MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par Christine Dolmazon

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

EIAV (EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS) : CARACTERISATION GENETIQUE D'ISOLATS CIRCULANTS DANS LES POPULATIONS EQUINES EN EUROPE ET LESIONS PULMONAIRES ASSOCIEES

soutenu le **10 décembre 2018** devant le jury suivant :

Dr Jean Marie Exbrayat – **Président**
Dr Caroline Leroux – **Tuteur scientifique**
Dr Maxime Ratinier – **Tuteur pédagogique**
Dr Catherine Legras-Lachuer – **Rapporteur**
Pr Jean Luc Cadoré – **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Caroline Leroux (Tuteur scientifique)
Dr Maxime Ratinier (Tuteur pédagogique)
UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée
50 avenue Tony Garnier 69007 LYON.
Directrice d'unité : Dr Fabienne Archer.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par Christine Dolmazon

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

EIAV (EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS) : CARACTERISATION GENETIQUE D'ISOLATS CIRCULANTS DANS LES POPULATIONS EQUINES EN EUROPE ET LESIONS PULMONAIRES ASSOCIEES

soutenu le **10 décembre 2018** devant le jury suivant :

Dr Jean Marie Exbrayat – **Président**
Dr Caroline Leroux – **Tuteur scientifique**
Dr Maxime Ratinier – **Tuteur pédagogique**
Dr Catherine Legras-Lachuer – **Rapporteur**
Pr Jean Luc Cadoré – **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Caroline Leroux (Tuteur scientifique)
Dr Maxime Ratinier (Tuteur pédagogique)
UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée
50 avenue Tony Garnier 69007 LYON.
Directrice d'unité : Dr Fabienne Archer.

RESUME

EIAV (EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS) : CARACTERISATION GENETIQUE D'ISOLATS CIRCULANTS DANS LES POPULATIONS EQUINES EN EUROPE ET LESIONS PULMONAIRES ASSOCIEES

CONTEXTE DE L'ETUDE. EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) est un rétrovirus, appartenant au genre lentivirus, qui infecte les équidés à travers le monde. Il peut entrainer l'apparition d'une maladie nommée AIE (Anémie Infectieuse Equine), une des 11 maladies équines à déclaration obligatoire listées par l'organisation mondiale de la santé animale, soumise en France à une police sanitaire imposant le maintien en quarantaine puis l'euthanasie des animaux séropositifs. Dans ce contexte très réglementé, la mise en place d'une prévention efficace de la transmission d'EIAV nécessite la connaissance des souches virales circulantes. La majorité des foyers européens d'AIE sont en Roumanie, avec plus de 50 000 chevaux séropositifs identifiés entre 1996-2013, suggérant une contamination d'origine roumaine de pays encore récemment indemnes.

OBJECTIFS. Bien que connu et étudié depuis des décennies, peu de données sont disponibles pour établir la nature et la diversité génétique d'EIAV à l'échelle mondiale. Dans ce contexte, l'un des objectifs de mon travail de recherche a été de caractériser les souches d'EIAV circulantes responsables de foyers en Roumanie et en France pour appréhender la cartographie d'EIAV en Europe. De même, alors que la transmission par le sang reste la voie d'infection la plus décrite, l'infection par voie aérienne a été suggérée lors d'épisodes infectieux en Irlande. J'ai analysé la présence d'EIAV et des lésions associées dans le poumon de chevaux infectés.

MATERIELS ET METHODES. Les lésions pulmonaires ont été analysées sur coupes histologiques de poumon de 93 chevaux roumains et français, séropositifs pour EIAV et ne présentant pas d'épisodes fébriles d'EIAV. L'expression pulmonaire de la protéine de capside d'EIAV a été recherchée par immunomarquage. Le virus a été recherché sur le sang de 75 chevaux roumains et français, séropositifs asymptomatiques ; 25 isolats d'EIAV ont été séquencés dans *gag* et analysés phylogénétiquement La souche virale d'$EIAV_{FR1478}$, partiellement caractérisée génétiquement, a été dérivée *in vitro*.

RESULTATS. Nous avons décrit une atteinte pulmonaire interstitielle chez des chevaux infectés par le virus EIAV, associée à une expression de la capside dans les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales matures du poumon distal, non connues auparavant comme cellules cibles de l'infection. Par l'analyse génétique des virus circulant et par comparaison avec les séquences publiées en Europe, Amérique et Asie, nous avons mis en évidence la circulation de virus distincts en France et en Roumanie, distants entre eux de ~20% de divergence au niveau nucléotidiques et ~15% en séquences déduites en acides aminés, et également distants des souches virales caractérisées en Amérique du Nord, en Italie et en Asie. Nous avons mis en évidence l'existence de clusters génétiques, associés au pays d'origine des chevaux en Europe et sur la base des isolats étudiés, nous avons exclu l'hypothèse d'une contamination d'origine roumaine. Nous avons montré que la variabilité dans le gène *gag* est importante, notamment au niveau de la région « late domain », essentielle pour la production de particules virales. Enfin, nous avons établi le premier clone biologique français $EIAV_{FR1478}$, partiellement décrit sa séquence et montré sa réplication dans les cellules fibroblastiques pulmonaires équines et constitue la première souche non adaptée, isolée d'EIAV Français.

CONCLUSION. Cette étude a permis de mettre en évidence une atteinte du poumon au cours de l'infection par EIAV, d'élargie le tropisme du virus aux cellules épithéliales alvéolaires et de montrer la diversité des souches circulant en Europe et dans le monde.

Mots clés : Lentivirus/ équidés/ EIAV/ variabilité/ séquence/ poumon

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE
Christine Dolmazon

REMERCIEMENTS

« C'est un joli mot qui vient de l'enfance, un mot ennemi de l'indifférence, c'est un mot très court que l'on nous a appris, qui mêle à la fois le cœur et l'esprit. Bien qu'il soit passé dans nos habitudes, il est le reflet de nos gratitudes, il sait être doux tout en étant fort et il est reçu tel un réconfort. J'ai le grand plaisir, pour vous aujourd'hui, de le prononcer, ce seul mot MERCI »

A l'aube de nos vies (https://www.facebook.com/permalink.php?story_fbid=794799010653745&id=565079856958996&substory_index=0)

Je me suis engagée dans la préparation d'un diplôme EPHE, il y a quelques années. Le moment est donc venu de faire le bilan de cette expérience unique et de remercier les nombreuses personnes sans qui ces années n'auraient pas été ce qu'elles ont été.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Exbrayat Jean Marie, le Dr Leroux Caroline, le Dr Ratinier Maxime, le Dr Catherine Legras-lachuer et le Dr Cadoré Jean Luc d'avoir accepté d'être membre de mon jury de diplôme EPHE.

Caroline, je tiens à te remercier tout particulièrement pour avoir cru en moi, pour m'avoir aiguillé sur cette formation au moment où je souhaitais entreprendre une formation continue en licence. Merci de m'avoir soutenu, d'avoir financé tous mes déplacements pour les formations EPHE que ce soit à Paris, Versailles ou encore Montpellier. Merci pour tous les précieux conseils pour la rédaction, les corrections et les nombreuses relectures tout d'abord du certificat de capacité à la recherche et encore plus pour ce mémoire. Merci pour ta disponibilité, le temps que l'on a passé à planifier les manipulations, à discuter des résultats et à vérifier inlassablement les séquences des amorces…. Sans la confiance que tu m'as accordée, je ne pense pas que j'aurais entrepris ce parcours et c'est pourquoi je te dis encore une fois un grand MERCI.

Un grand merci à Christophe pour avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique et m'avoir donné toutes les informations concernant le diplôme, pour tes conseils, pour nos entretiens lors des bilans, pour ta disponibilité. Merci aussi pour les connaissances que tu m'as apportées lors de l'unité d'enseignement « analyse in silico des génomes », j'ai vraiment beaucoup appris et j'ai pu découvrir tes grandes qualités pédagogiques. Dommage que tu sois parti trop tôt et que tu ne sois pas là pour l'aboutissement de ce parcours.

Merci à toi Maxime, de m'avoir proposé de prendre la suite de Christophe. Merci de t'être intéresser à mon sujet et aussi pour nos échanges, tes conseils et ta disponibilité.

Merci à Fabienne, pour tes conseils en culture cellulaire, pour ton intérêt dans ma formation, pour tes éclairages.

Merci au Dr J. L. Cadoré, au Dr A. Hans pour le prélèvement et la mise à disposition de sang et poumons et au Dr Cook pour les fibroblastes ED que j'ai utilisé au cours de mon étude.

Merci au Dr P. Bolfa pour le prélèvement et la mise à disposition de sangs, de poumon

de chevaux roumains, pour notre travail en commun.

Merci à Barbara pour avoir toujours pris soin de mes boites de culture cellulaire pendant mes absences, pour avoir sorti toutes les boites de bactériologie, pour nos discussions, notre travail d'équipe et tout simplement car tu es une personnalité que j'apprécie énormément, bien sûr certain diront que tu es trop … ou pas assez, moi je te dis ne change rien !

Merci à Alexandra pour tous les conseils sur la culture cellulaire, pour nos discussions de tout, de rien comme on dit mais qui font que la vie au laboratoire est agréable.

Merci à Maryline, Margaux pour nos échanges, nos réunions, nos discussions, le partage d'idée, d'astuces ou encore de recettes, …

Merci à Sylvie pour tout le temps passé à faire mes ordres de missions et réservations de train et d'hôtel et les remboursements de frais de transport et nos discussions, nos échanges.

Merci à tous les membres de l'UMR 754 IVPC (Infections Virales et Pathologie Comparée).

Je tiens à adresser un message à toutes les personnes que j'ai rencontré lors des unités d'enseignement, car grâce à vous les semaines passées en formation ont été très enrichissantes et très agréables.

Merci à mes parents pour m'avoir soutenu dans mes choix d'études qui m'ont permis d'être où je suis actuellement et de faire ce métier si passionnant. Et merci aussi à mon frère Franck.

Merci à ma mamie Simone pour ton soutien et ton ouverture d'esprit, tu me disais que j'étais ta confidente et moi je te dirais que tu as été une personne avec beaucoup de cœur qui a jalonné mon enfance puis ma vie d'adulte et qui a toujours été une oreille attentive pour moi. Tu resteras toujours dans mon cœur.

Et je terminerais par un grand merci à mon chéri pour avoir géré nos deux filles pendant les semaines où je suis partie en formation et merci à une chaîne célèbre de surgelés pour leur avoir permis de manger des plats équilibrés pendant que je n'étais pas là ou pas très disponible. Merci pour les soirées où j'avais besoin de temps pour les devoirs ou la rédaction. Merci de ton amour et ton soutien.

En espérant n'avoir oublié personne …

Christine

SOMMAIRE

RESUME .....

INTRODUCTION 1

I Les équidés 1

II L'anémie infectieuse équine 2

II.1 Répartition des foyers d'AIE 3

II.2 Réglementation 5

II.3 Surveillance de l'AIE 6

II.4 Les symptômes de l'AIE 7

III EIAV dans la famille des *Retroviridae* 8

III.1 Les Retroviridae 8

III.2 L'infection par EIAV 20

IV Conclusion 31

RESULTATS EXPERIMENTAUX .....

Partie 1 : Epidémiologie moléculaire d'EIAV en Europe à partir de foyers en Roumanie et en France 33

I Introduction 33

II Matériels et méthodes 33

II.1 Matériel biologique 33

II.2 Lignées cellulaires et dérivation de cellules primaires 34

II.3 Amplification du génome d'EIAV 36

II.4 Clonage 38

II.5 Séquençage et analyse 38

II.6 Production de virus souche $EIAV_{UK}$ et $EIAV_{FR1478}$ 39

II.7 Détection de la protéine de capside (CA) 40

III Résultats 41
III.1 Détection d'EIAV roumains et français. 41
III.2 Circulation de souches génétiquement distinctes en Europe 44
III.3 Diversité génétique du gène *gag* des souches EIAV 50
III.4 Dérivation du clone biologique $EIAV_{FR1478}$ 57
IV Discussion 62
Partie 2 : Maladie interstitielle pulmonaire associée à l'infection par EIAV chez le cheval 65
I Introduction 65
II Article 67
III Discussion 77
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....
I Discussion générale et perspectives 81
II Conclusion générale 83
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 85

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la population des équidés par continent entre 2006 et 2016. 1
Figure 2 : Répartition des nouveaux foyers d'AIE enregistrés par continents et ou pays entre 2005 et 2016. 4
Figure 3 : Police sanitaire en cas de suspicion d'AIE en France 5
Figure 4 : Profils cliniques et virologiques de poneys expérimentalement infectés par EIAV. 8
Figure 5 : Classification des Retroviridae..... 9
Figure 6 : Morphologie de différents Retroviridae. 11
Figure 7 : Organisation schématique du génome rétroviral de type simple comme ALV (A) ou complexe comme HTLV (B) .....**Erreur ! Signet non défini.**
Figure 8 : Comparaison des domaines de liaison de la protéine Alix au « late domain » p9 d'EIAV et p6 d'HIV [181] 14
Figure 9 : Interaction Tat/ P-TEFb /TAR avec le complexe d'élongation..... 14
Figure 10 : Particule (A) et organisation du génome proviral d'EIAV (B) 15
Figure 11 : Cycle cellulaire de EIAV.. 17
Figure 12 : LTR et interaction avec le facteur de transcription PU.1..... 20
Figure 13 : Maturation de la réponse immunitaire dirigée contre EIAV. 22
Figure 14 : Régions hypervariables V1-V8 de la glycoprotéine de surface gp90 d'EIAV..... 26
Figure 15 : Provenance géographique des chevaux de Roumanie.. 34
Figure 16 : Clonage des produits PCR EIAV avec le kit « CyClone Ligase-free Cloning » (Jena Bioscience).. 38
Figure 17 : Détection du génome d'EIAV. 41
Figure 18 : Répartition par âge de 22 isolats EIAV positif provenant de Roumanie. 43
Figure 19 : Estimation de la divergence selon l'origine géographique des souches d'EIAV..... 45
Figure 20 : Reconstruction phylogénétique à partir des séquences partielles du gène gag (~500 pb) d'isolats d'EIAV géographiquement distincts..... 46-48
Figure 21 : Alignement des séquences déduites en acides aminés d'isolats d'EIAV géographiquement distincts. 49-50

Figure 22 : Estimation de la divergence selon l'origine géographique des souches d'EIAV..... 51
Figure 23 : Reconstruction phylogénétique à partir des séquences complètes du gène gag (~1500 pb) d'isolats d'EIAV géographiquement distincts..... 51-52
Figure 24 : Alignement des séquences déduites en acides aminés d'isolats d'EIAV géographiquement distincts..... 53-55
Figure 25 : Estimation de la divergence dans le « late domain » p9 selon l'origine géographique des souches d'EIAV..... 56
Figure 26 : Alignement des séquences déduites en acides aminés dans le late domain p9..... 57
Figure 27 : $EIAV_{FR1478}$ se réplique dans les cellules eMDM. 58
Figure 28 : Expression de l'ARNm du récepteur ERL1 d'EIAV des cellules ED, des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648}..... 59
Figure 29 : Morphologie des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} infectés avec $EIAV_{FR1478}$ ou $EIAV_{UK}$ observés à 8 et 15 jours post infection (Jpi)..... 60
Figure 30 : $EIAV_{FR1478}$ se réplique dans les cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648}..... 61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Retroviridae : genre, hôtes, virus et pathologie. 10

Tableau 2 : Récepteur cellulaire utilisé par les Retroviridae. 18

Tableau 3 : Essais vaccinaux EIAV 30

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du génome d'EIAV 37

Tableau 5 : Détection du génome d'EIAV sur sangs de chevaux collectés en Roumanie et en France. 42

Tableau 6 : Echantillons séquencés dans le gène *gag* provenant de Roumanie (RO) et de France (FR). 44

ABREVIATIONS UTILISEES

ADN et ADNc : Acide DésoxyriboNucléique et ADN complémentaire
AIE : Anémie Infectieuse Equine
ARN : Acide RiboNucléique
CA : Capside
dNTP : désoxyNucléosides TriPhosphates
ED : Equine Dermal fibroblasts
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EIAV : Equine Infectious Anemia Virus
ELR-1 : Equine Lentivirus Receptor-1
env : Enveloppe
FIV : Feline Immunodeficiency Virus
gag : groupe-associated antigen
gp : glycoprotéine
HIV : Human Immunodeficiency Virus
IgG : Immunoglobuline G
kb: kilobase
LTR : Long Terminal Repeat
MA : protéine de Matrice
µl : microlitre
NC : NucléoCapside
ng : nanogramme
OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale.
pb : paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction
PM : marqueur de poids moléculaire
pol : polymerase
PR : protéase
$PR180^{gag}$: précurseur protéique de 180 kDa codé par les gènes *gag* et *pol*
$PR55^{gag}$: précurseur protéique de 55 kDa codé par le gène *gag*
R : Repeat region
Rev : regulator of expression of viral proteins
rpm : rotation par minute
RT : reverse transcriptase
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SRLV : Small ruminant lentivirus
SU : Surface
Tat : transactivator of transcription
TM : Transmembrane

INTRODUCTION

Dans le cadre de la préparation du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, j'ai intégré le projet de recherche EIAV dans l'équipe « Physiopathologie, rétrovirus et tumeurs rares » dirigée par le Dr Caroline Leroux au sein de l'UMR 754 (UCBL, INRA et EPHE) « Infections virales et Pathologie Comparée » de Lyon.

EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) est un rétrovirus responsable de l'anémie infectieuse équine, une des 11 maladies listées par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) [139]. L'infection est répartie à l'échelle mondiale et elle est surveillée dans de nombreux pays. La première partie de mon rapport décrit l'état des connaissances sur l'infection par EIAV et la maladie induite. Dans la partie expérimentale, je décris les travaux que j'ai réalisés sur la diversité génétique d'EIAV en Europe et la caractérisation des atteintes pulmonaires associées.

I LES EQUIDES

Les équidés sont des grands mammifères, herbivores, quadrupèdes, ongulés à sabot unique. Les chevaux, poneys, ânes, mulets, bardots et zèbres composent la famille des équidés. Il y avait plus de 50 millions d'équidés recensés dans le monde en 2016 alors que l'on en comptait près de 70 millions en 2006 (Figure 1) [2].

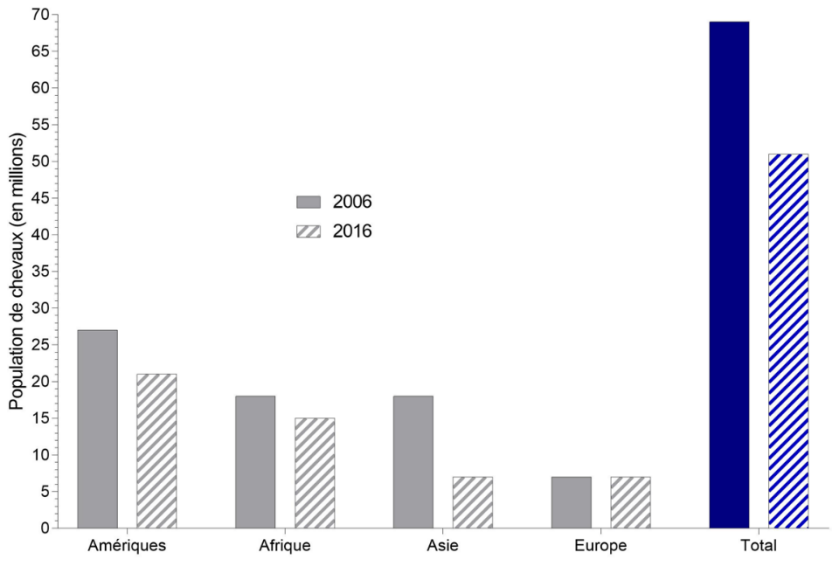


Figure 1 : Evolution de la population des équidés par continent entre 2006 et 2016. Nombre d'équidés recensés par continents d'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale [2] de 2006 et 2016.

Ces chiffres sont sous-estimés par le manque de recensements précis en Océanie ou en Asie. En Europe, il y a plus de sept millions d'équidés (Figure 1). En Roumanie, le cheptel a diminué de moitié en 10 ans [2].Le cheptel équin français comptait à lui seul plus d'un million d'équidés en 2016 sur les sept millions d'équidés recensés en Europe [2, 80]. Les équidés français doivent être identifiés depuis l'Arrêté du 30 avril 2002 relatif à l'identification et la certification des origines des équidés et l'Arrêté du 21 mai 2004 relatif à l'identification complémentaire des équidés par la pose d'une puce d'identification (transpondeur électronique). Ainsi depuis janvier 2008, la pose d'une puce est obligatoire sur tous les équidés domestiques présents en France. Ils doivent aussi être enregistrés dans la base de données nationale SIRE (système d'information relatif aux équidés) gérée par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation [80]. Ceci permet d'obtenir une estimation précise du cheptel d'équidés présent en France. Parmi les équidés domestiques Français, on compte 8 % d'ânes et 92 % de chevaux pour la majorité de selle et poneys (68 %), 18 % de chevaux de course et 6 % de chevaux de trait [80].

Les équidés peuvent être atteints de deux types de maladies :

1. Les **maladies nutritionnelles et métaboliques** qui sont liées à l'alimentation comme les coliques.
2. Les **maladies infectieuses** causées par des parasites et des protozoaires, des bactéries ou des virus.

Parmi les maladies viro-induites, mon travail s'est focalisé sur l'AIE (Anémie Infectieuse Equine) induite par le rétrovirus EIAV (Equine Infectious Anemia Virus).

II L'ANEMIE INFECTIEUSE EQUINE

L'infection d'un équidé par le virus EIAV peut entrainer l'apparition d'une maladie nommée AIE (Anémie Infectieuse Equine), décrite pour la première fois en France dans la Haute-Marne en 1843 par Ligné [110]. Cette maladie était alors dénommée cachexie aqueuse ou hydrohémie [110]. L'AIE fut ensuite associée à un agent filtrant en 1904 [201]. La maladie a été décrite aux États Unis en 1888, nommée « fièvre des marais » [55, 196]. L'AIE a été rapportée dans le monde entier, dans les années 1940 en Chine [205], dans les années 1950 en Roumanie [72], en 1968 au Brésil [195], en 1978 en Espagne [50], ou encore en 1987 en Inde [118].

II.1 **Répartition des foyers d'AIE**

L'AIE a une répartition mondiale. Entre 2005 et 2016, 95 000 nouveaux foyers ont été signalés dans le monde essentiellement en Amériques (86%) et en Europe (13%) avec une moyenne de presque 8000 nouveaux foyers par an (Figure 2) [1]. Deux foyers en Afrique et 28 foyers en Asie ont été recensés entre 2005 et 2016 [1]. Le Brésil représente la moitié et la Colombie ¼ des foyers recensés d'AIE dans le monde entre 2005 et 2016 (Figure 2) [1]. L'infection par EIAV est très importante dans les élevages de chevaux au Brésil avec 48 564 foyers recensés entre 2005 et 2016 [1]. La prévalence de l'infection est élevée et différente selon les régions [13, 140, 143, 195], elle est par exemple de 31,5 % dans la région du Pantanal [13, 52]. Sur la même période, l'Europe comptait presque 13 000 nouveaux foyers dont 80 % en Roumanie (pays qui représentait plus de 30 % des foyers au niveau mondial en 2011) (Figure 2).

Entre 2010 et 2013, la Roumanie comptait 6945 foyers avec 9194 équidés positifs [12]. Entre 2007 et 2014, des cas d'AIE ont été rapportés en Italie (Figure 2), Allemagne, Belgique, Bosnie, Croatie, Grèce, Hongrie, Irlande, Lettonie, Pologne, Royaume-Uni, Serbie, et Slovénie. [12, 37]. En France, depuis 2005, il a été détecté un à deux foyers avec deux à 15 équidés positifs par an dans les départements de l'Ardèche, du Var, du Vaucluse, du Gard, de la Dordogne, de la Gironde, du Lot et Garonne, du Nord et l'Ile et Vilaine, de la Sarthe et de l'Eure et Loire [1, 62] sauf en 2008 et 2010 où respectivement 14 et sept foyers avaient été détectés.

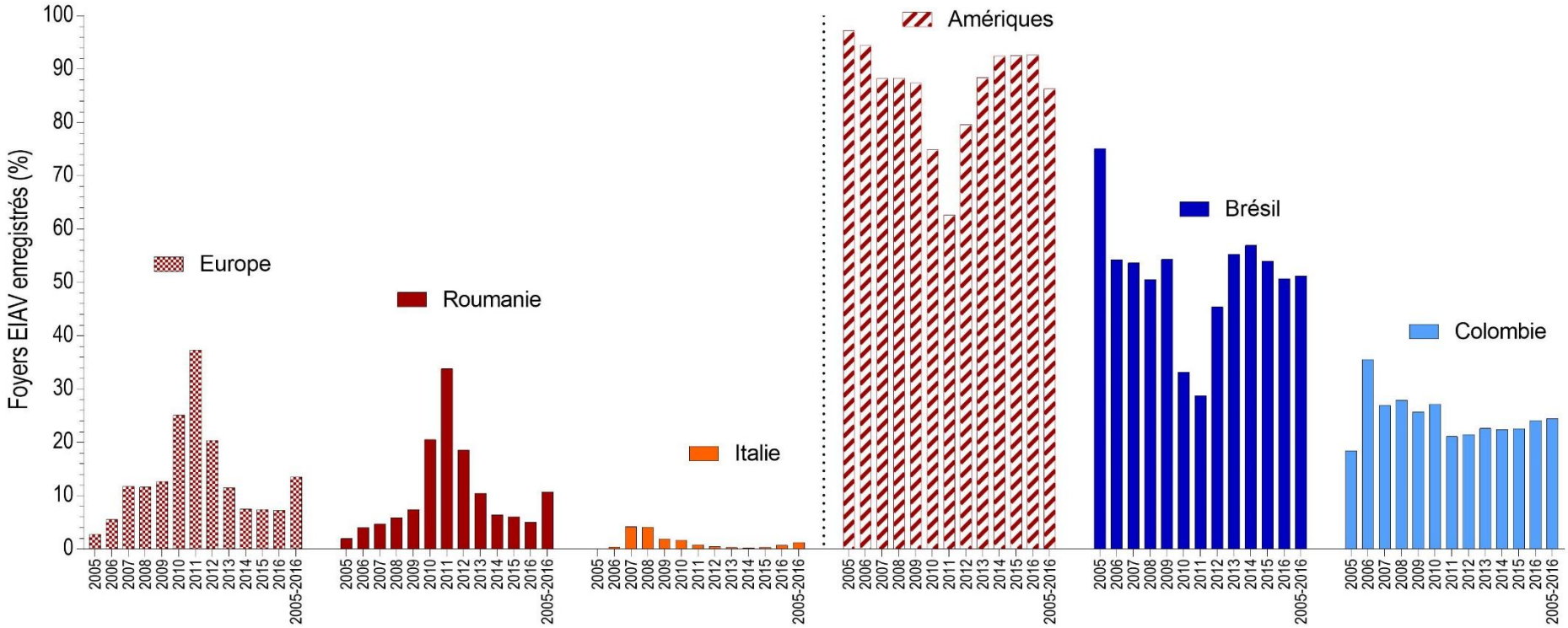


Figure 2 : Répartition des nouveaux foyers d'AIE enregistrés par continents et ou pays entre 2005 et 2016. D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale de 2005 à 2016 [1]

II.2 **Réglementation**

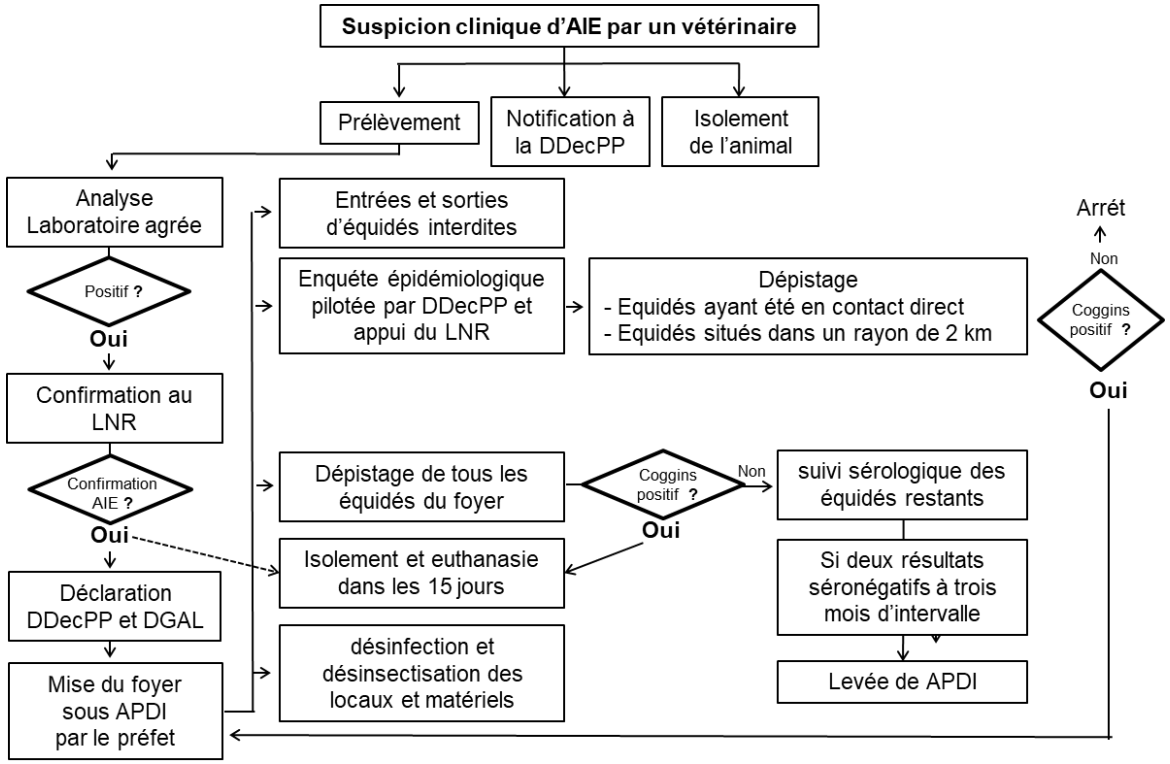


Figure 3 : Police sanitaire en cas de suspicion d'AIE en France [73]. LNR : laboratoire national de référence, DDecPP : direction départementale en charge de la protection de l'environnement, DGAL : direction générale de l'alimentation, APDI : arrêté préfectoral portant déclaration d'infection.

L'AIE fait partie des 11 maladies et infections des équidés à déclaration obligatoire figurant sur la liste des « Maladies, infections et infestations » de L'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) en vigueur en 2018 [139] qui entraine la mise en quarantaine et l'euthanasie des animaux séropositifs pour EIAV. Les 181 pays membres de l'OIE s'engagent à soumettre des informations sur la situation relative aux maladies animales dans les meilleurs délais et de façon transparente. L'apparition ou réapparition d'AIE, doit être notifiée dans les 24 heures à l'OIE par l'autorité vétérinaire du pays concerné qui devra assurer le suivi de la situation jusqu'à l'éradication ou la stabilisation de l'AIE [138]. L'AIE est soumise à une réglementation sur les importations de chevaux, avec l'établissement d'un certificat vétérinaire international attestant que les animaux n'ont présenté aucun signe clinique d'anémie infectieuse durant les 48 heures précédant leur chargement, et qu'aucun cas n'a été associé aux lieux dans lesquels les animaux ont séjourné au cours des trois derniers mois. Ce certificat doit aussi comporter une sérologie

négative pour EIAV dans les 30 jours précédents pour une importation définitive ou 90 jours pour une importation temporaire [137]. Au niveau de la communauté européenne, la réglementation s'appuie sur la directive 92/65/CEE du Conseil, du 13 juillet 1992, définissant les conditions de police sanitaire régissant les échanges et les importations. L'entrée de la Roumanie dans la communauté européenne en 2007 a nécessité des mesures de protection par rapport aux mouvements des équidés par décision de la commission européenne du 23 avril 2007.

En France, l'AIE est une « Maladie Réputée Contagieuse » (MRC) depuis le 23 septembre 1992 selon le code rural et de la pêche maritime (article D.223-21). Elle est classée en danger sanitaire de première catégorie depuis le décret n°2012-845 du 30 juin 2012 et l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013 (annexe 1a dangers sanitaires de première catégorie pour les espèces animales). Elle est inscrite sur la liste des vices rédhibitoires (article R213-1 du Code rural) pouvant entraîner la résolution de la vente ou la restitution d'une partie du prix dans les 30 jours suivant la livraison du cheval infecté par EIAV (Figure 3).

II.3 **Surveillance de l'AIE**

Dans le monde, la surveillance des équidés pour l'AIE est établie par chaque pays selon quatre modes [1]:

- Aucune mesure de surveillance indiquée,
- Surveillance générale,
- Surveillance de routine
- Surveillance ciblée.

Au niveau de l'union européenne, les pays membres doivent déclarer les foyers d'AIE aux autorités nationales et européennes selon la directive 82/894/CEE du Conseil du 21 décembre 1982 concernant la notification des maladies des animaux dans la Communauté. L'Italie et la Roumanie ont instauré un programme national de surveillance par un contrôle des équins de plus de six mois depuis 2006 en Italie ou de tous les équidés depuis 2007 en Roumanie [12, 72, 175]. Depuis 2011, la quasi-totalité des chevaux de Roumanie sont dépistés avec euthanasie de tous les animaux positifs [12]. Pour suivre les mouvements d'animaux, il existe le système expert de contrôle des échanges TRACES (TRAde Control and Expert System) depuis la Décision 2003/623/CE de la Commission européenne du 19 août 2003. En

France, la surveillance est obligatoire en cas de suspicion clinique ou nécropsique et des tests sérologiques avant exportation. Le dépistage des mâles reproducteurs utilisés pour l'insémination artificielle est obligatoire selon l'arrêté ministériel du 04 novembre 2010 et la directive 92/65/CEE du Conseil du 13 juillet 1992**.** La surveillance est volontaire pour les autres reproducteurs et en amont d'une vente d'un équidé. En cas de suspicion d'AIE, une police sanitaire (Figure 3) est mise en place afin d'assainir le foyer infectieux. Le dépistage s'effectue par sérologie reposant sur le test de Coggins [32] (développé dans le paragraphe *III.2.4).*

II.4 **Les symptômes de l'AIE**

L'AIE associe différents symptômes dont une hyperthermie associée à une thrombocytopénie, un amaigrissement, une splénomégalie et des pétéchies [101]. L'infection expérimentale par EIAV se caractérise par l'évolution d'un stade aigu vers un stade chronique à un stade asymptomatique pendant lequel les équidés bien qu'infectés à vie ne présentent plus de manifestation clinique [101] (Figure 4). Les équidés restent potentiellement infectieux comme le montre le transfert de sang d'un cheval positif pour EIAV à un cheval naïf [40, 45, 201].

Lors de l'infection expérimentale par EIAV, la maladie se caractérise par une virémie, une hyperthermie et une thrombocytopénie [30] (Figure 4) :

① La **phase aiguë** apparait 10 à 15 jours après l'infection et est caractérisée par une hyperthermie avec une température rectale supérieure à 39°C et une thrombocytopénie avec un nombre de plaquettes inférieur à 100 000/microlitre de sang total [49, 100]. La virémie peut atteindre 10^5 à 10^7 copies d'ARN viral par millilitre de plasma [48].

② La **phase chronique** s'étend de 6 et 12 mois. Elle est caractérisée par la récidive d'épisodes associant hyperthermie et thrombocytopénie [101].

③ La **phase asymptomatique** présente un retour à la normale de la température et du taux des plaquettes. Les équidés peuvent rester asymptomatiques toute leur vie. L'état chronique peut être rétabli par traitement immunosuppresseur transitoire avec de la dexaméthasone [42, 43, 101].

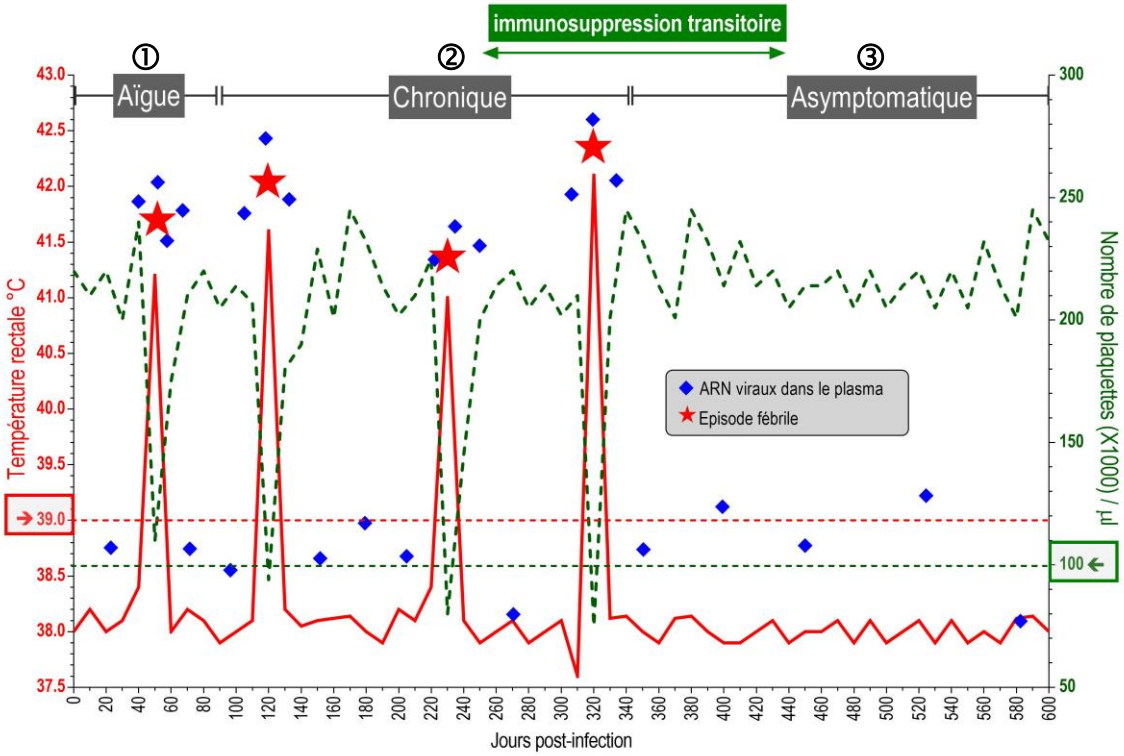


Figure 4 : Profils cliniques et virologiques de poneys expérimentalement infectés par EIAV. Température rectale (——), nombre de plaquette/µl de sang total (-----), épisodes fébriles (★) et charge virale en ARN dans le plasma (♦) (d'après [100]).

III EIAV DANS LA FAMILLE DES *RETROVIRIDAE*

III.1 Les Retroviridae

III.1.1 Classification

Les *Retroviridae* sont une famille de virus divisée en sept genres : alpha-rétrovirus, beta-rétrovirus, delta-rétrovirus, gamma-rétrovirus, epsilon-rétrovirus, spumavirus et lentivirus dont EIAV [79, 215] (Figure 5, tableau 1). Ils infectent de nombreuses espèces de la souris ou le poulet jusqu'aux grands singes et l'homme avec HIV (Human Immunodeficiency Virus) ou HTLV (Human T-Lymphotropic Virus). Les rétrovirus sont présents chez les animaux domestiques tels que le chat avec FIV (Feline Immunodeficiency Virus) et FeLV (Feline Leukemia Virus), les petits ruminants avec SRLV (Small Ruminant Lentiviruses), JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) et ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus) ou les bovins avec BIV (Bovine immunodeficiency virus) et BLV (Bovine Leukemia Virus); à noter que jusqu'à ce jour aucun rétrovirus n'a été découvert chez les canidés. Les rétrovirus sont responsables

de cancers comme JSRV, de syndrome d'immunodéficience comme HIV ou de maladies chroniques comme EIAV chez les équidés [173] (Tableau 1). Outre EIAV, les chevaux sont également infectés par EFV (Equine Foamy Virus), un spumavirus non associé à une maladie pathologique [96].

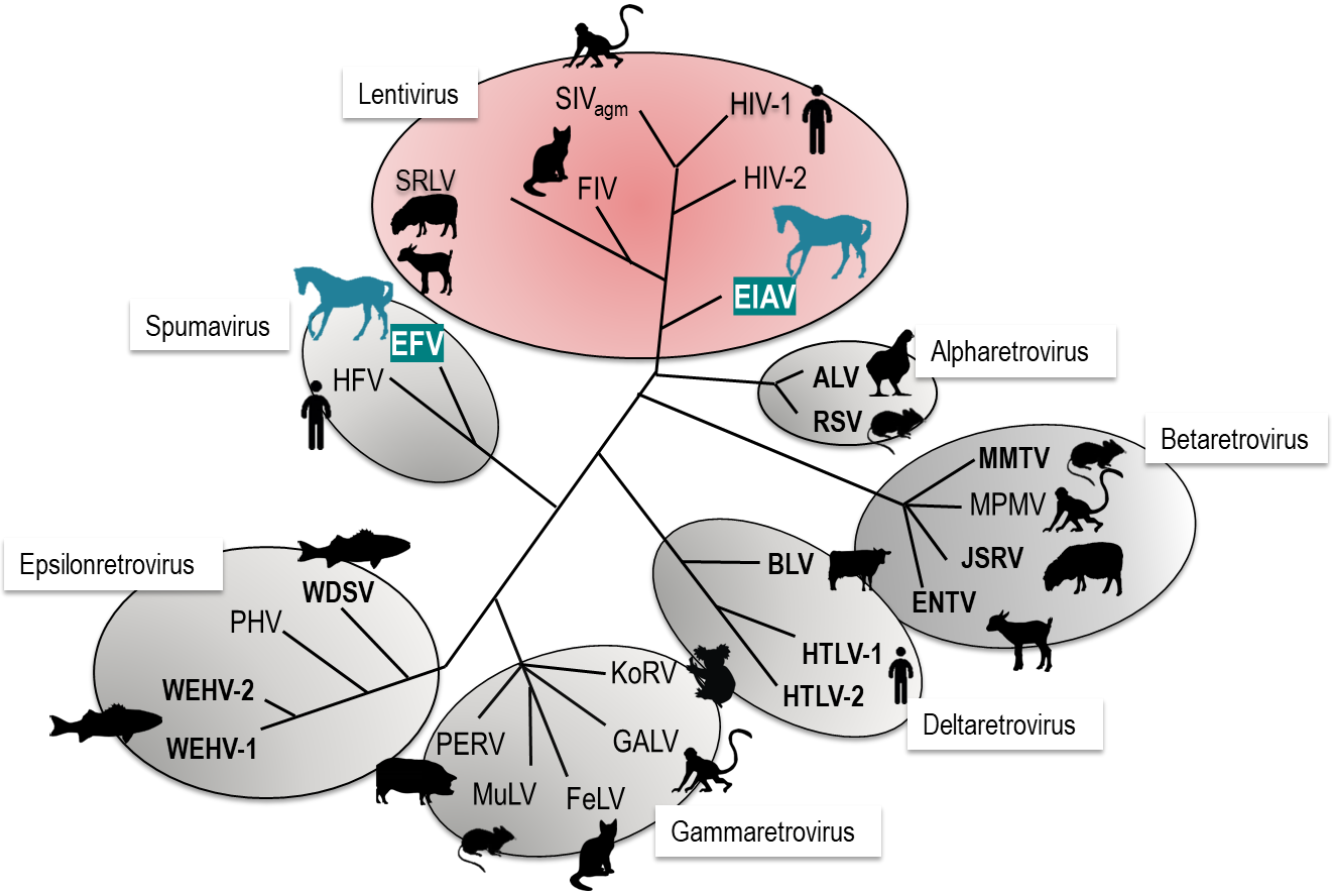


Figure 5 : Classification des Retroviridae (adaptée de [79]).

Tableau 1 : Retroviridae : genre, hôtes, virus et pathologie. [79, 173].

Genre	Hôtes	Virus	Pathologie
Alpharétrovirus	Oiseaux	ALV (Avian Leukosis Virus)	lymphome
		RSV (Rous Sarcoma Virus)	sarcome
Betarétrovirus	Ovins/caprins	JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus)	adénocarcinome pulmonaire
		ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus)	adénocarcinome nasal
	Souris	MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus)	adénocarcinome mammaire
	Singes	MPMV (Mason Pflzer Monkey Virus)	syndrome d'immunodéficience
Gammarétrovirus	Félins	FeLV (Feline Leukemia Virus)	leucémie
	Porcs	PERV (Porcine endogenous retrovirus)	aucune pathologie associée
	Primates	GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus)	leucémie
	Souris	MLV (Murine Leukemia Virus)	leucémie
	Koalas	KoRV-A et B (Koala Retrovirus A et B)	leucémie, lymphome, immunosuppression
Deltarétrovirus	Bovins	BLV (Bovine Leukemia Virus)	leucémie
	Humains	HTLV1 et 2 (Human T-Lymphotropic Virus 1 et2)	leucémie, neuromyélopathie
Epsilonrétrovirus	Poissons	WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus)	sarcome épidermique
		WEHV1 et 2 (Walleye Epidermal Hyperplasia Virus 1 et 2)	hyperplasie épidermique
Lentivirus	Humains	HIV 1 et 2 (Human Immunodeficiency Virus 1 et 2)	syndrome d'immunodéficience aquise, anémie, pneumopathie interstielle
	Singes	SIV (Simian Immunodeficiency Virus)	syndrome d'immunodéficience
	Félins	FIV (Feline Immunodeficiency Virus)	syndrome d'immunodéficience, pneumopathie interstielle
	Ovins/caprins	SRLV (Small Ruminant Lentiviruses)	pneumopathie interstielle, maladies pulmonaires et articulaires
	Equins	**EIAV (Equine Infectious Anemia Virus)**	**anémie infectieuse équine**
Spumavirus	Singes	SFV (Simian Foamy Virus)	aucune pathologie associée
	Humains	HFV (Human Foamy Virus)	
	Equins	EFV (Equine Foamy Virus)	
	Félins	FSV (Feline Syncytial Virus)	
	Bovins	BSV (Bovine Syncytial Virus)	

III.1.2 La particule rétrovirale

La particule rétrovirale est généralement sphérique, d'un diamètre compris entre 80 et 200 nm [173, 215] (Figure 6). Le diamètre de la particule d'EIAV est d'environ 115 nm [36, 85]. Deux copies d'ARN simple brin sont contenues dans une capside de forme conique pour les lentivirus dont EIAV (Figure 10A). L'ensemble appelé nucléocapside est entouré d'une matrice protéique. L'enveloppe rétrovirale est constituée des glycoprotéines d'enveloppes virales et d'éléments de la bicouche lipidique cellulaire dont des protéines acquises lors du bourgeonnement du virus à la membrane cellulaire (Figure 10A).

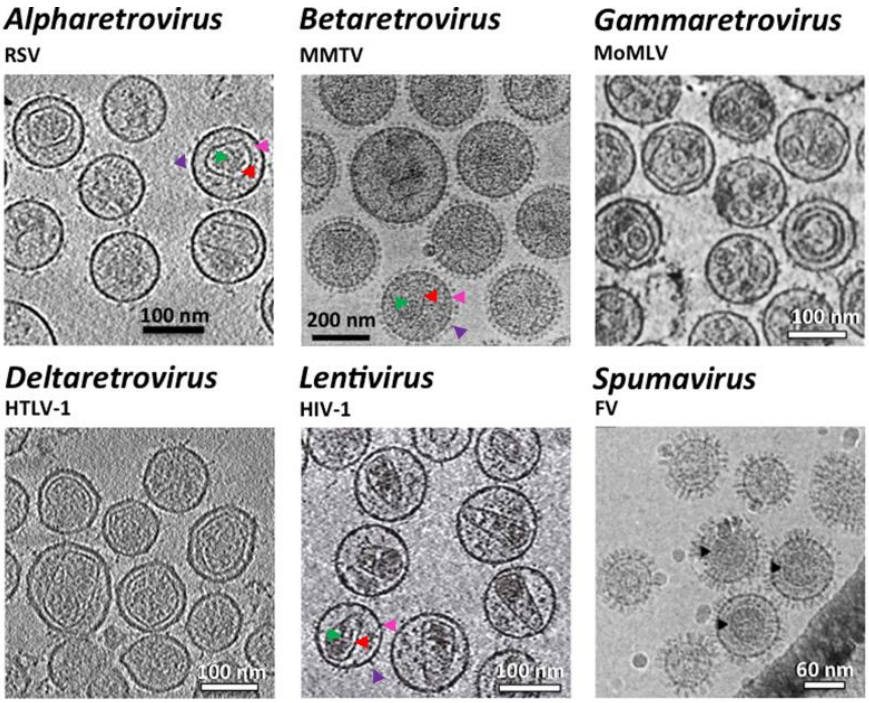


Figure 6 : Morphologie de différents Retroviridae. Images obtenues par cryo-microscopie électronique et tomographie cryo-électronique adapté de [215]. Glycoprotéine d'enveloppe (►), matrice (►), capside (►), ARN viral (►) et assemblage Gag (►).

III.1.3 Organisation génomique et protéines virales

Les *Retroviridae* sont des virus enveloppés dont le génome est composé de deux brins d'ARN monocaténaire de polarité positive [173] de 7 à 13 kb [204]. Ils possèdent les gènes *gag*, *pro*, *pol, et env* en communs *qui* codent pour les protéines de structure et les activités enzymatiques nécessaires à la réplication du virus [31]. Le gène *gag* code pour les protéines de la matrice (MA), de capside (CA) et de

nucléocapside (NC), *pro*/*pol* codent pour les activités enzymatiques soit la protéase (PR), la reverse transcriptase (RT), l'intégrase (IN) et la dUTPase et *env* code pour les glycoprotéines de surface (SU) et transmembranaire de l'enveloppe (TM) [204].

Les rétrovirus sont divisés en deux types : simples possédant les gènes cités précédemment ou complexes avec des gènes codant pour des protéines accessoires ou régulatrices [31] (Figure 7).

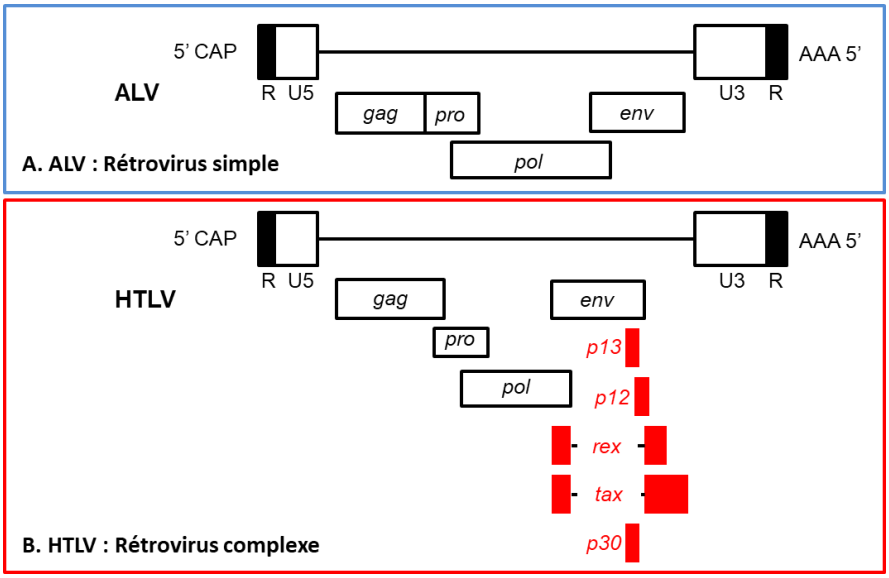


Figure 7 : Organisation schématique du génome rétroviral de type simple comme ALV (A) ou complexe comme HTLV (B) [31]

Le précurseur protéique Gag-Pol ($PR180^{gag/pol}$) d'EIAV est clivé en quatre enzymes : la PR (protéase), la RT (reverse transcriptase), l'IN (INtegrase) et la dUTPase (deoxyUridine Triphosphatase) [100]. La PR permet le clivage des polyprotéines, la RT associé à la RNase-H est une ADN polymérase ARN dépendante permettant la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN (Acide DésoxyriboNucléique). L'IN permet l'intégration de l'ADN dans le génome de l'hôte. La dUTPase hydrolyse les dUTP (deoxyUridine Triphosphate) en dUMP (deoxyUridine Monophosphate) et PPi (pyrophosphate), précurseur des dTTP (désoxythymidine triphosphate), pour limiter l'intégration d'uracile dans l'ADN néosynthétisé [78]. Le précurseur protéique Gag ($PR55^{gag}$) est clivé par la protéase PR en quatre protéines structurales : matrice (MA), capside (CA) de 26 kDa pour EIAV, nucléocapside (NC) de liaison à l'ARN génomique. La capside des *Retroviridae* contient une région très conservée nommée MHR (Major Homology Region) d'une taille de 20 acides aminés [191]. MHR est requis pour l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales [56, 115, 159, 191]. La séquence déduite

en acides aminés proposée de MHR pour les virus apparentés à la souche Wyoming (GenBank accession AF033820) est IRQG(A/V)KEPYPEF(V/I)DRLLSQI [56]. La nucléocapside d'EIAV présente deux motifs ZBD (Zinc Binding Domain) de 14 acides aminés (C-X2-C-X4-H-X4-C avec C pour cystéine et H pour histidine) séparés par la séquence RAPKV (arginine-alanine-proline-lysine-valine) [56]. Le motif ZBD est connu pour se lier aux acides nucléiques et pour l'encapsidation des ARN lors de l'assemblage du virus [65]. Une région de *gag* de certains lentivirus code pour un « late domain », p9 pour EIAV [157] et p6 pour HIV [181] (Figure 8) qui contient un motif YPDL pour EIAV. Ce domaine est essentiel pour la libération des particules virales par bourgeonnement à la membrane plasmique [26, 157] par interaction avec un complexe cellulaire AP-2 (Adaptor Protein 2) pour EIAV [158] ou la protéine AIP1/Alix (Alg-2 interacting protein X/Apoptosis Interacting Protein 1) pour HIV et EIAV [187] (Figure 8). EIAV combine la machinerie de transport endosomal précoce (sous unité µ2 de AP-2) et tardive (AIP1/Alix) pour l'assemblage rétroviral et le bourgeonnement des particules [27]. EIAV détourne la voie cellulaire ESCRT (endosomal sorting complexe required for transport) par interaction du motif YPDL avec le domaine V de la protéine ubiquitaire AIP1/Alix [187], CHMP4B (Charged Multivesicular Body Protein 4B), CHMP2A (Charged Multivesicular Body Protein 2A) et Vps4A/B (vacuolar protein sorting 4 A/B) [172] pour bourgeonner à la surface des cellules qu'il infecte. Outre ces motifs, *gag* possède des épitopes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques dans la matrice d'EIAV comme CTL-EC1 et CTL-EC2 (Cytotoxic T Lymphocytes - Epitope Cluster) et dans la capside d'EIAV soit CTL-EC3 et CTL-EC4 [129]. Les épitopes EC1, 3 et 4 possèdent chacun une région de séquence peptidique conservée pour se lier aux CTL [28]. L'épitopes EC2 est un domaine hypervariable [129].

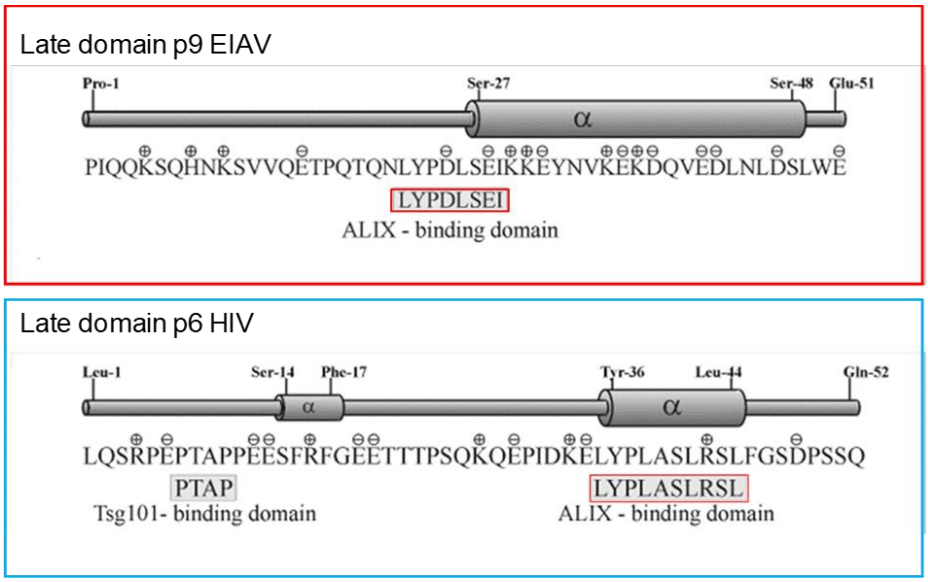


Figure 8 : Comparaison des domaines de liaison de la protéine Alix au « late domain » p9 d'EIAV et p6 d'HIV [181]

Le précurseur protéique Env est clivé et glycosylé en glycoprotéine de surface (SU) et transmembranaire (TM) de respectivement 90 kDa (gp90) et 45 kDa (gp45) pour EIAV.

Avec 8,2 kb, le génome d'EIAV (Figure 10B). est le plus petit et le plus simple des génomes lentiviraux [101]. Il est de type complexe et comporte en plus des gènes *gag*, *pol et env*, trois petits cadres de lecture additionnels codant pour les protéines régulatrices ou accessoires Tat, Rev et S2 [100] :

- **La protéine Tat (TransActivator of Transcription)** d'EIAV est un transactivateur transcriptionnel qui augmente le taux de transcription virale grâce à l'interaction avec l'élément TAR (Transactivation Response Element), une séquence ARN en épingle à cheveu indispensable pour la transactivation du promoteur viral LTR (Long Terminal Repeat) [59, 192]. Les interactions Tat/TAR permettent le recrutement de facteurs cellulaires dont P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b), un complexe protéique contenant la CDK9 (Cyclin-Dependant Kinases 9) et la cycline T1 [3, 9, 91, 192] qui augmentent la processivité de l'ARN polymérase II *via* la phosphorylation de son extrémité carboxy-terminal [4, 189] (Figure 9). Tat d'EIAV participe à la restriction d'hôte du virus puisqu'elle ne peut interagir qu'avec la cycline T1 équine et avec son orthologue canin [192].

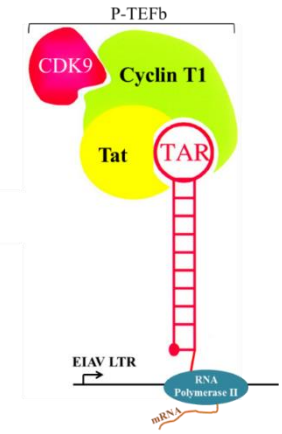


Figure 9 : Interaction Tat/ P-TEFb /TAR avec le complexe d'élongation adapté de [192].

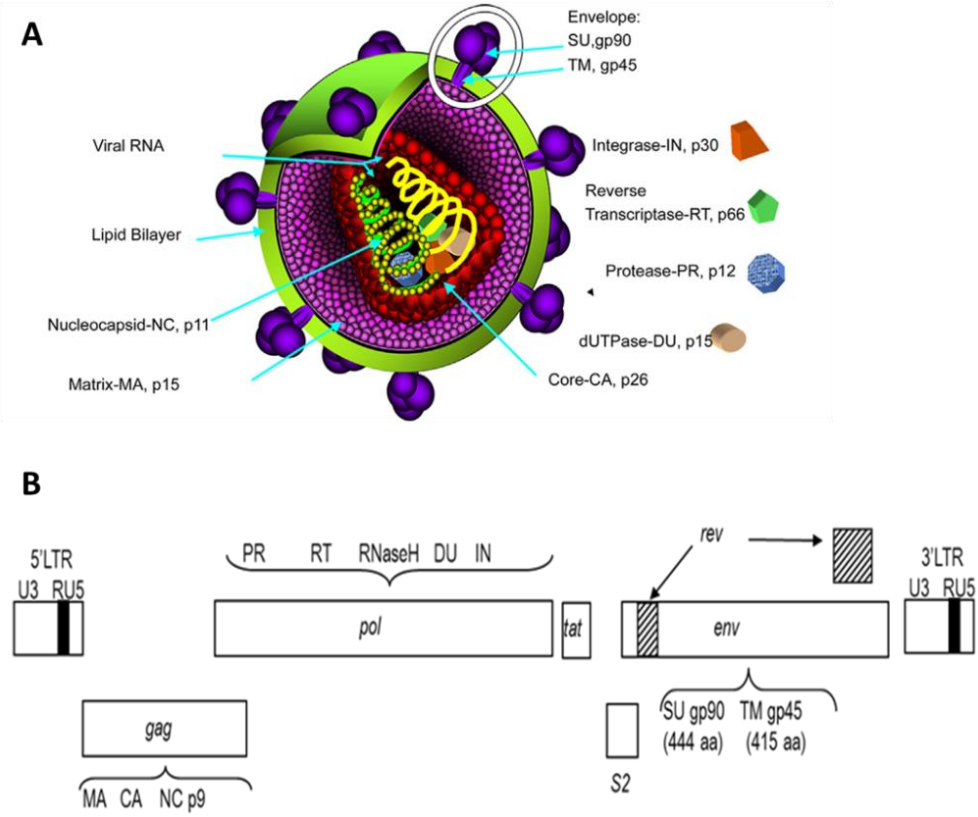


Figure 10 : Particule (A) et organisation du génome proviral d'EIAV (B). D'après [85, 100]

- **La protéine Rev (Regulator of Viral expression)** résulte de la traduction de l'ARNm *tat-rev* [22]. L'expression de *rev* est régulée par une séquence Kozak (séquence conservé au niveau du codon d'initiation) située en amont du cadre de lecture ouvert de *rev* dans l'ARNm *tat-rev* [117]. Rev permet le transport du noyau vers le cytoplasme par liaison des ARNm non totalement épissés *via* la séquence RRE (Rev Response Elements) [22, 117].
- EIAV possède une petit **cadre de lecture supplémentaire S2**, codant une petite protéine auxiliaire S2 de 65 acides aminés, unique parmi les rétrovirus [101]. Elle est composée de trois motifs fonctionnels (GLFG, PXXP et RRKQETKK) et le cadre de lecture ouvert est très conservé [105]. Il a été montré que la protéine S2 n'est pas essentielle pour la réplication du virus *in vitro* [105], mais indispensable pour la réplication du virus et la progression de la maladie *in vivo* [60, 105, 106]. S2 active l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1α, IL-1β, IL-8 et des chimiokines MCP-2 (Monocyte chemotactic protein-2), MIP-1β (Macrophage inflammatory protein-1β) et IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10) dans les

macrophages infectés [38]. L'interaction de S2 avec certaines protéines cellulaires et l'activation de l'expression des cytokines et chimiokines entrainant une accumulation de macrophages dans les tissus, permet de supposer qu'une des fonctions de S2 est de favoriser la réplication virale [38, 39]. S2 est capable de favoriser l'infectivité du virus EIAV en s'opposant à l'activité antivirale des protéines transmembranaires SERINC (SERine INCorporator) 3 et 5 [25]. S2 empêche l'incorporation des protéines SERINC 3 et 5 dans les virions de façon similaire à Nef de HIV [25, 200].

III.1.4 Le cycle rétroviral

Le cycle d'infection d'une cellule par un rétrovirus peut se diviser en plusieurs étapes: attachement du virus avec fixation à un récepteur, fusion des membranes, décapsidation, rétrotranscription de l'ARN viral en ADN, intégration de l'ADN viral au génome, synthèse des protéines structurales et du génome viral, assemblage à la membrane et sortie et maturation de nouvelles particules virales par bourgeonnement (Figure 11).

Les virus interagissent avec la cellule cible *via* un récepteur membranaire (Tableau 2) et les glycoprotéines d'enveloppe de la particule virale [133]. Certains rétrovirus ont besoin d'un corécepteur comme HIV [209] (Tableau 2). Le récepteur cellulaire du virus EIAV, ELR1 (Equine Lentivirus Receptor 1), a été identifié en 2005, par criblage d'une banque d'ADNc de macrophages équins sur des fibroblastes murins NIH 3T3 non permissifs [212]. ELR1 appartient à la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) [212] et est exprimé dans les cellules équines permissives comme les macrophages et monocytes équins ou les lignées cellulaires ED (Equine Dermal) et FEK (Fetal Equine Kidney) [212].

Une forme soluble de la protéine sELR1 a été décrite; elle agit comme un facteur cellulaire secrété qui inhibe l'infection par EIAV [113]. Le récepteur ELR1 interagit avec la glycoprotéine d'enveloppe gp90 [161]. L'ectodomaine d'ELR1 contient quatre domaines riches en cystéine, CRD1 à CRD4 (Cysteine Rich Domain 1 to 4) [213]. La leucine en position 70 et la glycine en position 72 du domaine CRD1 d'ELR1 sont les résidus critiques pour l'interaction avec la glycoprotéine gp90 [161].

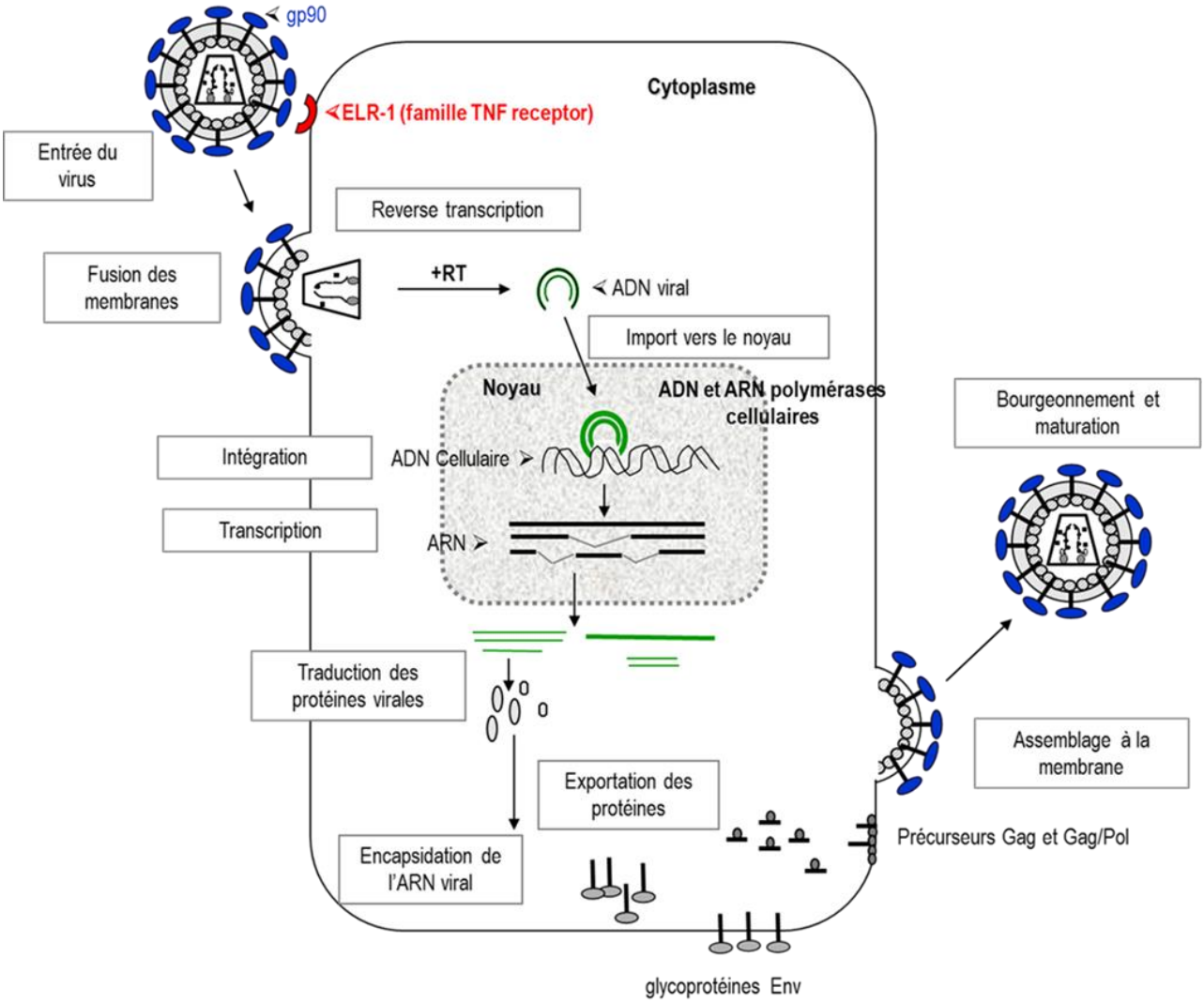


Figure 11 : Cycle cellulaire de EIAV. Adapté de [100].

Tableau 2 : Récepteur cellulaire utilisé par les Retroviridae d'après [141].

Genre	Virus	Récepteur
alpharétrovirus	ALV(B)	CAR1 (carbonic anhydrase 1)
betarétrovirus	JSRV	HYAL2 (hyaluronoglucosaminidase 2)
	MMTV	mTfR1 (mouse transferrin receptor 1)
gammarétrovirus	GALV	Pit1 (synonyme de SLC20A1, solute carrier family 20 member 1)
	MLVs	mCAT1 (Mouse cationic amino acid transporter 1) ou XPR1 (xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1) ou SLC20A1 (solute carrier family 20 member 1) ou SLC20A2 (solute carrier family 20 member 2)
deltarétrovirus	HTLV_1	GLUT1 (synonyme de SLC2A1, solute carrier family 2 member 1) et NRP-1 (neuropiline 1) et HSPG (Héparanes sulfates protéoglycanes) (synonyme de SDC2, syndecan 2)
epsilonrétrovirus	WDSV	RACK1 (receptor for activated C kinase 1)
lentivirus	HIV, SIV	CD4 (CD4 molecule) et corécepteur CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4), CCR5 (C-C motif chemokine receptor 5)
	EIAV	ELR1 (Equine lentivirus receptor-1)
	FIV	CD134 (synonyme de TNFRSF4, TNF receptor superfamily member 4)
spumavirus	FVs	non connu

Les cellules fibroblastiques embryonnaires de souris NIH 3T3 rendues permissives par l'expression du récepteur ELR1 et de la cycline T1 équine permettent la réplication productive d'EIAV et la production de virion infectieux [214]. Des souris transgéniques exprimant ELR1 et la cycline T1 équine sont sensibles à l'infection et à la réplication d'EIAV et développent des anomalies dans la rate et des ganglions lymphatiques [91]. La fusion des membranes peut s'effectuer selon un mécanisme indépendant du pH par interaction de l'enveloppe virale avec le récepteur cellulaire ou dépendant du pH par endocytose du virus [215]. La décapsidation entraine la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule cible. Les deux copies d'ARN sont rétrotranscrites en ADN grâce à la RT associée à la RNase-H qui conduit à la formation d'un ADN viral double brin possédant des

séquences LTR (Long Terminal Repeat) à chaque extrémité [104]. Les LTR se composent de régions répétées (R) encadrées par des régions uniques (U3 et U5) (Figure 12A). Ils sont indispensables pour l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire [104] .

Le complexe PIC (Pre-integration complex) est formé de l'ADN viral, des protéines virales de matrice, de l'intégrase et des protéines cellulaires [104]. Ce complexe va permettre d'amener l'ADN viral au noyau et procéder à son intégration à l'ADN cellulaire grâce à l'intégrase fixée aux LTR [104]. L'intégration du génome EIAV se fait préférentiellement dans les gènes et les régions riches en nucléotides A (adénine) et T (thymine) dans le génome équin et s'intègre préférentiellement près des séquences répétées de type LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) [69, 114].

Les LTR sont indispensables pour la transcription *via* le promoteur viral et les signaux de terminaison et de polyadénylation en 3' [36, 56, 77, 101]. Le facteur de transcription PU.1 (Purine Rich element 1) spécifique des macrophages et cellules B, se fixe sur la région activatrice du LTR d'EIAV (Figure 12) pour activer la transcription [23, 77]. Les LTR contiennent une séquence TATA conservée en aval du site de liaison au facteur de transcription PU.1 situé le plus en 3' [77] (Figure 12A). Le facteur de transcription PU.1 est critique pour les niveaux de transcription médiés par le transactivateur transcriptionnel Tat [77]. Les LTR jouent un rôle dans la virulence par les différents facteurs qui peuvent s'y fixer [56, 151] (Figure 12A).

L'ADN proviral est répliqué lors de la division cellulaire par l'ADN polymérase cellulaire et les ARN sont transcrits par l'ARN polymérase II. Les transcrits ARN sont soit épissés et traduits pour Env, soit non épissés pour être incorporés dans le nouveau virion ou pour être traduits en protéines virales pour Gag et Pol [173]. Après encapsidation de l'ARN viral et assemblage, le bourgeonnement à la membrane cellulaire et la maturation permettent la production de particules virales néoformées capables d'infecter de nouvelles cellules cibles [173].

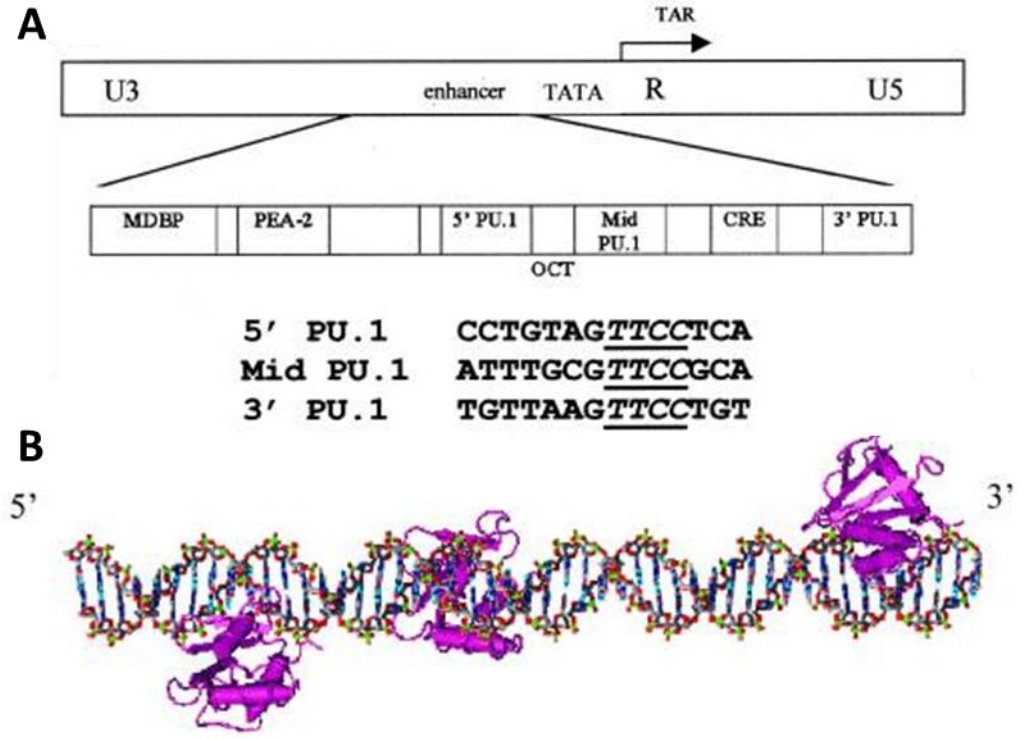


Figure 12 : LTR et interaction avec le facteur de transcription PU.1 [77]. (A) LTR d'EIAV et séquences nucléotidiques des trois motifs de liaison du facteur de transcription PU.1. Sites de liaison de la région activatrice « enhancer » du LTR au PU.1, au MDBP (Methylated DNA-Binding Protein), au PEA-2 (Polyomavirus Enhancer Activator 2), au OCT : OCTamer et au CRE (Camp Response Element). (B) Modélisation du facteur de transcription PU.1 montrant les 3 régions de liaison (en rose) sur la région activatrice « enhancer » du LTR d'EIAV.

III.2 **L'infection par EIAV**

De manière générale, les lentivirus infectent différentes espèces de mammifères et ils se répliquent dans les macrophages, seuls HIV, FIV, BIV et SIV se répliquent également dans les lymphocytes [100, 166]. Les lentivirus sont responsables de maladies inflammatoires d'évolution lente et ou dégénératives. Les SRLVs (Small Ruminant LentiVirus) (Tableau 1) infectant les ovins et les caprins entraînent une infection systémique persistante conduisant à des lésions de la glande mammaire, du poumon, des articulations et du système nerveux central [102, 124]. EIAV infecte les chevaux, mules et ânes, ces derniers ne développent pas de signes cliniques [37].

III.2.1 Transmission d'EIAV

Le virus EIAV se transmet essentiellement par le sang [82], de façon « mécanique » soit par des insectes piqueurs ou lors de soins vétérinaires [82]. EIAV peut être transmis par de gros insectes diptères hématophages comme les tabanidés

tels que *tabanus* ou mouches à cheval et chrysops ou mouches à cerf ou par les mouches des écuries ou des étables (*stomoxys calcitrans*) lors de repas sanguins interrompus [86]. Le virus ne se multiplie pas dans les cellules des insectes [183]. La transmission iatrogène se fait lors de soins vétérinaires avec utilisation de matériels tels que aiguilles et instruments chirurgicaux non stériles et contaminés par du sang infecté [51, 163]. Il n'existe pas d'évidence de transmission verticale de la jument au poulain [67, 103] et la transmission par transfert d'embryons est considérée comme nulle [6, 67]. Par contre, le passage par voie aérienne a été suggéré lors d'épisodes infectieux en Irlande [125].

III.2.2 EIAV et tropisme.

In vivo, les cibles d'EIAV sont principalement les monocytes et macrophages [134, 177]. Le virus est détecté dans les tissus riches en macrophages soit la rate, le foie, le poumon, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse [74]. L'infection des monocytes du sang périphérique est non productive se limitant à l'infection virale avec l'entrée du virus et la transcription inverse des ARN, mais sans réplication virale [177, 178]. Leur différenciation en macrophages est requise pour activer la réplication du virus [119, 177, 178]. EIAV infecte également les cellules endothéliales [120, 135]. Nous avons décrit l'infection *in vivo* de cellules épithéliales bronchiolaires et alvéolaires du poumon [11] associée à la présence de lésions de pneumopathie interstitielle similaires à celles observées lors d'infection par d'autres lentivirus comme FIV chez le chat [15], HIV chez l'enfant [210] ou SRLV chez les petits ruminants [127]. *In vitro*, EIAV se réplique dans les macrophages équins dérivés de monocytes sanguins, les macrophages tissulaires dérivés de rate ou de moelle osseuse, les fibroblastes, quelques lignées cellulaires de fibroblastes transformées d'origine canine ou féline, ou des cellules primaires fœtales de rein d'origine équine [101, 150].

III.2.3 Réponse immunitaire de l'hôte

L'infection expérimentale d'un poney par le virus $EIAV_{PV}$ entraine une réponse immunitaire humorale et cellulaire [70] (Figure 13). Les anticorps de type IgG (Immunoglobuline G) spécifiques de l'enveloppe et de la protéine de capside sont produits pour atteindre un plateau vers trois mois (Figure 13). Les anticorps neutralisants, bloquant l'entrée du virus dans les cellules lors des phases initiales de

l'infection, apparaissent plus tardivement (N = 2,5 mois) (Figure 13). La réponse immunitaire humorale évolue sur une période de maturation de 6 à 8 mois où la population des anticorps spécifiques de faible avidité, non neutralisants avec une spécificité d'épitope linéaire prédominant évolue vers une population d'anticorps d'avidité modérée à forte, neutralisants avec une spécificité d'épitope conformationnel prédominant [70]. Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'enveloppe sont produits rapidement [70]. L'établissement d'une réponse immunitaire mature associant des taux élevés d'anticorps à haute avidité, dépendant de la conformation et d'une réponse CTL forte coïncide avec la résolution des épisodes fébriles et le contrôle de l'infection.

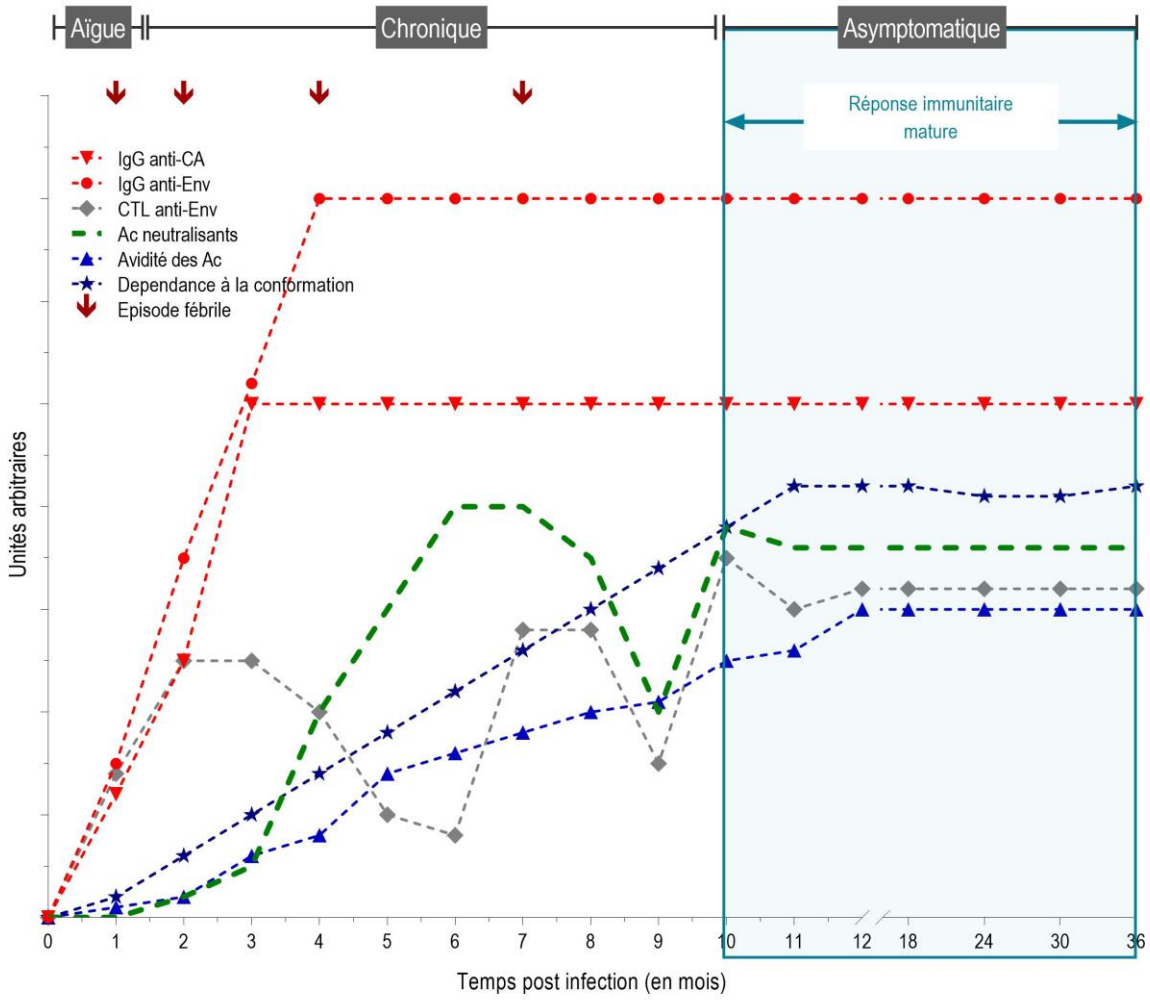


Figure 13 : Maturation de la réponse immunitaire dirigée contre EIAV. Chez un poney expérimentalement infecté par $EIAV_{PV}$, la réponse immunitaire humorale et cellulaire évolue au cours des 8-12 premiers mois et le développement d'épisodes fébriles (🡻) jusqu'à la mise en place d'une réponse immunitaire mature, caractérisée par des taux élevés d'anticorps (Ac) dirigés contre CA (▼) et Env (●), d'Ac neutralisants (- - -), de CTL anti-Env (◆) et d'Ac dépendants de la conformation de l'antigène (★) et de forte avidité (▲)[36, 70, 101].

L'utilisation des chevaux de race arabe SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) présentant un déficit immunitaire [193, 194] a permis de comprendre l'effet des anticorps. Le syndrome SCID est une maladie autosomale, récessive héréditaire qui apparait chez ~ 2,5 % des poulains arabes [154]. La pathologie induite est liée à la mutation d'allèle codant pour la protéine DNA-PK (DNA – dependant protein Kinase) indispensable pour la recombinaison V(D)J et pour l'expression des récepteurs antigéniques sur les lymphocytes B et T. [154]. En absence de ces récepteurs, les lymphocytes B et T ne se différencient pas [154]. L'immunodéficience combinée sévère entraine une déficience du système immunitaire, sans production d'anticorps ou de lymphocytes T cytotoxiques. Chez ces chevaux immunodéficients, le transfert d'anticorps neutralisants spécifiques confère une protection de l'animal contre l'infection par EIAV [193, 194].

Des chevaux infectés expérimentalement avec une souche virale EIAV japonaise (V70) montrent une dérive antigénique du virus au cours du temps [90]. Les virus produits au cours des épisodes fébriles ne sont pas neutralisés par des sérums précoces mais le sont par des sérums tardifs [90]. Des variations antigéniques au niveau des glycoprotéines de surface de l'enveloppe [99] apparaissent rapidement, ~ 15 jours après l'infection [146-148]. De façon analogue, l'infection expérimentale par la souche $EIAV_{Wyo}$ a permis de mettre en évidence un mécanisme de persistance des rétrovirus par la génération de population de variant [146].

III.2.4 Diagnostic

Le diagnostic de l'infection d'un cheval par EIAV repose sur le test de Coggins [32], une immunodiffusion radiaire permettant la détection des anticorps dirigés contre la capside p26 d'EIAV. Hormis ce test de référence, différents tests de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ont été développés, basés sur la détection d'anticorps dirigés contre la capside p26 ou la glycoprotéine transmembranaire gp45 [136]. Plus rapide et plus facile à mettre en œuvre, les tests ELISA sont plus sensibles que le test de Coggins. Une étude réalisée en Italie sur 1102 chevaux associant le test de Coggins et un ELISA compétitif a établi que 5 % des sérums testés positifs en ELISA compétitif, étaient négatifs en test de Coggins [130]. La positivité de ces sérums a été confirmée par Western blot en utilisant des

anticorps dirigés contre la protéine de capside p26 ou contre les glycoprotéines gp45 et ou gp90 [130]. De plus, sur 10 mulets testés séropositifs par ELISA ou immunoblot en Italie, la moitié étaient négatifs en test de Coggins [175]. Le diagnostic par test de Coggins est donc insuffisamment sensible pour détecter tous les animaux séropositifs [84, 131, 175]. En Italie, six kits ELISA ont été évalués sur 4 panels de sérums, il présente 100 % de spécificité et de 98,2 à 100 % de sensibilité selon les kits [131]. Un test ELISA par méthode indirecte a été validé selon les critères de l'OIE de 2010 en Italie utilisant un antigène chimérique *gag* et *env* permettant une détection robuste, sensible (99.1 %) et spécifique (100 %), permettant la mise en évidence d'anticorps précoces [176]. Dans le cadre du programme national de surveillance de l'anémie infectieuse équine en Italie le diagnostic s'effectue selon un système de tests à trois niveaux [84, 175] combinant le test de Coggins associé à un test ELISA et un immunoblot avec une réactivité contre les protéines gp90, gp45 et p26. Un test ELISA avec des anticorps qui détectent la protéine S2 d'EIAV a été développé pour assurer une différenciation entre chevaux vaccinés et chevaux infectés par EIAV car les tests classiques de référence détectent la protéine p26 de la capside [88].

Le virus EIAV peut être détecté dans les monocytes sanguins par PCR basée sur l'amplification d'une région du gène *gag* [195] ou du gène *env* [167]. Une RT-PCR multiplex en temps réel a été décrite pour estimer la charge virale à partir ARN viraux extraits de plasma [33]. Sur une cohorte de 62 échantillons de sang de chevaux, il a été établi que la détection d'EIAV était plus sensible par PCR (85.5 %) que par le test de Coggins (53 %) [195]. Sur la base de 59 chevaux testés en Argentine, 50 % des chevaux séronégatifs portaient du génome viral d'EIAV [167]. Dans le cadre d'un programme de surveillance de l'anémie infectieuse équine, le test de Coggins est donc insuffisamment sensible pour effectuer un contrôle efficace de l'infection [84, 167, 175, 195].

III.2.5 Souches virales et variabilité génétique

Comme les virus à ARN, la plupart des rétrovirus présentent une très forte diversité de population virale [156]. Ainsi le taux de mutation des rétrovirus est très élevé, il varie de 0,05 à 1 mutation pour 10 000 bases et par cycle de réplication selon le rétrovirus [156]. Les mutations peuvent être des substitutions de base, des

réarrangements génétiques (délétions et insertions) ou des recombinaisons [156]. La variabilité est due à la reverse transcriptase qui n'a pas d'activité de correction 3'-5' exonucléasique et qui présente un taux d'erreur élevé de substitution, d'addition et de délétion de nucléotides compris entre 10^{-4} et 10^{-5} entrainant de nombreuses mutations ponctuelles [123]. Les lentivirus se maintiennent sous forme de « quasi-espèces », définies comme des populations complexes de génomes viraux apparentées mais génétiquement distincts [49, 109].

La variabilité est très documentée pour le lentivirus HIV. Ainsi HIV-1 est divisé en 4 groupes M, N, O et P et HIV-2 comporte 8 groupes A à H [75, 168]. Pour HIV-1, seul le groupe M est responsable de la pandémie, il est subdivisé en 9 sous-types (A à D, F à H, J et K) auquel on ajoute de nombreuses formes recombinantes circulantes CRF (Circulating Recombinant Forms) et quelques formes uniques URF (Unique Recombinant Forms), ayant une répartition géographique différente [75, 168].

Hormis les erreurs commises par la reverse transcriptase, une part de la diversité génétique des rétrovirus est due à la recombinaison [54]. Le taux de recombinaison de HIV-1 est d'environ 2 à 3 événements de recombinaison par génome et par cycle de réplication [87] La reverse transcriptase peut sauter d'un brin matrice d'ARN à un autre et favoriser la recombinaison. La reverse transcriptase peut se dissociée de la matrice ARN en moyenne 8 fois pour un génome de 10 000 bases pour les rétrovirus et de 3 à 12 fois par génome et par cycle de réplication pour HIV-1 [54]. Cela engendre soit des insertions ou délétions si les deux brins sont identiques, soit l'apparition de virus recombinants dans le cas de co-infections ou de surinfections [54]. Une étude montre que le transfert de brin en système ARN donneur et accepteur est plus efficace pour la reverse transcriptase d'HIV que pour celle d'EIAV [169]. Pendant la synthèse d'ADNc, la reverse transcriptase dégrade l'ARN donneur, la RNase H génère une série de coupures qui permet à l'ARN accepteur de s'hybrider à l'ADNc et se dissocié de l'ARN donneur clivé, la partie 5' de l'ARN accepteur est ensuite copiée par la reverse transcriptase. Ainsi, il a été déterminé que l'efficacité de transfert passe de 5 à 21 % pour la reverse transcriptase d'HIV alors qu'il n'évolue que de 3 à 6% pour celle d'EIAV selon le ratio entre le brin ARN donneur et accepteur [169]. Cette différence d'efficacité de transfert serait corrélée au fait que des coupures multiples ont pu être déterminées

pour HIV mais pour EIAV, une seule coupure a pu être montrée [169]. Une autre piste de variation génétique est l'hypermutation G►A (transition de base G vers A). Cette hypermutation G►A a d'abord été décrite dans le rétrovirus SNV (spleen necrosis virus) [145] puis dans le gène *env* de HIV [202] mais aussi pour EIAV [153].

La variabilité des régions *env, rev* et LTR d'EIAV a été explorée lors d'infection expérimentale de poneys ou de chevaux [98, 99, 109]. Des variations ont été retrouvées dans le gène *rev* avec une conservation du domaine d'activation [109]. Le gène *env* est la région dans laquelle s'accumulent le plus de mutations de type transitions, transversions, délétions, insertions. Au cours de l'infection chez un même animal les mutations ne sont pas réparties de façon aléatoire mais délimitent 8 régions variables V1 à V8 (Figure 14), avec notamment une région V3 hypervariable comportant le PND (Principal Neutralizing Domain), essentielle pour la réponse neutralisante [98] (Figure 14).

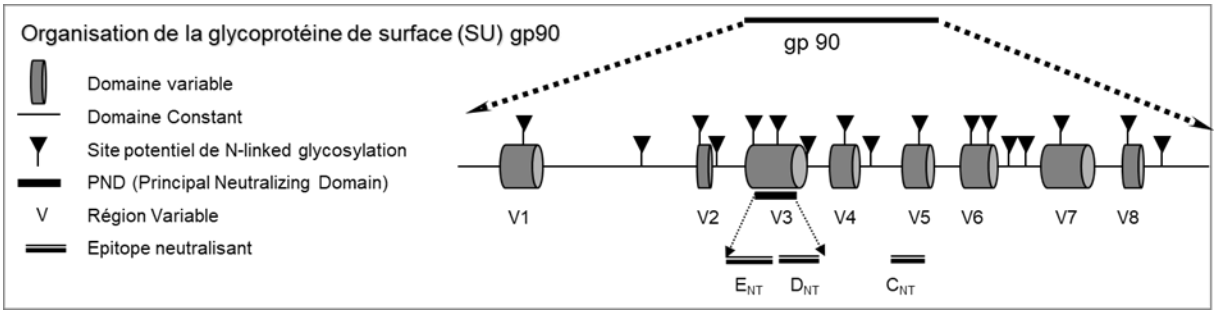


Figure 14 : Régions hypervariables V1-V8 de la glycoprotéine de surface gp90 d'EIAV [100]

Chaque épisode fébrile est associé à l'émergence de nouvelles « quasi-espèces » [98, 109, 207]. Au cours du stade asymptomatique, le virus continue son évolution comme le montre la mise en évidence de virus distincts dans les monocytes circulants en l'absence de signes cliniques [98, 99]. De façon intéressante, il est possible de prévoir *in silico* le régions variables d'EIAV, mais aussi d'HIV, SIV, FIV ou SRLV, en utilisant des algorithmes basés sur les chaines de Markhov cachées, suggérant des signaux forts de variabilité identifiables par des algorithmes non basés sur des alignements de séquences [10].

Diverses séquences génomiques complètes ou partielles d'EIAV ont été obtenues dans différents pays comme la souche hyper-virulente Nord-américaine

$EIAV_{Wyo}$ [34], la souche chinoise $EIAV_{Lia}$ [199] ou la souche japonaise $EIAV_{Miya}$ [58]. $EIAV_{Miya}$ présente un pourcentage d'identité inférieur à 80 % avec les souches $EIAV_{Wyo}$ et $EIAV_{Lia}$ [58]. En 2006, l'Irlande a connu un épisode sévère d'infection par EIAV qui a conduit à la mort ou l'euthanasie de 35 chevaux et poulains [162, 163]. La séquence d'$EIAV_{Ire}$ obtenue provient des isolats d'une jument et de trois poulains avec un pourcentage d'identité > à 99 % et < de 80 % avec $EIAV_{Wyo}$ et $EIAV_{Lia}$ [163]. L' analyse des génomes de la souche $EIAV_{Ire}$ et des souches circulantes en Italie à la même époque a permis d'établir un lien épidémiologique, avec ~ 99 % d'homologie entre les génomes [21].

En conclusion, peu de souches EIAV circulantes ont pu être caractérisées moléculairement ne permettant pas d'établir la carte moléculaire des virus circulant dans le monde et leur propagation dans les populations équines.

III.2.6 Vaccin

La stratégie de vaccination prophylactique passe par l'utilisation de vaccins conçus à partir d'agents pathogènes vivants atténués, morts inactivés ou recombinant en utilisant diverses sous unités virales qui vont activer la réponse immunitaire cellulaire et tumorale pour permettre à l'hôte d'éliminer l'agent pathogène [132]. Chez l'homme, cette stratégie a été employée pour produire des vaccins à partir de bactéries et quelques vaccins viraux contre le virus influenza (grippe), les virus des hépatites A et B ou les rotavirus [132].

Les chevaux infectés par EIAV sont capables en quelques mois de contrôler la réplication virale, évoluant de la phase chronique associée aux épisodes fébriles vers une phase asymptomatique sans signe clinique en corrélation avec la maturation de la réponse immunitaire. L'animal étant naturellement capable de contrôler la réplication virale, les objectifs de la vaccination anti-EIAV sont de permettre le développement d'une réponse immunitaire mature, protégeant l'animal. Chez les équins, on note deux vaccins couramment utilisés contre le virus de la grippe équine (equine influenza A virus) et contre EHV (equine herpes virus type 1 and 4) qui entrainent une rhino-pneumonie [142]. Peu de vaccins ont pu être développés contre les rétrovirus. Ainsi aux USA, 4 vaccins sont commercialisés contre le rétrovirus FeLV (Feline leukémia virus) [188]. FeLV est un onco-rétrovirus qui a une

multiplication lente et un génome assez stable, ainsi la vaccination par un vaccin à virus complet inactivé assure une bonne protection [144, 188]. Concernant les lentivirus, de nombreux essais vaccinaux ont été développés pour HIV, mais aucun n'assure de protection stérile [182]. Pour protéger les chats contre l'infection par le lentivirus FIV, un vaccin est commercialisé, mais il ne protège que de ~ 50 % des cas [95, 170]. Différents essais vaccinaux pour protéger les chevaux de l'infection par EIAV ont été développés en utilisant des vaccins vivants atténués [107, 111, 112, 185], inactivés (virus complet) [83], inactivés couplé à des particules [71], avec des sous-unité purifiées [83], avec des protéines recombinantes [164, 206], ou l'ADN [35] (Tableau 3). Un vaccin vivant atténué chinois a été développé à partir de la souche EIAV Liaoning dans les années 70 [111, 112, 185] par passages successifs d'une souche pathogène $EIAV_{LN40}$ sur des ânes pour obtenir une souche plus virulente $EIAV_{D510}$ et atténuation sur des macrophages d'ânes afin d'obtenir la souche vaccinale $EIAV_{DLV120}$ ou sur des cellules FDD (Fetal Donkey Dermal) pour développer le vaccin $EIAV_{FDDV13}$ [111, 112, 116, 185]. L'accumulation de substituons/délétions tout au long du génome viral d'$EIAV_{FDDV13}$ a permis son atténuation [160]. Les vaccins vivants atténués chinois assurent une protection supérieur à 80 % contre la maladie par un challenge homologue ou hétérologue avec les souches chinoises de Heilongjiang et Xinjiang et la plupart des souches américaines [160, 184, 185].

Plusieurs souches vaccinales ont permis une protection contre la maladie et le virus par un challenge homologue à la souche vaccinale [107] : $EIAV_{UK\Delta S2}$ portant un codon stop dans le gène accessoire S2 [41, 107], $EIAV_{UK\Delta S2/DU}$ [41] portant une double mutation dans S2 et la dUTPase et $EIAV_{D9}$ généré à partir de $EIAV_{UK\Delta S2}$ avec une délétion spécifique de neuf nucléotides [43, 44, 46, 49]. La protection vaccinale est atteinte six mois après la dernière injection du vaccin [41, 46]. Une infection avec des souches virulentes EV0, EV6 ou EV13 divergentes respectivement de 0 %, 6 % et 13 % sur 3 groupes de 8 poneys vaccinés préalablement avec $EIAV_{D9}$ ont présenté une efficacité vaccinale de 100 % pour EV0, 60 % pour EV6, et seulement 50 % d'efficacité pour EV13 [44, 47, 49] montrant une protection uniquement contre des souches homologues. Il a aussi été créé un vaccin contenant une enveloppe consensus (ConD9) résultant de l'alignement de séquences de 90 isolats avec une divergence de séquence dans l'enveloppe de 4%, 6% et 11% respectivement par rapport aux souches EV0, EV6 et EV13 et d'un vaccin polyvalent de l'enveloppe

(TriD9) qui provient du mélange de $EIAV_{D9,}$, $EIAV_{6D9}$ et $EIAV_{13D9,}$ qui ont respectivement 6% et 13 % de divergence par rapport à $EIAV_{D9}$ [49]. Les animaux vaccinés avec ConD9 et TriD9 produisent un taux d'anticorps Env spécifiques très élevé mais ne sont pas protégés d'un challenge avec EV_{MX} (mélange de EV0, EV6 et EV13) [49].

Un vaccin préparé en cellules d'insectes avec le système baculovirus contenant les glycoprotéines gp90 recombinantes (rgp90) de $EIAV_{PR}$ a été un échec avec développement de la maladie voir même une exacerbation des signes cliniques et une augmentation de la réplication virale. [164, 206].

En conclusion, de nombreux essais vaccinaux ont été développés pour EIAV (Tableau 3). La variabilité des rétrovirus [123] rend difficile l'obtention d'un vaccin qui assure une protection stérile contre l'infection et contre la maladie. Pour EIAV, seul le vaccin vivant atténué chinois assure une protection contre la maladie par challenge homologue et hétérologue (Tableau 3) [111, 112, 184, 185]

Tableau 3 : Essais vaccinaux EIAV d'après [36] Les signes cliniques post vaccinaux sont gradués de ø, +, +++ où ø : pas de signes cliniques, + : idem infection, +++ exacerbation. La protection est déterminée par rapport à un challenge vaccinal avec une souche Homologue (= souche vaccinale) ou hétérologue (≠ souche vaccinale).

		STATUT APRES CHALLENGE			
	TYPE DE VACCIN	SIGNE CLINIQUES	PROTECTION	SOUCHE DE CHALLENGE	REF
	Virus complet inactivé avec formaldéhyde	ø	NON	ø	[83]
Sous unités	gp90 purifié	ø	OUI	Homologue	[83]
	Vaccin à ADN (codon-optimized EIAV SU)	+	NON	ø	[35]
	Protéine virale couplée à des particules oxide de fer	+	NON	ø	[71]
	gp90 recombinante en *E. Coli*	+/+++	NON	ø	[164]
	gp90 recombinante en baculovirus	+/+++	NON	ø	[164, 206]
	Lipopeptides (Gag, Pol, Env)	+	NON	ø	[61]
	Vaccin à ADN (gag p15/p26 + IL-2/plasmides IgG)	+++	NON	ø	[122]
Vivant atténué	$EIAV_{UK\Delta DU}$ délétion région codant DU	+	NON	ø	[108]
	$EIAV_{UK\Delta S2}$ Inactivation S2	ø	OUI	Homologue	[107]
	Vaccin « chinois » atténué	ø	OUI	Homologue + Hétérologue	[111, 112, 184]

IV CONCLUSION

Par la réglementation imposée, EIAV est un virus d'impact en santé équine qui nécessite la mise en place de mesures de prise en charge des animaux infectés, des actions évitant la dissémination du virus entre pays et permettant le maintien de statut indemne des animaux soumis aux échanges internationaux. Dans ce contexte très réglementé, la mise en place d'une prévention efficace de la transmission d'EIAV nécessite la connaissance des souches virales circulantes.

Bien que connu et étudié depuis des décennies, et contrairement à d'autres lentivirus, dont HIV, pour lesquels de nombreuses souches circulantes ont pu être identifiées moléculairement, peu de données sont disponibles pour établir la nature et la diversité génétiques d'EIAV à l'échelle mondiale. Ces connaissances sont pourtant indispensables pour comprendre l'apparition de nouveaux foyers épidémiques. Dans ce contexte, l'un des objectifs de mon travail de recherche a été de caractériser les souches d'EIAV circulantes responsables de foyers en Roumanie et en France pour appréhender la cartographie d'EIAV en Europe.

De même, alors que la transmission par le sang reste la voie d'infection la plus décrite, les conditions de transfert du virus de l'animal infecté à l'animal naïf n'ont été que partiellement analysées. L'infection par voie aérienne a été suggérée lors d'épisodes infectieux en Irlande [125]. Pour appréhender cette question, nous avons analysé la présence d'EIAV et de lésions associées dans le poumon de chevaux infectés.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

PARTIE 1

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE D'EIAV EN EUROPE A PARTIR DE FOYERS EN ROUMANIE ET EN FRANCE

I INTRODUCTION

EIAV a été rapporté dans de nombreux pays européens dont la Belgique, la Bosnie, la Croatie, la France, la Grèce, la Hongrie, l'Irlande, le Royaume Uni, la France ou la Roumanie. L'intérêt pour ce virus équin se renforce lors de foyers épidémiques ayant un impact économique. Cependant, la surveillance de l'infection et la nature des souches circulantes restent largement délaissées. Lors d'épisodes au cours de la dernière décennie d'infections dans des pays tels que la Belgique ou l'Irlande qui n'avaient pas de cas depuis plusieurs années, l'importation de produits sanguins de Roumanie ou d'Italie a été mise en cause. Outre la maladie, qu'il engendre, EIAV porte un enjeu économique en limitant les mouvements d'animaux et dans les cas d'infection imposant leur euthanasie. Face à ces enjeux, il est important de connaitre les routes de circulation du virus entre les populations équines et de caractériser les souches, notamment en Europe. Nous avons entrepris une caractérisation moléculaire des souches d'EIAV à l'origine de foyers en France et en Roumanie. La Roumanie a déployé un contrôle systématique des chevaux de moins de 6 mois et testé la presque totalité de la population équine dans le cadre de son plan « Eradication d'AIE en Roumanie », renforcé en 2010 [12]. Entre 1996 et 2013, plus de 20 000 foyers d'EIAV ont été rapportés avec environ 50 000 chevaux infectés et 15 000 chevaux euthanasiés [12]. A l'opposé de cette situation épidémiologique, les cas reportés en France sont rares.

Au cours de ce projet, nous avons amplifié par PCR le génome d'EIAV à partir d'échantillons de sang de chevaux roumains et français. Nous avons amplifié le gène *gag* et établi la phylogénie des souches circulantes. Nous avons établi que des souches différentes circulaient dans les pays européens. Nous avons dérivé et mis en évidence la réplication d'une souche d'EIAV française, $EIAV_{FR1478}$.

II MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel biologique

Du sang total a été récolté sur 75 chevaux séropositifs pour EIAV (tests de Coggins réalisés par les Laboratoires Nationaux de Référence en France et en Roumanie) dont 69 en Roumanie (Dr P. Bolfa, université vétérinaire de Cluj Napoca, Roumanie) (Figure 15) et six en France (D^{r} J.L. Cadoré, VetAgro Sup, Marcy l'étoile;

D[r] Bardiès, Hippodrome Cagnes sur Mer, D[r] A. Hans, Dozulé, France) (Tableau 4).



Figure 15 : Provenance géographique des chevaux de Roumanie. Carte de la Roumanie présentant la provenance géographique des échantillons de chevaux participant à notre étude (n = 39 provenant de Bistrita Nasaud et n = 30 provenant de la région ----) (adapté de *http://www.salutroumanie.com/cartes-roumanie.html*).

Un prélèvement de sang total a été collecté sur un cheval français (# 2522) séronégatif pour EIAV (P[r] J.L. Cadoré, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile). Des prélèvements de poumons ont été obtenus lors de nécropsies de deux chevaux français (# 2647 et # 2648) séronégatifs pour EIAV et collectés en milieu DMEM additionné de 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ ml de streptomycine, 50 µg /ml de gentamycine, 100 U/ml de nystatine, 2,5 µg/ml d'amphotéricine B.

II.2 Lignées cellulaires et dérivation de cellules primaires

Les fibroblastes ED (Equine Dermal) ont été fournis gracieusement par le Dr Frank Cook (Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington KY, USA. Ils ont été cultivés en milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (GE Healthcare) à 37°C sous 5 % de CO_2 en atmosphère humide.

Les macrophages dérivés de monocytes sanguins ou eMDM (equine Monocytes Derived Macrophages) ont été préparés à partir de sang total du cheval 1478 infecté par EIAV et du cheval # 2522 naïf comme précédemment décrit [165]

avec des modifications mineures. Brièvement, après centrifugation à 700 g pendant 30' à 20°C, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été récupérées et diluées au 1/3 en PBS 1X stérile. Les cellules ont été séparées par centrifugation à 800 g, 45' à 20°C sur « Histopaque® 1077 » (Sigma-Aldrich), lavées et centrifugées en PBS 1X stérile. Les cellules ont été ensemencées en milieu DMEM additionné de 8 % de sérum de cheval décomplémenté (Biowest) sur boites de culture préalablement traitées avec une matrice de 2 % de gélatine (Sigma-Aldrich) et incubées une nuit à 37°C sous 5 % CO_2 en atmosphère humide. Après 24 heures, les cellules non adhérentes ont été éliminées par aspiration et lavage avec du PBS 1X stérile. Les eMDM ont été observées quotidiennement et récoltées par traitement avec un mélange 1:1 d'EDTA 10 mM en PBS 1X et de milieu DMEM additionné de 8 % de sérum de cheval décomplémenté (Biowest). Les cellules eMDM dérivées de l'animal 1478 séropositif pour EIAV ont été maintenues en culture 12 jours avec une récolte de surnageant à 4, 8 et 12 jours.

Des cellules pulmonaires ont été dérivées comme précédemment décrit [5] des chevaux # 2647 et # 2648, séronégatifs pour EIAV (Pr J.L. Cadoré). Brièvement, après rinçage avec du PBS 1X additionné de 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ ml de streptomycine et de 2,5 µg/ml d'amphotéricine B, les poumons ont été disséqués stérilement en retirant la plèvre et les bronches, digérés 2 h à 37°C sous agitation en milieu DMEM additionné de 1 mg/ml de protéase XIV (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml de DNase I (Sigma-Aldrich), 25 µg/ml de collagénase I (Sigma-Aldrich). Après filtration sur gaze stérile, les cellules ont été lavées en PBS 1X, centrifugées à 450 g pendant 10' à 4°C, numérées, ensemencées sur plaques de culture 6 puits non traitées ou préalablement traitées avec 10 µg/ml de fibronectine (Sigma-Aldrich), 40 µg/ml de collagène I (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml de collagène IV (Sigma-Aldrich) et 10 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich) à raison 2 x 10^6 cellules / puits et incubées à 37°C, 5 % de CO_2 en atmosphère humide. Des cellules fibroblastiques pulmonaires équines ont été obtenues à partir des poumons des chevaux # 2647 et # 2648 et maintenues en culture en milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (GE Healthcare) à 37°C sous 5 % de CO_2 en atmosphère humide. Les cellules ont été congelées en azote liquide en milieu contenant 95 % de sérum de cheval décomplémenté (Biowest) et 5 % de DMSO (diméthylsulfoxyde) (Sigma-Aldrich).

II.3 **Amplification du génome d'EIAV**

Les ADN ont été extraits du sang total et des cellules mononucléées du sang périphérique de chevaux roumains et français (Tableau 5) avec le kit « Quick DNA Universel » (Zymo Research) selon les instructions du fournisseur. Les ADN ont été vérifiés par électrophorèse, dosés et conservés à - 20°C. Les ADN ont été amplifiés dans les gènes *gag,* ß actine ou TNFRSF14 par PCR simple ou nichée (Tableau 4). Les amorces EIAV (Tableau 4) ont été définies sur la base de l'alignement multiples de séquences d'origines géographiques diverses. Le génome viral a été amplifié dans 25 µl final à raison de 100 ng d'ADN en présence de 0,2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTP et de 0,5 à 1 unité d'enzyme Kapa Taq (Cliniscience) ou équivalent pour la détection et enzyme haute-fidélité pour le séquençage. Les conditions d'amplification ont été adaptées à la composition des amorces et des enzymes utilisées avec 15-30'' à 50-60°C pour l'hybridation et 30'' à 1'/kb à 72°C pour l'élongation. Les produits d'amplification ont été contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de « SYBR Safe DNA Gel Stain" 1X » (Life Technologies) et visualisés sur plaque UV avec le logiciel Mega-Capt (Vilber Lourmat France). Les gels d'agarose ont été transférés sur membrane de nylon « Amersham™ Hybond™-N+ » (GE Healthcare) en tampon SSC 20X (Euromedex) par méthode sandwich après incubation de 20 min en solution dénaturante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) et de 20 min en solution neutralisante (Tris-Cl 0,5 M pH 7,2, NaCl 1M) sous agitation oscillante. Après 16 à 18 heures, les ADN ont été fixés 5 min sous UV. Les membranes ont été incubées 16 à 18 heures avec 60 ng de sonde $EIAV_{UK}^{DIG*}$, correspondant à un fragment de 610 nucléotides (amorces EIAV 1/ EIAV 2 (Tableau 4)) dans le gène *gag* marqué avec de la digoxigénine avec le kit « Dig Luminescent detection for nucleic acids » (Roche) selon les instructions du fournisseur. Après lavage en tampon (0,1M d'acide maléïque, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween 20) les hybridations ont été révélées par exposition d'un film autoradiographique Blue devil (dominique Dutscher) pendant 30 à 60 minutes.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du génome d'EIAV. Les amorces EIAV ont été positionnées par référence avec la séquence du clone moléculaire $EIAV_{UK}$ (Genbank accession AF016316) [34]. Les amorces ß actine ont été positionnées par rapport à la séquence Genbank accession NM001081838 et TNFRSF14 par rapport à la séquence Genbank accession NM001081907. * : Amorces utilisées pour le clonage avec le kit « CyClone Ligase-free Cloning ». En rouge : séquence de référence sens ; en bleu : séquence de référence antisens

	Amorce	Gène	Séquence (5'-3')	Position	Orientation	Taille amplicon
EIAV	EIAV 3	*gag*	ggctggaaacagaacttta	455-474	Sens	260 bp
	EIAV 5		ccagtggagcattcggta	714-694	Antisens	
	EIAV 4	*gag*	tgggtgaataccatacagac	504-523	Sens	211 bp
	EIAV 5		ccagtggagcattcggta	714-694	Antisens	
	EIAV 1	*gag*	gtaattgggcgctaagtctag	154-174	Sens	610 pb
	EIAV 2		cctctaataaatcttgctgtc	763-742	Antisens	
	EIAV 85	*gag*	gtcttctggaggtgttcctg	404-424	Sens	715 pb
	EIAV 91		aggcccttgtggtggtgc	1118-1100	Antisens	
	EIAV 87	*gag*	gagaaggtgacggtacaag	491-510	Sens	506 pb
	EIAV 90		atccaaaaatcgattcatttc	995-974	Antisens	
	EIAV 85	*gag*	gtcttctggaggtgttcctg	405-424	Sens	1631 pb
	EIAV 95		atattttaacctattataatgtgc	2035-2012	Antisens	
	EIAV 87	*gag*	**gagaaggtgacggtacaag**	491-510	Sens	1411 pb
	EIAV 97		**caaactgtccaggttgagat**	1901-1882	Antisens	
	EIAV 110 *	*gag*	gcttgatatcgaatt**gagaaggtg acggtacaag**	491-510	Sens	1447 pb
	EIAV 111 *		ccgctctagaactagtggatc**caa actgtccaggttgagat**	1901-1882	Antisens	
Gène cellulaires	Gnc 5	*ß actine*	atgtgcaaggccggcttcg		Sens	580 pb
	Gnc 6		ttaatgtcacgcacgatttcc		Antisens	
	Gnc 633	*TNFRSF14*	ccccaaatgcagtccaggtt	397-413	Sens	197pb
	Gnc 634		cacactcggtgttttccgtg	593-574	Antisens	

II.4 **Clonage**

Après purification sur gel avec le kit « Zymoclean™ Gel DNA Recovery » (Zymo Research) selon les instructions du fournisseur, les produits d'amplification d'isolats de 20 chevaux ont été clonés par recombinaison dans le plasmide pBluescript II SK+ avec le kit « CyClone Ligase-free Cloning » (Jena Bioscience) (Figure 16) ou par ligation TA avec le kit « pLUG-Prime » (iNtRON Biotechnology) selon les instructions des fournisseurs. L'ADN plasmidique a été extrait avec le kit « Zyppy™ Plasmid Miniprep » (Zymo Research) selon les instructions du fournisseur, dosé et contrôlé par digestion avec EcoRI (Fermentas) ou directement par PCR dans 25 µl final avec les amorces EIAV 87 / EIAV 97 (Tableau 4) après lyse bactérienne (10 min à 100°C). Les clones ont été stockés en milieu LB (Luria-Bertani) additionné de 50 % de glycérol à - 80°C.

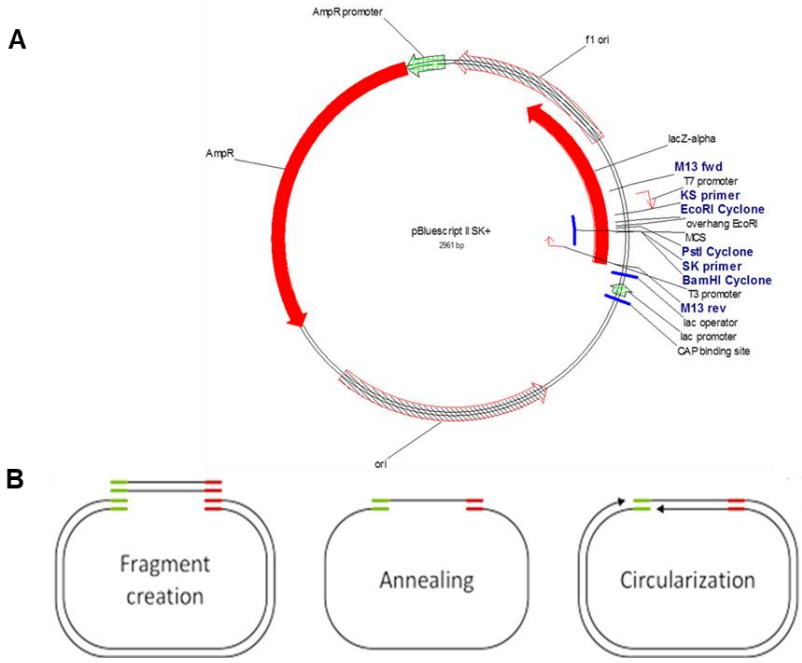


Figure 16 : Clonage des produits PCR EIAV avec le kit « CyClone Ligase-free Cloning » (Jena Bioscience). Les amplicon sont été clonés par recombinaison dans le plasmide pBluescript SK+ (A) basé sur la reconnaissance de séquences (─ et ─B) présentes sur l'amplicon et le plasmide (B**).**

II.5 **Séquençage et analyse**

Un à cinq clones par isolat d'EIAV ont été séquencés en double sens avec les amorces universelles M13FOR (5'-TGTAAAACGACGGCCAGTTGAAGGCACAGAAATGGA-3')

et M13REV (5'-CAGGAAACAGCTATGACCACCATTCTTCCTTTACTCC-3') pour les amplicons clonés en pLUG-Prime ou avec les amorces spécifiques (Tableau 4) pour les amplicons clonés en pBluescript II SK+ (GATC Biotech). Les séquences ont été assemblées avec le logiciel vector NTI II (Invitrogen). Les alignements multiples ont été générés avec l'outil MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation) et les reconstructions phylogénétiques ont été générées avec la méthode NJ (Neighbor-joining) avec un bootstrap de 1000 réplicats en utilisant le logiciel MEGAX [94]. Les séquences des souches françaises (FR) ou roumaines (ROM) ont été comparées aux séquences publiées provenant des USA (Genbank accession AF016316) [34], du Canada (Genbank accession EF418582 à 418584) [129], de Belgique (Genbank accession JX193071 et JX193072) [16], de Chine (Genbank accession GU385365) [208], d'Allemagne (Genbank accession KF878267, KF878268, KF878270 et KF878267), d'Irlande (Genbank accession JX480631) [163], d'Italie (Genbank accession EU240733, EU375543, EU741609 et GQ265785) [20] et du Japon (Genbank accession JX003263) [58].

II.6 **Production de virus souche $EIAV_{UK}$ et $EIAV_{FR1478}$**

Le virus $EIAV_{FR1478}$ a été récolté dans les surnageants des eMDM dérivées de l'animal 1478 séropositif pour EIAV. Le virus $EIAV_{UK}$ a été produit à partir du clone moléculaire $pEIAV_{UK}$ contenant la totalité du génome viral de la souche $EIAV_{PV}$ adaptée *in vitro* [22]. Les plasmides $pEIAV_{UK}$ ont été amplifiés en milieu LB (Luria-Bertani) additionné de 20 µg/ml d'ampicilline (Invivogen) et purifiés avec le kit « ZymoPure™ Plasmid Midiprep » (Zymo Research) selon les instructions du fournisseur. L'ADN plasmidique a été dosé et contrôlé par digestion avec des enzymes de restriction. Les virus $EIAV_{FR1478}$ et $EIAV_{UK}$ ont été produits par infection des cellules eMDM 2522 avec une suspension virale en milieu DMEM additionné de 8% de sérum de cheval décomplémenté (Biowest) et de 10 µg/ml de polybrene (Sigma). Après 24 heures, les cellules ont été lavées puis les surnageants de culture et les culots cellulaires ont été récoltés régulièrement et stockés à - 80°C.

Les infections ont été réalisées sur les cellules fibroblastiques pulmonaires équines 2647 et 2648 (EF_{2647} et EF_{2648}) avec une suspension virale d'$EIAV_{FR1478}$ ou d'$EIAV_{UK}$ en milieu DMEM additionné de 8% de sérum de cheval décomplémenté (Biowest) et de 10 µg/ml de polybrene (Sigma) à 37°C sous 5 % de CO_2 en

atmosphère humide puis les cellules ont été observées et les surnageants de culture et les culots cellulaires ont été récoltés régulièrement et stockés à - 80°C.

Les ARN viraux ont été extraits avec le kit « ZR Viral RNA » (Zymo Research) pour les surnageants cellulaires et avec le kit « PureLink RNA Mini » (Ambion) pour les culots cellulaires selon les instructions des fournisseurs. Les ARN ont été traités avec le kit « TURBO DNA-free™ » (Ambion) selon les instructions du fournisseur, dosés et stockés à -80°C. Les ARN ont été rétro-transcrits en ADNc à raison d'un volume d'ARN (correspondant à 200 µl de surnageant de culture) ou 500 à 1000 ng d'ARN de culot cellulaire avec le kit « iScript™ cDNA Synthesis » (Biorad) selon les instructions du fournisseur. La réplication virale a été contrôlée par amplification par PCR des ADNc.

II.7 **Détection de la protéine de capside (CA)**

Les protéines totales ont été purifiées à partir des surnageants concentrés et des culots cellulaires avec le kit « M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent » (Thermo Scientific), dosées avec le kit « Quick Start™ Bradford Protein Assay » (BIO-RAD) selon les instructions des fournisseurs. Les protéines ont été séparées sur gel SDS-Polyacrylamide 12% avec le kit « TGX™ FastCast™ Acrylamide » (BIO-RAD), transférées sur membrane « Mini-PROTEAN® » avec le système « Trans-Blot® Turbo™ Transfer » (BIO-RAD) selon les instructions des fournisseurs. La protéine p26 de capside d'EIAV a été détectée par immunomarquage avec l'anticorps primaire anti EIAV Core Antigen (p26), clone EIAV 12E8.1 (Millipore), dilué au 1/1000 et l'anticorps secondaire conjugué HRP Anti-Mouse IgG–Peroxidase (Sigma-Aldrich) dilué au 1/30000. La β actine (contrôle cellulaire de charge en protéine) a été détectée avec l'anticorps couplé HRP Monoclonal Anti-β-Actin−Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich) dilué au 1/50000. L'immunomarquage a été détecté avec le réactif « SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate » (Thermo Scientific). Un film autoradiographique Blue devil (dominique Dutscher) a été exposé 5 à 60 min sur la membrane et développé avec une développeuse « CAWOMAT 2000 » (WIROMA).

III RESULTATS

III.1 Détection d'EIAV roumains et français.

Une cohorte de 69 chevaux roumains collectés en 2007 et 2008 et six chevaux français collectés en 1998, 2005 et 2009 (Tableau 5) séropositifs pour EIAV, ont été analysés pour la recherche du génome EIAV (Figure 17, tableau 5) avec des amorces spécifiques du gène *gag* (Tableau 4) et confirmés par hybridation avec une sonde marquée $EIAV_{Dig}$ (Figure 17). Le génome d'EIAV a été détecté chez 77 % des chevaux roumains et 100 % des chevaux français (Tableau 5). L'absence de génome d'EIAV détectable dans 23% des cas a été liée à la qualité du prélèvement et/ou la faible quantité de matériel génétique disponible.

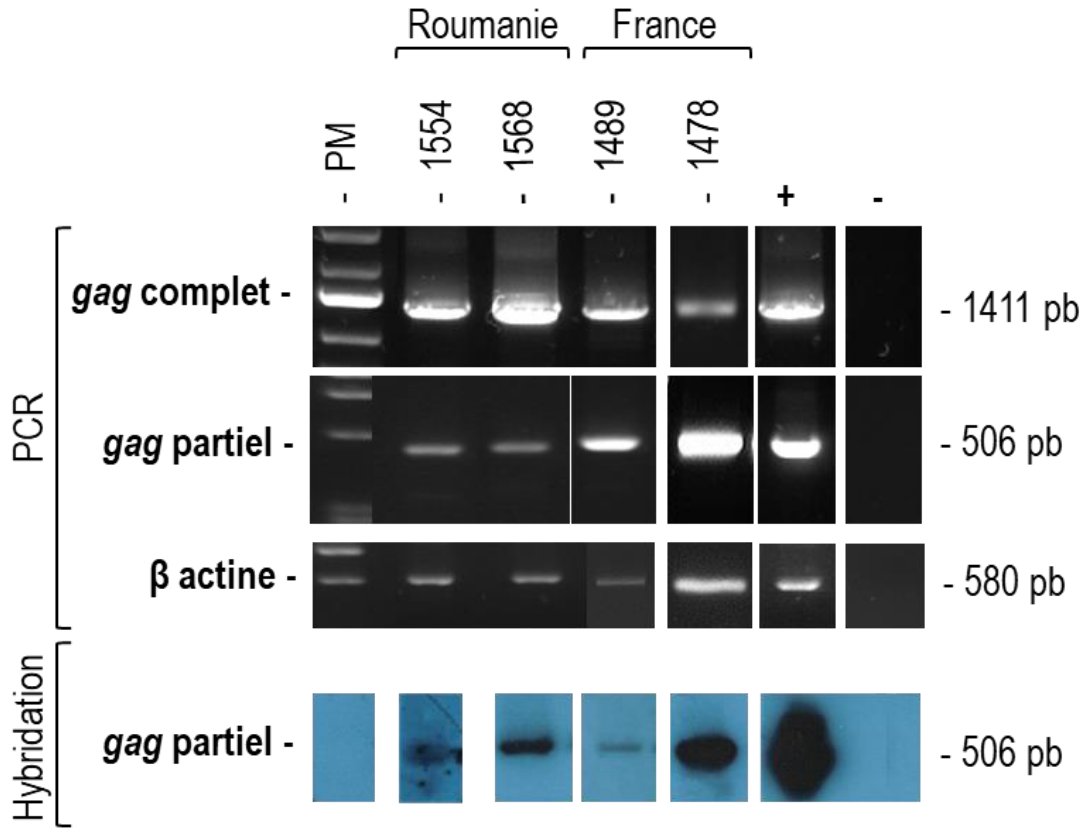


Figure 17 : Détection du génome d'EIAV. Des ADN extraits de sangs de chevaux français et roumains ont été amplifiés avec des amorces dans le gène *gag* d'EIAV. La spécificité des amplicons a été confirmée par hybridation Les témoins de PCR sont des ADN positifs (+) ou négatifs (-) pour EIAV. PM : marqueur de poids moléculaire.

Tableau 5 : Détection du génome d'EIAV sur sangs de chevaux collectés en Roumanie et en France. Les échantillons ont été collectés en Roumanie, dans la région de Transylvanie dans le comté de Bistrița-Năsăud en octobre 2007 (1271 à 1288) et octobre 2008 (1446 à 1646) et en France 1998 (860 et 983), 2005 (1029) et 2009 (1478, 1488 et 1489). La détection de génome EIAV a été confirmée par PCR dans le gène *gag*. ? : donnée manquante ; ♂ : male, ♀ : femelle ; POS : positif ; NEG: négatif

Cheval #	Age	Sexe	Localisation géographique	Détection EIAV par PCR
1271	1 an	♂	RO/Bistrita-Nasaud/Cetate	POS
1273	4 mois	♂		POS
1278	5 ans	♀		NEG
1279	12 ans	♀		NEG
1280	7 ans	♀		POS
1282	13 ans	♂		POS
1283	17 ans	♀	RO/Bistrita-Nasaud/Dumitrița	POS
1284	3 ans	♀		NEG
1285	12 ans	♀		POS
1286	7 ans	♀		NEG
1287	< 1 an	♀		POS
1288	5 ans	♀		NEG
1446	9 ans	♀	RO/Bistrita-Nasaud/Livezile	POS
1447	8 ans	♀		POS
1448	10 ans	♀		POS
1449	12 ans	♂		POS
1450	12 ans	♀		POS
1451	7 ans	♂		POS
1452	9 ans	♀		POS
1453	8 ans	♂		POS
1455	10 ans	♂	RO/Bistrita-Nasaud/Josenii Bârgăului	POS
1456	7 ans	♂		POS
1458	12 ans	♂		POS
1459	10 ans	♀		POS
1460	8 ans	♀		POS
1462	17 ans	♀		POS
1463	29 ans	♂		POS
1516	?	?	RO/Bistrita-Nasaud	POS
1518	?	?		POS
1519	?	?		POS
1520	?	?		POS
1524	?	?		NEG
1527	?	?		POS
1528	?	?		NEG
1533	?	?		POS
1534	?	?		NEG
1535	?	?		NEG
1538	?	?		POS
1540	?	?		NEG
1551	?	?	RO/Mures/Viisoara ou RO/Bistrita-Nasaud	POS
1552	?	?		NEG
1553	?	?		NEG
1554	?	?		POS
1555	?	?		NEG
1564	?	?	RO/Bistrita-Nasaud ou RO/Salaj ou RO/Mures	POS
1565	?	?		POS
1566	?	?		POS
1567	?	?		POS
1568	?	?		POS
1569	?	?		NEG
1570	?	?		NEG
1571	?	?		NEG
1572	?	?		POS
1573	?	?		POS
1574	?	?		POS
1575	?	?		POS
1576	?	?		POS
1577	?	?		POS
1578	?	?		POS
1637	?	?		POS
1638	?	?		POS
1639	?	?		POS
1640	?	?		POS
1641	?	?		POS
1642	?	?		POS
1643	?	?		POS
1644	?	?		POS
1645	?	?		POS
1646	?	?		POS
860	18 ans	♀	FR/Marcy l'étoile	POS
983	21 ans	♀	FR/Nord	POS
1029	16 ans	♂	FR/Val de Marne	POS
1478	ND	?	FR/Alpes-Maritimes/Cagnes sur mer	POS
1488	17 ans	♂	FR/Calvados/Dozulé	POS
1489	9 ans	♀		POS

Pour les 22 chevaux roumains, positifs pour EIAV et pour lesquels les données d'âge (4 mois à 29 ans) et de sexe (10 males, 12 femelles) étaient disponibles (Tableau 5), l'âge moyen était de 9 ans et 4 mois. La moitié des chevaux positifs pour EIAV avait entre 1 et 10 ans, 23% avaient entre 10 et 15 ans, et 14% plus de 15 ans (Figure 18) suggérant la circulation du virus dans la population équine, indépendamment de l'âge.

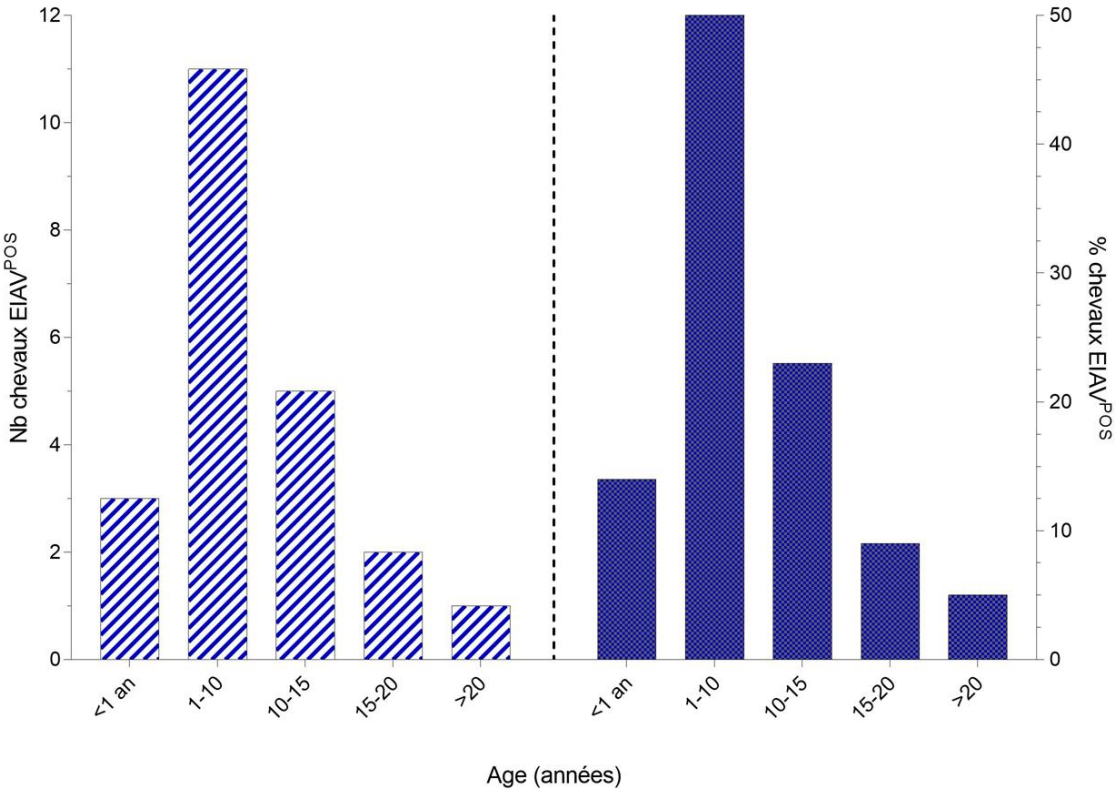


Figure 18 : Répartition par âge de 22 isolats EIAV positif provenant de Roumanie. Les résultats ont été stratifiés par classe d'âge soit : < 1 an, 1-10 ans, 10-15 ans, 15-20 ans, >20 ans. Le graphique indique le nombre de chevaux EIAV^{POS} (axe Y gauche) et le pourcentage de chevaux EIAV^{POS} (axe Y droite)

De façon intéressante, nous avons donc détecté du génome viral dans le sang circulant du cheval #1463 âgé de 29 ans, séropositif asymptomatique (Tableau 5). Les chevaux provenaient des communes de Cetate, Dumitrița, Livezile et Josenii Bârgăului dans le comté de Bistrita-Nasaud dans le Nord de la Roumanie (Figure 15, tableau 5). En majorité, les chevaux positifs provenaient des communes de Livezile (36 %) et Josenii Bârgăului (32 %).

III.2 Circulation de souches génétiquement distinctes en Europe

Tableau 6 : Echantillons séquencés dans le gène *gag* provenant de Roumanie (RO) et de France (FR). Obtention (X) de la séquence partielle (MA/ CA ~500 pb) ou complète (MA/ CA/ NC/ p9 ~1500 pb)

Virus #	Age	Sexe	Localisation géographique (pays/département/ville)	Séquence *gag*	
				MA/CA	MA/CA/ NC/p9
1446	9 ans	♀	RO/Bistrita-Nasaud/Livezile	x	
1455	10 ans	♂	RO/Bistrita-Nasaud/Josenii Bârgăului	x	
1516	?	?	RO/Bistrita-Nasaud	x	
1520	?	?		x	
1554	?	?	RO/Mures/Viisoara	x	x
1564	?	?	RO/Bistrita-Nasaud ou RO/Salaj ou RO/Mures	x	
1568	?	?		x	x
1572	?	?		x	
1574	?	?		x	
1575	?	?		x	
1576	?	?		x	
1640	?	?		x	
1641	?	?		x	
1644	?	?		x	
860	18 ans	♀	FR/Rhône/Marcy l'étoile	x	
983	21 ans	♀	FR/Nord	x	
1029	16 ans	♂	FR/Val de Marne	x	
1478	?	?	FR/Alpes Maritimes/ Cagnes	x	x
1488	17 ans	♂	FR/Calvados/Dozulé	x	
1489	9 ans	♀		x	x

Les séquences partielles (~500 pb, nt 495 à 992) de la souche de référence $EIAV_{UK}$, Genbank accession AF016316 [34]) de *gag,* comprenant la région codant la matrice MA et partiellement la capside CA, ont été obtenues par séquençage de vingt isolats d'EIAV provenant de chevaux infectés isolés en Roumanie (14 souches) ou en France (6 souches) (Tableau 6). Les amplicons ont été clonés et un minimum de 5 clones ont été analysés pour évaluer la diversité intra-isolat. Seules les séquences non redondantes ont été inclues dans les analyses. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Mega X [94]. La phylogénie a été reconstruite par la méthode Neighbor-Joining [171] et la valeur statistique des embranchements déterminée par boostrap, sur 1000 itérations. Les alignements des séquences nucléotidiques et déduites en acides aminés ont été réalisés avec MUSCLE (**MU**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation) et la divergence entre les souches a été estimée avec le modèle de correction de Poisson.

Le calcul des distances génétiques à partir des séquences en nucléotides et déduites en acides aminés (Figure 19) a permis d'établir la diversité des souches d'EIAV circulant en Europe. En moyenne, les souches roumaines et françaises divergeaient entre elles de 19,7% en séquences nucléotidiques (15,1% en séquences déduites en acides aminés), de ~26% (~21% en acides aminés) avec la souche japonaise $EIAV_{Miya}$ et de ~20% (~14% en acides aminés) avec la souche américaine (Figure 19A). L'analyse a permis de montrer que les souches françaises et roumaines étaient également divergentes des souches d'Europe, de Chine et d'Amérique du nord (Figure 19).

A.

	France		Roumanie	
	nt	aa	nt	aa
Roumanie	**19,7**	**15,1**	-	-
France	-	-	**19,7**	**15,1**
Belgique	22,1	14,3	24,1	16,3
Allemagne	21,3	17,5	21,6	18,3
Italie	22,4	17,4	21,3	17,9
USA	20,9	13,3	20,1	15,1
Canada	19,9	14,5	22,3	17,1
Chine	21,6	15,8	21,0	17,0
Japon	25,8	20,6	26,0	21,6

B.

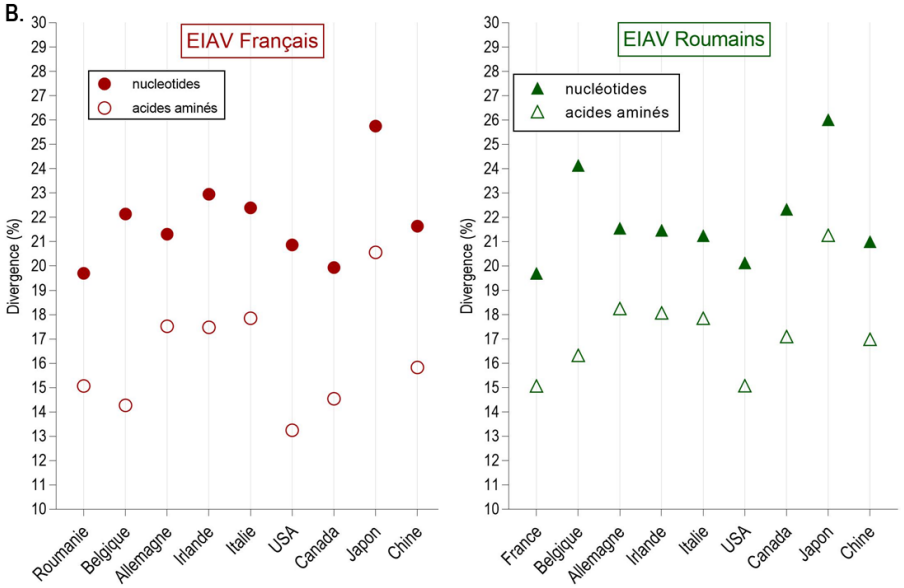


Figure 19 : Estimation de la divergence selon l'origine géographique des souches d'EIAV. Les matrices de distances ont été calculées sur la base des séquences nucléotidiques et déduites en acides aminés (A) et représentées (B) selon le pourcentage de divergence entre les souches française et roumaines et les séquences d'EIAV isolés en Amérique du Nord, Europe et Asie en nucléotides (●▲) ou déduites en acides aminées (○△).

Les isolats d'EIAV isolés en France et en Roumanie dans notre étude appartiennent à des clusters phylogénétiquement distincts (Figure 20). Les isolats français étudiés correspondent à au moins trois foyers indépendants entre 1998 et

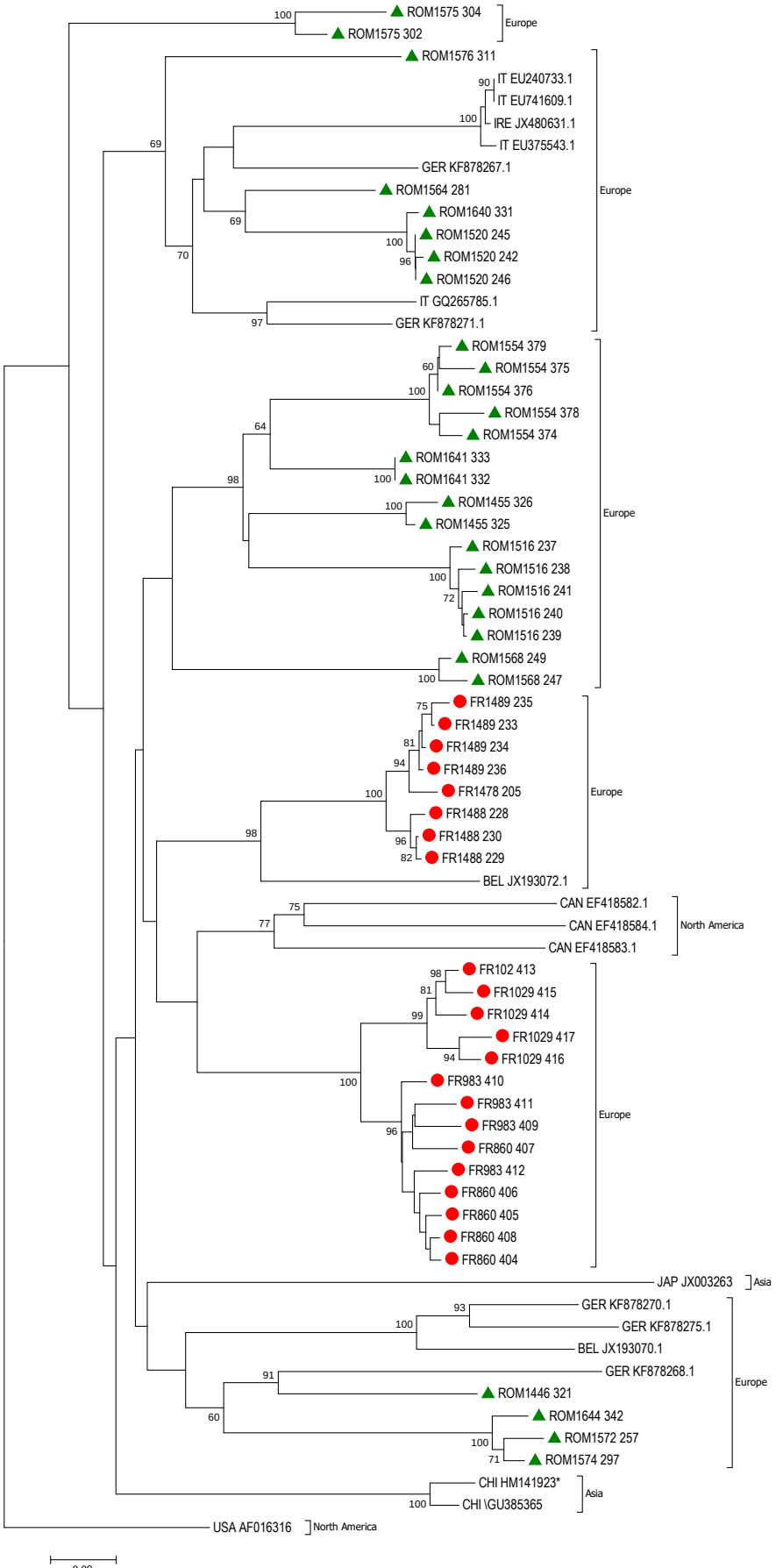
2009. L'isolat $EIAV_{FR983}$ a été isolé en 1998 d'une jument séropositive, identifiée en Normandie et a été inoculé à la jument 860. L'analyse phylogénétique a montré que les virus $EIAV_{FR983}$ et $EIAV_{FR860}$ étaient génétiquement apparentés et formaient un même cluster génétique avec la souche $EIAV_{FR1029}$ isolée en 2005 (Figure 20). Les isolats $EIAV_{FR1488}$ et $EIAV_{FR1489}$ correspondent à un foyer identifié en 2009 et sont génétiquement proches (Figure 20).

Phylogénétiquement, les isolats roumains ne définissaient pas un cluster homogène, mais étaient répartis dans plusieurs clusters génétiques distincts (Figure 20), non dépendants de la région de provenance, génétiquement apparentés aux souches italiennes pour $EIAV_{ROM1564}$ et $EIAV_{ROM1576}$ et aux souches chinoises pour $EIAV_{ROM1640}$ et $EIAV_{ROM1520}$. Les autres souches roumaines formaient des clusters distincts mettant en évidence la diversité des souches d'EIAV responsables de l'épidémie en Roumanie entre 2007 et 2008. L'analyse des données de séquences dans *gag* n'a pas permis de clairement discriminer les souches selon le pays ou le continent d'origine (Amérique du Nord, Asie ou Europe) (Figure 20), suggérant la circulation dans la population équine de multiples génotypes, notamment en Europe. L'alignements des séquences nucléotidiques et déduites en acides aminés dans la région du gène *gag* codant la matrice (Figure 21A) ou la capside (Figure 21B) a permis de mettre en évidence une diversité notamment dans la partie 3' codant la matrice.

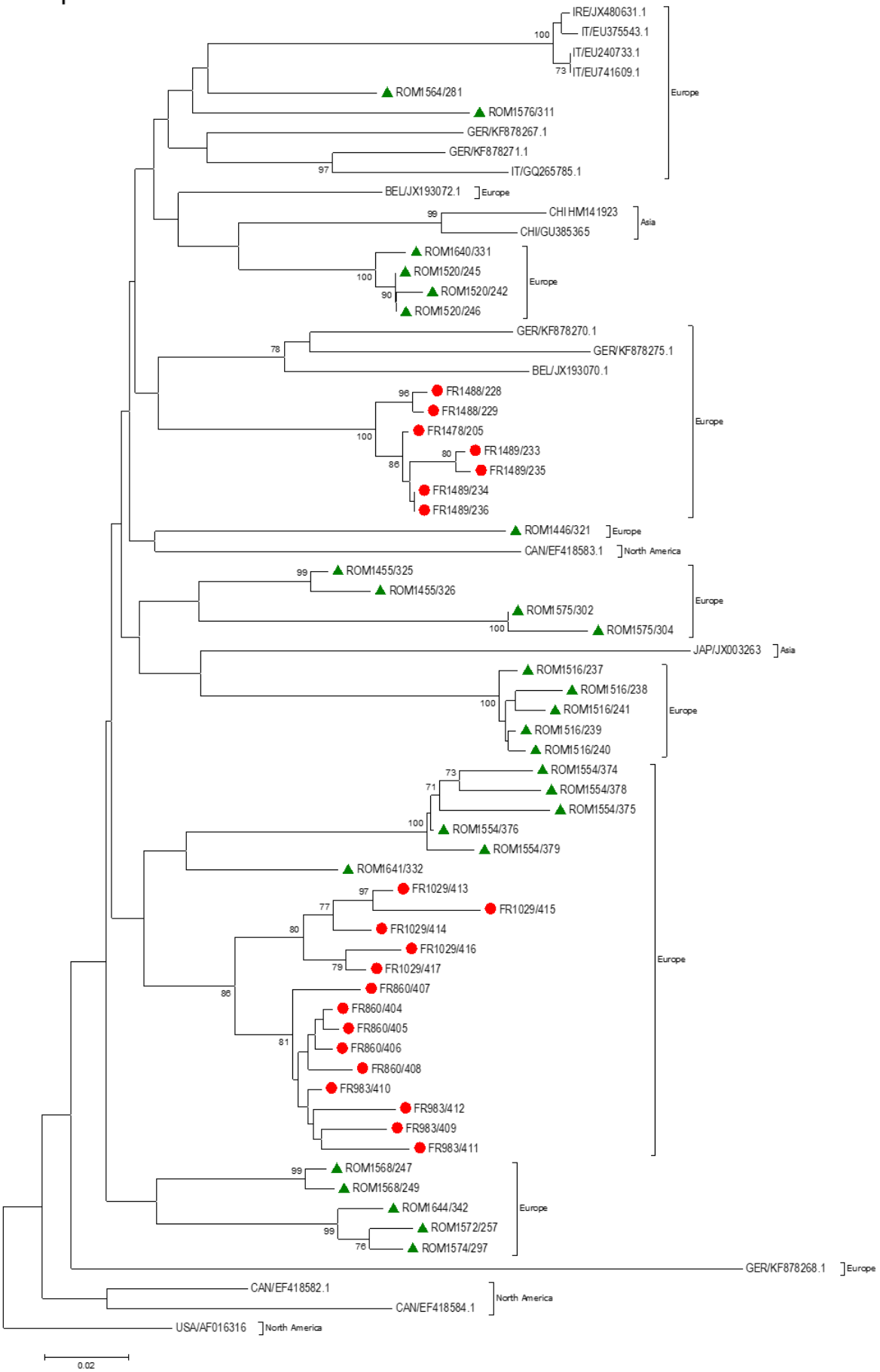
En résumé, l'analyse de la séquence partielle de *gag* de 20 isolats français et roumains et leur comparaison avec des souches déjà décrites d'EIAV en Europe, Amérique du Nord, ou Asie a permis de mettre en évidence la forte hétérogénéité des souches d'EIAV circulantes et l'absence de clusters génétiques clairement définis par l'origine géographique des animaux. Nous avons mis en évidence la circulation en France et en Roumanie de nouveaux isolats, distincts génétiquement de ceux rapportés à ce jour.

Figure 20 : Reconstruction phylogénétique à partir des séquences partielles du gène gag (~500 pb) d'isolats d'EIAV géographiquement distincts. L'arbre a été construit avec les séquences nucléotidiques (A) et déduites en acides aminés (B) d'isolats français FR (●) et roumains ROM (▲) par la méthode de Neighbor-Joining en utilisant le logiciel Mega X [171]. La valeur statistique des embranchements a été déterminée par bootstrap sur 1000 itérations, elles sont indiquées en pourcentage à la racine des branches. Toutes les positions contenant des gaps ou des données manquantes ont été éliminées. La souche $EIAV_{UK}$ (AF016316) a été utilisée comme racine de l'arbre. Des séquences d'EIAV isolés en Europe, Amérique du Nord et Asie ont été inclues dans l'analyse ; elles sont identifiées par le préfixe du pays (IRE : Ireland, GER : Germany, IT : Italy, BEL : Belgium, CHI : China ; JAP : Japan, CAN : Canada) suivi du numéro d'accès Genbank

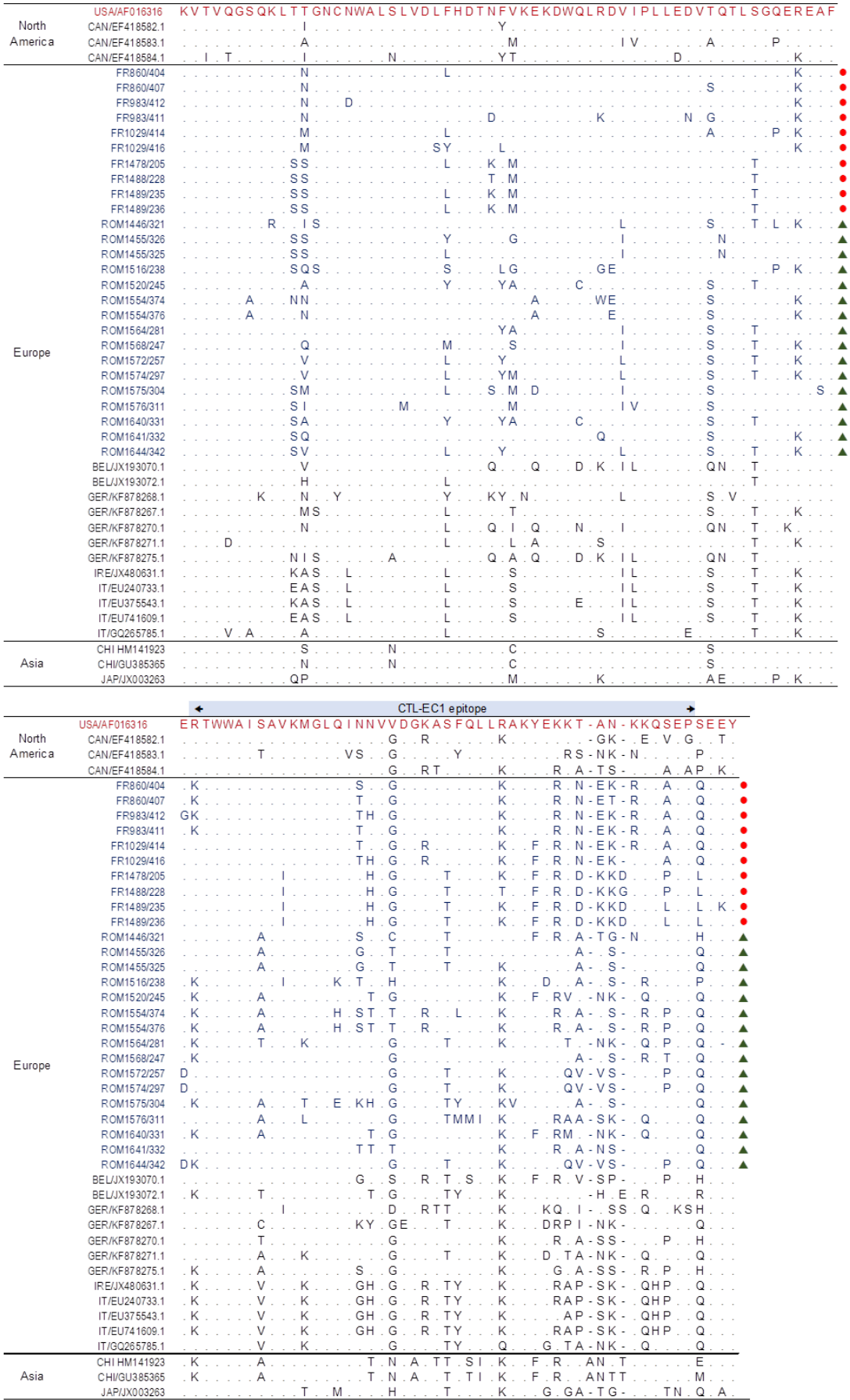
A. Séquences nucléotidiques



B. Séquences déduites en acides aminés



A. MA P15



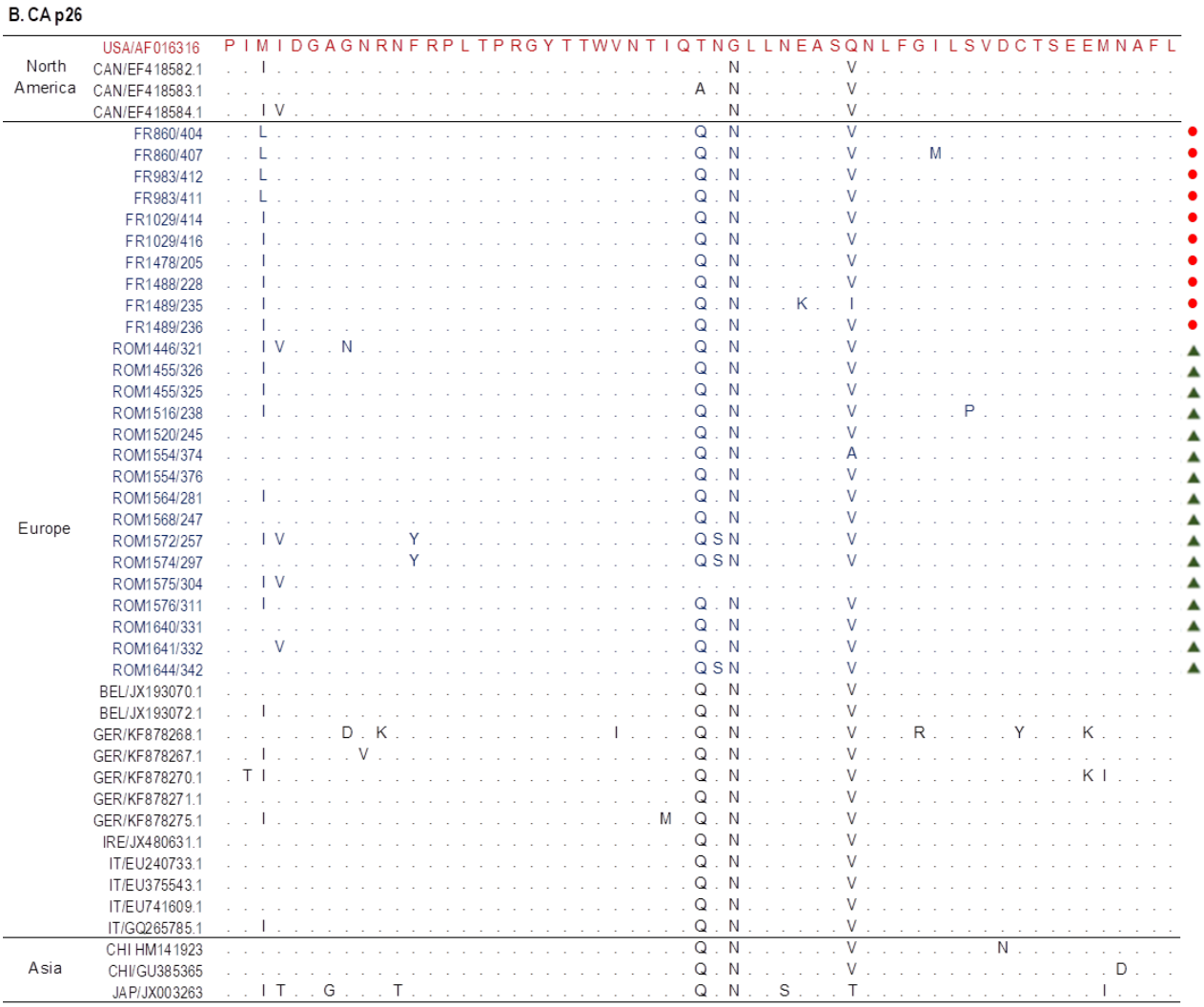


Figure 21 : Alignement des séquences déduites en acides aminés d'isolats d'EIAV géographiquement distincts. Les séquences déduites en acides aminés des isolats d'EIAV roumains (▲) et français (●) ont été alignées dans la région du gène gag codant pour la matrice MA (A) et une partie de la capside CA (B) et comparées aux souches d'EIAV circulant en Europe, Asie et Amérique du Nord. Seuls les acides différents de la souche de référence $EIAV_{UK}$ USA AF016316 (en rouge) sont montrés. Les gaps sont indiqués par (-)

III.3 **Diversité génétique du gène *gag* des souches EIAV**

Nous avons étendu l'analyse par le séquençage du gène gag complet (~1500 pb) des isolats français $EIAV_{FR1489}$ et $EIAV_{FR1478}$, et roumains $EIAV_{ROM1554}$ et $EIAV_{ROM1568}$. En moyenne, les souches roumaines et françaises divergeaient entre elles de 18% en séquences nucléotidiques (17% en séquences déduites en acides aminés), de ~26% (~22% en acides aminés) avec la souche japonaise $EIAV_{Miya}$ et de ~23% (~18.5% en acides aminés) avec la souche américaine (Figure 22). L'analyse a permis de montrer la circulation en France et en Roumanie de nouveaux génotypes

d'EIAV. La reconstruction phylogénétique à partir des séquences nucléotidiques de la totalité du gène *gag* soit ~1500 pb (Figure 23A) et déduites en acides aminés (Figure 23B) a permis de mettre en évidence une répartition des espèces virales identiques à celles obtenues sur un fragment de *gag* restreint à la MA et à la CA (Figure 23).

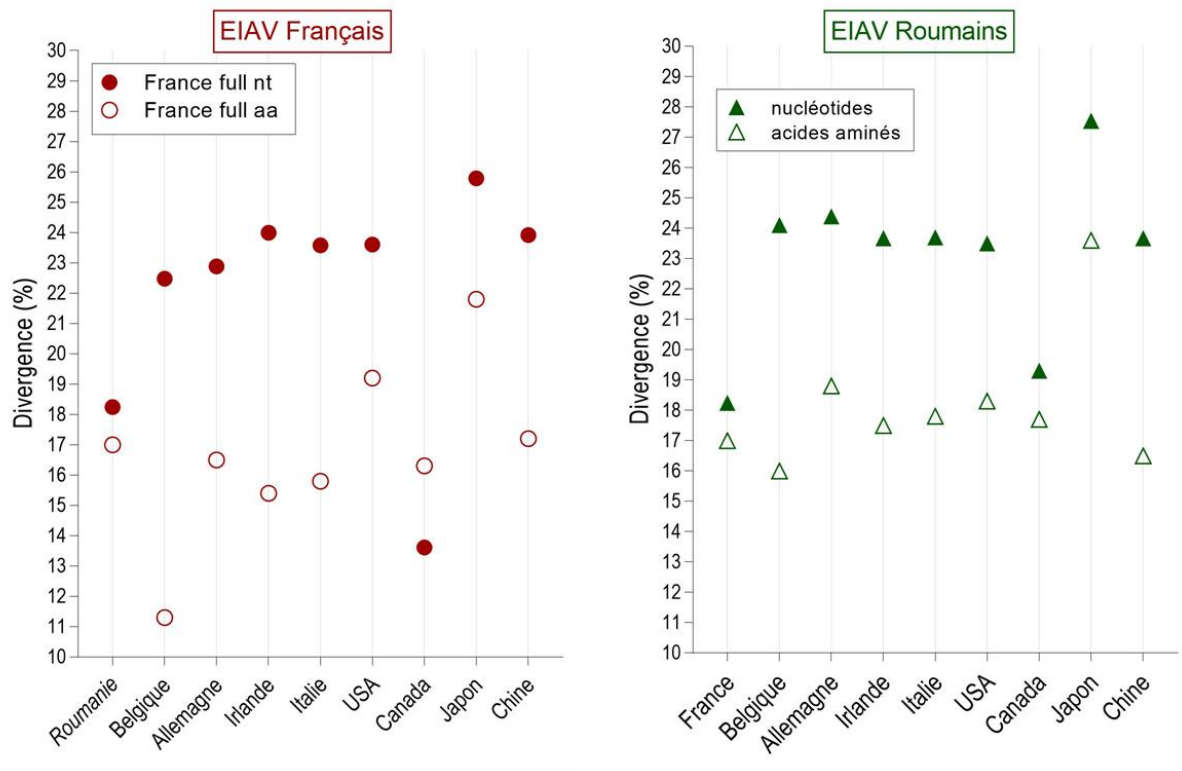
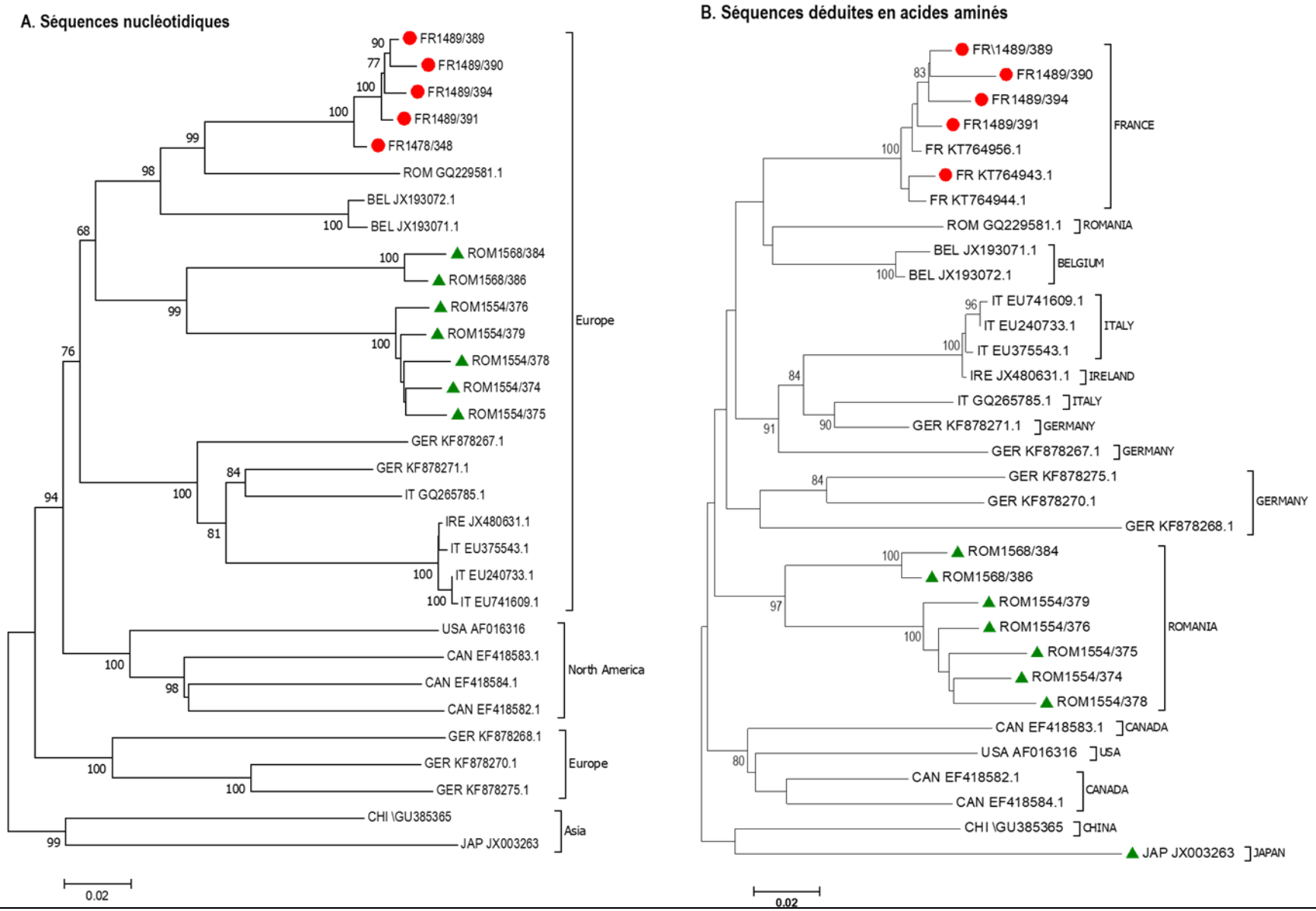


Figure 22 : Estimation de la divergence selon l'origine géographique des souches d'EIAV. Les matrices de distances ont été calculées sur la base des séquences nucléotidiques et déduites en acides aminés (A) et représentées (B) selon le pourcentage de divergence entre les souches française et roumaines et les séquences d'EIAV isolés en Amérique du Nord, Europe et Asie en nucléotides (●▲) ou déduites en acides aminées (○△).

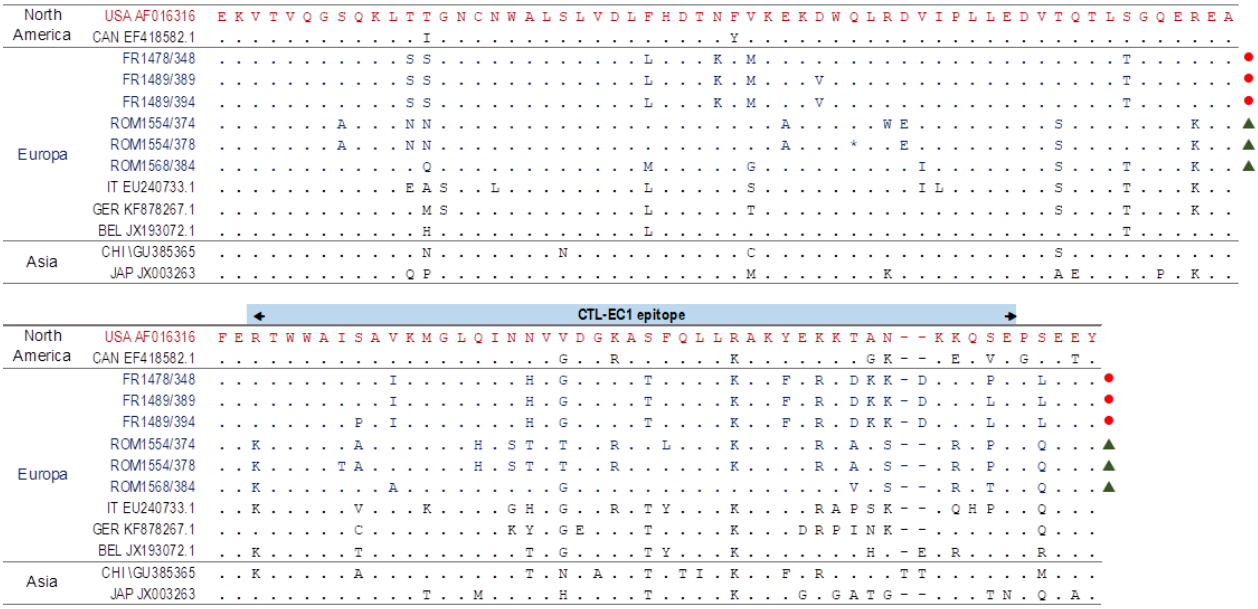
Figure 23 : Reconstruction phylogénétique à partir des séquences complètes du gène gag (~1500 pb) d'isolats d'EIAV géographiquement distincts. L'arbre a été construit avec les séquences nucléotidiques (A) et déduites en acides aminés (B) d'isolats français FR (●) et roumains ROM (▲) par la méthode de Neighbor-Joining en utilisant le logiciel Mega X [171]. La valeur statistique des embranchements a été déterminée par bootstrap sur 1000 itérations, elles sont indiquées en pourcentage à la racine des branches. Toutes les positions contenant des gaps ou des données manquantes ont été éliminées. La souche $EIAV_{UK}$ (AF016316) a été utilisée comme racine de l'arbre. Des séquences d'EIAV isolés en Europe, Amérique du Nord et Asie ont été inclues dans l'analyse ; elles sont identifiées par le préfixe du pays (IRE : Ireland, GER : Germany, IT : Italy, BEL : Belgium, CHI : China ; JAP : Japan, CAN : Canada) suivi du numéro d'accès Genbank.


A. Séquences nucléotidiques
FR1489/389
FR1489/390
FR1489/394
FR1489/391
FR1478/348
ROM GQ229581.1
BEL JX193072.1
BEL JX193071.1
ROM1568/384
ROM1568/386
ROM1554/376
ROM1554/379
ROM1554/378
ROM1554/374
ROM1554/375
GER KF878267.1
GER KF878271.1
IT GQ265785.1
IRE JX480631.1
IT EU375543.1
IT EU240733.1
IT EU741609.1
Europe
USA AF016316
CAN EF418583.1
CAN EF418584.1
CAN EF418582.1
North America
GER KF878268.1
GER KF878270.1
GER KF878275.1
Europe
CHI \GU385365
JAP JX003263
Asia
0.02
B. Séquences déduites en acides aminés
FR\1489/389
FR1489/390
FR1489/394
FR1489/391
FR KT764956.1
FR KT764943.1
FR KT764944.1
FRANCE
ROM GQ229581.1
ROMANIA
BEL JX193071.1
BEL JX193072.1
BELGIUM
IT EU741609.1
IT EU240733.1
IT EU375543.1
ITALY
IRE JX480631.1
IRELAND
IT GQ265785.1
ITALY
GER KF878271.1
GERMANY
GER KF878267.1
GERMANY
GER KF878275.1
GER KF878270.1
GER KF878268.1
GERMANY
ROM1568/384
ROM1568/386
ROM1554/379
ROM1554/376
ROM1554/375
ROM1554/374
ROM1554/378
ROMANIA
CAN EF418583.1
CANADA
USA AF016316
USA
CAN EF418582.1
CAN EF418584.1
CANADA
CHI \GU385365
CHINA
JAP JX003263
JAPAN
0.02

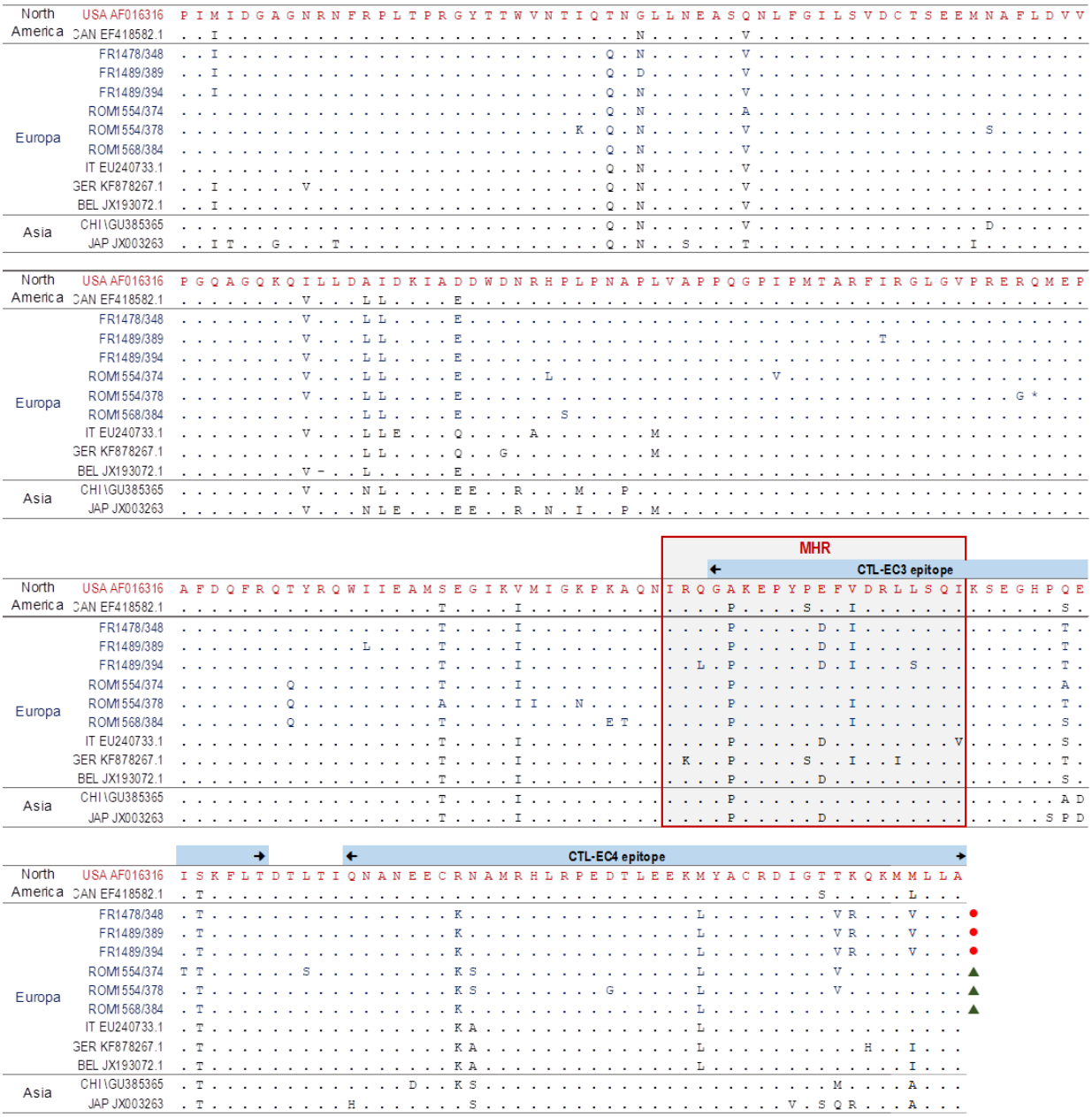
Les alignements des séquences déduites en acides aminés de MA (Figure 24A), CA (Figure 24B) et NC (Figure 24C) ont mis en évidence une répartition hétérogène des divergences entre des souches d'EIAV d'origine géographique différente. La variabilité est restreinte pour la région de *gag* codant la capside (Figure 24B) notamment dans la région MHR (Major Homology Region) et les épitopes CTL-EC3 et CTL-EC4. MHR est un motif conservé, requis pour l'assemblage des rétrovirus [115, 159] et présent dans les souches d'EIAV décrites aux USA et apparentées à la souche Wyoming d'EIAV avec la séquence IRQG(A/V)KEPYPEF(V/I)DRLLSQI. La comparaison des séquences roumaines et françaises de cette étude et de souches EIAV publiées a mis en évidence la présence d'une proline (P) en position 5 du motif MHR au lieu d'une alanine (A). En position 11, un acide aspartique D remplace l'acide glutamique, notamment dans les souches françaises. Grace à cette étude, apportant des informations sur la séquences des souches géographiques distinctes d'EIAV, nous proposons de retenir la séquence consensus IRQG**P**KEPYP(E/**D**)F(V/I)DRLLSQI pour le motif MHR.

La variabilité dans la région de *gag* codant la nucléocapside (Figure 24C) est limitée, notamment dans les régions ZBD (Zinc Binding Domain) connues pour se lier aux acides nucléiques et pour l'encapsidation des ARN lors de l'assemblage du virus [65]. Nous avons montré que la diversité était plus importante dans la région codant pour MA (Figure 24A), notamment dans la région définie comme l'épitope CTL-EC1.

A. Matrice MA



B. Capside CA p26



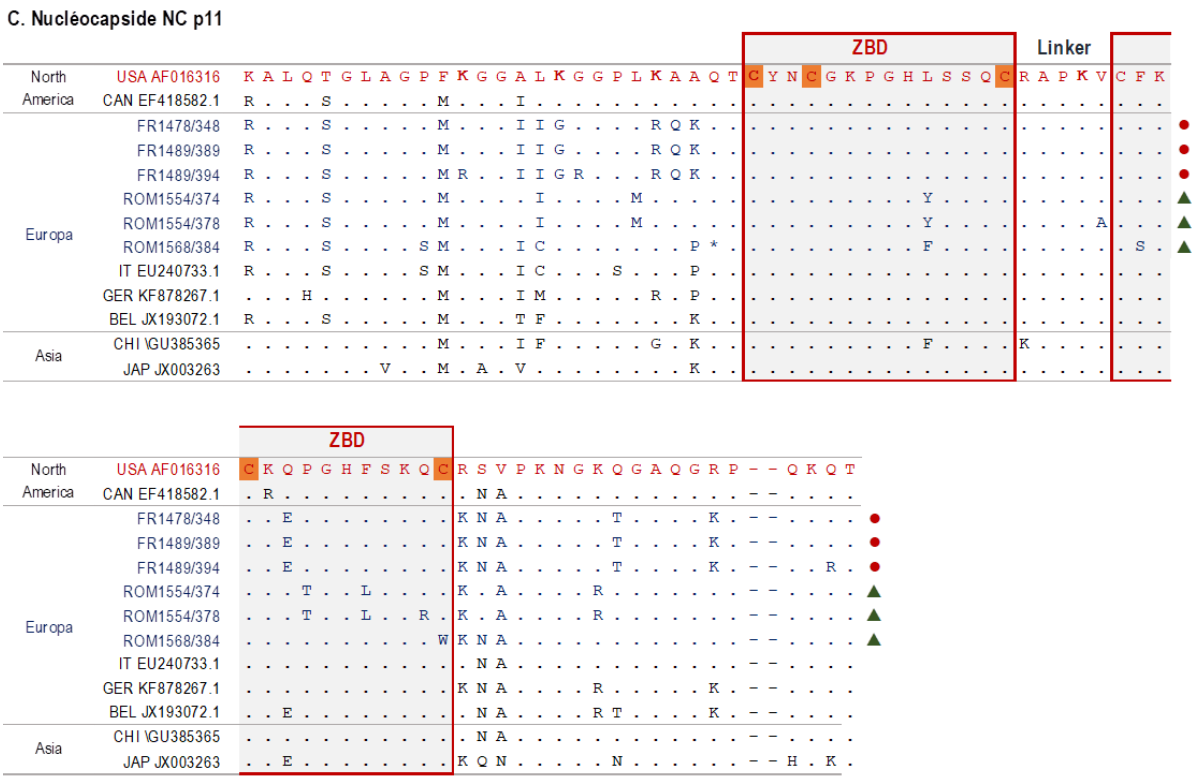


Figure 24 : Alignement des séquences déduites en acides aminés d'isolats d'EIAV géographiquement distincts. Les séquences déduites en acides aminés des isolats d'EIAV roumains (▲) et français (●) ont été alignées dans la région du gène gag codant codant pour MA (A), CA (B) et NC (C) et comparées aux souches d'EIAV circulant en Europe, Asie et Amérique du Nord. Seuls les acides différents de la souche de référence $EIAV_{UK}$ USA AF0.16316 (en rouge) sont montrés. Les gaps sont indiqués par (-). Les épitopes CTL (CTL-EC) sont encadrés en bleu ; les motifs MHR (Major Homology Region) et ZBD (Zinc Binding Domain) sont encadrés en rouge ; les cystéines C conservées sont indiquées en orange.

La région de gag codant pour le « late domain », p9, indispensable au bourgeonnement viral présente un niveau élevé de divergence entre les souches avec ~47% de divergence entre les souches roumaines et française (Figure 25). Les souches roumaines étaient les plus divergentes dans le « late domain » avec 85, 76, 56% de divergence en comparaison respectivement des souches américaines, canadiennes et japonaises (Figures 25A et 25B). Globalement les souches roumaines avaient de 62 à 76% de divergence avec les souches européennes, hors France (Figures 25).

Le « late domain » des lentivirus contient un motif YPDL essentiel pour la libération des particules virales par bourgeonnement à la membrane plasmique [26]. YPDL est conservé dans toutes les souches étudiées et est dupliqué dans la souche $EIAV_{ROM1554}$ (Figure 26).

A.

	France	Roumanie
Roumanie	**46,8**	-
France	-	**46,8**
Belgique	39,5	62,7
Allemagne	44,4	76,0
Italie	46,6	74,0
USA	73,6	85,5
Canada	57,3	76,1
Chine	44,9	49,8
Japon	57,1	56,5

B.

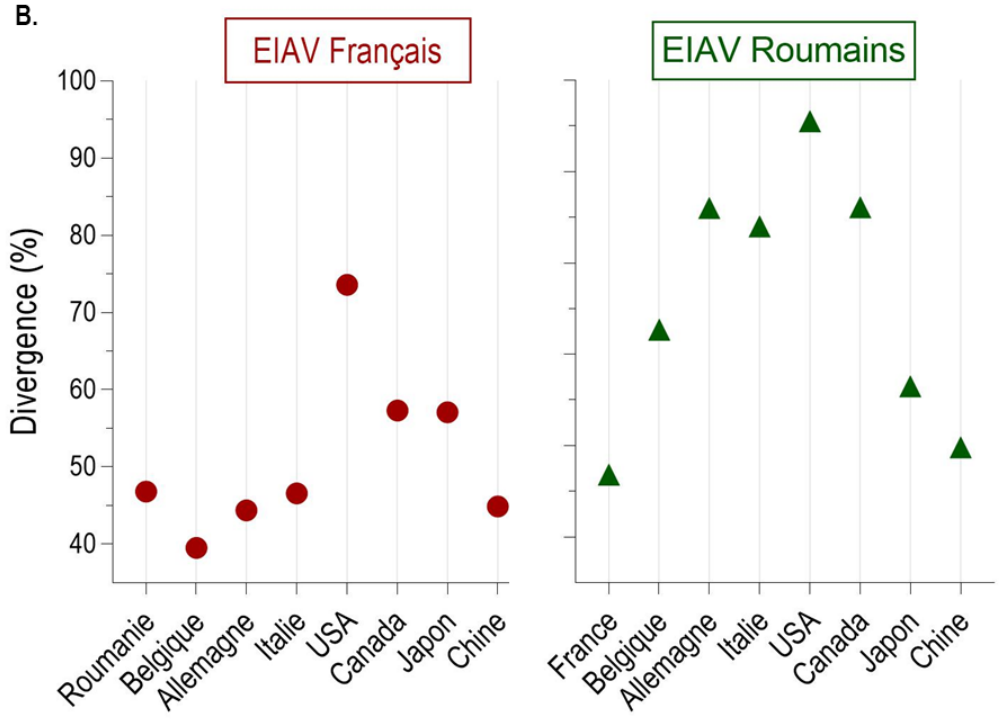


Figure 25 : Estimation de la divergence dans le « late domain » p9 selon l'origine géographique des souches d'EIAV. Les matrices de distances ont été calculées sur la base des séquences déduites en acides aminés (A) et représentées (B) selon le pourcentage de divergence entre les souches française (●) et roumaines (▲) et les séquences d'EIAV isolés en Amérique du Nord, Europe et Asie déduites en acides aminées

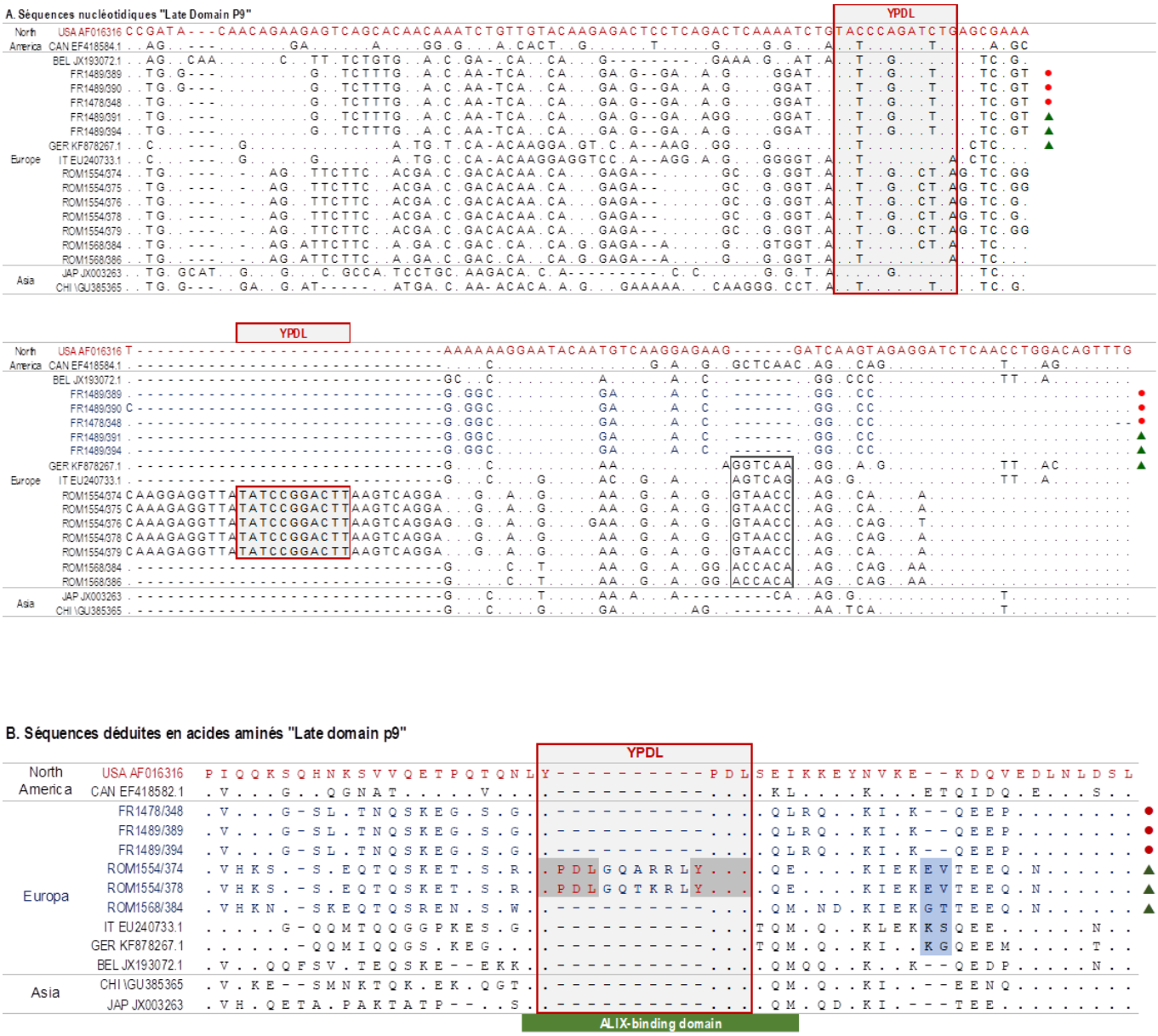


Figure 26 : Alignement des séquences déduites en acides aminés dans le late domain p9. Les séquences déduites en acides aminés des isolats d'EIAV roumains (●) et français (▲) ont été alignées dans la région du gène *gag* codant p9 et comparées aux souches d'EIAV circulant en Europe, Asie et Amérique du Nord. Seuls les acides différents de la souche de référence $EIAV_{UK}$ USA AF016316 (en rouge) sont montrés. Les gaps sont indiqués par (-). Le motif YPDL est encadré en rouge

III.4 **Dérivation du clone biologique $EIAV_{FR1478}$.**

Le virus français $EIAV_{FR1478}$ a été dérivé *in vitro* directement à partir de macrophages dérivés de monocytes sanguins ou $eMDM_{1478}$ obtenus à partir de sang total du cheval 1478 séropositif pour EIAV. Les surnageants ont été récoltés à 4 et 8 jours après la mise en culture. Le génome viral a été recherché par RT-PCR avec des amorces localisées dans *gag* précédemment définies (Tableau 4) permettant

efficacement l'amplification d'EIAV européens à partir de séquences obtenues au laboratoire (Figure 27). Les ARN viraux étaient présents dès quatre jours de culture comme le montre la présence d'un amplicon de 506 pb dans les surnageants (Figure 27). Les cellules eMDM du cheval 1478 séropositif étaient donc capables d'excréter du virus EIAV *in vitro*

Les cellules 2522 eMDM ont été obtenues à partir du sang d'un cheval séronégatif pour EIAV. Ces cellules avaient une morphologie compatible avec les macrophages dérivés de monocytes sanguins soit des cellules de grande taille, adhérentes avec un cytoplasme large et multinucléées. Les cellules 2522 eMDM ont été infectées avec des surnageants concentrés d'$EIAV_{FR1478}$ provenant de cellules $eMDM_{1478}$. La présence d'ARN viraux dans les surnageants des cellules 2522 eMDM infectées a été détectée dès quatre jours de culture (Figure 27). La souche virale non adaptée $EIAV_{FR1478}$ s'est répliquée *in vitro* en cellules eMDM comme la souche virale adaptée au laboratoire $EIAV_{UK}$ (Figure 27).

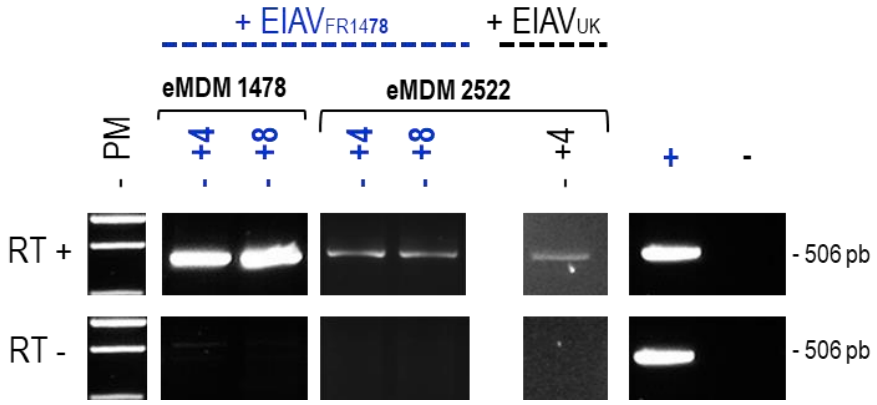


Figure 27 : $EIAV_{FR1478}$ se réplique dans les cellules eMDM. Une région du gène *gag* d'EIAV a été détectée par amplification RT-PCR dans les surnageants des cellules eMDM infectées par $EIAV_{FR1478}$ à 4 et 8 jours post infection. Un contrôle d'infection a été effectué avec $EIAV_{UK}$ en eMDM 2522 à 4 jours post infection. Les témoins de PCR sont des ADN positifs pour EIAV (+) ou négatifs pour EIAV (-). Une migration des produits d'amplification a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. PM : marqueur de poids moléculaire.

Les cellules eMDM sont difficiles à maintenir en culture et à préparer, nous avons donc développé des fibroblastes équins à partir des poumons # 2647 et # 2648. Ils ont été dissociés et mis en culture. Les cellules présentaient un phénotype épithélial macroscopique avec de petites cellules adjacentes, cubiques en îlots. Elles ont gardées une morphologie épithéliale, avec présence d'une double population fibroblastique et épithelioïde, dès le premier passage, puis la population

fibroblastique avec un aspect fusiforme ou étoilée est devenue majoritaire. Les cellules EF_{2647} et EF_{2648} (Equine Fibroblaste 2647 et 2648) ont pu être amplifiées par passages successifs. Elles se sont maintenues jusqu'au vingtième passage. Les cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} conservées en azote liquide ont été décongelées régulièrement et sont repartie à chaque décongélation.

EIAV utilise le récepteur ERL1 (Equine Lentivirus Receptor 1) pour entrer dans les cellules, codé par le gène TNFRSF14 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14) chez le cheval. Nous avons vérifié la présence du récepteur. L'amplification par RT PCR à partir des ARN extraits des fibroblastes équins ED et des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} a permis d'établir la présence d'ARNm du récepteur ERL1 dans les cellules équines (Figure 28).

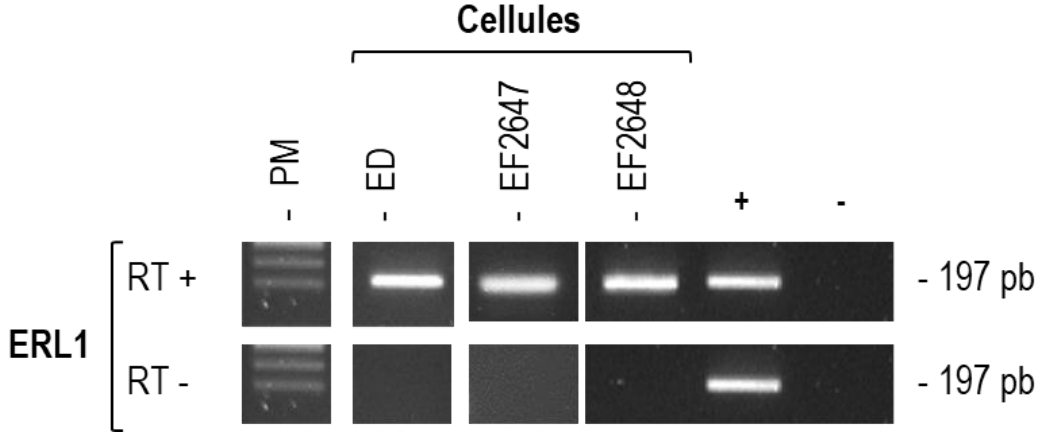


Figure 28 : Expression de l'ARNm du récepteur ERL1 d'EIAV des cellules ED, des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648}. Détection de l'ARNm du récepteur ERL1 par amplification par RT-PCR. Les témoins de PCR sont des ADN positifs pour ERL1 (+) ou négatifs pour ERL1 (-). PM pour marqueur de poids moléculaire.

L'infection des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} a été réalisée avec la souche virale non adaptée $EIAV_{FR1478}$ ainsi qu'avec la souche virale adaptée $EIAV_{UK}$ (Figure 29). Les cellules ont été observées régulièrement (Figure 29). La morphologie et l'état des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} infectées par le virus sauvage $EIAV_{FR1478}$ n'a pas changé au cours du temps et nous n'avons pas observé de différence avec les fibroblastes non infectés ni de différence avec les cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} infectées par $EIAV_{UK}$ (Figure 29). EIAV n'a pas d'effet cytopathique sur les fibroblastes pulmonaires.

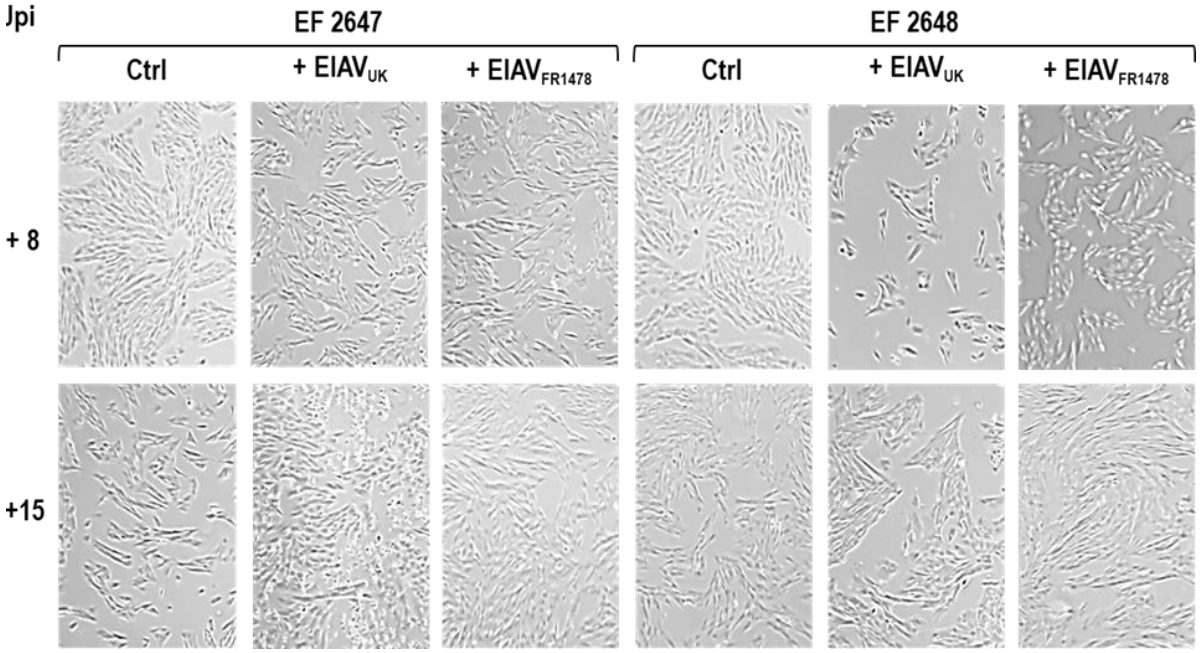


Figure 29 : Morphologie des cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} infectés avec $EIAV_{FR1478}$ ou $EIAV_{UK}$ observés à 8 et 15 jours post infection (Jpi). Observation des cellules au microscope inversé Evos Core (Ozyme) à l'objectif 4.

Nous avons analysé la réplication d'$EIAV_{FR1478}$ sur les fibroblastes pulmonaires équins EF_{2647} et EF_{2648} par détection de l'ARN viral dans les cellules infectées et leur surnageant par RT PCR. L'ARN viral est présent dans les fibroblastes EF_{2647} et EF_{2648} et leur surnageant et la protéine p26 de la capside virale est aussi présente dans le surnageant quinze jours après infection (Figure 30).

Les cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648} que nous avons dérivées sont donc permissives à EIAV (Figure 28 et 30) ou les eMDM et sont capables de supporter la réplication d'une souche virale non adaptée ($EIAV_{FR1478}$) d'une manière identique à une souche virale adaptée en culture ($EIAV_{UK}$).

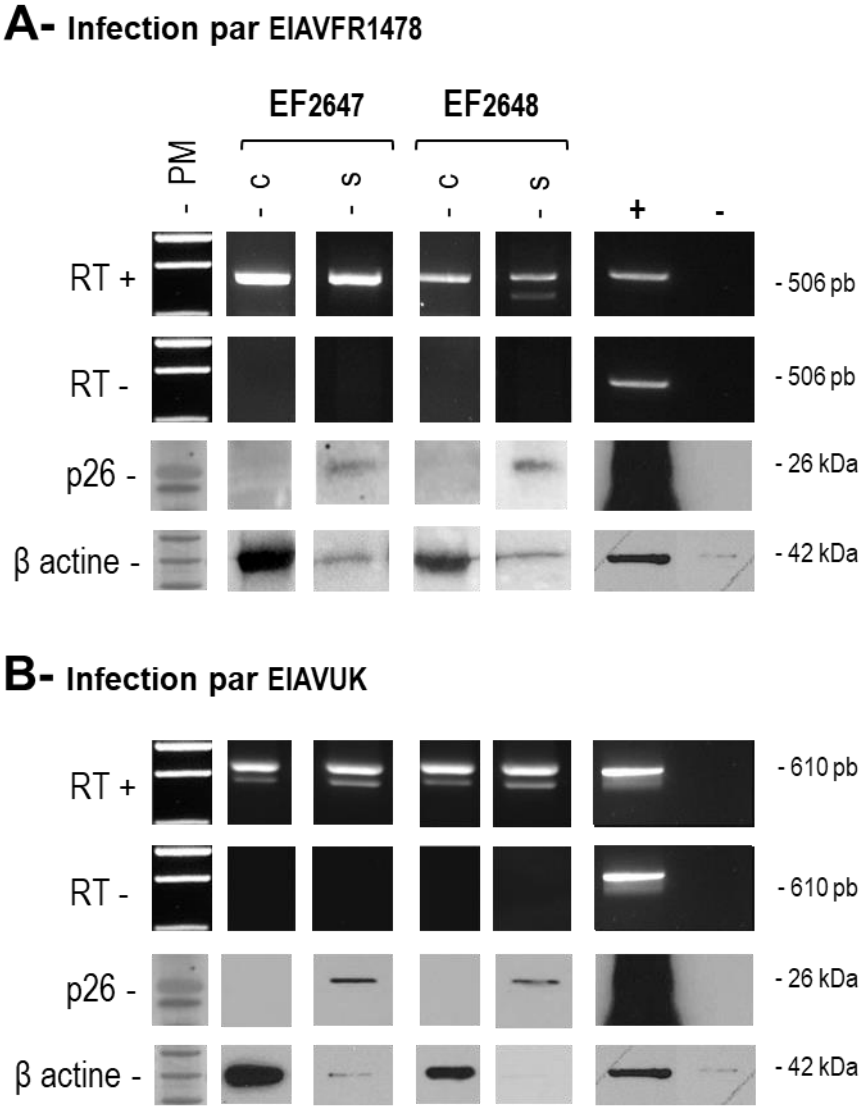


Figure 30 : $EIAV_{FR1478}$ se réplique dans les cellules fibroblastiques pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648}. Une région du gène *gag* d'EIAV a été détectée par amplification RT-PCR dans les cellules (C) et dans les surnageants (S) des cellules EF2647 et EF2648 infectés par $EIAV_{FR1478}$ à 15 jours post infection (A). La capside d'EIAV a été détectée dans les surnageants des cellules EF2647 et EF2648 infectés par EIAV à 15 jours post infection par immunomarquage de la protéine de capside p26 montrant la réplication du virus $EIAV_{FR1478}$ in vitro. Un contrôle d'infection a été effectué avec $EIAV_{UK}$ en cellules EF2647 et EF2648 à 15 jours post infection (B). Les témoins de PCR sont des ADN positifs pour EIAV (+) ou négatifs pour EIAV (-).

La séquence consensus du gène *gag* de la souche $EIAV_{FR1478}$ a été établie et a été comparée avec les séquences de référence publiées dans Genbank (Figure 22 à 26). La comparaison des séquences a permis de déterminer que la souche virale $EIAV_{FR1478}$ correspondait à une souche virale distincte génétiquement présentant de 18 à 26 % de divergence en nucléotides (11 à 21 % en acides aminés) par rapport aux souches d'Europe, de Chine, du Japon et d'Amérique du Nord.

IV DISCUSSION

Nous avons réalisé une étude à grande échelle sur 69 échantillons de sang total et cellules mononuclées de sang périphérique provenant de chevaux roumains séropositifs pour EIAV. La présence du gène *gag* du génome d'EIAV a été recherchée par amplification PCR ou RT-PCR. Les échantillons étaient issus du programme national de surveillance instauré en Roumanie depuis 2006 par contrôle de tous les équidés [72, 175]. Les chevaux prélevés ne présentaient aucun signe clinique d'AIE [12].

Dans notre étude, le génome d'EIAV a été retrouvé dans le sang circulant de 53 chevaux soit 77% des prélèvements analysés ; ceci peut être attribué à la qualité des prélèvements (certains anciens ou de volume faible) ou la faiblesse de la charge virale circulante lors des phases asymptomatiques. Il a été décrit que la charge virale d'EIAV dans le sang circulant de chevaux infectés expérimentalement en dehors des épisodes cliniques était très faible à indétectable [74]. Lors d'infections naturelles, plusieurs études ont établi la difficulté de détecter le génome du virus dans le sang circulant, le plasma ou les cellules mononuclées de sang périphériques sur des chevaux asymptomatiques séropositifs : aucun prélèvement positif par PCR pour une étude réalisée en France sur 15 chevaux, [63], et moins de 30% de prélèvements positifs par PCR sur des études réalisées en Slovénie [92] ou en Mongolie [179].

Nous rapportons la détection de génome d'EIAV dans le sang chez des chevaux « vieux » (>15 ans) [81] représentant 14% des chevaux positifs en PCR parmi les 22 chevaux roumains séropositifs pour lesquels nous avions les données d'âge et de sexe. Le génome n'avait pas été détecté chez un cheval de 25 ans séropositif depuis 15 ans, asymptomatique cliniquement [45].

Pour analyser la diversité des souches d'EIAV circulant en Europe, nous avons cloné et séquencé le gène *gag* d'EIAV d'isolats roumains ou français. Les séquences nucléotidiques des souches françaises et roumaines divergeaient de ~25% de la souche de référence américaine $EIAV_{UK}$ ou de la souche japonaise $EIAV_{MYA}$ (et de ~19% pour les séquences déduites en acides aminés), confirmant la circulation en France et en Roumanie de nouveaux génotypes d'EIAV distincts des isolats géographiques identifiés. De façon intéressante, les isolats présents en France et en Roumanie appartiennent à des clusters phylogénétiquement distincts. Les souches

françaises les plus anciennes de 1998 et 2005 ($EIAV_{860, 983 et 1029}$) forment un même cluster génétique, et les souches les plus récentes de 2009 ($EIAV_{1478, 1488 et 1489}$) en forment un autre. Les isolats roumains ne définissent phylogénétiquement pas un cluster homogène. Nos résultats orientent vers l'évolution indépendant d'EIAV dans les pays dont ils sont originaires et la non contamination des animaux avec une souche spécifique d'un pays, tel que la Roumaine comme cela a pu être suggéré.

La capside des *Retroviridae* contient une région très conservée nommé MHR (Major Homology Region) d'une taille de 20 acides aminés [191]. La séquence en acide aminé proposée de MHR pour les virus apparentés à la souche américaine $EIAV_{Wyoming}$ (GenBank accession AF033820) est IRQG(A/V)KEPYPEF(V/I)DRLLSQI. L'alignement des séquences déduites en acides aminés des EIAV roumains et français montre en position 5, la présence constante d'une proline (P) à la place d'une alanine (A) ou valine (V) et la présence d'un acide aspartique (D) à la place d'un acide glutamique (E) en position 11. Les changements d'acides aminés en position 5 et 11 avaient déjà été observés sur la souche irlandaise et japonaise en comparaison avec les souches américaine $EIAV_{Wyoming}$ et chinoise $EIAV_{Liaoning}$ [56]. Par notre étude sur 30 échantillons, nous pouvons confirmer la présence d'une proline en position 5 et la présence soit d'un acide aspartique soit d'un acide glutamique en position 11. Ainsi nous pourrions proposer la séquence suivante pour MHR : IRQG**P**KEPYP(E/**D**)F(V/I)DRLLSQI.

Les analyses des séquences déduites en acides aminés de souches d'EIAV provenant de différentes régions confirment la présence d'un motif YPDL dans le « late domain» p9 localisé en partie terminale de *gag*[157]. L'isolat $EIAV_{ROM1554}$ possède deux motifs YPDL, jamais rapportés dans la littérature ; Nous avons mis en évidence la présence d'une insertion de six acides aminés (G Q (A ou T) (R ou K) R L) encadrée par deux motifs.

Divers épitopes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques ou CTL-EC (Cytotoxic T Lymphocytes - Epitope Cluster) ont été mis en évidence dans la matrice avec CTL-EC1 et CTL-EC2 et la capside avec CTL-EC3 et CTL-EC4 [129]. Les épitopes CTL-EC1, 3 et 4 possèdent chacun une séquence peptidique conservée, optimale pour se liant aux CTL [28], alors que CTL-EC2 est un domaine hypervariable [129]. Ces épitopes sont conservés dans les souches françaises et roumaines que nous avons étudiées.

Outre les informations génétiques nous permettant de caractériser les EIAV circulant en Europe, nous avons entrepris la dérivation d'un clone moléculaire infectieux d'EIAV. A partir de la mise en culture in vitro de macrophages dérivés de monocytes sanguins, nous avons isolé le virus $EIAV_{FR1478}$, non adapté au laboratoire par passage successifs sur des cellules différentes des cellules cibles *in vivo*, réplicatif sur les fibroblastes pulmonaires équines EF_{2647} et EF_{2648}. Ce virus isolé d'un cheval français naturellement infecté par EIAV constitue la première souche isolée d'EIAV Français. Il existe peu de souches non adaptées d'EIAV. La plupart des EIAV réplicatifs *in vitro* dérivent de la souche hypervirulente américaine $EIAV_{wyo}$ ou des souches vaccinales chinoises [111, 112, 116, 185] par passages réitérés *in vitro* sur cellules [149]. Le maintien en culture a atténué cette souche modifiant ses propriétés in vitro et in vivo [100]

En conclusion, nous avons établi le degré de diversité génétique des EIAV circulant en Europe et montré que des clusters indépendants de virus évoluaient dans les pays. Nous n'avons pas mis en évidence une origine Roumaine des souches Européennes, suggérant un cloisonnement des populations virales, sans évidence (dans la limite du nombre de souches analysées) de contamination roumaine en France.

PARTIE 2

MALADIE INTERSTITIELLE PULMONAIRE ASSOCIEE A L'INFECTION PAR EIAV CHEZ LE CHEVAL

VETERINARY RESEARCH, 2013, 44 :113

I INTRODUCTION

L'AIE associe différents symptômes dont une hyperthermie associée à une thrombocytopénie, un amaigrissement, une splénomégalie et des pétéchies [101]. L'infection expérimentale par EIAV se caractérise par l'évolution d'un stade aigu vers un stade chronique à un stade asymptomatique pendant lequel les équidés bien qu'infectés à vie ne présentent plus de manifestation clinique [101]. Les équidés restent néanmoins infectieux [40, 45, 201] et sont des réservoirs potentiels pour la transmission aux équidés naïfs et ainsi la maladie se propage encore chez les chevaux. L'infection par EIAV est endémique pour les chevaux du monde entier [20]. On a peu de connaissance sur les origines et la propagation pandémique des virus [17].

Une réplication virale d'EIAV a été détectée dans les tissus riches en macrophages soit la rate, le foie, le poumon, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse [74]. EIAV comme tous les lentivirus, se réplique dans les macrophages [100, 166]. EIAV infecte également les cellules endothéliales puisque les ARN viraux de l'EIAV ont été détectés chez les chevaux infectés expérimentalement [120, 135] .

Nous avons émis l'hypothèse que EIAV peut induire des lésions pulmonaires comme chez d'autre lentivirus avec l'observation de lésions de pneumopathie interstitielle chez le chat infecté par FIV [15], l'enfant infecté HIV [210], le mouton ou la chèvre infecté par SRLV [102, 127]. Pour cela, nous avons caractérisé les lésions pulmonaires de 93 chevaux provenant de Roumanie ou de France (79 chevaux séropositifs pour EIAV et 14 chevaux séronégatifs).

Pour évaluer la sévérité des lésions pulmonaires, nous avons utilisé un système de gradation [76].

Les lésions ont d'abord été classées selon trois types :

- (A) Infiltration des lymphocytes,

- (B) Inflammation (péri) bronchiolaire,

- (C) Epaississement des septa alvéolaires.

Dans chaque type, plusieurs grades ont été définit :

- (A) : présence ou absence de cellules inflammatoires dans le parenchyme

pulmonaire

- (B) : 0 pour aucunes lésions, I pour inflammation lymphocytaire légère autour de la bronchiole, II pour inflammation lymphocytaire modérée autour de la bronchiole et de la paroi interne (hyperplasie de l'épithélium bronchiolaire), III pour inflammation lymphocytaire modérée à sévère (destruction partielle de l'épithélium bronchiolaire, cellules musculaires péri bronchiolaires plus visible et IV pour destruction de la lumière de l'épithélium bronchiolaire qui est remplacé par des couches fibreuses ou musculaires avec ou sans cellules inflammatoire.

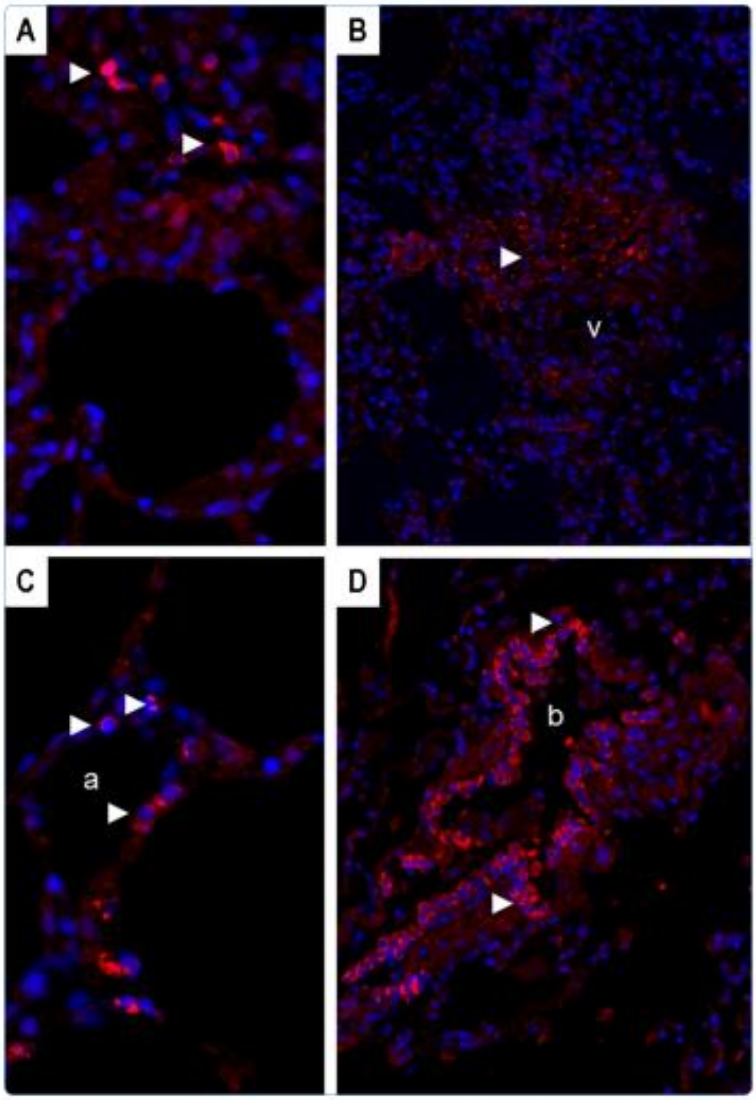
- (C) l'épaississement des septa alvéolaires est évalué en fonction du degré d'accumulation interstitielle des cellules inflammatoires et exsudats. 0 s'il n'y a pas de changement, I si leucocytes interstitielles multifocaux sans exsudat protéique, II si zones de confluence d'infiltration des leucocytes multifocales ou intermittentes avec ou sans exsudats protéiques. III si zones confluentes d'épaississement des septa alvéolaires avec leucocytes et exsudats protéiques

Enfin un score histologique de pathologie pulmonaire est calculé à l'aide de la formule suivante (B+C) /2. Pour un score compris entre 0 et 0,4 on considère qu'il n'y a pas de lésion, entre 0,5 et 1,4 présence de lésions légères, entre 1,5 et 2,4 lésions modérées et un score supérieur à 2,4 nous concluons à des lésions sévères.

Nous avons observé des lésions pulmonaires chez les chevaux infectés par EIAV ainsi que la présence de la capside d'EIAV dans les cellules épithéliales pulmonaires.

II ARTICLE

VETERINARY RESEARCH



Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses

Bolfa *et al.*

BioMed Central

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

VETERINARY RESEARCH

RESEARCH Open Access

Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses

Pompei Bolfa[5†], Marie Nolf[1,2,3,6†], Jean-Luc Cadoré[1,2,3,6], Cornel Catoi[5], Fabienne Archer[1,2,3], Christine Dolmazon[1,2,3,4], Jean-François Mornex[1,2,3,4] and Caroline Leroux[1,2,3*]

Abstract

EIA (Equine Infectious Anemia) is a blood-borne disease primarily transmitted by haematophagous insects or needle punctures. Other routes of transmission have been poorly explored. We evaluated the potential of EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) to induce pulmonary lesions in naturally infected equids. Lungs from 77 EIAV seropositive horses have been collected in Romania and France. Three types of lesions have been scored on paraffin-embedded lungs: lymphocyte infiltration, bronchiolar inflammation, and thickness of the alveolar septa. Expression of the p26 EIAV capsid (CA) protein has been evaluated by immunostaining. Compared to EIAV-negative horses, 52% of the EIAV-positive horses displayed a mild inflammation around the bronchioles, 22% had a moderate inflammation with inflammatory cells inside the wall and epithelial bronchiolar hyperplasia and 6.5% had a moderate to severe inflammation, with destruction of the bronchiolar epithelium and accumulation of smooth muscle cells within the pulmonary parenchyma. Changes in the thickness of the alveolar septa were also present. Expression of EIAV capsid has been evidenced in macrophages, endothelial as well as in alveolar and bronchiolar epithelial cells, as determined by their morphology and localization. To summarize, we found lesions of interstitial lung disease similar to that observed during other lentiviral infections such as FIV in cats, SRLV in sheep and goats or HIV in children. The presence of EIAV capsid in lung epithelial cells suggests that EIAV might be responsible for the broncho-interstitial damages observed.

Introduction

Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) is a retrovirus belonging to the lentivirus genus, which infects equids worldwide (reviewed in [1]). Persistent infection is characterized by recurring viremic febrile episodes. Clinical signs of EIA (Equine Infectious Anemia), the EIAV-induced disease, are variable although infected equids often experience acute febrile episodes with concomitant thrombocytopenia and wasting syndrome followed by a chronic stage characterized by recurring disease episodes. In most cases, these febrile episodes eventually cease and despite remaining persistently infected the animals enter a prolonged phase with no overt clinical signs (reviewed in [1]). These inapparent carriers are potential reservoirs for transmission to naive equids. Despite a sanitary policy including culling of the seropositive animals and serological survey of all the in-contact horses, the disease still spreads among horses.

EIAV infection is endemic in horse populations throughout the world [2] including recent outbreaks in Belgium, Germany, Greece, France, Italy, Romania and UK (source OIE reports). Romania had to deal with more than 10 000 infected horses over the 2009–2012 period [3]. Relatively little is known about the origins, the viral characterization and the pandemic spread of the viruses [4,5].

In experimentally-infected equids, active viral replication has been detected in various tissues such as spleen, liver, lung, lymph nodes or bone marrow (reviewed in [1]), and viral tropism for mononuclear phagocytes is widely accepted. As for other human and animal lentiviruses, the cells of the monocyte/macrophage lineage represent the main targets of EIAV *in vivo*, supporting active viral replication during clinical and subclinical infection [6]. EIAV viral RNAs have been also detected in vascular endothelial cells in experimentally infected horses during the acute

* Correspondence: caroline.leroux@univ-lyon1.fr
†Equal contributors
[1]UMR754, Retrovirus and Comparative Pathology, INRA, Lyon, France
[2]Université Lyon 1, Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Bolfa et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

phase [7]. We recently demonstrated that EIAV is involved in the development of oxidative stress in horses [8].

We hypothesized that, as demonstrated with other lentiviruses, EIAV may induced specific lung lesions. We systematically characterized lung lesions from paraffin embedded sections collected from 93 Romanian and French horses. We stained the lung for the expression of EIAV p26 capsid protein. In this study we described for the first time an interstitial lung disease in EIAV infected horses as well as infection of lung epithelial cells.

Materials and methods

Animal source and tissue specimens

Lungs from 93 horses have been collected for this study. Seventy nine lungs (# 1 to 79) came from EIAV-positive ($EIAV^{POS}$) horses, mean age 10.65 years (± 5.43) and from 14 EIAV-negative ($EIAV^{NEG}$) horses (# 80 to 93), mean age 9.73 years (± 5.14). Among the $EIAV^{POS}$ horses, 77 (31 females and 46 males, mean age 10.58 years (± 5.47)) have been collected in Romania (-rom) from October 2010 to May 2011. They were serologically positive for EIAV as confirmed by agar gel immunodiffusion test (AGID) or Coggins test (EIA Kit No. 119, Pasteur Institute) performed by regional reference laboratories across the country in the context of the wide range National survey of EIAV infection among farm horses. Positive animals have been put to death according to the national plan for eradication of EIA in Romania (Order No. 52/09.06.2010, ANSVSA Bucharest, Romania). At that time, none of these animals displayed clinical signs of EIA nor pulmonary disease as assessed by a rapid examination; importantly no biological parameters (body temperature or blood cell counts) have been collected. Lungs from 2 $EIAV^{POS}$ French horses (78-fr, 10 year-old female and 79-fr, 16-year old male) have been collected on April 2005 (kindly provided by Dr Stephan Zientara, Veterinary school, Maisons-Alfort, France).

Fourteen $EIAV^{NEG}$ horses, 7 males and 7 females (mean age 9.92 (± 4.94)), have been collected in France (-fr) and Romania (-rom). Five of these came from Romanian slaughterhouses (3 females and 2 males, mean age 9.00 years (± 6.06)) and nine French horses (mean age 10.14 years (± 5.01)) have been put to death at the Veterinary School of Lyon for colic ($n = 6$), septic shock ($n = 2$) or inguinal abscess ($n = 1$). While the EIAV serological status has been confirmed for the Romanian animals, none of the French horses have been serologically tested for EIAV. France does not have a wide range National survey of EIAV infection and the AGID is only performed for suspected animals presenting with clinical signs relevant to EIA or on "in-contact" animals with an already confirmed $EIAV^{POS}$ animal. But importantly, none of the French $EIAV^{NEG}$ horses had symptoms associated with EIAV and the prevalence in France being low, we considered these animals $EIAV^{NEG}$ and associated them to the Romanian $EIAV^{NEG}$ horses to constitute the control group.

Pathology

Lungs were sampled from the mid dorsal part of the caudal lobe. Samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for at least 24 h at 4 °C, dehydrated in ascending concentrations (70, 95 and 100%) of ethanol, cleared in xylene, and embedded in Histowax (Histo-Lab. Ltd, Gothenburg, Sweden). Five µm thick serial sections were cut, deparaffinized, rehydrated with water in descending concentrations of ethanol (100, 95 and 70%) and used for HE (hematoxylin and eosin) staining. Tissues were observed under a light microscope and a score was assigned according to the severity of the lesions, by blinded reading of the lung slides, accordingly to previously reported studies on the SRLV-induced interstitial lung disease in sheep [9-11]. Three types of lesions have been evaluated: lymphocyte infiltration i.e. presence or absence of inflammatory cells in the lung parenchyma [A], (peri)bronchiolar inflammation [B] and thickness of the alveolar septa [C]. The bronchiolar inflammation was evaluated per ten random microscopic fields using a magnification of X100 and included five categories: "0" for no lesions; "I" for mild lymphocyte inflammation around bronchiole; "II" for moderate lymphocyte infiltration around bronchiole and inside wall, epithelial bronchiolar hyperplasia; "III" for moderate to severe lymphocyte infiltration, partial destruction of bronchiolar epithelium, peribronchiolar muscle cells more visible and "IV" for destruction of bronchiolar lumen or epithelium replaced by fibrous/muscular layers with or without inflammatory cells. The thickening of the alveolar septa was evaluated according to the degree of interstitial accumulation of inflammatory cells and exudate and included four categories: "0" for no change, "I" for multifocal interstitial leukocytes without protein exudate, "II" for multifocal and intermittent confluent areas of leukocyte infiltration, with or without interstitial protein exudates and "III" for confluent areas of alveolar septal thickening with leukocytes and protein exudates.

For each horse, a lung pathology score was estimated using the [(B + C)/2] formula taking into account the severity of (peri)bronchiolar inflammation [B] and thickness of the alveolar septa [C] as previously reported [9-11]. This score was used to sort the horses according to the severity of the observed lung pathology where 0 to 0.4 means lesions, 0.5 to 1.4 defined mild lesions, 1.5 to 2.4 defined moderate lesions and >2.4 defines severe lesions.

Expression of αSMA and p26 EIAV capsid (CA) evaluated by immunofluorescence on lung tissues

Four µm thick sections from paraffin embedded lungs were cut and placed on superfrost glass slides. All

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

sections were dewaxed in 3 sequential 10-min xylene washes and rehydrated through 100%, 90% and 75% ethanol baths. Tissues were rinsed with tap water and PBS for 30 min and blocked with 5% normal horse serum, 1% bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature. The mouse anti-αSMA (alpha Smooth Muscle Actin) (Sigma) and the mouse anti-EIAV core antigen p26 (clone EIAV 12E8.1 MAB10206, Millipore) antibodies were respectively diluted at 1/500 and 1/50 in PBS. After overnight incubation at 4 °C, tissue sections were rinsed twice with PBS and incubated for 30 min, in the dark, with 1/500 dilution of goat anti-mouse IgG Dylight488 (Eurobio) or goat anti-mouse IgG Dylight 594 (Eurobio). Tissue sections were rapidly rinsed twice with PBS and incubated with DAPI (Fluka) for 10 min at room temperature in the dark. Sections were rinsed twice with PBS and covered with fluoromount before microscopic examination.

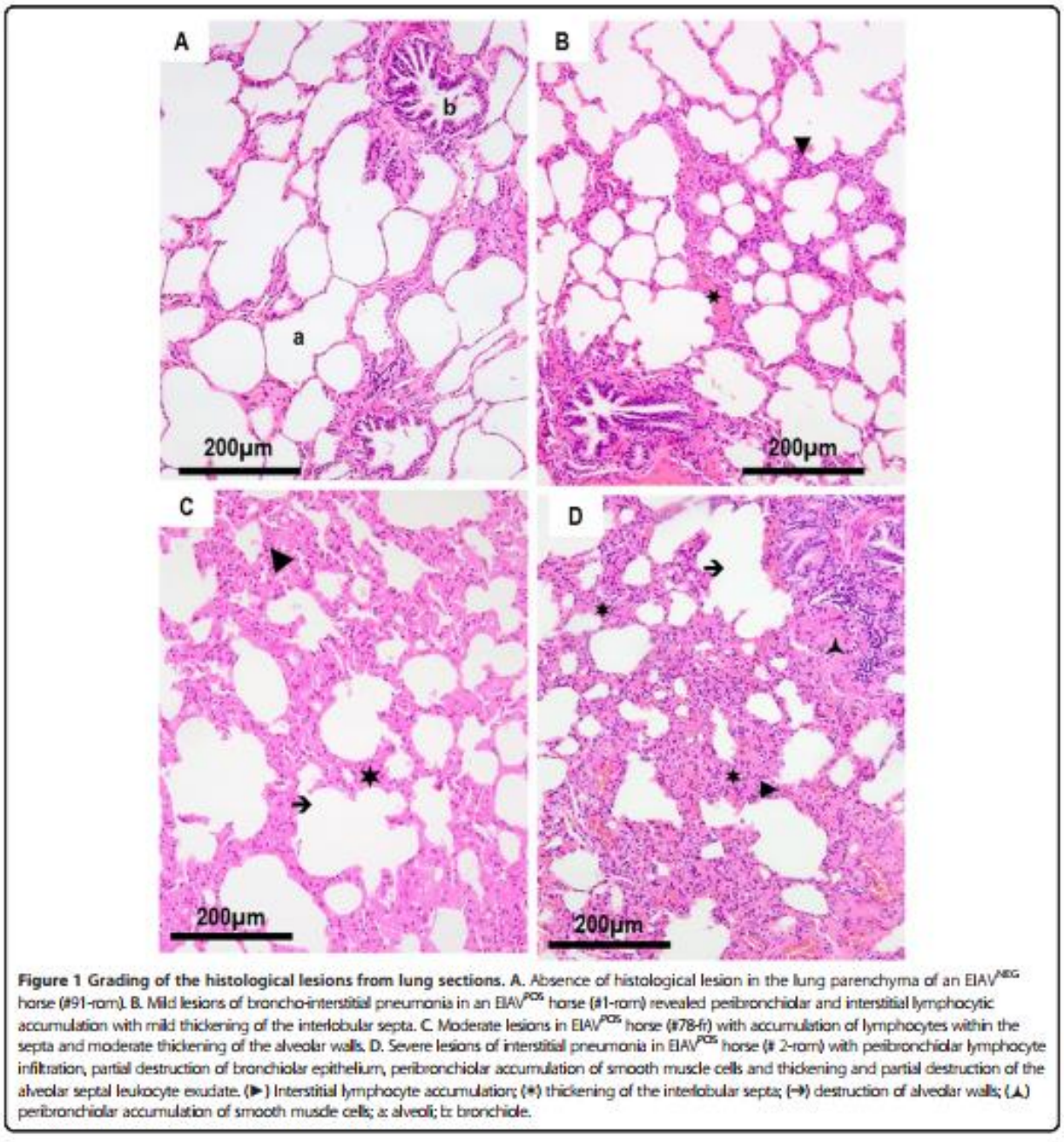


Figure 1 Grading of the histological lesions from lung sections. A. Absence of histological lesion in the lung parenchyma of an $EIAV^{NEG}$ horse (#91-rom). B. Mild lesions of broncho-interstitial pneumonia in an $EIAV^{POS}$ horse (#1-rom) revealed peribronchiolar and interstitial lymphocytic accumulation with mild thickening of the interlobular septa. C. Moderate lesions in $EIAV^{POS}$ horse (#78-fr) with accumulation of lymphocytes within the septa and moderate thickening of the alveolar walls. D. Severe lesions of interstitial pneumonia in $EIAV^{POS}$ horse (# 2-rom) with peribronchiolar lymphocyte infiltration, partial destruction of bronchiolar epithelium, peribronchiolar accumulation of smooth muscle cells and thickening and partial destruction of the alveolar septal leukocyte exudate. (►) Interstitial lymphocyte accumulation; (✱) thickening of the interlobular septa; (➔) destruction of alveolar walls; (⅄) peribronchiolar accumulation of smooth muscle cells; a: alveoli; b: bronchiole.

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

Western blot detection of p26

Splenic tissues from an non-infected and a naturally EIAV-infected French mare were lysed in 0.5 M Tris pH 8.0, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL, homogenized with the "Fastprep system device" (Qbiogene) and incubated for 30 min on ice. Forty μg of proteins were separated on a 15% SDS PAGE and transferred onto a 0.2-mM nitrocellulose membrane (Biorad). The membranes were pre-incubated with TSBT (25 mM Tris pH 7.6; 0.15 M NaCl; 0.05% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. After three washes in TSBT, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with a 1/1000 dilution of the anti-p26 antibody, washed in TBST and incubated for an hour at room temperature with a 1/30 000 dilution of the anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody (Sigma). The immunoreactive bands were detected using the "Supersignal West Pico" reagent (Perbio).

Results

Lesions consistent with interstitial lung disease are present in $EIAV^{POS}$ horses

In contrast to the $EIAV^{NEG}$ horses (Figure 1A), 52% of the $EIAV^{POS}$ horses displayed a mild inflammation around the bronchioles (Figure 1B), 21.5% had moderate inflammation with inflammatory cells inside the alveolar wall and areas of epithelial bronchiolar hyperplasia (Figure 1C), and 6.3% had moderate to severe inflammation, with destruction of the bronchiolar epithelium and accumulation of smooth muscle cells (Figure 1D). Severe inflammation was present only in one horse (#16-rom) with absence of bronchial epithelium, replaced by fibromuscular layers with dispersed inflammatory cells. Among the $EIAV^{NEG}$ horses only 3 of the 15 animals (21.4%) presented with mild inflammatory changes in the (peri)bronchiolar area. Changes in the thickness of the alveolar septa were present in the $EIAV^{POS}$ animals. Considering this group, over 40% presented with multiple foci of mainly mononuclear cells in the septa and 26.6% displayed multifocal and intermittent confluent areas of leukocyte infiltration, without interstitial protein exudate. Among these $EIAV^{POS}$ horses, 30% had no change regarding the thickness of septa. Except for one horse showing limited thickness and mononuclear cell infiltration into the septa, lesions were absent in the $EIAV^{NEG}$ control group.

Taking together, pulmonary lesions characterized by lymphocyte infiltration, (peri)bronchiolar inflammation and thickness of the septa were present in most $EIAV^{POS}$ horses (Table 1, Figure 1). Only mild lesions of bronchiolar or peribronchiolar inflammation and limited thickness of the alveolar septa have been observed in the $EIAV^{NEG}$ animals. After the blind observation of all the 93 lung sections and the determination of the histological score defined by [(bronchiolar/peribronchiolar inflammation + thickness of the alveolar septa)/2], 83% of the $EIAV^{POS}$ horses developed mild to severe lung lesions defined by a score above 0.4. In contrast, only 21% of animals from the $EIAV^{NEG}$ group had mild lesions with a score under 1.5, with no animal with moderate or severe lesions (Table 1, Figure 2).

Table 1 Grading of the pulmonary lesions.

Type of lesion		Number of cases	
		$EIAV^{POS}$	$EIAV^{NEG}$
[A] Lymphocyte infiltration	Absence:	14	11
	Presence:	65	3
	Grade:		
[B] (Peri)bronchiolar inflammation	0	15	11
	I	41	3
	II	17	0
	III	5	0
	IV	1	0
[C] Thickness of the septa	0	24	13
	I	34	1
	II	21	0
	III	0	0
	Histological score* [(B + C)/2]		
No lesions	0 (0–0.4)	13	11
Mild lesions	I (0.5-1.4)	35	3
Moderate lesions	II (1.5-2.4)	27	0
Severe lesions	III (>2.4)	4	0
	Mean score:	1.09	0.17

Pulmonary lesions have been blindly observed and graded according to their severity from EIAV-positive ($EIAV^{POS}$) and EIAVnegative ($EIAV^{NEG}$) horses. [A] described the presence of infiltrating lymphocytes. [B] described the type and the severity of (peri) bronchiolar inflammation; [C] described the thickness of the septa and its severity; * total histological score was calculated using the [(B + C)/2] formula. The histological score allows the ranking of the pulmonary disease where 0 to 0.4 means no lesions, 0.5-1.4 mild lesions, 1.5-2.4 moderate lesions and >2.4 severe lesions.

Smooth-muscle cells accumulation within the lung parenchyma has been observed in 8 $EIAV^{POS}$-horses (10.13%) (Figure 3A). In these animals, the inflammation and destruction of the bronchiolar architecture were accompanied by smooth muscle hyperplasia or proliferation centrifugally starting from a bronchiole, accompanied by bronchiolar metaplasia of alveoli. Immunostaining with anti-αSMA antibodies evidenced large cells with organized reticulated actin- fibers (Figures 3B and 3C).

The EIAV p26 capsid protein is expressed in the equine pulmonary cells

In order to associate the observed lesions with the expression of the EIAV viral protein, immunostainings for the p26 capsid protein using a monoclonal anti-p26 antibody have been performed on lung sections from $EIAV^{NEG}$ and $EIAV^{POS}$ horses. Specificity of the anti-p26 antibody has

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

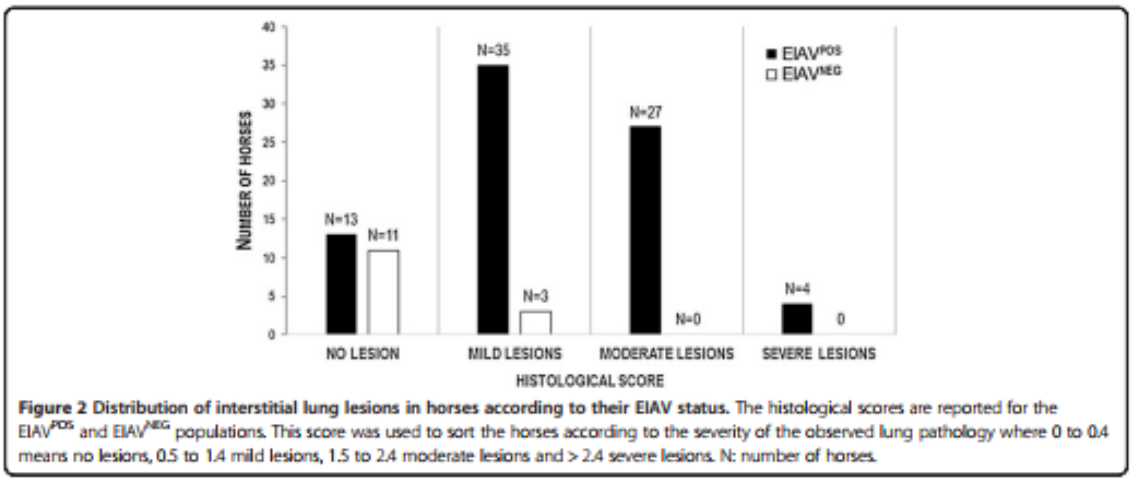


Figure 2 Distribution of interstitial lung lesions in horses according to their EIAV status. The histological scores are reported for the EIAV^{POS} and EIAV^{NEG} populations. This score was used to sort the horses according to the severity of the observed lung pathology where 0 to 0.4 means no lesions, 0.5 to 1.4 mild lesions, 1.5 to 2.4 moderate lesions and > 2.4 severe lesions. N: number of horses.

been validated by Western blot analysis on splenic protein extracts from EIAV^{POS} French horses with the detection of both the p26 CA and the PR55^{gag} precursor (data not shown).

The p26 capsid was expressed in the infiltrated mononuclear cells within the alveolar septa (Figure 4A) and into endothelial cells of the blood vessels (Figure 4B). Interestingly, EIAV p26 was also expressed in cells consistent by their morphology and localization into the lung parenchyma with alveolar and bronchiolar epithelial cells such as type I and type II alveolar epithelial cells (AECI and AECII) in the alveoli (Figure 4C) and club cells (Clara) in the bronchiole (Figure 4D). These epithelial cells expressed p26 capsid in their cytoplasm, with a dotted pattern corresponding to local accumulation of protein (Figure 4C). Despite several attempts, phenotypic characterization of AECII by their expression of SP-C (Surfactant Protein C) failed, due to non-specific cross reaction with the tested antibodies (not shown).

Discussion

We explored the potential of EIAV to induce pulmonary lesions in naturally infected equids from 79 EIAV-seropositive horses collected in Romania and France. We scored three types of lesions on paraffin-embedded sections: lymphocyte infiltration, (peri)bronchiolar inflammation, and thickness of the alveolar septa and analyzed the expression of the p26 EIAV capsid protein. Compared to EIAV-negative horses, over 80% of the EIAV-positive animals displayed lesions of interstitial lung disease, with an histological score above 0.4 varying from from mild inflammation around the bronchioles, to moderate inflammation with inflammatory cells inside the walls and epithelial bronchiolar hyperplasia or severe inflammation with destruction of the bronchiolar epithelium and accumulation of smooth muscle cells within the lung parenchyma. The lesions were often localized subpleurally concomitantly with metaplasia of the alveolar epithelium, suggesting a chronic bronchiolitis. Interestingly, the p26 EIAV capsid was strongly expressed in mononuclear cells, endothelial cells as well as alveolar and bronchiolar epithelial cells.

Smooth muscle proliferation or myomatosis was present in over 10% of the EIAV^{POS} horses as evidenced by microscopic examination of lung parenchyma and immunostaining for the expression of α-smooth muscle actin. Lentivirus infection of smooth muscle cells may play a role in the induction of pathogenic events as reported for myomatosis in the lung of SRLV infected sheep [12,13], primary pulmonary hypertension and coronary lesions as well as smooth muscle tumors of liver or ileum in HIV infected individuals [14-16], or intimal proliferation in pulmonary artery in SIV infected monkeys [17,18]. From the analyzed sections, we did not evidenced the presence of p26 into the smooth muscle cells; the link between EIAV infection and accumulation of smooth muscle cells needs to be further investigated.

Taking all together, the observed lesions resemble the lung lesions associated with LIP (lymphoid interstitial pneumonia), a lung disease described during lentivirus-infection, and reported in child infected by HIV-1 [19], cats infected by FIV [20,21] or sheep infected by SRLV [12,22,23]. LIP has been reported as a direct consequence of HIV-1 infection in humans [19] especially in child born from seropositive mothers [24]. Pulmonary disease is the major cause of morbidity and mortality in infants and children infected HIV [25]. A direct role of HIV in the induction of the observed lung disease has been reported (reviewed in [26]). Highly active antiretroviral therapy (HAART) proved to be efficient in changing the natural history of HIV infection in child, reducing opportunistic infections as well as organ specific diseases such as HIV-

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

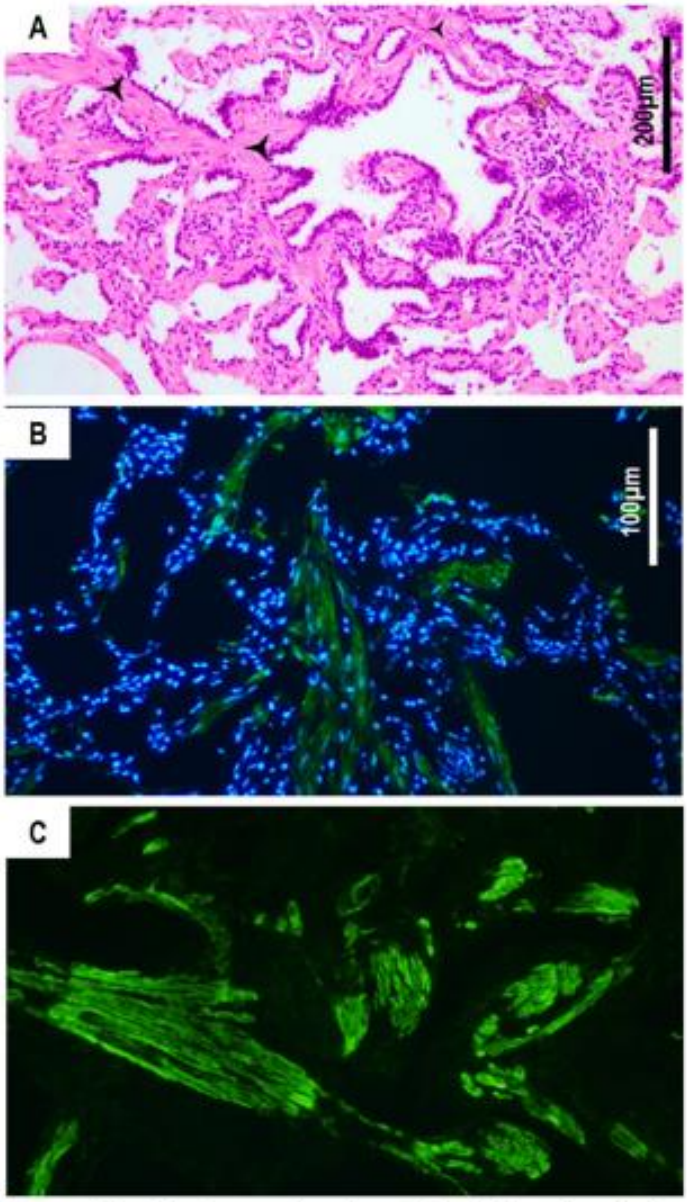


Figure 3 Smooth muscle cell accumulation in the lung parenchyma (horse #16-rom). **A.** Smooth muscle cells accumulate into the lung parenchyma (▲) and disrupt the bronchiolar structure. Hematoxylin-eosin staining on paraffin-embedded sections. **B.** Immunostaining of smooth muscle cells using an anti-αSMA antibody shows the accumulation of fusiform cells (in green) within the lung parenchyma. **C.** Higher magnification shows organized actin filaments within the infiltrating cells. Nucleus are stained in blue with DAPI.

associated LIP [27,28]. This suggests a direct role of the lentivirus in the induction of the interstitial lung disease. In SRLV-infected sheep, the severity of the lung lesions has been correlated with the virus load [29].

We observed EIAV capsid expression in mononuclear cells as well as in endothelial cells. *In vivo*, equine infectious anemia virus (EIAV) replicates in macrophage-rich tissues [6,30,31] and monocyte maturation controls EIAV expression [32]. Infection of endothelial cells has been reported in horses experimentally-infected with cell-adapted EIAV strains during the acute phase [7]. Our results suggest that EIAV-expression in endothelial cells is maintained throughout the infection, in long term infected animals even in absence of clinical signs. Interestingly

Bolfa *et al. Veterinary Research* 2013, **44**:113
http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/113

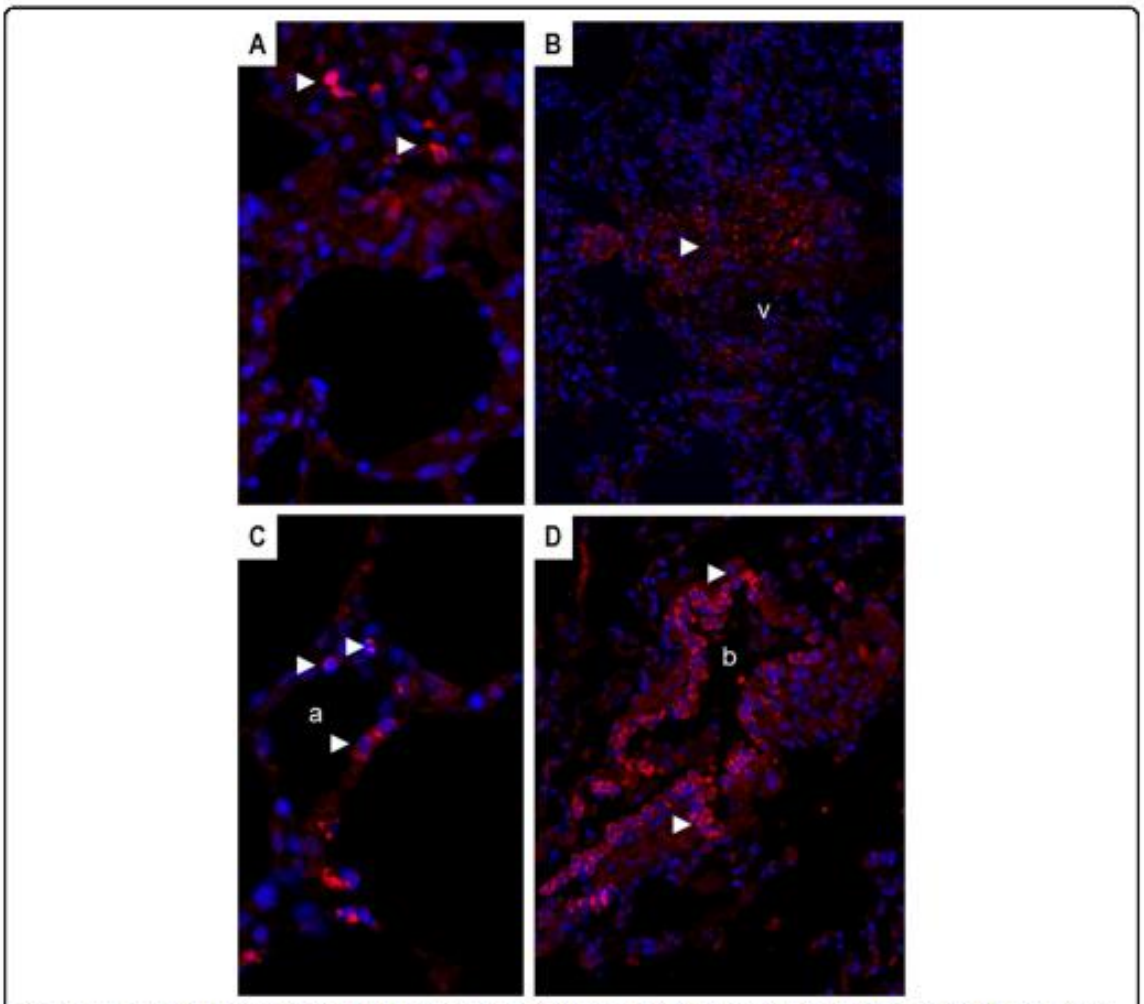


Figure 4 Expression of EIAV p26 capsid in lung sections of EIAV^{POS} horses. A. Capsid expression in macrophages present in the interstitial lung tissue from an EIAV^{POS} horse (#5-rom); original magnification X400; B. Capsid expression in mononuclear inflammatory cells infiltrating the lung parenchyma around a blood vessel (v); horse #2-rom; original magnification X200; C. Capsid expression in epithelial cells of the alveolar walls, compatible with AECII and AECI; EIAV^{POS} horse #5-rom; original magnification X400; D. Capsid expression in bronchiolar epithelial cells or club cells (Clara); EIAV^{POS} horse #23-rom; original magnification X200; a: alveoli; b: bronchiole.
Red: p26 expression (►); blue: nucleus stained with DAPI.

enough we evidenced EIAV-capsid expression into epithelial cells consistent with club cells in the bronchiole and type I and II alveolar epithelial cells in the alveoli. We failed to phenotypically characterize these cells for their expression of specific markers such as SP-C (surfactant protein C) or CC10 (Club cell 10 kDa) as we reported in sheep [33], due to a high background of unspecific staining (data not shown). Interestingly, unidentified-cells harboring EIAV have been reported in the alveolar walls of experimentally infected horses [34]. Except the detection of HIV-1 p24 capsid in bronchiololalveolar epithelium [35], little is known about the interaction between the lentiviruses and these specialized epithelial cells. Interestingly club cells and type II alveolar epithelial cells are the main targets of JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus), an oncogenic β-retrovirus responsible for the development of a naturally occurring pulmonary adenocarcinoma in small ruminants [33,36]. Chronic infection of alveolar and/or bronchiolar cells is likely to play a role in the maintenance of a chronic inflammation as it has been suggested for interstitial lung disease related to other lentiviral infection such as HIV. Although highly speculative, an aerosol transmission occurring from EIAV-infected pulmonary cells, as reported for SRLV [37], needs to be further estimated.

In conclusion, we described an interstitial lung disease in EIAV-infected horses associated with capsid-expression in macrophages, endothelial as well as in mature epithelial cells of the distal lung. The detection of infected pulmonary cells and of lesions consistent with lentivirus-induced interstitial lung disease opens the hypothesis of a virus transmission through aerosolized particles as reported for other retroviruses, such as SRLV or JSRV.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
PB collected most tissues, carried out the histopathological analysis and the immunostainings, drafted the manuscript; MN carried out the immunostaining and tissue analysis; JLC participated to the result analysis and to the writing; CC participated to the tissues collection and to the histopathological analysis, FA carried out the fluorescent microscopy observations and helped to draft the manuscript, CD carried out the immunostaining and Western blot analysis; JFM participated to the design, to the interpretation of the results and their analysis and to the final version of the manuscript; CL conceived the study, elaborated its design, coordinated the work and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements
PB was a recipient of a USAMV Grant 1348/-08.02.2013. The work was supported by the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation). We thank Rodica Boros and Sabine Balleydier for excellent technical assistance.

Author details
[1]UMR754, Retrovirus and Comparative Pathology, INRA, Lyon, France. [2]Université Lyon 1, Lyon, France. [3]Université de Lyon, Lyon, France. [4]Hôpital Louis-Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. [5]Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, 400372 Cluj-Napoca, Romania. [6]Equine department, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, France.

Received: 23 June 2013 Accepted: 12 November 2013
Published: 1 December 2013

References

1. Cook RF, Leroux C, Issel CJ: Equine infectious anemia and Equine Infectious Anemia Virus 2013: A Review. *Vet Microbiol* 2013, 167:181–204.
2. Cappelli K, Capomaccio S, Cook FR, Felicetti M, Marenzoni ML, Coppola G, Verini-Supplizi A, Coletti M, Passamonti F: Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. *J Clin Microbiol* 2011, 49:27–33.
3. WAHID [http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail]
4. Capomaccio S, Cappelli K, Cook RF, Nardi F, Gifford R, Marenzoni ML, Passamonti F: Geographic structuring of global EIAV isolates: a single origin for New World strains? *Virus Res* 2012, 163:656–659.
5. Capomaccio S, Willand ZA, Cook SJ, Issel CJ, Santos EM, Reis JK, Cook RF: Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. *Vet Microbiol* 2012, 157:320–332.
6. Oaks JL, McGuire TC, Ulibarri C, Crawford TB: Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol* 1998, 72:7263–7269.
7. Oaks JL, Ulibarri C, Crawford TB: Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus. *J Gen Virol* 1999, 80:2393–2397.
8. Bolfa PF, Leroux C, Pintea A, Andrei S, Catoi C, Taulescu M, Tabaran F, Spinu M: Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Vet J* 2012, 192:449–454.
9. Cadore JL, Guiguen F, Cordier G, Loire R, Lyon M, Chastang J, Greenland T, Court-Fortune I, Revel D, Mornex JF: Early events in the experimental interstitial lung disease induced in sheep by the Visna-maedi virus. *Immunol Lett* 1993, 39:39–43.
10. Mornex JF, Lena P, Loire R, Cozon G, Greenland T, Guigen F, Jacquier MF, Cordier G: Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. *Vet Res* 1994, 25:478–488.
11. Herrmann-Hoesing LM, Noh SM, White SN, Snekvik KR, Truscott T, Knowles DP: Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in naturally infected sheep. *Clin Vaccine Immunol* 2009, 16:551–557.
12. Georgsson G, Palsson PA: The histopathology of maedi a slow, viral pneumonia of sheep. *Vet Pathol* 1971, 8:63–80.
13. Leroux C, Cordier G, Mercier I, Chastang J, Lyon M, Querat G, Greenland T, Vigne R, Mornex JF: Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Arch Virol* 1995, 140:1–11.
14. Mueller BU, Butler KM, Higham MC, Husson RN, Montrella KA, Pizzo PA, Feuerstein IM, Manjunath K: Smooth muscle tumors in children with human immunodeficiency virus infection. *Pediatrics* 1992, 90:460–463.
15. Polos PG, Wolfe D, Harley RA, Strange C, Sahn SA: Pulmonary hypertension and human immunodeficiency virus infection. Two reports and a review of the literature. *Chest* 1992, 101:474–478.
16. Tabib A, Greenland T, Mercier I, Loire R, Mornex JF: Coronary lesions in young HIV-positive subjects at necropsy. *Lancet* 1992, 340:730.
17. Baskerville A, Ramsay AD, Addis BJ, Dennis MJ, Cook RW, Cranage MP, Greenaway PJ: Interstitial pneumonia in simian immunodeficiency virus infection. *J Pathol* 1992, 167:241–247.
18. Chalifoux LV, Simon MA, Pauley DR, MacKey JJ, Wyand MS, Ringler DJ: Arteriopathy in macaques infected with simian immunodeficiency virus. *Lab Invest* 1992, 67:338–349.
19. Travis WD, Fox CH, Devaney KO, Weiss LM, O'Leary TJ, Ognibene FP, Suffredini AF, Rosen MJ, Cohen MB, Shelhamer J: Lymphoid pneumonitis in 50 adult patients infected with the human immunodeficiency virus: lymphocytic interstitial pneumonitis versus nonspecific interstitial pneumonitis. *Hum Pathol* 1992, 23:529–541.
20. Hurtrel M, Ganiere JP, Guelfi JF, Chakrabarti L, Maire MA, Gray F, Montagnier L, Hurtrel B: Comparison of early and late feline immunodeficiency virus encephalopathies. *AIDS* 1992, 6:399–406.
21. Cadore JL, Steiner-Laurent S, Greenland T, Mornex JF, Loire R: Interstitial lung disease in feline immunodeficiency virus (FIV) infected cats. *Res Vet Sci* 1997, 62:287–288.
22. Cutlip RC, Jackson TA, Lehmkuhl HD: Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am J Vet Res* 1979, 40:1370–1374.
23. Lairmore MD, Rosadio RH, DeMartini JC: Ovine lentivirus lymphoid interstitial pneumonia. Rapid induction in neonatal lambs. *Am J Pathol* 1986, 125:173–181.
24. Joshi VV, Oleske JM, Minnefor AB, Saad S, Klein KM, Singh R, Zabala M, Dadzie C, Simpser M, Rapkin RH: Pathologic pulmonary findings in children with the acquired immunodeficiency syndrome: a study of ten cases. *Hum Pathol* 1985, 16:241–246.
25. Sharland M, Gibb DM, Holland F: Respiratory morbidity from lymphocytic interstitial pneumonitis (LIP) in vertically acquired HIV infection. *Arch Dis Child* 1997, 76:334–336.
26. Graham SM: HIV-related pulmonary disorders: practice issues. *Ann Trop Paediatr* 2007, 27:243–252.
27. Toro AA, Altemani AA, Zanardi VA, Menezes JR, da Silva MN, Vilela MM: Lung disease features in Brazilian children with HIV infection before HAART era. *J Trop Pediatr* 2006, 52:360–368.
28. Guillen S, GarciaSanMiguel L, Resino S, Bellon JM, Gonzalez I, JimenezdeOry S, Munoz-Fernandez MA, Navarro ML, Gurbindo MD, de José MI, Mellado MJ, Martin-Fontelos P, Gonzalez-Tomé MI, Martinez J, Beceiro J, Roa MA, Ramos JT, Madrid Group for Research on Pediatric HIV Infection: Opportunistic infections and organ-specific diseases in HIV-1-infected children: a cohort study (1990–2006). *HIV Med* 2010, 11:245–252.
29. Brodie SJ, Marcom KA, Pearson LD, Anderson BC, de la Concha-Bermejillo A, Ellis JA, DeMartini JC: Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *J Infect Dis* 1992, 166:531–541.
30. Harrold SM, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Issel CJ, Montelaro RC: Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J Virol* 2000, 74:3112–3121.
31. Sellon DC, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ: Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J Virol* 1992, 66:5906–5913.

32. Maury W: Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J Virol* 1994, 68:6270–6279.
33. Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, Leroux C: Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, 36:534–540.
34. McGuire TC, Crawford TB, Henson JB: Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am J Pathol* 1971, 62:283–294.
35. Bhoopat L, Rangkakulnuwat S, Ya-In C, Bhoopat T: Relationship of cell bearing EBER and p24 antigens in biopsy-proven lymphocytic interstitial pneumonia in HIV-1 subtype E infected children. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011, 19:547–551.
36. Platt JA, Kraipowich N, Villafane F, DeMartini JC: Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Pathol* 2002, 39:341–352.
37. Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E: Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res* 1998, 29:341–367.

doi:10.1186/1297-9716-44-113
Cite this article as: Bolfa *et al.*: Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Veterinary Research* 2013 44:113.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

III DISCUSSION

Pour explorer le potentiel d'EIAV à induire des lésions pulmonaires d'équidés naturellement infectés, nous avons analysé les poumons de 79 chevaux séropositifs et 14 chevaux séronégatifs provenant de Roumanie et de France. Sur les coupes de poumons inclus en paraffine, nous avons observé trois types de lésions : infiltration lymphocytaire, Inflammation (péri) bronchiolaire et épaississement des septa alvéolaires. Nous avons parallèlement analysé l'expression de la protéine p26 de capside d'EIAV. Par comparaison aux 14 chevaux séronégatifs, des lésions pulmonaires interstitielles étaient présentes sur plus de 80% des chevaux séropositifs avec un score histologique supérieur à 0.4 allant d'une inflammation légère autour des bronchioles à une inflammation modérée des cellules inflammatoires des parois et hyperplasie des cellules épithéliales bronchiolaires ou inflammation sévère avec destruction de l'épithélium et accumulation de cellules musculaires lisses dans le parenchyme pulmonaire. Les lésions étaient souvent localisées sous pleurale simultanément à la métaplasie de l'épithélium alvéolaire, suggérant une bronchiolite chronique De manière intéressante, les cellules mononucléées, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiolaires ont fortement exprimé la capside p26 d'EIAV.

La prolifération des muscles lisses ou myomatose était présente chez plus de 10% des chevaux séropositifs, comme le montre l'examen microscopique du parenchyme pulmonaire et l'expression de l'actine α des muscles lisses par immunomarquage. L'infection lentivirale des cellules musculaires lisses peut jouer un rôle dans l'induction d'évènements pathogènes tels que rapporté pour la myomatose dans les poumons de moutons infectés par le SRLV [64, 97], l'hypertension artérielle pulmonaire primaire et lésions coronaires comme les tumeurs du muscle lisse du foie et de l'iléon chez les personnes infectées par le HIV [29, 128, 190].ou prolifération de l'intima (endothélium épithéliale) des artères pulmonaires chez les singes infectés par le SIV [7, 24]. À partir des coupes de poumon, nous n'avons pas mis en évidence la présence de p26 dans les cellules musculaires lisses ; le lien entre l'infection par l'EIAV et l'accumulation de cellules musculaires lisses doit être étudiée plus profondément.

En prenant tous les résultats, les lésions observées ressemblent aux lésions de

poumon associées à la pneumonie interstitielle lymphoïde, une maladie de poumon décrite pendant l'infection de lentivirus et rapportée chez l'enfant infecté par le HIV 1 [198], des chats infectés par FIV [15] ou le mouton infecté par SRLV [53, 64]. La pneumonie interstitielle lymphoïde a été signalée comme une conséquence directe de l'infection par le HIV-1 chez l'homme [198], en particulier chez les enfants nés de mères séropositives [89]. La maladie pulmonaire est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les nourrissons et les enfants infectés par le HIV [180]. Le rôle direct du HIV a été rapporté dans l'induction de la maladie pulmonaire observée [66]. Le traitement antirétroviral hautement actif (HAART) s'est avéré être efficace au cours de l'infection par le HIV chez l'enfant en réduisant les infections opportunistes ainsi que les maladies spécifiques aux organes telle que la pneumonie interstitielle lymphoïde associée au HIV [68, 197]. Cela suggère un rôle direct du lentivirus dans l'induction de la maladie pulmonaire interstitielle. Chez les moutons infectés par le SRLV, la gravité des lésions pulmonaires a été corrélée à la charge virale [14].

Nous avons observé l'expression de la capside EIAV dans les cellules mononucléées ainsi que dans les cellules endothéliales. *In vivo*, EIAV se réplique dans les tissus riches en macrophages [74, 134, 177] et la maturation des monocytes contrôle l'expression de EIAV [119]. L'infection des cellules endothéliales a été signalée chez des chevaux infectés expérimentalement par des souches de virus adaptées pendant la phase aiguë [135]. Nos résultats suggèrent que l'expression de EIAV dans les cellules endothéliales est maintenue tout au long de l'infection, chez les animaux infectés à long terme, même en l'absence de signes cliniques. Chose intéressante, nous avons mis en évidence l'expression de la capside de EIAV dans les cellules épithéliales compatibles avec les cellules club dans la bronchiole et les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II dans les alvéoles. De manière intéressante, des cellules non identifiées hébergeant le virus de l'EIAV ont été retrouvées dans les parois alvéolaires de chevaux infectés expérimentalement [121], pouvant correspondre aux cellules alvéolaires de type II que nous avons montrées infectées dans notre étude. À l'exception de la détection de la capside du HIV-1 p24 dans l'épithélium bronchiololalvéolaire [8], on en sait peu sur l'interaction entre les lentivirus et ces cellules épithéliales spécialisées. Il est intéressant de noter que les cellules club et les cellules épithéliales alvéolaires de type II sont les principales cibles du JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus), un rétrovirus β oncogène

responsable du développement d'un adénocarcinome pulmonaire chez les petits ruminants [5, 155]. L'infection chronique des cellules alvéolaires et / ou bronchiolaires est susceptible de jouer un rôle dans le maintien d'une inflammation chronique, comme cela a été suggéré pour les maladies pulmonaires interstitielles liées à d'autres infections lentivirales telles que le HIV. Bien que hautement spéculative à ce stade, une transmission par voie respiratoire *via* des particules virales aérosolisées pourrait participer à la transmission inter-animal d'EIAV [152].

En conclusion, nous avons décrit une maladie pulmonaire interstitielle chez des chevaux infectés par le virus EIAV, associée à une expression de la capside dans les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales matures du poumon distal. La détection de cellules pulmonaires infectées et de lésions compatibles avec une pneumopathie interstitielle induite par les lentivirus ouvre l'hypothèse d'une transmission du virus par des particules aérosolisées, comme cela a été rapporté pour d'autres rétrovirus tels que SRLV ou JSRV [19].

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

I DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Face à une maladie contrôlée, d'impact en élevage équin, il est indispensable de caractériser la maladie associée, les voies de dissémination du virus et la nature des virus circulants pour améliorer le diagnostic clinique et moléculaire et la prise en charge des symptômes. Au cours de ce travail nous avons apporté deux types de connaissances nouvelles sur EIAV.

1. Nous avons établi la présence de lésions pulmonaires, de type pneumopathie, associées à l'infection des cellules épithéliales du poumon profond, qui n'étaient auparavant pas considérées comme des cibles potentielles du virus.

Nous avons montré que la maladie associée à EIAV est plus complexe que longtemps considéré et que le poumon, au même titre que la rate ou le foie, est un organe cible. Il est désormais important de comprendre comment le virus interagit avec les cellules épithéliales pulmonaires, entrainant une détérioration du parenchyme pouvant s'associer à des troubles respiratoires.

2. Nous avons cartographié la nature génétique des souches d'EIAV circulant en France et en Roumanie et montré que des clusters indépendant évoluaient en Europe.

Bien que connu et étudié depuis des décennies, et contrairement à d'autres lentivirus, dont HIV, pour lesquels de nombreuses souches circulantes ont pu être identifiées moléculairement, peu de données sont disponibles pour établir la nature et la diversité génétique d'EIAV à l'échelle mondiale. Ces connaissances sont pourtant indispensables pour comprendre l'apparition de nouveaux foyers épidémiques par la caractérisation des souches virales. Dans ce contexte, la caractérisation des souches d'EIAV circulantes responsables de foyers en Roumanie et en France pour appréhender la cartographie d'EIAV en Europe a été l'un de nos objectifs.

Peu de séquences complètes d'EIAV ont été publiées : la souche hyper-virulente Nord-américaine $EIAV_{Wyo}$ [34] et ses dérivés pathogéniques $EIAV_{PV}$, la souche chinoise $EIAV_{Lia}$ [199], la souche japonaise $EIAV_{Miya}$ [58] et la souche européenne $EIAV_{IRE}$ isolée en Irlande [162, 163]. Ces quatre souches présentent un pourcentage d'identité de moins de 80 % entre elles et sont séparées en groupes

monophylétiques distincts [57, 58, 163], suggérant l'évolution d'EIAV selon des clusters géographiquement distincts. . En effet dans ces études, apparait des clusters bien distincts en fonction du pays d'origine : Wyoming, Miyazaki et Liaoning [58, 163]. Outre ces quelques séquences complètes, des études ont été menées sur des régions plus restreintes du génome telles que le LTR en Mongolie [179], *env* pour un isolat de Pennsylvanie [45] et *gag* en Europe (Croatie [186], Slovénie [92, 93], Belgique [16], Italie [20] ou Irlande [162]), en Amérique (Canada [129], Brésil [18, 195]) et en Asie (Japon [58]). Les analyses phylogénétiques suggèrent que plusieurs sous-types d'EIAV circuleraient en France et Roumanie, comme cela a été rapporté en Slovénie [93], en Italie [20] et en Croatie [186]. Au vu de la diversité des séquences, les souches EIAV pourraient être regroupées en clades, comme cela a été montré pour les virus HIV [75, 168] ou SRLV [166], permettant d'affiner la phylogénie et mieux appréhender la nature des souches virales circulant dans les individus. Nous avons établi que les EIAV isolés en France et en Roumanie appartiennent à des clusters phylogénétiquement distincts. Au cours des dernières décennies des épidémies d'AIE ont été signalées en Europe notamment en Allemagne, en Belgique, en Croatie, en Grèce, Pologne, au Royaume-Uni, en Serbie, en Slovénie, en Italie, en France et en Roumanie [1, 12]. Entre 2005 et 2016, l'Europe comptait presque 13 000 nouveaux foyers dont 80 % en Roumanie [1] avec au moins 50 000 chevaux infectés [12]. Les épidémies en Irlande, en Belgique et au Royaume Uni, pays qui étaient indemnes depuis des décennies ont été associées à une importation de produits sanguins (plasma) provenant d'Italie ou de Roumanie [51, 125], avec sans doute des transferts d'animaux provenant de Roumanie, au Royaume Uni *via* la Belgique [16]. Deux cas d'AIE ont été dépistés au Royaume Uni. Après enquête, sur les 18 chevaux provenant de Roumanie, 2/9 ont été détectés séropositifs au Royaume Uni et 1/9 en Belgique [16]. Sur les 44 chevaux ayant été en contact avec le cheval roumain séropositif dépisté en Belgique, aucun n'a présenté de sérologie positive pour EIAV [16]. Même si une transmission occasionnelle ne peut être exclue, notre étude montre globalement que les virus circulant en France ne sont pas génétiquement apparentés aux isolats roumains, mettant en évidence la présence de virus autochtones en France comme dans les autres pays de l'EU

En conclusion, les reconstructions phylogénétiques et la comparaison des

souches Européennes d'EIAV ne permettent pas d'affirmer la diffusion du virus en Europe à partir des épidémies en Roumanie. EIAV évolue de manière indépendant dans les différentes aires géographiques.

Nos travaux se poursuivent avec la caractérisation du génome complet (~8.5 kb) de souches d'EIAV représentatives des populations virales présentes en France et en Roumanie, notamment dans la région du génome codant pour les glycoprotéines virales, essentielles au tropisme.

Au cours de nos analyses de la région terminal de *gag*, nous avons mis en évidence une duplication du motif YPDL du « late domain » p9 dans la souche $EIAV_{ROM1554}$. Les rétrovirus présentent une région « late domain » au sein de *gag* qui, par recrutement des facteurs cellulaires, permet le bourgeonnement à la membrane. Trois types de séquences protéiques confèrent une activité de « late domain »: P(T/S)AP, PPxY et $YP(x)_nL$ [126, 203]. Les différents rétrovirus possèdent une à deux motifs parmi les trois avec une localisation différente au sein du gène *gag* comme HIV qui possède deux motifs (P(T/S)AP et $YP(x)_nL$) localisés dans la protéine p6 située après la nucléocapside [126]. Les motifs P(T/S)AP, PPxY sont aussi présents chez d'autres virus enveloppée à ARN comme les rhabdovirus avec les deux motifs dans la protéine M de VSV (Vesicular Stomatis Virus), les Arenavirus ou les filovirus avec les deux motifs dans la protéine VP40 de Ebola [126, 203]. Un quatrième motif FPIV a été mis en évidence, nécessaire au bourgeonnement de certains paramyxoviruses [174]. Les protéines de type « late domain » recrutent des facteurs cellulaires ; ainsi le motif YP(x)nL de p6 d'HIV et p9 d'EIAV interagit avec le domaine central V de la protéine ubiquitaire AIP1/Alix [187]. Une analyse de structure montre que la protéine p9 d'EIAV présente une liaison 60 fois plus étroite avec le facteur cellulaire ALIX que la protéine p6 de HIV [211]. Le rôle de cette duplication reste à établir, par exemple en analysant l'efficacité de bourgeonnement des virus EIAV ayant des protéines P9 différentes.

II CONCLUSION GENERALE

En conclusion, la forte hétérogénéité des souches d'EIAV circulantes a pu être établie. Nous avons montré que les virus circulants dans les différents pays de l'union européenne évoluaient de manière indépendante. La transmission supposée du virus EIAV au sein de l'Europe à partir de la Roumanie n'a pas pu être clairement mise en évidence.

Il existe peu de souches non adaptées d'EIAV disponible. Nous avons dérivé un clone biologique non adapté au laboratoire qui est réplicatif dans les cellules fibroblastiques pulmonaires équines et constitue la première souche non adaptée, isolée d'EIAV Français.

Nous avons décrit une maladie pulmonaire interstitielle chez des chevaux infectés par le virus EIAV, associée à une expression de la capside dans les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales matures du poumon distal. La détection de cellules pulmonaires infectées et de lésions compatibles avec une pneumopathie interstitielle induite par les lentivirus ouvre l'hypothèse d'une transmission du virus par des particules en aérosol.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WAHIS [http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail].
2. WAHIS [http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation].
3. Anand K, Schulte A, Fujinaga K, Scheffzek K, Geyer M (2007) Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV tat. J Mol Biol 370:826-836
4. Anand K, Schulte A, Vogel-Bachmayr K, Scheffzek K, Geyer M (2008) Structural insights into the cyclin T1-Tat-TAR RNA transcription activation complex from EIAV. Nat Struct Mol Biol 15:1287-1292
5. Archer F, Jacquier E, Lyon M, Chastang J, Cottin V, Mornex JF, Leroux C (2007) Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol 36:534-540
6. Asseged BD, Habtemariam T, Tameru B, Nganwa D (2012) The risk of introduction of equine infectious anemia virus into USA via cloned horse embryos imported from Canada. Theriogenology 77:445-458
7. Baskerville A, Ramsay AD, Addis BJ, Dennis MJ, Cook RW, Cranage MP, Greenaway PJ (1992) Interstitial pneumonia in simian immunodeficiency virus infection. J Pathol 167:241-247
8. Bhoopat L, Rangkakulnuwat S, Ya-In C, Bhoopat T (2011) Relationship of cell bearing EBER and p24 antigens in biopsy-proven lymphocytic interstitial pneumonia in HIV-1 subtype E infected children. Appl Immunohistochem Mol Morphol 19:547-551
9. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, Cullen BR (1999) Highly divergent lentiviral Tat proteins activate viral gene expression by a common mechanism. Mol Cell Biol 19:4592-4599
10. Boissin-Quillon A, Piau D, Leroux C (2007) In silico segmentations of lentivirus envelope sequences. BMC Bioinformatics 8:99
11. Bolfa P, Nolf M, Cadore JL, Catoi C, Archer F, Dolmazon C, Mornex JF, Leroux C (2013) Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. Vet Res 44:113
12. Bolfa P, Barbuceanu F, Leau SE, Leroux C (2016) Equine infectious anaemia in Europe: Time to re-examine the efficacy of monitoring and control protocols? Equine Vet J 48:140-142
13. Borges AM, Silva LG, Nogueira MF, Oliveira AC, Segri NJ, Ferreira F, Witter R, Aguiar DM (2013) Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Pocone municipality, northern Brazilian Pantanal. Res Vet Sci 95:76-81
14. Brodie SJ, Marcom KA, Pearson LD, Anderson BC, de la Concha-Bermejillo A, Ellis JA, DeMartini JC (1992) Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. J Infect Dis 166:531-541
15. Cadore JL, Steiner-Laurent S, Greenland T, Mornex JF, Loire R (1997) Interstitial lung disease in feline immunodeficiency virus (FIV) infected cats. Res Vet Sci 62:287-288
16. Caij AB, Tignon M (2014) Epidemiology and genetic characterization of equine infectious anaemia virus strains isolated in Belgium in 2010. Transbound Emerg Dis 61:464-468
17. Capomaccio S, Cappelli K, Cook RF, Nardi F, Gifford R, Marenzoni ML, Passamonti F (2012) Geographic structuring of global EIAV isolates: a single origin for New World strains? Virus Res 163:656-659
18. Capomaccio S, Willand ZA, Cook SJ, Issel CJ, Santos EM, Reis JK, Cook RF (2012) Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. Vet Microbiol 157:320-332
19. Caporale M, Centorame P, Giovannini A, Sacchini F, Di Ventura M, De las Heras M, Palmarini M (2005) Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. Virology 338:144-153

20. Cappelli K, Capomaccio S, Cook FR, Felicetti M, Marenzoni ML, Coppola G, Verini-Supplizi A, Coletti M, Passamonti F (2011) Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of equine infectious anemia virus. J Clin Microbiol 49:27-33

21. Cappelli K, Cook RF, Stefanetti V, Passamonti F, Autorino GL, Scicluna MT, Coletti M, Verini Supplizi A, Capomaccio S (2017) Deep sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anaemia virus. Transbound Emerg Dis 64:2104-2112

22. Carpenter S, Dobbs D (2010) Molecular and biological characterization of equine infectious anemia virus Rev. Curr HIV Res 8:87-93

23. Carvalho M, Derse D (1993) The PU.1/Spi-1 proto-oncogene is a transcriptional regulator of a lentivirus promoter. J Virol 67:3885-3890

24. Chalifoux LV, Simon MA, Pauley DR, MacKey JJ, Wyand MS, Ringler DJ (1992) Arteriopathy in macaques infected with simian immunodeficiency virus. Lab Invest 67:338-349

25. Chande A, Cuccurullo EC, Rosa A, Ziglio S, Carpenter S, Pizzato M (2016) S2 from equine infectious anemia virus is an infectivity factor which counteracts the retroviral inhibitors SERINC5 and SERINC3. Proc Natl Acad Sci U S A 113:13197-13202

26. Chen C, Li F, Montelaro RC (2001) Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in viral budding and infection. J Virol 75:9762-9770.

27. Chen C, Vincent O, Jin J, Weisz OA, Montelaro RC (2005) Functions of early (AP-2) and late (AIP1/ALIX) endocytic proteins in equine infectious anemia virus budding. J Biol Chem 280:40474-40480

28. Chung C, Mealey RH, McGuire TC (2005) Evaluation of high functional avidity CTL to Gag epitope clusters in EIAV carrier horses. Virology 342:228-239

29. Cicalini S, Almodovar S, Grilli E, Flores S (2011) Pulmonary hypertension and human immunodeficiency virus infection: epidemiology, pathogenesis, and clinical approach. Clin Microbiol Infect 17:25-33

30. Clabough DL, Gebhard D, Flaherty MT, Whetter LE, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ (1991) Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. J Virol 65:6242-6251

31. Coffin JM HS, Varmus HE (1997) The Place of Retroviruses in Biology. In: Coffin JM HS, Varmus HE (ed) Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press

32. Coggins L, Norcross NL (1970) Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet 60:330

33. Cook R, Cook S, Li F, Montelaro R, Issel C (2002) Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). J Virol Methods 105:171.

34. Cook RF, Leroux C, Cook SJ, Berger SL, Lichtenstein DL, Ghabrial NN, Montelaro RC, Issel CJ (1998) Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus. J Virol 72:1383-1393

35. Cook RF, Cook SJ, Bolin PS, Howe LJ, Zhou W, Montelaro RC, Issel CJ (2005) Genetic immunization with codon-optimized equine infectious anemia virus (EIAV) surface unit (SU) envelope protein gene sequences stimulates immune responses in ponies. Vet Microbiol 108:23-37

36. Cook RF, Leroux C, Issel CJ (2013) Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. Veterinary Microbiology 167:181-204

37. Cook SJ, Cook RF, Montelaro RC, Issel CJ (2001) Differential responses of Equus caballus and Equus asinus to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. Vet Microbiol 79:93-109.

38. Covaleda L, Fuller FJ, Payne SL (2010) EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. Virology 397:217-223

39. Covaleda L, Gno BT, Fuller FJ, Payne SL (2011) Identification of cellular proteins interacting with equine infectious anemia virus S2 protein. Virus Res 151:235-239

40. Craigo JK, Leroux C, Howe L, Steckbeck JD, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC (2002) Transient immune suppression of inapparent carriers infected with a principal neutralizing domain-deficient equine infectious anaemia virus induces neutralizing antibodies and lowers steady-state virus replication. J Gen Virol 83:1353-1359

41. Craigo JK, Li F, Steckbeck JD, Durkin S, Howe L, Cook SJ, Issel C, Montelaro RC (2005) Discerning an Effective Balance between Equine Infectious Anemia Virus Attenuation and Vaccine Efficacy. J Virol 79:2666-2677

42. Craigo JK, Sturgeon TJ, Cook SJ, Issel CJ, Leroux C, Montelaro RC (2006) Apparent elimination of EIAV ancestral species in a long-term inapparent carrier. Virology 344:340-353

43. Craigo JK, Durkin S, Sturgeon TJ, Tagmyer T, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC (2007) Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. Vaccine 25:834-845

44. Craigo JK, Zhang B, Barnes S, Tagmyer TL, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC (2007) Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A 104:15105-15110

45. Craigo JK, Barnes S, Zhang B, Cook SJ, Howe L, Issel CJ, Montelaro RC (2009) An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. Retrovirology 6:95

46. Craigo JK, Barnes S, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC (2010) Divergence, not diversity of an attenuated equine lentivirus vaccine strain correlates with protection from disease. Vaccine 28:8095-8104

47. Craigo JK, Ezzelarab C, Cook SJ, Chong L, Horohov D, Issel CJ, Montelaro RC (2013) Envelope determinants of equine lentiviral vaccine protection. PLoS One 8:e66093

48. Craigo JK, Montelaro RC (2013) Lessons in AIDS Vaccine Development Learned from Studies of Equine Infectious, Anemia Virus Infection and Immunity. Viruses 5:2963-2976

49. Craigo JK, Ezzelarab C, Cook SJ, Liu C, Horohov D, Issel CJ, Montelaro RC (2015) Protective efficacy of centralized and polyvalent envelope immunogens in an attenuated equine lentivirus vaccine. PLoS Pathog 11:e1004610

50. Cruz F, Fores P, Ireland J, Moreno MA, Newton R (2015) Freedom from equine infectious anaemia virus infection in Spanish Purebred horses. Vet Rec 2:e000074

51. Cullinane A, Quinlivan M, Nelly M, Patterson H, Kenna R, Garvey M, Gildea S, Lyons P, Flynn M, Galvin P, Neylon M, Jankowska K (2007) Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. Vet Rec 161:647-652

52. Cursino AE, Vilela APP, Franco-Luiz APM, de Oliveira JG, Nogueira MF, Junior JPA, de Aguiar DM, Kroon EG (2018) Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal.

53. Cutlip RC, Jackson TA, Lehmkuhl HD (1979) Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. Am J Vet Res 40:1370-1374

54. Delviks-Frankenberry K, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, Hu W-S (2011) Mechanisms and Factors that Influence High Frequency Retroviral Recombination. Viruses 3:1650-1680

55. Ditchfield J (1967) Equine infectious anemia a review of the disease and diagnostic tests. Can Vet J 8:273-278

56. Dong J, Cook FR, Haga T, Horii Y, Norimine J, Misawa N, Goto Y, Zhu W (2014) Comparative analysis of LTR and structural genes in an equine infectious anemia virus strain isolated from a feral horse in Japan. Arch Virol 159:3413-3420

57. Dong J, Cook FR, Zhu W (2014) Equine infectious anemia virus in Japan: viral isolates V70 and V26 are of North American not Japanese origin. Vet Microbiol 174:276-278

58. Dong JB, Zhu W, Cook FR, Goto Y, Horii Y, Haga T (2013) Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. J Gen Virol 94:360-365

59. Dorn P, DaSilva L, Martarano L, Derse D (1990) Equine infectious anemia virus tat: insights into the structure, function, and evolution of lentivirus trans-activator proteins. J Virol 64:1616-1624

60. Fagerness AJ, Flaherty MT, Perry ST, Jia B, Payne SL, Fuller FJ (2006) The S2 accessory gene of equine infectious anemia virus is essential for expression of disease in ponies. Virology 349:22-30

61. Fraser DG, Leib SR, Zhang BS, Mealey RH, Brown WC, McGuire TC (2005) Lymphocyte proliferation responses induced to broadly reactive Th peptides did not protect against equine infectious anemia virus challenge. Clin Diagn Lab Immunol 12:983-993

62. Gaudaire D, Morilland E, lecouturier F, Cadore JI, Zientara S, leroux* C, Hans A (2012) Epidémiologie de l'Anémie infectieuse des équidés. Sciences et techniques équ'idée haras-nationaux, pp 14-16

63. Gaudaire D, Lecouturier F, Poncon N, Morilland E, Laugier C, Zientara S, Hans A (2018) Molecular characterization of equine infectious anaemia virus from a major outbreak in southeastern France. Transbound Emerg Dis 65:e7-e13

64. Georgsson G, Palsson PA (1971) The histopathology of maedi a slow, viral pneumonia of sheep. Vet Pathol 8:63-80

65. Gorelick RJ, Henderson LE, Hanser JP, Rein A (1988) Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. Proc Natl Acad Sci U S A 85:8420-8424

66. Graham SM (2007) HIV-related pulmonary disorders: practice issues. Ann Trop Paediatr 27:243-252

67. Gregg K, Polejaeva I (2009) Risk of equine infectious anemia virus disease transmission through in vitro embryo production using somatic cell nuclear transfer. Theriogenology 72:289-299

68. Guillen S, Garcia San Miguel L, Resino S, Bellon JM, Gonzalez I, Jimenez de Ory S, Munoz-Fernandez MA, Navarro ML, Gurbindo MD, de Jose MI, Mellado MJ, Martin-Fontelos P, Gonzalez-Tome MI, Martinez J, Beceiro J, Roa MA, Ramos JT (2010) Opportunistic infections and organ-specific diseases in HIV-1-infected children: a cohort study (1990-2006). HIV Med 11:245-252

69. Hacker CV, Vink CA, Wardell TW, Lee S, Treasure P, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Miskin JE (2006) The integration profile of EIAV-based vectors. Mol Ther 14:536-545

70. Hammond SA, Cook SJ, Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC (1997) Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. J Virol 71:3840-3852

71. Hammond SA, Cook SJ, Falo LDJ, Issel CJ, Montelaro RC (1999) A particulate viral protein vaccine reduces viral load and delays progression to disease in immunized ponies challenged with equine infectious anemia virus. Virology 254:37-49

72. Hans A, Ponçon N, Zientara S (2012) Situation épidémiologique de l'anémie infectieuse des équidés en France et en Europe de 1994 à 2011. Bull Acad Vét France 165:27-34

73. Hans A, Jean-Baptiste S, Chevé F (2015) Surveillance de l'anémie infectieuse des équidés : deux foyers détectés dans le Sud de la France en 2014. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation /Spécial MRE 71:72-76

74. Harrold SM, Cook SJ, Cook RF, Rushlow KE, Issel CJ, Montelaro RC (2000) Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. J Virol 74:3112-3121

75. Hemelaar J (2012) The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol Med 18:182-192

76. Herrmann-Hoesing LM, Noh SM, White SN, Snekvik KR, Truscott T, Knowles DP (2009) Peripheral ovine progressive pneumonia provirus levels correlate with and predict histological tissue lesion severity in naturally infected sheep. Clin Vaccine Immunol 16:551-557

77. Hines R, Sorensen BR, Shea MA, Maury W (2004) PU.1 binding to ets motifs within the equine infectious anemia virus long terminal repeat (LTR) enhancer: regulation of LTR activity and virus replication in macrophages. J Virol 78:3407-3418

78. Hizi A, Herzig E (2015) dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. Retrovirology 12:70

79. ICTV (2017) Virus Taxonomy: 2017 Release EC 49, Singapore. International Committee on Taxonomy of Viruses

80. IFCE (2016) Institut Français du Cheval et de l'Équitation, Annuaire écus 2016, Tableau économique, statistique et graphique du cheval en France. p 50

81. Ireland JL, Clegg PD, McGowan CM, McKane SA, Pinchbeck GL (2011) A cross-sectional study of geriatric horses in the United Kingdom. Part 1: Demographics and management practices. Equine Vet J 43:30-36

82. Issel CJ, Rushlow K, Foil LD, Montelaro RC (1988) A perspective on equine infectious anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. Vet Microbiol 17:251-286

83. Issel CJ, Horohov DW, Lea DF, Adams WVJ, Hagius SD, McManus JM, Allison AC, Montelaro RC (1992) Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. J Virol 66:3398-3408

84. Issel CJ, Scicluna MT, Cook SJ, Cook RF, Caprioli A, Ricci I, Rosone F, Craigo JK, Montelaro RC, Autorino GL (2013) Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. Vet Rec 172:210

85. Issel CJ, Cook RF, Mealey RH, Horohov DW (2014) Equine infectious anemia in 2014: live with it or eradicate it? Vet Clin North Am Equine Pract 30:561-577

86. Issel CJ, Foil LD (2015) Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasties. Rev Sci Tech 34:513-523

87. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. J Virol 74:1234-1240

88. Jin S, Issel CJ, Montelaro RC (2004) Serological method using recombinant S2 protein to differentiate equine infectious anemia virus (EIAV)-infected and EIAV-vaccinated horses. Clin Diagn Lab Immunol 11:1120-1129

89. Joshi VV, Oleske JM, Minnefor AB, Saad S, Klein KM, Singh R, Zabala M, Dadzie C, Simpser M, Rapkin RH (1985) Pathologic pulmonary findings in children with the acquired immunodeficiency syndrome: a study of ten cases. Hum Pathol 16:241-246

90. Kono Y, Kobayashi K, Fukunaga Y (1973) Antigenic drift of equine infectious anemia virus in chronically infected horses. Arch Gesamte Virusforsch 41:1-10

91. Kossai M, Duchemann B, Boutros C, Caramella C, Hollebecque A, Angevin E, Gazzah A, Bahleda R, Ileana E, Massard C, Vielh P, Soria JC, Besse B (2015) Antitumor activity in advanced cancer patients with thymic malignancies enrolled in early clinical drug development programs (Phase I trials) at Gustave Roussy. Lung Cancer 89:306-310

92. Kuhar U, Zavrsnik J, Toplak I, Malovrh T (2013) Detection and molecular characterisation of equine infectious anaemia virus from field outbreaks in Slovenia. Equine Vet J 46:386-391

93. Kuhar U, Malovrh T (2016) High genetic diversity of equine infectious anaemia virus strains from Slovenia revealed upon phylogenetic analysis of the p15 gag gene region. Equine Vet J 48:205-210

94. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol

95. Kusuhara H, Hohdatsu T, Okumura M, Sato K, Suzuki Y, Motokawa K, Gemma T, Watanabe R, Huang C, Arai S, Koyama H (2005) Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. Vet Microbiol 108:155-165

96. Lecellier CH, Neves M, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Saib A (2002) Further characterization of equine foamy virus reveals unusual features among the foamy viruses. J Virol 76:7220-7227

97. Leroux C, Cordier G, Mercier I, Chastang J, Lyon M, Querat G, Greenland T, Vigne R, Mornex JF (1995) Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. Arch Virol 140:1-11

98. Leroux C, Issel CJ, Montelaro RC (1997) Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. J Virol 71:9627-9639

99. Leroux C, Craigo JK, Issel CJ, Montelaro RC (2001) Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. J Virol 75:4570-4583.

100. Leroux C, Cadore JL, Montelaro RC (2004) Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? Vet Res 35:485-512

101. Leroux C, Montelaro RC, Sublime E, Cadore JL (2005) EIAV (equine infectious anemia virus): mieux comprendre la pathogénèse des infections lentivirales. Virologie 9:289-300

102. Leroux C, Cruz JC, Mornex JF (2010) SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. Curr HIV Res 8:94-100

103. Leroux C, Cook R (2016) Chapter 20. Equine infectious anaemia virus. In: Liu D (ed) Molecular Detection of Animal Viral Pathogens. Taylor and Francis groupe CRC Press, pp 177-189

104. Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P (2016) Retroviral DNA Integration. Chemical Reviews 116:12730-12757

105. Li F, Puffer BA, Montelaro RC (1998) The S2 gene of equine infectious anemia virus is dispensable for viral replication in vitro. J Virol 72:8344-8348

106. Li F, Leroux C, Craigo JK, Cook SJ, Issel CJ, Montelaro RC (2000) The S2 gene of equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. J Virol 74:573-579

107. Li F, Craigo JK, Howe L, Steckbeck JD, Cook S, Issel C, Montelaro RC (2003) A live attenuated equine infectious anemia virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. J Virol 77:7244-7253

108. Lichtenstein DL, Rushlow KE, Cook RF, Raabe ML, Swardson CJ, Kociba GJ, Issel CJ, Montelaro RC (1995) Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. J Virol 69:2881-2888

109. Lichtenstein DL, Issel CJ, Montelaro RC (1996) Genomic quasispecies associated with the initiation of infection and disease in ponies experimentally infected with equine infectious anemia virus. J Virol 70:3346-3354

110. Lignée M (1843) Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anhémie hydrohémie, cachexie acquise du cheval. Rec Med Vet Ec Alfort 20:30-45

111. Lin YZ, Cao XZ, Li L, Jiang CG, Wang XF, Ma J, Zhou JH (2011) The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression and apoptosis in macrophages. Virus Res 160:274-282

112. Lin YZ, Shen RX, Zhu ZY, Deng XL, Cao XZ, Wang XF, Ma J, Jiang CG, Zhao LP, Lv XL, Shao YM, Zhou JH (2011) An attenuated EIAV vaccine strain induces significantly different immune responses from its pathogenic parental strain although with similar in vivo replication pattern. Antiviral Res 92:292-304

113. Lin YZ, Yang F, Zhang SQ, Sun LK, Wang XF, Du C, Zhou JH (2013) The soluble form of the EIAV receptor encoded by an alternative splicing variant inhibits EIAV infection of target cells. PLoS One 8:e79299

114. Liu Q, Wang X-F, Ma J, He X-J, Wang X-J, Zhou J-H (2015) Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Integration in the Horse Genome. Viruses 7:3241-3260

115. Lokhandwala PM, Nguyen TL, Bowzard JB, Craven RC (2008) Cooperative role of the MHR and the CA dimerization helix in the maturation of the functional retrovirus capsid. Virology 376:191-198

116. Ma J, Shi N, Jiang CG, Lin YZ, Wang XF, Wang S, Lv XL, Zhao LP, Shao YM, Kong XG, Zhou JH, Shen RX (2011) A proviral derivative from a reference attenuated EIAV vaccine strain failed to elicit protective immunity. Virology 410:96-106

117. Ma J, Zhang Z, Yao Q, Su C, Yin X, Wang X (2016) Regulation of Rev expression by the equine infectious anaemia virus tat-rev mRNA Kozak sequence and its potential influence on viral replication. J Gen Virol 97:2421-2426

118. Malik P, Singha H, Goyal SK, Khurana SK, Kumar R, Virmani N, Shanmugasundaram K, Pandey SB, Kant R, Singh BK, Singh RK (2013) Sero-surveillance of equine infectious anemia virus in equines in India during more than a decade (1999–2012). Indian J Virol 24:386-390

119. Maury W (1994) Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. J Virol 68:6270-6279

120. Maury W, Oaks JL, Bradley S (1998) Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. J Virol 72:9291-9297

121. McGuire TC, Crawford TB, Henson JB (1971) Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. Am J Pathol 62:283-294

122. Mealey RH, Leib SR, Littke MH, Wagner B, Horohov DW, McGuire TC (2009) Viral load and clinical disease enhancement associated with a lentivirus cytotoxic T lymphocyte vaccine regimen. Vaccine 27:2453-2468

123. Menendez-Arias L, Sebastian-Martin A, Alvarez M (2017) Viral reverse transcriptases. Virus Res 234:153-176

124. Minguijon E, Reina R, Perez M, Polledo L, Villoria M, Ramirez H, Leginagoikoa I, Badiola JJ, Garcia-Marin JF, de Andres D, Lujan L, Amorena B, Juste RA (2015) Small ruminant lentivirus infections and diseases. Vet Microbiol 181:75-89

125. More SJ, Aznar I, Myers T, Leadon DP, Clegg A (2008) An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: the modes of transmission and spread in the Kildare cluster. Equine Vet J 40:709-711

126. Morita E, Sundquist WI (2004) Retrovirus budding. Annu Rev Cell Dev Biol 20:395-425

127. Mornex JF, Lena P, Loire R, Cozon G, Greenland T, Guigen F, Jacquier MF, Cordier G (1994) Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. Vet Res 25:478-488

128. Mueller BU, Butler KM, Higham MC, Husson RN, Montrella KA, Pizzo PA, Feuerstein IM, Manjunath K (1992) Smooth muscle tumors in children with human immunodeficiency virus infection. Pediatrics 90:460-463

129. Nagarajan MM, Simard C (2007) Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. Virus Res

130. Nardini R, Autorino GL, Ricci I, Frontoso R, Rosone F, Simula M, Scicluna MT (2016) Validation according to OIE criteria of a monoclonal, recombinant p26–based, serologic competitive enzyme-linked immunosorbent assay as screening method in surveillance programs for the detection of Equine infectious anemia virus antibodies. J Virol Methods 28:88-97

131. Nardini R, Autorino GL, Issel CJ, Cook RF, Ricci I, Frontoso R, Rosone F, Scicluna MT (2017) Evaluation of six serological ELISA kits available in Italy as screening tests for equine infectious anaemia surveillance. BMC Vet Res 13:105

132. Nascimento IP, Leite LC (2012) Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Braz J Med Biol Res 45:1102-1111

133. Nisole S, Saïb A (2004) Early steps of retrovirus replicative cycle. Retrovirology 1:9-9

134. Oaks JL, McGuire TC, Ulibarri C, Crawford TB (1998) Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. J Virol 72:7263-7269

135. Oaks JL, Ulibarri C, Crawford TB (1999) Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus. J Gen Virol 80:2393-2397

136. OIE (2013) OIE Terrestrial Manual 2013 - Chapter 2.5.6 Equine Infectious Anaemia. OIE

137. OIE (2017) Code sanitaire pour les animaux terrestres OIE 2017, chapitre 12.5 - anémie infectieuse des équidés Article 12.5.2. - Recommandations relatives à l'importation d'équidés. .

138. OIE (2017) Code sanitaire pour les animaux terrestres OIE 2017, chapitre 1.1 - notification des maladies, des infections et des infestations, et communication des informations épidémiologiques, Article 1.1.3.

139. OIE (2018) Maladies, infections et infestations de la Liste de l'OIE en vigueur en 2018.

140. Oliveira FG, Cook RF, Naves JHF, Oliveira CHS, Diniz RS, Freitas FJC, Lima JM, Sakamoto SM, Leite RC, Issel CJ, Reis JKP (2017) Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. Prev Vet Med 140:30-37

141. Overbaugh J, Miller AD, Eiden MV (2001) Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycophosphatidylinositol-anchored and secreted proteins. Microbiol Mol Biol Rev 65:371-389

142. Paillot R, Marcillaud Pitel C, D'Ablon X, Pronost S (2017) Equine Vaccines: How, When and Why? Report of the Vaccinology Session, French Equine Veterinarians Association, 2016, Reims. Vaccines 5:46

143. Parreira DR, Jansen AM, Abreu UG, Macedo GC, Silva AR, Mazur C, Andrade GB, Herrera HM (2016) Health and epidemiological approaches of Trypanosoma evansi and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. Acta Trop 163:98-102

144. Patel M, Carritt K, Lane J, Jayappa H, Stahl M, Bourgeois M (2015) Comparative Efficacy of Feline Leukemia Virus (FeLV) Inactivated Whole-Virus Vaccine and Canarypox Virus-Vectored Vaccine during Virulent FeLV Challenge and Immunosuppression. Clin Vaccine Immunol 22:798-805

145. Pathak VK, Temin HM (1990) Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. Proc Natl Acad Sci U S A 87:6019-6023

146. Payne S, Parekh B, Montelaro RC, Issel CJ (1984) Genomic alterations associated with persistent infections by equine infectious anaemia virus, a retrovirus. J Gen Virol 65 (Pt 8):1395-1399

147. Payne SL, Fang FD, Liu CP, Dhruva BR, Rwambo P, Issel CJ, Montelaro RC (1987) Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. Virology 161:321-331

148. Payne SL, Salinovich O, Nauman SM, Issel CJ, Montelaro RC (1987) Course and extent of variation of equine infectious anemia virus during parallel persistent infections. J Virol 61:1266-1270

149. Payne SL, Qi XM, Shao H, Dwyer A, Fuller FJ (1998) Disease induction by virus derived from molecular clones of equine infectious anemia virus. J Virol 72:483-487

150. Payne SL, La Celle K, Pei XF, Qi XM, Shao H, Steagall WK, Perry S, Fuller F (1999) Long terminal repeat sequences of equine infectious anaemia virus are a major determinant of cell tropism. J Gen Virol 80:755-759

151. Payne SL, Fuller FJ (2010) Virulence determinants of equine infectious anemia virus. Curr HIV Res 8:66-72

152. Pepin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E (1998) Maedi-visna virus infection in sheep: a review. Vet Res 29:341-367

153. Perry ST, Flaherty MT, Kelley MJ, Clabough DL, Tronick SR, Coggins L, Whetter L, Lengel CR, Fuller F (1992) The surface envelope protein gene region of equine infectious anemia virus is not an important determinant of tropism in vitro. J Virol 66:4085-4097

154. Perryman LE (2004) Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs. Vet Pathol 41:95-100

155. Platt JA, Kraipowich N, Villafane F, DeMartini JC (2002) Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. Vet Pathol 39:341-352

156. Preston BD, Dougherty JP (1996) Mechanisms of retroviral mutation. Trends Microbiol 4:16-21

157. Puffer BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC (1997) Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. J Virol 71:6541-6546

158. Puffer BA, Watkins SC, Montelaro RC (1998) Equine infectious anemia virus Gag polyprotein late domain specifically recruits cellular AP-2 adapter protein complexes during virion assembly. J Virol 72:10218-10221

159. Purdy JG, Flanagan JM, Ropson IJ, Rennoll-Bankert KE, Craven RC (2008) Critical role of conserved hydrophobic residues within the major homology region in mature retroviral capsid assembly. J Virol 82:5951-5961

160. Qi X, Wang X, Wang S, Lin Y, Jiang C, Ma J, Zhao L, Lv X, Shen R, Wang F, Kong X, Su Z, Zhou J (2010) Genomic analysis of an effective lentiviral vaccine-attenuated equine infectious anemia virus vaccine EIAV FDDV13. Virus Genes 41:86-98

161. Qian L, Han X, Liu X (2015) Structural insight into equine lentivirus receptor 1. Protein Sci 24:633-642

162. Quinlivan M, Cook RF, Cullinane A (2007) Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. Vet Rec 160:611-618

163. Quinlivan M, Cook F, Kenna R, Callinan JJ, Cullinane A (2013) Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. J Gen Virol 94:612-622

164. Raabe ML, Issel CJ, Cook SJ, Cook RF, Woodson B, Montelaro RC (1998) Immunization with a recombinant envelope protein (rgp90) of EIAV produces a spectrum of vaccine efficacy ranging from lack of clinical disease to severe enhancement. Virology 245:151-162

165. Raabe MR, Issel CJ, Montelaro RC (1998) Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. J Virol Methods 71:87-104

166. Ramírez H, Reina R, Amorena B, de Andrés D, Martínez HA (2013) Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. Viruses 5:1175-1207

167. Ricotti S, Garcia MI, Veaute C, Bailat A, Lucca E, Cook RF, Cook SJ, Soutullo A (2016) Serologically silent, occult equine infectious anemia virus (EIAV) infections in horses. Vet Microbiol 187:41-49

168. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B (2000) HIV-1 nomenclature proposal. Science 288:55-56

169. Roda RH, Balakrishnan M, Hanson MN, Wohrl BM, Le Grice SF, Roques BP, Gorelick RJ, Bambara RA (2003) Role of the Reverse Transcriptase, Nucleocapsid Protein, and Template Structure in the Two-step Transfer Mechanism in Retroviral Recombination. J Biol Chem 278:31536-31546

170. Sahay B, Yamamoto JK (2018) Lessons Learned in Developing a Commercial FIV Vaccine: The Immunity Required for an Effective HIV-1 Vaccine. Viruses 10

171. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425

172. Sandrin V, Sundquist WI (2013) ESCRT requirements for EIAV budding. Retrovirology 10:104

173. Saxena SK, Chitti SV (2016) Molecular Biology and Pathogenesis of Retroviruses. In: Saxena SK (ed) Advances in Molecular Retrovirology. InTech, Rijeka, p Ch. 01

174. Schmitt AP, Leser GP, Morita E, Sundquist WI, Lamb RA (2005) Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. J Virol 79:2988-2997

175. Scicluna MT, Issel CJ, Cook FR, Manna G, Cersini A, Rosone F, Frontoso R, Caprioli A, Antognetti V, Autorino GL (2013) Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? Vet Microbiol 165:123-134

176. Scicluna MT, Autorino GL, Nogarol C, Ricci I, Frontoso R, Rosone F, Nardini R (2017) Validation of an indirect ELISA employing a chimeric recombinant gag and env peptide for the serological diagnosis of equine infectious anemia. J Virol Methods 251:111-117

177. Sellon DC, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ (1992) Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. J Virol 66:5906-5913

178. Sellon DC, Walker KM, Russell KE, Perry ST, Covington P, Fuller FJ (1996) Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. J Virol 70:590-594

179. Sharav T, Konnai S, Ochirkhuu N, Ts EO, Mekata H, Sakoda Y, Umemura T, Murata S, Chultemdorj T, Ohashi K (2017) Detection and molecular characterization of equine infectious anemia virus in Mongolian horses. J Vet Med Sci 79:1884-1888

180. Sharland M, Gibb DM, Holland F (1997) Respiratory morbidity from lymphocytic interstitial pneumonitis (LIP) in vertically acquired HIV infection. Arch Dis Child 76:334-336

181. Sharma A, Bruns K, Roder R, Henklein P, Votteler J, Wray V, Schubert U (2009) Solution structure of the equine infectious anemia virus p9 protein: a rationalization of its different ALIX binding requirements compared to the analogous HIV-p6 protein. BMC Struct Biol 9:74

182. Sheets RL, Zhou T, Knezevic I (2016) Review of efficacy trials of HIV-1/AIDS vaccines and regulatory lessons learned: A review from a regulatory perspective. Biologicals 44:73-89

183. Shen DT, Gorham JR, Jones RH, Crawford TB (1978) Failure to propagate equine infectious anemia virus in mosquitoes and Culicoides variipennis. Am J Vet Res 39:875-876

184. Shen R, Wang ZM (1985) Development and use of an equine infectious aneamia donkey leukocyte attenuated vaccine. In: Tashjian R (ed) Equine Infectious Anemia: a national review of policies, programs, and future objectives, Amarillo, Texas, pp 135-148

185. Shen T, Liang H, Tong X, Fan X, He X, Ma Y, Xiang W, Shen R, Zhang X, Shao Y (2006) Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. Vaccine 24:738-749

186. Stevanovic V, Lojkic I, Barbic L, Kovac S, Mojcec-Perko V, Ambriovic-Ristov A, Hadina S, Velic L, Perharic M, Staresina V (2016) The genetic heterogeneity of equine infectious anaemia virus field strains in Croatia. Vet arhiv 86:623-640

187. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. Cell 114:689-699

188. Stuke K, King V, Southwick K, Stoeva MI, Thomas A, Winkler MT (2014) Efficacy of an inactivated FeLV vaccine compared to a recombinant FeLV vaccine in minimum age cats following virulent FeLV challenge. Vaccine 32:2599-2603

189. Sune C, Goldstrohm AC, Peng J, Price DH, Garcia-Blanco MA (2000) An in vitro transcription system that recapitulates equine infectious anemia virus tat-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat activity demonstrates a role for positive transcription elongation factor b and associated proteins in the mechanism of Tat activation. Virology 274:356-366

190. Tabib A, Greenland T, Mercier I, Loire R, Mornex JF (1992) Coronary lesions in young HIV-positive subjects at necropsy. Lancet 340:730

191. Tanaka M, Robinson BA, Chutiraka K, Geary CD, Reed JC, Lingappa JR (2016) Mutations of Conserved Residues in the Major Homology Region Arrest Assembling HIV-1 Gag as a Membrane-Targeted Intermediate Containing Genomic RNA and Cellular Proteins. J Virol 90:1944-1963

192. Taube R, Fujinaga K, Irwin D, Wimmer J, Geyer M, Peterlin BM (2000) Interactions between equine cyclin T1, Tat, and TAR are disrupted by a leucine-to-valine substitution found in human cyclin T1. J Virol 74:892-898

193. Taylor SD, Leib SR, Carpenter S, Mealey RH (2010) Selection of a Rare Neutralization-Resistant Variant following Passive Transfer of Convalescent Immune Plasma in Equine Infectious Anemia Virus-Challenged SCID Horses. J Virol 84:6536-6548

194. Taylor SD, Leib SR, Wu W, Nelson R, Carpenter S, Mealey RH (2011) Protective effects of broadly neutralizing immunoglobulin against homologous and heterologous equine infectious anemia virus infection in horses with severe combined immunodeficiency. J Virol 85:6814-6818

195. Tigre DM, Brandao CF, de Paula FL, Chinalia FA, Campos GS, Sardi SI (2017) Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. Arch Virol 162:873-877

196. Todd JL, Wolbach SB (1911) The Swamp Fever of Horses. J Med Res 24:213-242

197. Toro AA, Altemani AA, Zanardi VA, Menezes JR, da Silva MN, Vilela MM (2006) Lung disease features in Brazilian children with HIV infection before HAART era. J Trop Pediatr 52:360-368

198. Travis WD, Fox CH, Devaney KO, Weiss LM, O'Leary TJ, Ognibene FP, Suffredini AF, Rosen MJ, Cohen MB, Shelhamer J (1992) Lymphoid pneumonitis in 50 adult patients infected with the human immunodeficiency virus: lymphocytic interstitial pneumonitis versus nonspecific interstitial pneumonitis. Hum Pathol 23:529-541

199. Tu YB, Zhou T, Yuan XF, Qiu HJ, Xue F, Sun CQ, Wang L, Wu DL, Peng JM, Kong XG, Tong GZ (2007) Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. Arch Virol 152:209-218

200. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG (2015) SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. Nature 526:218-223

201. Vallée H, Carré H (1904) Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. C R Acad Sci 139:1239

202. Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S (1991) Selection, recombination, and G----A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. J Virol 65:1779-1788

203. Votteler J, Sundquist WI (2013) Virus Budding and the ESCRT Pathway. Cell host & microbe 14:10.1016/j.chom.2013.1008.1012

204. Waheed AA, Freed EO (2010) The Role of Lipids in Retrovirus Replication. Viruses 2:1146-1180

205. Wang HN, Rao D, Fu XQ, Hu MM, Dong JG (2018) Equine infectious anemia virus in China. Oncotarget 9:1356-1364

206. Wang SZ, Rushlow KE, Issel CJ, Cook RF, Cook SJ, Raabe ML, Chong YH, Costa L, Montelaro RC (1994) Enhancement of EIAV replication and disease by immunization with a baculovirus-expressed recombinant envelope surface glycoprotein. Virology 199:247-251

207. Wang X-F, Liu Q, Wang Y-H, Wang S, Chen J, Lin Y-Z, Ma J, Zhou J-H, Wang X (2018) Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Long Terminal Repeat Quasispecies In Vitro and In Vivo. Journal of Virology 92:e02150-02117

208. Wang X, Wang S, Lin Y, Jiang C, Ma J, Zhao L, Lv X, Wang F, Shen R, Kong X, Zhou J (2011) Genomic comparison between attenuated Chinese equine infectious anemia virus vaccine strains and their parental virulent strains. Arch Virol 156:353-357

209. Woodham AW, Skeate JG, Sanna AM, Taylor JR, Da Silva DM, Cannon PM, Kast WM (2016) Human Immunodeficiency Virus Immune Cell Receptors, Coreceptors, and Cofactors: Implications for Prevention and Treatment. AIDS Patient Care STDS 30:291-306

210. Zar HJ (2008) Chronic lung disease in human immunodeficiency virus (HIV) infected children. Pediatr Pulmonol 43:1-10

211. Zhai Q, Fisher RD, Chung HY, Myszka DG, Sundquist WI, Hill CP (2008) Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. Nat Struct Mol Biol 15:43-49

212. Zhang B, Jin S, Jin J, Li F, Montelaro RC (2005) A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. Proc Natl Acad Sci U S A 102:9918-9923

213. Zhang B, Sun C, Jin S, Cascio M, Montelaro RC (2008) Mapping of equine lentivirus receptor 1 residues critical for equine infectious anemia virus envelope binding. J Virol 82:1204-1213

214. Zhang B, Montelaro RC (2009) Replication of equine infectious anemia virus in engineered mouse NIH 3T3 cells. J Virol 83:2034-2037

215. Zhang W, Cao S, Martin JL, Mueller JD, Mansky LM (2015) Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. AIMS Biophys 2:343-369