au MTT</u>	122
5.1 - Préparation de la solution de MTT	122
5.2 - Mode opératoire	123
<u>6 - Lecture des densités optiques</u>	123
<u>7 - Détermination de la cytotoxicité des molécules testées</u>	124
<u>8 - Détermination de l'activité antivirale de la molécule testée</u>	124
CHAPITRE SECOND : RESULTATS	127
<u>I - CULTURE DU VIRUS</u>	127
<u>1 - Effet cytopathique ou effet cytopathogène (ECP)</u>	127
<u>2 - Résultats du titrage</u>	127
<u>II - DETERMINATION DE LA CYTOTOXICITE</u>	129
<u>III - DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE VIS A VIS DES SOUCHES VISNA ET MAEDI</u>	142
<u>IV - DISCUSSION</u>	143
CONCLUSION	148
BIBLIOGRAPHIE	152
ABREVIATIONS	183
TABLE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	186
TABLE DES MATIERES	191



MARTHON Florence

LENTIVIRUS ANIMAUX. EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DE MOLECULES ORIGINALES SUR LE VIRUS VISNA-MAEDI.

Thèse Pharm. Limoges, 1995.

RESUME :

Les lentivirus animaux présentent de nombreuses caractéristiques communes d'un point de vue morphologique, génomique, réplicatif et pathogénétique. L'intérêt des scientifiques pour ces microorganismes s'est accru depuis la découverte du premier lentivirus humain, le HIV, responsable d'un syndrome d'immunodéficience fatal.

L'urgence de la mise au point d'une thérapeutique antirétrovirale entraîne la synthèse d'une quantité innombrable de molécules dont une infime minorité s'avère efficace. Une présélection de ces composés est donc devenue nécessaire.

Le lentivirus ovin VISNA-MAEDI, qui présente des sensibilités à l'inhibition comparables avec le HIV-1, nous a servi de modèle expérimental *in vitro*. L'effet antiviral de six molécules originales a été évalué sur des cellules de plexus choroïdes permissives au virus, par une méthode colorimétrique utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). La DDC a également été testée.

MOTS-CLES :

- lentivirus animaux
- VISNA-MAEDI
- antiviraux
- analogues nucléosidiques
- MTT



JURY

Président : Madame C. BOSGIRAUD, Professeur

Juges : Monsieur Francis COMBY, Maître de Conférences
Madame S. DELEBASSEE, Maître de Conférences
Monsieur B. PLANCHE, Docteur en Pharmacie