

Transmission expérimentale de la tremblante du mouton à des souris transgéniques ovinisée : franchissement de la barrière d'espèce et mise au point d'outils de caractérisation de l'agent infectieux

J.L. VILOTTE (1), S. SOULIER (1), R. ESSALMANI (1), M.G. STINNAKRE (1), L. LEPOURRY (1), J. COSTA DA SILVA (1), N. BESNARD (1), D. VAIMAN (1), S. PETIT (2), S. RAKOTOBÉ (2), M.F. MADELAINE (2), A. LE DUR (2), D. VILETTE (2), H. LAUDE (2)
(1) INRA, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex
(2) INRA, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, 78352, Jouy-en-Josas Cedex

RESUME – Nous avons entrepris d'exprimer l'allèle PrP ovin V136/R154/Q171, à partir de trois constructions distinctes, dans des souris. Cet allèle est connu pour conférer la plus grande sensibilité à la tremblante. Plusieurs lignées de souris transgéniques exprimant ce gène dans leur tissu nerveux central ont été obtenues. La transmission primaire à partir de deux isolats d'origine distincte mais provenant de moutons homozygotes VRQ, a révélé que ces souris présentent une susceptibilité nettement accrue comparativement à des souris conventionnelles. Une différence notable, notamment du temps d'incubation, a été observée entre les deux isolats. Ces souris constituent donc non seulement un outil de détection de l'agent infectieux mais également un nouveau modèle expérimental pour l'étude de la tremblante du mouton et en particulier de la diversité biologique des souches présentes sur le terrain.

Experimental transmission of sheep scrapie to sheep PrP-transgenic mice : efficient crossing of the species barrier and creation of new models to characterise the infectious agent

J.L. VILOTTE (1), S. SOULIER (1), R. ESSALMANI (1), M.G. STINNAKRE (1), L. LEPOURRY (1), J. COSTA DA SILVA (1), N. BESNARD (1), D. VAIMAN (1), S. PETIT (2), S. RAKOTOBÉ (2), M.F. MADELAINE (2), A. LE DUR (2), D. VILETTE (2), H. LAUDE (2)
(1) INRA, Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex
(2) INRA, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, 78352, Jouy-en-Josas Cedex

SUMMARY – Three constructs were designed to express the ovine PrP V136/R154/Q171 allele in the central nervous system of transgenic mice. This allele is known to confer the highest susceptibility to scrapie. Several expressing lines were obtained. When challenged by intra-cerebral inoculation of two brain homogenates from two distinct PrP-VRQ homozygous scrapie affected sheep, these mice showed a higher susceptibility compared to conventional mice. Noticeable differences were observed between the two isolates, including in the incubation time. Thus these mice are not only an acute system to detect the infectious agent but also a new experimental model to study sheep scrapie, and notably the biological diversity of the naturally occurring strains.

INTRODUCTION

La tremblante du mouton est une EST (Encéphalopathie Spongiforme Transmissible) qui sévit sur un mode naturellement contagieux (Hunter, 1996). Elle se caractérise, entre autres, par l'apparition d'une forme anormale (PrPres) d'une protéine de l'hôte, la protéine PrP qui devient résistante à une dégradation par la protéinase K (Prusiner, 1998). La sensibilité des moutons à l'agent fait intervenir non seulement le génotype du mouton, notamment au locus Prnp, mais également un effet souche de l'agent infectieux. L'étude expérimentale de cet agent repose sur l'inoculation aux rongeurs de laboratoire. Dans ce modèle, seul disponible à ce jour, la maladie n'apparaît qu'après 1 à 2 ans d'incubation après l'inoculation *en passage primaire* d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de tremblante (Bruce et al., 1994). Cette latence reflète l'existence d'une barrière de transmission, phénomène dans lequel la protéine PrP, joue un rôle prépondérant mais incomplètement élucidé (Priola, 1999). L'approche consistant à exprimer chez la souris un transgène spécifiant la PrP de l'espèce dont provient l'agent a permis de créer des modèles améliorés pour l'étude des EST humaines et bovine, mais restait à valider pour la tremblante, d'autant qu'une tentative antérieure s'était révélée infructueuse (Westaway, 1996).

Nous avons entrepris d'exprimer l'allèle PrP ovine V136/R154/Q171, à partir de trois gènes distincts, dans des souris. L'utilisation de trois gènes différents devaient nous permettre d'analyser l'effet éventuel de la répartition tissulaire de la protéine PrPc sur la susceptibilité des souris à l'agent infectieux. L'allèle VRQ a été choisi car il est en effet maintenant connu pour conférer la plus grande sensibilité à la tremblante (Hunter, 1996, Tranulis et al., 1999, Elsen et al., 1999). Nous rapportons que l'expression de cet allèle ovine dans le tissu nerveux central de souris transgéniques permet une transmission inter-spécifique efficace.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 REALISATION DES CONSTRUCTIONS

La construction P1 dérive du vecteur semi-génomique phgPrP, vecteur comprenant le gène PrP murin dont le second exon a été éliminé (Fischer et al., 1996) et dans lequel la séquence codant pour la protéine PrP murine a été substituée par celle codant pour l'allèle VRQ de la protéine ovine (Fig. 1). La construction P2 dérive de la construction P1 par l'insertion d'un promoteur viral CMV humain en place du promoteur PrP murin. Enfin, la construction P3 correspond au gène ovine isolé d'une banque de BAC (Vaiman et al., 1999). Cet insert de 125 kb comprend environ 40 kb de séquence en amont du gène et 60 kb en aval.

1.2 OBTENTION DE SOURIS TRANSGENIQUES

Les trois constructions ont été injectées dans des œufs de souris (C57BL/6x(CBA)Prnp^{0/0}). Les souris Prnp^{0/0} (obtenues auprès de C. Weissmann, Zurich) sont des animaux dont le gène Prnp a été invalidé par recombinaison homologue (Büeler et al., 1992) et dont les œufs se sont malheureusement avérés ne pas résister à la micro-injection. Les souris transgéniques ont été identifiées par hybridation de leur ADN génomique, isolé à partir d'une biopsie de queue, à l'aide de l'ADNc de la protéine PrP ovine. Par croisement avec des animaux Prnp^{0/0}, les transgènes ont été introduits sur fond génétique Prnp^{0/0}.

1.3 ANALYSE DE LA SUSCEPTIBILITE DES SOURIS

Deux isolats distincts issus de moutons atteints de tremblante et homozygotes pour l'allèle PrPVRQ ont été utilisés, ainsi qu'un cerveau issu d'un mouton sain. Le premier isolat (noté DA/98) provient d'un mouton anglais, le second (noté LA/95) d'un mouton français issu du domaine expérimental INRA de Langlade. Les cerveaux de ces animaux ont été homogénéisés (10 % poids/volume) dans une solution stérile de glucose 5 %. Vingt ml de la solution, préalablement chauffée 30 minutes à 80°C, ont été injectés par voie intra-cérébrale dans des souris âgées d'environ 6 semaines, hétérozygotes au locus du

transgène. L'état de santé de ces animaux a été suivi tous les deux jours, et les souris ont été sacrifiées au stade terminal de l'évolution de la maladie. La présence de la protéine PrPres a alors été recherchée dans leur cerveau. Des souris conventionnelles ont été inoculées en parallèle avec ces mêmes isolats.

2. RESULTATS

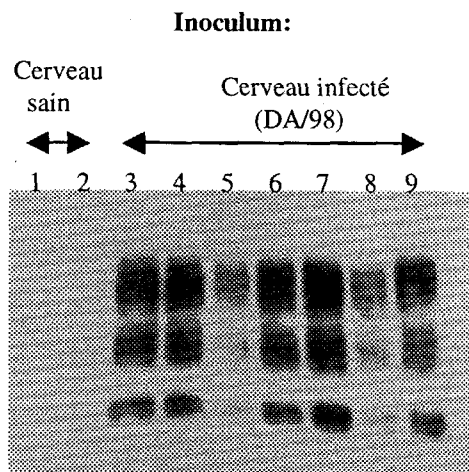
2.1 OBTENTION ET ANALYSES DES SOURIS TRANSGENIQUES

12, 6 et 9 fondateurs ont été respectivement obtenus à partir des constructions P1, P2 et P3. Tous ces animaux, à l'exception d'une souris P3 morte en bas âge, ont transmis le transgène à la génération suivante. L'expression du transgène a été recherchée sur des animaux G1, donc hétérozygotes à ce locus. La protéine recombinante ovine a pu être détectée par analyse par Western dans le cerveau des souris issues de 3 lignées P1, de 4 lignées P2 et des 8 lignées P3. Les niveaux d'expression relatifs sont rapportés dans le tableau I. Il est à noter que pour la construction P3, le niveau d'expression semble indépendant du site d'intégration et proportionnel au nombre de copies intégrées.

2.2 ANALYSE DE LA SUSCEPTIBILITE DES SOURIS

Les temps de survie des souris après inoculation intra-cérébrale des homogénats de cerveaux issus de moutons atteints de scrapie sont rapportés dans le tableau I. Des analyses par Western ont confirmé que tous les animaux sacrifiés au stade terminal de la maladie présentaient une accumulation de PrPres dans leur cerveau, confirmant ainsi que les troubles neurologiques observés reflétaient bien le développement de l'EST (Fig. 1). D'autre part les souris inoculées à partir de l'homogénat issu du cerveau du mouton « sain » n'ont pas présenté de symptômes, démontrant ainsi que les observations étaient bien associées à l'injection de l'agent infectieux de la tremblante.

Figure 1
Recherche de PrPres dans le cerveau
de souris transgéniques P2-11



Les homogénats ont été préparés à partir de cerveaux de souris en phase terminale après inoculation par l'homogénat DA/98 et de cerveau de souris du même âge, inoculées en parallèle avec un homogénat de cerveau de mouton sain. Les échantillons (2 mg) ont été digérés par la protéinase K avant révélation de la présence de PrPres par Western.

Les souris transgéniques présentent une susceptibilité nettement plus forte comparativement à des souris conventionnelles en termes d'efficacité de transmission et de délai d'incubation. Dans certaines lignées, les délais observés sont proches de ceux rapportés suite à l'inoculation de souches de laboratoire adaptées à la souris (de l'ordre de 65 jours d'incubation, Tableau I). Des inoculations en passage secondaire, voir tertiaire, ne se sont pas traduites par une diminution significative du temps d'incubation, suggérant une adaptation complète dès la primo-infection. On notera que ces délais semblent indé-

pendants du type de construction utilisée et liés au niveau d'expression observé de la protéine ovine dans le cerveau des animaux.

Entre les deux isolats pourtant issus de deux moutons homozygotes pour l'allèle VRQ de la protéine prion, une différence hautement significative a été observée dans les délais d'incubation, et ce sur l'ensemble des lignées analysées.

3. DISCUSSION

Un panel de souris transgéniques exprimant dans leur tissu nerveux central l'allèle VRQ de la protéine PrP ovine a été obtenu à partir de trois constructions différentes. Ces souris présentent une susceptibilité accrue aux agents de la tremblante du mouton comparativement à des souris conventionnelles. Cette susceptibilité ne semble pas être associée à la construction utilisée même si, par l'emploi de promoteurs distincts, des types cellulaires différents doivent exprimer la protéine ovine. Cependant, notre analyse porte uniquement sur des inoculations par voie intra-cérébrale, et nous ne pouvons exclure que ces souris présentent des sensibilités différentes si d'autres voies d'inoculation étaient utilisés. Des expériences sont actuellement en cours pour tester cette hypothèse.

Les délais d'incubation observés semblent inversement proportionnels au niveau d'expression de la protéine PrP ovine dans le cerveau. Ces analyses ayant porté sur des animaux hétérozygotes au locus du transgène, l'utilisation de souris homozygotes ou porteuses de plusieurs transgènes pourrait résulter dans une augmentation du niveau d'expression de la protéine PrP et donc accroître leur susceptibilité à l'agent infectieux. Il apparaît cependant que de forts niveaux d'expression de la protéine ovine sont associés à l'apparition de troubles neurologiques spontanés. D'autre part, l'existence d'un niveau d'expression au delà duquel aucun gain en terme de délai d'incubation ne peut plus être obtenu, n'est pas à exclure. A nouveau, des expériences sont en cours en ce sens. L'inoculation en second passage de ces souris ne s'est pas traduit par une diminution significative du délai d'incubation. Cette observation démontre le franchissement de la barrière d'espèce dès la primo-infection. Ces résultats peuvent sembler contradictoire avec ceux rapportés par Westaway (Westaway, 1996). Une explication possible peut résider dans l'emploi d'allèles différents de la protéine PrP ovine. Dans la présente étude, l'allèle utilisé est maintenant connu pour conférer la plus grande susceptibilité chez le mouton (Hunter, 1996, Tranulis *et al.*, 1999, Elsen *et al.*, 1999). Or, un allèle de moins grande sensibilité a été employé dans l'expérience de Westaway.

Les délais d'incubations observés à partir des deux isolats issus de moutons homozygotes pour l'allèle VRQ font apparaître une susceptibilité très différente des souris, avec des réponses plus rapides pour l'isolat DA/98 que pour l'isolat LA/95 (Tableau I). La différence observée, qui se retrouve dans toutes les lignées analysées, peut difficilement traduire une simple différence de titre des deux homogénats. En effet, sur des souris P3-01, l'utilisation de l'isolat DA/98 dilué au 1/10000 n'augmente le délai d'incubation que de 22 jours, alors que pour cette même lignée la différence observée entre les deux isolats est de 164 jours (Tableau I). Il est plus vraisemblable que ce résultat traduise la présence dans les deux homogénats de deux souches différentes de tremblante. Une souche de prion est caractérisée par une durée d'incubation propre et par un profil histopathologique particulier (Hunter, 1996). Des analyses préliminaires indiquent que les deux isolats utilisés conduisent à l'apparition de profils histopathologiques différents dans les souris transgéniques.

CONCLUSION

L'expression de l'allèle PrP^{VRQ} ovin dans le tissu nerveux central de souris transgéniques permet une transmission inter-spécifique efficace de la tremblante du mouton. Le franchisse-

ment de la barrière d'espèce semble avoir été obtenu dès la primo-infection. Ces souris présentent une forte susceptibilité aux agents de la scrapie. Elles constituent un outil amélioré de détection de l'agent infectieux mais aussi potentiellement un nouveau modèle expérimental pour l'étude de la tremblante du mouton et notamment de la diversité biologique des souches présentes sur le terrain.

Tableau 1
Analyse de la susceptibilité
des souris à différents isolats de tremblante

Gène	Lignée	Expression PrP dans le cerveau *	Isolat	Mortalité	Temps de Survie (jours)
P1	16	< 0,4	DA/98	7/7	399 +/- 6
	43	1,5	DA/98	8/8	149 +/- 4
			LA/95	8/8	351 +/- 5
			Cerv. Sain	0/7	> 410
P2	07	1,2	DA/98	8/8	196 +/- 10
			LA/95	8/8	424 +/- 13
			Cerv. Sain	0/8	> 480
	11	1,9	DA/98	8/8	111 +/- 2
			LA/95	8/8	341 +/- 5
			Cerv. Sain	0/8	> 480
P3	35	1,2	DA/98	0/7	> 200
	28	3,5	DA/98	8/8	101 +/- 5
	01	8	DA/98	7/7	73 +/- 3
			LA/95	4/4	237 +/- 3
RIII	(souris conventionnelle)		DA/98	8/8	423 +/- 6
			LA/95	0/8	> 600

* niveau 1: mouton

- Bruce M., Chree A., McConnell I., Foster J., Pearson G., Fraser H. 1994. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 343(1306), 405-411.
- Büeler H., Fisher M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M., Weissmann C. 1992. Nature, 356, 577-582
- Elsen J.M., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eyehenne F., Khang J.V., Poivey J.P., Lantier F., Laplanche J.L. 1999. Arch. Virol., 144, 431-445
- Fischer M., Rüllicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A., Weissmann C. 1996. EMBO J., 15, 1255-1264
- Hunter, N. 1996. In Baker H. and Ridley R.M. (Editors), Methods in Molecular Medicine : Prion Diseases. Humana Press Inc, USA.211-221
- Priola S.A. 1999. Biomed Pharmacother, 53, 27-33
- Prusiner, S.B. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13363-13383
- Tranulis M.A., Osland A., Bratberg B., Ulvund M.J. 1999. J. Gen. Virol., 80, 1073-1077
- Vaiman D., Billault A., Tabet-Aoul K., Schibler L., Vilette D., Oustry-Vaiman A., Soravito C., Cribiu E.P. 1999. Mamma. Genome, 10, 585-587
- Westaway D. 1996. In Baker H. and Ridley R.M. (Editors), Methods in Molecular Medicine : Prion Diseases. Humana Press Inc, USA.251-263