

Construction et étude de la réplication de virus CAEV atténués, déficients pour la dUTPase.

P. TURELLI (1), C. HIÉBLOT (1) P. RUSSO (2), F. GUIGUEN (3), R. VIGNE (1) G. QUÉRAT (1)

1: INSERM, U372 «Pathogénie des infections à lentivirus»: Campus de Luminy, PB 178, 13276 Marseille cedex 9

2: CNEVA-LPPRA, route des Colles, Sophia-Antipolis, 06410 BIOT

3: Unité associée INRA-env. de Lyon: «Pathologie des petits ruminants» 10, av bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile.

RÉSUMÉ – Les lentivirus persistent chez l'hôte malgré une intense réponse immunitaire. Le réservoir d'infection latente est probablement constitué par les monocytes du sang circulant. Nous cherchons à créer des virus atténués vivants incapables de s'établir dans les monocytes. A cette fin, nous avons détruit par mutagenèse le gène de la dUTPase et de l'Intégrase du virus CAEV. Nous avons étudié la réplication de ces mutants, *in vitro* dans divers types cellulaires en particulier les monocytes-macrophages, et *in vivo* au cours d'infections expérimentales à visées vaccinales. Les résultats sont inattendus puisque on n'observe pas de différences majeures dans la réplication des virus dUTPase moins et du virus sauvage, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Une épreuve avec le virus sauvage permettra de savoir si cette première infection par le mutant induit une immunité protectrice.

Replication properties of dUTPase minus mutants of CAEV.

Renc. Rech. Ruminants, 1994, 1, 73 – 76

P. TURELLI (1), C. HIÉBLOT (1) P. RUSSO (2), F. GUIGUEN (3), R. VIGNE (1) G. QUÉRAT (1)

SUMMARY – Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) is a pathogenic lentivirus of goat which is closely related to the sheep visna virus and distantly related to the human lentivirus HIV. Like the feline (FIV) and equine (EIAV) lentiviruses CAEV exhibits a gene (DU) which is thought to encode a dUTPase. We have constructed a series of in frame deletion mutants of DU and IN (Integrase gene) either alone or in combination and studied their replication in fibroblasts and monocytes/macrophages. None of the integrase deficient mutants was infectious, but the DU deficient virus was found to replicate as efficiently as the wild type virus in primary synovial membrane cells. Unexpectedly, the growth kinetics of DU mutants in goat macrophages were found to be comparable to that of wild type virus. DU-1 mutant was shown to infect goats in experimental infection with near wild type kinetics of seroconversion.

INTRODUCTION

Les virus visna et CAEV appartiennent à la famille des lentivirus qui regroupe également les virus de l'immuno-déficience humaine (HIV) simienne (SIV) ou féline (FIV). Ils sont responsables de pathologies inflammatoires chez le mouton et chez la chèvre. L'apparition des signes cliniques est précédée par une longue période asymptomatique. Le virus persiste dans l'organisme malgré une intense réponse immunitaire. Deux mécanismes semblent participer à cette persistance: 1) La dérive antigénique qui permet de diminuer la visibilité du virus vis à vis du système immunitaire; à tout moment, des variants apparaissent qui ne sont pas reconnus par la réponse immune. 2) Il se constitue un réservoir d'infection latente dans les monocytes du sang circulant. Ces cellules, bien qu'infectées, n'expriment pas les protéines structurales du virus et échappent ainsi à la reconnaissance et à la destruction par le système immunitaire. La production virale n'est activée que lors de la maturation du monocyte en macrophage tissulaire (Gendelman et al., 1985, 1986).

Il est vraisemblable, mais pas prouvé, que la réponse immunitaire cellulaire contrôle dans une certaine mesure l'infection virale. Par contre, une forte réponse humorale est fréquemment associée au développement des manifestations pathologiques. Les premières tentatives de vaccination par des virus inactivés ont abouti à une forte induction d'anticorps et à une exacerbation de la pathologie après l'épreuve par une souche virulente (McGuire et al., 1988). Les approches actuelles s'orientent donc vers une induction préférentielle de la réponse cellulaire cytotoxique (CD 8+). Trois vecteurs de vaccination semblent appropriés: le virus vivant atténué, le virus vaccine recombinant et l'injection d'ADN de plasmide expresseur *in vivo*. L'injection de plasmide expresseur est largement étudié dans notre laboratoire mais en est au stade de la faisabilité. Dans le contexte de la destruction des dernières souche du virus de la variole il semble que l'utilisation des souches vaccines recombinantes ait un avenir limité. Bien que l'utilisation de souches vaccinales atténuées soit bien maîtrisée pour un certain nombre d'infection, tel n'est pas le cas pour les virus persistants et en particulier pour les lentivirus. De mon point de vue, ce vecteur n'a d'avenir que si le virus vaccinant est éliminé par la réponse immunitaire afin d'éviter tout risque d'apparition d'une pathologie sur le long terme.

Une des approches vaccinales possible serait de construire par génie génétique un virus atténué qui serait diminué dans sa capacité à infecter les monocytes. En enlevant au virus un mécanisme majeur lui permettant de persister, on peut espérer que ce virus vaccinant sera éliminé par la réponse immunitaire qu'il aura lui même induite.

Les monocytes sont des cellules au repos. Une des caractéristiques des cellules au repos est de posséder un pool de nucléotides réduit : 1 pmol/ 10⁶ cellules pour les monocytes (Terai et Carson, 1991) contre 5 nmol/10⁶ cellules pour des cellules T activées (Marijnen et al., 1989). Certains enzymes du métabolisme des nucléotides et de la réparation de l'ADN sont absents, en particulier la dUTPase cellulaire. La dUTPase hydrolyse le dUTP en dUMP et aboutit à la synthèse du TTP, minimisant l'incorporation de dUTP dans

l'ADN. Cette activité est importante pour l'infection de cellules au repos, et pour la réactivation de virus latents. Pour le virus Herpes Simplex (HSV), par exemple, il a été montré que la dUTPase virale est nécessaire à l'infection des cellules neuronales et à la réactivation des virus latents *in vivo* (Pyles et al. 1992). Par contre, dans les cellules en division, *in vitro*, la transcomplémentation par l'activité cellulaire permet au virus de se répliquer avec un phénotype sauvage.

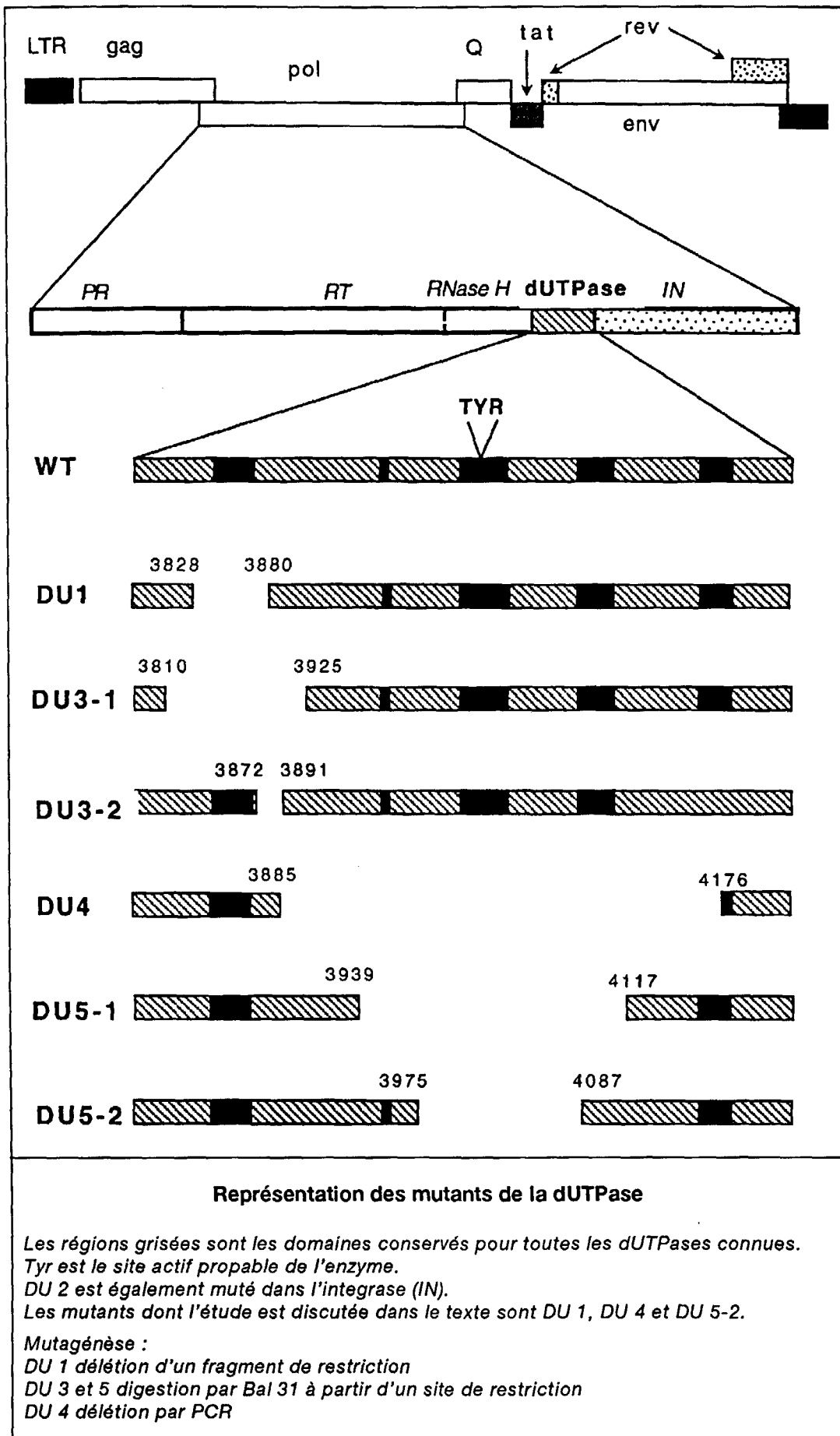
Un gène homologue à celui des dUTPases cellulaires et virales (HSV, poxvirus) est présent dans le génome de certains lentivirus (Equine Infectious Anemia Virus EIAV, Feline Immunodeficiency Virus FIV, et les lentivirus d'ongulés visna et CAEV (Elder et al., 1992). Il est situé entre la RNase H et l'intégrase (IN) (voir figure). La dUTPase est encapsidée dans les virions sous forme de précurseurs gag-pol où elle est maturée par la Protéase virale (Elder et al., 1992). A ce titre, elle est probablement présente dans le complexe de préintégration pendant la transcription inverse du génome viral.

Des mutants de la dUTPase ont été construits pour les lentivirus FIV, EIAV et CAEV. Pour EIAV il a été montré que le virus DDU se réplique comme le virus sauvage sur des cellules en division, mais très faiblement (1% du niveau du virus sauvage). Pour FIV le mutant DDU obtenu par insertion d'une séquence «linker» présente une capacité de répllication réduite dans des cellules sanguines mononucléées cultivées en présence d'IL-2. L'absence de résultats dans des cellules primaires au repos, non stimulées à l'IL-2 limite les conclusions que l'on peut tirer de ce travail.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour le virus CAEV, nous avons construit une série de 11 mutants de délétion (en phase) pour les gènes de l'intégrase et de la dUTPase soit individuellement soit en combinaison. Toutes les mutations de l'intégrase se révèlent létales pour la répllication virale, après cotransfection des clones moléculaires reconstituant l'ADN proviral. La répllication virale a été étudiée pour trois (DDU-1, DDU-4, DDU-5) des six mutants de la dUTPase dont un présente une délétion de la presque totalité du gène (DDU-4)(voir figure). Le résultat est inattendu, puisque tous trois se répliquent comme le virus sauvage (WT) tant sur des monocytes non adhérents ou des macrophages adhérents dérivés du sang que sur des macrophages alvéolaires. Nous avons vérifié par PCR qu'il n'y avait pas eu de contaminations par le virus WT ni de recombinaisons avec le gène de la dUTPase cellulaire. Le premier des mutants construits (DDU-1) a été injecté à des chèvres.

Nous suivons la répllication virale (PCR sur les cellules mononucléées et isolement de virus à partir de macrophages dérivés des monocytes sanguins), la réponse immunitaire (ELISA et activité T cytotoxique), un index clinique de l'arthrite, et la numération et la formule des cellules du liquide synovial. Sept mois après le début de l'expérimentation avec ce premier mutant, les résultats sont les suivants: Le virus DDU-1 est infectieux *in vivo*, la séroconversion est comparable en délai et en intensité à celle du WT, de même que les index clinico-pathologiques. L'isolement des virus à partir des macrophages montre que



le virus muté persiste dans l'organisme au même titre que le virus sauvage. Même si ce mutant ne peut donc prétendre être une souche vaccinale idéale, il va nous permettre de tester la protection immunitaire que confère ce

type d'approche. Une épreuve vaccinale avec le virus sauvage par voie intratrachéale et un suivi par PCR pour caractériser les virus isolés constituent la suite logique de cette expérimentation.

RÉFÉRENCES

ELDER, J.H., LERNER, D.L, HASSELKUS-LIGHT, C.S., FONTENOT, D.J., HUNTER, E., LUCIW, P.A., MONTELARO, R.C., PHILLIPS, T.R., 1992. J. Virol. 66: 1791-1794

GENDELMAN H.E., O. NARAYAN, S. MOLINEAUX, J.E. CLEMENTS, Z. GHOTBI (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 7086-7090.

GENDELMAN H.E., O. NARAYAN, S. KENNEDY-STOSKOPF, P.G.E. KENNEDY, Z. GHOTBI, J.E. CLEMENTS, J. STANLEY, G. PEZESHKPOUR (1986) J. Virol. 58 : 67-74 .

MARIJINEN, Y.M.T., DE KORTE, D., HAVERKORT, W.A., DEN BREEJEN, E.J.S., VAN GENNIP, A.H., ROOS, D., 1989. B.B.A 1012: 148-155.

McGUIRE, T.C., ADAMS, D.S., JOHNSON, G.C., KLEVER-ANDERSON, P., BARBEE, D.D. , CHEEVERS, W.P. 1986. Am. J. Vet. Res. 47: 537-540.

PYLES, R.P., SAWTELL, N.M., THOMPSON, R.L. 1992. J. Virol. 66: 6706-6713

TERAI, C., CARSON, D.A. 1991. Exp. Cell. Res. 193: 375-381.