

Génétique de la susceptibilité à la tremblante ovine

J. VU TIEN KHANG (1), J.M. ELSEN (1), F. BARILLET (1), J.P. POIVEY (1), C. CLOUSCARD (2),
J.L. LAPLANCHE (3), D. MILAN (2), F. SCHELCHER (4), F. LANTIER (5)

(1) INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

(2) INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

(3) Formation de Recherche Associée Claude Bernard "Neurochimie des Communications Cellulaires",
Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris

(4) Ecole Nationale Vétérinaire, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex

(5) INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, 37380 Nouzilly

La tremblante est une maladie neurodégénérative fatale qui appartient au groupe des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Elle peut se transmettre de manière naturelle ou expérimentale (par inoculation ou ingestion de tissus atteints). La susceptibilité des ovins à la tremblante expérimentale et naturelle est contrôlée par un gène majeur (*Sip*). Un candidat produit de ce gène est la "protéine prion" *PrP* qui joue un rôle central dans la pathogenèse des EST : une isoforme anormale de cette protéine codée par l'hôte s'accumule dans le cerveau des animaux atteints et se révèle constamment associée à l'infectivité. Des polymorphismes du gène *PrP* sont liés à la susceptibilité à la tremblante. Est-il possible de contrôler la tremblante par un programme de sélection ? Les animaux "résistants", qui ont une durée d'incubation allongée, pourraient constituer un réservoir d'infection pour les autres. Les animaux "résistants" à une souche de tremblante peuvent être sensibles à une autre. Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour répondre à cette question.

Genetics of scrapie susceptibility in sheep

J. VU TIEN KHANG (1), J.M. ELSEN, F. BARILLET, J.P. POIVEY, C. CLOUSCARD,
J.L. LAPLANCHE, D. MILAN, F. SCHELCHER, F. LANTIER

(1) INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

Scrapie is a fatal neurodegenerative disease that belongs to the group of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Scrapie can be transmitted naturally or experimentally (by inoculation or feeding of diseased tissues). Susceptibility of sheep to experimental and natural scrapie is controlled by a major gene (*Sip*). A candidate product of this gene is the *PrP* "prion protein" that plays a central role in the pathogenesis of the TSE : an abnormal isoform of this host encoded protein accumulates in the brain of affected animals and correlates consistently with infectivity. Polymorphisms in the *PrP* gene are associated with scrapie susceptibility. Is it possible to control scrapie by selective breeding ? "Resistant" animals, that have a lengthened incubation period, could act as sources of infection to others. Animals "resistant" to one scrapie strain can be susceptible to another. Therefore further research is needed to address this question.

INTRODUCTION

La tremblante est une maladie neurodégénérative fatale du mouton et de la chèvre. Elle appartient au groupe des "encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles" (ESST) ou "maladies à prions" affectant l'homme et les animaux. La maladie humaine de Creutzfeldt-Jakob et l'encéphalopathie bovine spongiforme ("maladie des vaches folles"), récemment apparue, font également partie de ce groupe. Connue depuis plus de deux siècles, la tremblante affecte les ovins et les caprins de manière enzootique. Son caractère transmissible a été démontré expérimentalement (Cuillé et Chelle, 1938). La transmission peut se faire par ingestion ou inoculation d'extraits cérébraux d'animaux malades. L'agent transmissible de la tremblante (ATT) est très résistant aux procédés inactivants physiques et chimiques. Après une longue période d'incubation cliniquement silencieuse (qui dure plusieurs mois ou années), les animaux atteints présentent des troubles nerveux sensitifs et moteurs. Le diagnostic, essentiellement histologique, repose sur l'observation des lésions de l'encéphale (spongiose). On ne dispose pas de moyen pour repérer les "porteurs sains". En l'absence de réaction immunitaire spécifique, il est notamment impossible de pratiquer un séro-diagnostic.

Prusiner (1982) a montré que l'infectivité des extraits cérébraux d'animaux atteints est associée à la présence de la protéine "prion" PrP (prion = *proteinaceous infectious particle*). La maladie se caractérise par l'accumulation, dans l'encéphale, d'une isoforme anormale de cette glycoprotéine membranaire neuronale codée par l'hôte. L'isoforme pathologique PrP^{Sc} dérive de l'isoforme cellulaire normale PrP^C par un processus post-traductionnel (modification de la conformation sous l'influence de facteurs encore mal connus). L'isoforme PrP^{Sc} résiste partiellement à la protéinase K et se polymérise facilement sous forme pseudo-fibrillaire. L'ATT, dont la nature exacte demeure inconnue, est largement constitué de molécules PrP^{Sc}. Contient-il aussi un acide nucléique ? La question reste en suspens. L'étiologie de la tremblante suscite de nombreux débats. Parry (1960, 1962, 1979) la considère comme une maladie génétique (déterminée par un gène autosomal récessif *s*), transmissible uniquement dans des conditions expérimentales : les homozygotes *ss* produiraient des particules pathogènes susceptibles de transmettre la maladie. Mais Dickinson et al (1965, 1974) ont mis en évidence la transmission maternelle et horizontale de la tremblante naturelle, démontrant ainsi le caractère infectieux de la maladie. Les voies naturelles de transmission sont encore mal connues. De nombreux travaux montrent que le génotype de l'hôte module la susceptibilité à la tremblante, expérimentale ou naturelle. L'objet de cette communication est de faire le point sur cette question.

1. MISE EN ÉVIDENCE DU GÈNE *Sip*

1.1. LE GÈNE *Sip* ET LA TREMBLANTE EXPÉRIMENTALE

A partir des années 1960, des lignées d'ovins ont été sélectionnées au Royaume-Uni sur leur réponse à une inoculation sous-cutanée d'un isolat de tremblante : deux lignées divergentes Cheviot NPU (Neuropathogenesis Unit, Edimbourg), "sensibles" et "résistantes" à l'isolat SSBP/1 (*sheep scrapie brain pool 1*), deux lignées Herdwick NPU

sélectionnées de manière analogue et une lignée Swaledale "résistante" aux isolats SW73 et SW75. Le terme de "résistance" doit être interprété ici de manière relative : la "résistance" consisterait en effet essentiellement en une augmentation de la durée d'incubation. Les "isolats" ou "souches" de tremblante sont obtenus à partir de mélanges d'extraits cérébraux d'animaux atteints. L'analyse de croisements effectués à partir d'animaux des deux lignées Cheviot NPU a permis de montrer que la susceptibilité à la tremblante est gouvernée par un gène majeur autosomal, le gène *Sip* (*Scrapie Incubation Period*), correspondant au gène murin *Sinc* : l'allèle de susceptibilité *sA* est dominant par rapport à l'allèle *pA* de "résistance". Dans la lignée sensible, les animaux (*sAsA* ou *sApA*) développent la maladie 300 jours environ après une inoculation sous-cutanée, tandis que dans la lignée "résistante", les animaux (*pApA*) survivent. Néanmoins, ces derniers peuvent développer la maladie 1000 jours environ après une inoculation intracérébrale (Dickinson et al, 1968). Dans les troupeaux Herdwick NPU (Nussbaum et al, 1975) et Swaledale (Hoare et al, 1977 ; Davies et Kimberlin, 1985), un déterminisme génétique analogue a été mis en évidence : il s'agit vraisemblablement du même gène (*Sip*), bien que ce ne soit pas formellement établi.

1.2. LE GÈNE *Sip* ET LA TREMBLANTE NATURELLE

Alors que les lignées sensibles étaient touchées par des épidémies de tremblante naturelle, aucun cas de tremblante n'a été relevé dans les lignées "résistantes". Le rôle du gène *Sip* vis-à-vis de la tremblante naturelle a été confirmé (Foster et Dickinson, 1988a ; Dickinson et Outram, 1988) : mais, à l'inverse de ce qui est observé en tremblante expérimentale, l'allèle de susceptibilité *sA* pourrait n'être que partiellement dominant (ou récessif) vis-à-vis de *pA*. Les relations de dominance entre les deux allèles dépendraient de la race, de la dose et de la voie d'inoculation, ainsi que de la "souche" de tremblante (Hunter, 1992a).

2. POLYMORPHISME DU GÈNE *PrP* ET SUSCEPTIBILITÉ À LA TREMBLANTE

Le gène *PrP* (codant pour la protéine PrP) est très conservé chez les Mammifères. Il comprend un exon principal d'environ 2 kilobases qui contient toute l'information codante. Dans les espèces humaine et murine, certains polymorphismes du gène *PrP* sont associés à l'incidence des ESST, à leur durée d'incubation et à leurs formes cliniques. Des souris dépourvues de gène *PrP* sont totalement résistantes, tout en étant viables (Büeler et al, 1993). Dans l'espèce ovine, des travaux conduits sur les lignées Cheviot NPU suggèrent que les gènes *PrP* et *Sip* sont étroitement liés, voire confondus (Hunter et al, 1989; Foster et Hunter, 1991 ; Goldmann et al, 1991). Des associations entre polymorphismes du gène *PrP* et incidence de la maladie naturelle ont par ailleurs été observées dans plusieurs races (Hunter et al, 1991, 1992 ; Hunter, 1992a). Les premiers polymorphismes décrits correspondaient à des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) n'affectant pas la région codante (vraisemblablement en déséquilibre de liaison avec les mutations causales responsables des phénotypes observés). Des travaux ultérieurs, faisant appel à d'autres techniques, telles la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et la DGGE (*Denaturing*

Gradient Gel Electrophoresis), ont permis d'identifier des polymorphismes dans la région codante. Lorsque ces polymorphismes sont associés à la susceptibilité à la tremblante, il est souvent difficile de savoir s'il s'agit de mutations causales affectant la susceptibilité à la maladie ou de marqueurs génétiques en déséquilibre de liaison avec de telles mutations.

2.1. POLYMORPHISME DU GÈNE *PrP* AU CODON 136

Un polymorphisme au codon 136 (avec deux allèles *136Ala* et *136Val* codant respectivement pour les acides aminés alanine et valine) est associé à la tremblante expérimentale (Goldmann et al, 1991, 1994 ; Maciulis et al, 1992). L'allèle *136Val* (associé à la susceptibilité) est dominant (ou partiellement dominant) sur *136Ala* (associé à la "résistance"). Dans les lignées Cheviot NPU, Goldmann et al (1991) ont montré que l'allèle *136Val* est associé à l'allèle *sA* de susceptibilité. Dans de nombreuses populations, les homozygotes *136Ala/Ala* semblent protégés de la tremblante naturelle (Laplanche et al, 1992, 1993a ; Hunter et al, 1993, 1994 ; Belt et al, 1995), à quelques exceptions près toutefois (Hunter et al, 1993, 1994). Par ailleurs, la tremblante naturelle existe dans des races où l'allèle *136Val* est pratiquement absent (Laplanche et al, 1993b) et, dans d'autres populations, elle ne semble pas associée au polymorphisme du codon 136 (Hunter et al, 1994). L'allèle *136Val* n'est donc pas toujours nécessaire au développement de la maladie.

2.2. POLYMORPHISME DU GÈNE *PrP* AU CODON 171

Goldmann et al (1990) ont décrit, pour la première fois, un polymorphisme au codon 171. Les allèles *171Gln* et *171Arg* codent respectivement pour la glutamine et l'arginine. Le premier, associé à la susceptibilité, paraît récessif, tant en tremblante expérimentale (Goldmann et al, 1994) que naturelle (Westaway et al, 1994 ; Belt et al, 1995 ; Cloucard et al, 1995). Westaway et al (1994) suggèrent que l'allèle *171Gln* pourrait correspondre à l'allèle autosomal récessif *s* introduit par Parry (1960, 1962, 1979) dans son hypothèse de maladie génétique. Selon Cloucard et al (1995), l'acide aminé situé en position 171 pourrait jouer un rôle clé dans le risque de conversion de l'isoforme cellulaire *PrP^C* en isoforme pathogène *PrP^{Sc}* (l'arginine pouvant ici empêcher ou retarder la conversion d'une structure en hélice alpha vers des feuillettes bêta). Un nouvel allèle, *171His* (codant pour l'histidine), a été mis en évidence par Belt et al (1995) et Cloucard et al (1995). D'après les premières observations, portant sur un nombre réduit d'animaux, les hétérozygotes *171Gln/His* semblent aussi susceptibles à la tremblante naturelle que les homozygotes *171Gln/Gln*.

2.3. POLYMORPHISMES DU GÈNE *PrP* AUX CODONS 136 ET 171 CONSIDÉRÉS SIMULTANÉMENT

Comment se comportent les animaux possédant à la fois les allèles *136Val* et *171Arg*, tous deux considérés comme dominants, le premier conférant la "susceptibilité" et le second la "résistance" ? Une étude conduite en tremblante naturelle montre que les doubles hétérozygotes *136Val/171Gln/136Ala/171Arg* se trouvent également répartis chez les malades et chez les témoins (Belt et al, 1995). Selon Laplanche et al (1992, 1993a), la présence de l'allèle *171Arg* pourrait prolonger la durée d'incubation chez les porteurs de l'allèle de susceptibilité *136Val*.

2.4. AUTRES POLYMORPHISMES DU GÈNE *PrP*

Des polymorphismes ont été mis en évidence aux codons 112 et 154 (Laplanche et al, 1992, 1993a ; Belt et al, 1995). Alors que le polymorphisme du codon 112 ne semble pas influencer l'expression de la tremblante naturelle, l'allèle *154His* pourrait être associé à un allongement de la durée d'incubation (Laplanche et al, 1993a).

3. D'AUTRES GÈNES INFLUENCENT-ILS LA SUSCEPTIBILITÉ À LA TREMBLANTE ?

Millot et al (1988) affirment avoir mis en évidence une liaison entre le complexe majeur d'histocompatibilité ovin (OLA) et la susceptibilité à la tremblante naturelle. Cette conclusion a été réfutée par Cullen (1989). Par ailleurs, une approche rigoureuse, fondée sur l'analyse de pedigrees, montre que les différences de fréquence de certains facteurs OLA observées entre les lignées Herdwick NPU sont dues à la dérive génétique et non à une éventuelle association au gène majeur de susceptibilité à la tremblante (Cullen et al, 1984).

4. INTERACTIONS ENTRE GÉNOTYPE DE L'HÔTE ET "SOUCHES" DE TREMBLANTE

Une typologie des "souches" de tremblante ovine peut être réalisée par inoculation de souris appartenant à diverses lignées. Chaque "souche", inoculée dans des conditions définies à des souris d'une lignée donnée, se caractérise par une durée d'incubation, ainsi que par des signes cliniques et histologiques spécifiques. Ces caractéristiques restent stables après plusieurs passages sur des souris de la même lignée, tant qu'on ne modifie pas la voie d'inoculation ni la dose inoculée (Bruce et Dickinson, 1987). Plusieurs souches de tremblante peuvent coexister chez le même hôte. Dans les lignées Cheviot NPU, le génotype *pApA* au locus *Sip*, résistant à la souche SSBP/1 inoculée par voie intra-cérébrale, se révèle plus sensible que les génotypes *sAsA* et *sApA* lorsque l'inoculation est réalisée avec la souche CH1641 (Foster et Dickinson, 1988b). Dans ces mêmes lignées, les animaux de génotype *136Ala/Ala* sont résistants à la souche SSBP/1, mais non aux souches CH1641 et BSE ; l'allèle *171Arg* confère une protection vis-à-vis des souches CH1641 et BSE, mais non vis-à-vis de la souche SSBP/1 ; dans ce dernier cas, il pourrait néanmoins retarder l'apparition de la maladie (Goldmann et al, 1994). Les résultats concernant la tremblante expérimentale sont-ils transposables à la tremblante naturelle ? Les observations portant sur différentes races évoluant dans des milieux géographiques divers montrent que ce sont les mêmes allèles (aux codons 136 et 171) qui sont associés à la résistance ou à la susceptibilité à la tremblante naturelle. Ceci pourrait constituer un indice en faveur de l'hypothèse d'une faible variabilité de l'agent de la tremblante naturelle.

5. L'HYPOTHÈSE DE LA MALADIE GÉNÉTIQUE

Dans les ESST humaines, il existe des formes génétiques (syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker ou GSS, insomnie fatale familiale et certains cas de la maladie de Creutzfeldt-Jakob). Des souris transgéniques pour un variant humain du gène *PrP* lié au syndrome de GSS développent spontanément une ESST (Hsiao et al, 1990), maladie dont

le caractère transmissible n'a pas été prouvé de façon certaine. Dans l'état actuel des connaissances, on ne peut donc exclure l'éventualité de formes génétiques de la tremblante ovine. Certains auteurs réactualisent l'hypothèse de la maladie génétique (soutenue initialement par Parry dans le cas de la tremblante ovine), avançant l'idée selon laquelle les ESST seraient des maladies à la fois génétiques et infectieuses (Brown et al, 1991).

6. FAUT-IL ENVISAGER UNE SÉLECTION ?

Si la "résistance" à la tremblante naturelle se caractérise, comme la "résistance" à la tremblante expérimentale, par un allongement de la durée d'incubation, il n'est pas exclu que les animaux "résistants" constituent un réservoir de

l'agent transmissible de la tremblante (ATT), représentant ainsi un danger potentiel pour d'autres ovins ou même d'autres espèces. Dans l'hypothèse où l'ATT posséderait un génome, on peut également redouter une co-évolution de l'hôte et de l'agent pathogène conduisant à une virulence accrue de ce dernier. Par ailleurs, un génotype "résistant" à une souche de tremblante pourrait se révéler sensible à une autre souche. C'est pourquoi il paraît indispensable d'acquérir des connaissances complémentaires avant de préconiser une sélection portant sur de grandes populations. Néanmoins, des opérations de sélection à caractère expérimental, limitées à quelques troupeaux, peuvent présenter un intérêt à la fois d'un point de vue pratique et fondamental.

RÉFÉRENCES

- BELT P.B.G.M., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E.C., BOS-DE RUIJTER J., GIELKENS A.L.J., SMITS M.A., 1995. *J. Gen. Virol.*, 76, 509-517
- BROWN P., GOLDFARB L.G., GAJDUSEK D.C., 1991. *The Lancet*, 337, 1019-1022.
- BRUCE M.E., DICKINSON A.G., 1987. *J. Gen. Virol.*, 68, 79-89
- BÜELER H., AGUZZI A., SAILER A., GREINER R.A., AUTENRIED P., AGUET M., WEISSMANN C., 1993. *Cell*, 73, 1339-1347
- CLOUSCARD C., BEAUDRY P., ELSÉN J.M., MILAN D., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., SCHELCHER F., CHATELAIN J., LAUNAY J.M., LAPLANCHE J.L., 1995. *J. Gen. Virol.*, à paraître
- CUILLE J., CHELLE P.L., 1938. *C.R. Acad. Sci.*, 206, 78-79
- CULLEN P.R., 1989. *Immunogenetics*, 29, 414-416
- CULLEN P.R., BROWNLIE J., KIMBERLIN R.H., 1984. *J. Comp. Pathol.*, 94, 405-415
- DAVIES D.C., KIMBERLIN R.H., 1985. *Vet. Rec.*, 116, 211-214
- DICKINSON A.G., OUTRAM G.W., 1988. In *CIBA Symposium n° 135, Novel infectious Agents and the central nervous System*. Wiley, Chichester. 63-83.
- DICKINSON A.G., YOUNG G.B., STAMP J.T., RENWICK C.C., 1965. *Heredity*, 20, 485-503
- DICKINSON A.G., STAMP J.T., RENWICK C.C., RENNIE J.C., 1968. *J. Comp. Pathol.*, 78, 313-321
- DICKINSON A.G., STAMP J.T., RENWICK C.C., 1974. *J. Comp. Pathol.*, 84, 19-25
- FOSTER J.D., DICKINSON A.G., 1988a. *Vet. Rec.*, 123, 159
- FOSTER J.D., DICKINSON A.G., 1988b. *Vet. Rec.*, 123, 5-8
- FOSTER J.D., HUNTER N., 1991. *Vet. Rec.*, 128, 548-549
- GOLDMANN W., HUNTER N., FOSTER J.D., SALBAUM J.M., BEYREUTHER K., HOPE J., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2476-2480
- GOLDMANN W., HUNTER N., BENSON G., FOSTER J.D., HOPE J., 1991. *J. Gen. Virol.*, 72, 2411-2417
- GOLDMANN W., HUNTER N., SMITH G., FOSTER J., HOPE J., 1994. *J. Gen. Virol.*, 75, 989-995
- HOARE M., DAVIES D.C., PATTISON I.H., 1977. *Vet. Rec.*, 101, 482-484
- HSIAO K.K., SCOTT M., FOSTER D., GROTH D.F., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B., 1990. *Science*, 250, 1587-1590
- HUNTER N., 1992a. In PRUSINER S.B., COLLINGE J., POWELL J., ANDERTON B. (Eds), *Prion Diseases of Humans and Animals*. Ellis Horwood Ltd, Chichester. 318-328
- HUNTER N., 1992b. In SPEEDY A.W. (Ed), *Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International. 131-151
- HUNTER N., FOSTER J.D., DICKINSON A.G., HOPE J., 1989. *Vet. Rec.*, 124, 364-366
- HUNTER N., FOSTER J.D., BENSON G., HOPE J., 1991. *J. Gen. Virol.*, 72, 1287-1292
- HUNTER N., FOSTER J.D., HOPE J., 1992. *Vet. Rec.*, 130, 389-392
- HUNTER N., GOLDMANN W., BENSON G., FOSTER J.D., HOPE J., 1993. *J. Gen. Virol.*, 74, 1025-1031
- HUNTER N., GOLDMANN W., SMITH G., HOPE J., 1994. *Arch. Virol.*, 137, 171-177
- LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., THOMAS S., DUSSAUCY M., BRUGERE-PICOUX J., LAUNAY J.M., 1992. In PRUSINER S.B., COLLINGE J., POWELL J., ANDERTON B. (Eds), *Prion Diseases of Humans and Animals*. Ellis Horwood Ltd, Chichester. 330-337
- LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., WESTAWAY D., THOMAS S., DUSSAUCY M., BRUGERE-PICOUX J., LAUNAY J.M., 1993a. *Genomics*, 15, 30-37
- LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., BEAUDRY P., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., LAUNAY J.M., 1993b. *Mamm. Genome*, 4, 463-464
- MACIULIS A., HUNTER N., WANG S., GOLDMANN W., HOPE J., FOOTE W.C., 1992. *Am. J. Vet. Res.*, 53, 1957-1960
- MILLOT P., CHATELAIN J., DAUTHEVILLE C., SALMON D., CATHALA F., 1988. *Immunogenetics*, 27, 1-11
- NUSSBAUM R.E., HENDERSON W.M., PATTISON I.H., ELCOCK N.V., DAVIES D.C., 1975. *Res. Vet. Sci.*, 18, 49-58
- PARRY H.B., 1960. *Nature*, 185, 441-443
- PARRY H.B., 1962. *Heredity*, 17, 75-105
- PARRY H.B., 1979. *Nature*, 277, 127-129
- PRUSINER S.B., 1982. *Science*, 216, 136-144
- WESTAWAY D., ZULIANI V., COOPER C.M., DA COSTA M., NEUMAN S., JENNY A.L., DETWILER L., PRUSINER S.B., 1994. *Genes and Development*, 8, 959-969