

## Souris transgéniques et modèles d'étude du virus HTLV-1

La transgénèse est couramment utilisée pour créer des modèles murins de maladies. Dans le cas des maladies virales, les souris transgéniques permettent d'identifier les tissus dans lesquels l'ADN viral peut être transcrit, les conditions d'activation ou d'inhibition de l'expression virale et les effets cytopathologiques des diverses protéines synthétisées par le virus. L'analyse des différents modèles d'étude du virus HTLV-1 permet ainsi d'affirmer que, chez la souris, la protéine Tax est oncogénique pour les fibroblastes périneuraux, mais non pour les lymphocytes T. Des effets myélogénératifs et des arthropathies sont aussi décrits, l'ensemble de ces symptomatologies étant, comme chez l'homme, assez tardives et d'incidence variable. Enfin, l'expression particulièrement élevée dans les plexus choroïdes, d'un gène traceur placé sous le contrôle transcriptionnel des séquences régulatrices d'un virus HTLV-1 isolé d'un cas de paraparésie spastique, soulève l'hypothèse de l'infection des cellules des plexus choroïdes comme voie de dissémination du virus au niveau du système nerveux central.

---

Pascale Briand

---

#### ADRESSE

P. Briand : directeur de recherche à l'Inserm. ICGM, laboratoire de recherche et pathologie expérimentales, CJF 90-03, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

**L**e virus HTLV-1 (*figure 1*), premier rétrovirus leucémogène humain [1], est responsable, dans les zones d'endémie, du déclenchement de rares formes de leucémies de l'adulte (ATL). Le virus est aussi impliqué dans la genèse de certaines maladies dégénératives chroniques affectant les systèmes musculaires et nerveux. Là encore l'incidence de ces atteintes est faible, probablement moins de 0,5 % des patients séropositifs étant, par exemple, atteints de

la plus fréquente des neuromyélopathies dégénératives associées au virus HTLV-1, à savoir la paraparésie spastique tropicale. On observe aussi, chez ces malades, une forte incidence d'arthrites rhumatoïdes, des scléroses multiples et quelques rares cas d'exocrinopathies affectant les glandes lacrymales et salivaires (syndrome de Sjögren) considérées comme étant d'origine auto-immune. La symptomatologie apparaît après une période de latence qui peut atteindre plus de vingt ans, ce qui laisse supposer que

divers agents pourraient être nécessaires, en plus de l'infection virale, pour que se développent les unes et/ou les autres de ces manifestations cliniques. Par une approche devenue aujourd'hui classique pour identifier les effets directement liés à l'expression de gènes viraux, des chercheurs américains et japonais ont, depuis quatre ans, créé des modèles de souris transgéniques exprimant une ou plusieurs protéines du virus HTLV-1, et tout particulièrement la protéine régulatrice Tax dont l'activité de transactivation sur divers gènes viraux et cellulaires était connue. L'analyse des modèles murins obtenus par transgénèse doit prendre en compte : (a) la nature des transgènes introduits, qui tous codent pour la protéine Tax mais dont certains codent aussi pour les protéines p27, p21 et Env ; (b) le niveau d'expression, la spécificité tissulaire et le moment à partir duquel s'exprime le transgène au cours du développement, facteurs qui dépendent des séquences régulatrices utilisées mais qui peuvent être modulés par le site d'intégration ; (c) les souches de souris utilisées dont peuvent dépendre les phénotypes observés. En outre, lorsque la séquence introduite code pour un facteur transcriptionnel ou un oncogène, on peut s'attendre à ce que même des niveaux d'expression extrêmement faibles, se situant en dessous des seuils de détectabilité des analyses par *Northern blot*, puissent suffire pour qu'apparaisse une symptomatologie. Enfin, l'analyse peut être compliquée par l'apparition tardive, et seulement chez un faible pourcentage des animaux, de certaines des symptomatologies. En tenant compte de ces éléments, certains des résultats à première vue contradictoires, des modèles de souris transgéniques HTLV-1, s'organisent de façon cohérente, et permettent de dégager trois types d'altérations induites par l'expression des gènes viraux.

### Induction d'un état prolifératif

Contrairement à ce que l'on observe chez l'homme, aucune prolifération lymphocytaire T ne fut obtenue dans les différents modèles de souris HTLV-1 dont les transgènes sont

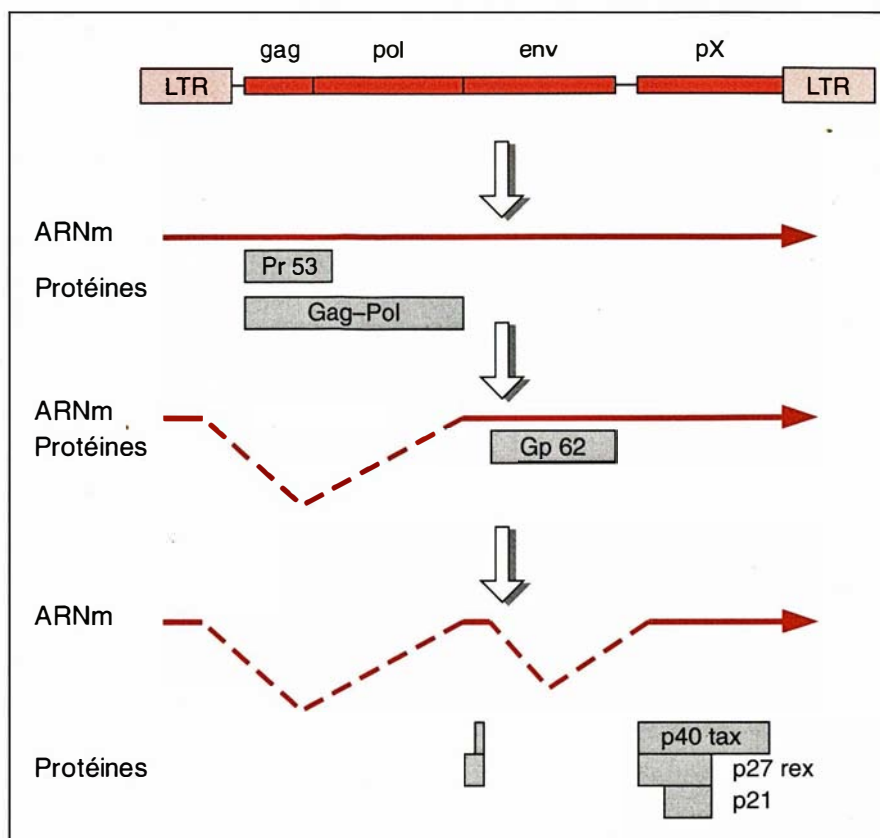


Figure 1. **Provirus HTLV-1 : messagers et protéines synthétisés.** LTR : long terminal repeat (*longues répétitions terminales*).

schématisés sur les figures 2,3 et 4 p. 210 et 211. En revanche, dans le premier modèle produit en 1987 par Nerenberg *et al.* (Bethesda, MD, USA), en micro-injectant une séquence codant majoritairement pour la protéine régulatrice Tax du virus HTLV-1, mais aussi pour la protéine p21 (figure 2 A) [2], des tumeurs mésoenchymateuses furent décrites chez des animaux exprimant le transgène essentiellement dans les muscles et la vessie. Les animaux de ces lignées développèrent des tumeurs bénignes multicentriques dont les cellules, de forme étoilée, évoquaient une origine mésoenchymateuse. Il fut ensuite précisé qu'il s'agissait de neurofibromes [3] composés de cellules périneurales et de fibroblastes, dont certains acquéraient un caractère malin, démontrant ainsi le potentiel oncogénique de la protéine Tax du virus HTLV-1. En effet, ce phéno-

type, observé chez les descendants de plusieurs fondateurs, pouvait être légitimement rattaché à l'expression de la séquence introduite. Des tumeurs de l'iris et de la surrénale furent ensuite rapportées chez certains de ces animaux (cité dans [4]) alors que chez d'autres survenait une prolifération des cellules ductales des glandes salivaires et lacrymales. Cette prolifération, suivie d'une infiltration par des cellules lymphocytaires, présentait des caractéristiques proches de celles d'un syndrome de Sjögren [5]. Ce résultat est doublement intéressant : (1) en effet, certains malades infectés par le virus HTLV-1 ont une exocrinopathie du même type, que l'on peut donc probablement rattacher à la présence du virus ; (2) le syndrome de Sjögren est classiquement considéré comme une maladie auto-immune où l'infiltrat lymphocytaire est primitif alors que, comme cela est indiqué plus haut, il est secondaire à une phase proliférative

## RÉFÉRENCES

- Gessain A, de Thè G. Virus HTLV-1, leucémies T de l'adulte et neuromyélopathies chroniques. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 471-8.
- Nerenberg M, Hinrichs SH, Reynolds RK, Khoury G, Jay G. The *tax* gene of human T lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* 1987 ; 237 : 1324-9.
- Hinrichs SH, Nerenberg M, Reynolds RK, Khoury G, Jay G. A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science* 1987 ; 237 : 1340-3.
- Green JE. Transactivation of nerve growth factor in transgenic mice containing the human T-cell lymphotropic virus type 1 *tax* gene. *Mol Cell Biol* 1991 ; 9 : 4635-41.
- Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 *tax* transgenic mice. *Nature* 1989 ; 341 : 72-4.
- Nerenberg MI, Minor T, Price J, Ernst DN, Shinohara T, Schwarz H. Transgenic thymocytes are refractory to transformation by the human T cell leukemia virus type 1 *tax* gene. *J Virol* 1991 ; 65 : 3349-53.
- Green JE, Begley CG, Wagner DK, Waldmann TA, Jay G. Transactivation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and the interleukine 2 receptor in transgenic mice carrying the human T-lymphotropic virus type 1 *tax* gene. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 4731-7.
- Nerenberg MI, Wiley CA. Degeneration of oxidative muscle fibers in HTLV-1 *tax* transgenic mice. *Am J Pathol* 1989 ; 135 : 1025-33.
- Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989 ; 59 : 1145-56.
- Allison J, Campbell IL, Morahan G, Mandel TE, Harrison LC, Miller JF. Diabetes in transgenic mice resulting from overexpression of class I histocompatibility molecules in pancreatic beta cells. *Nature* 1988 ; 333 : 529-33.

chez les souris transgéniques exprimant Tax. Peut-être ce modèle pourrait-il inciter à réévaluer le mécanisme d'apparition de certains syndromes de Sjögren ? Des neurofibromes furent aussi observés, bien que plus tardivement, chez des animaux transgéniques pour la même séquence codante mais contrôlée par les séquences régulatrices du gène *Thy-1* (figure 2B), quoique dans

ces cas la synthèse de la protéine Tax fût essentiellement thymique [6]. La symptomatologie tumorale était ici probablement due à un niveau très faible d'expression dans les cellules péri-neurales, qui seraient extrêmement sensibles à la transformation par Tax.

Les divers types cellulaires subissant une induction de la prolifération sous l'influence de l'expression du trans-

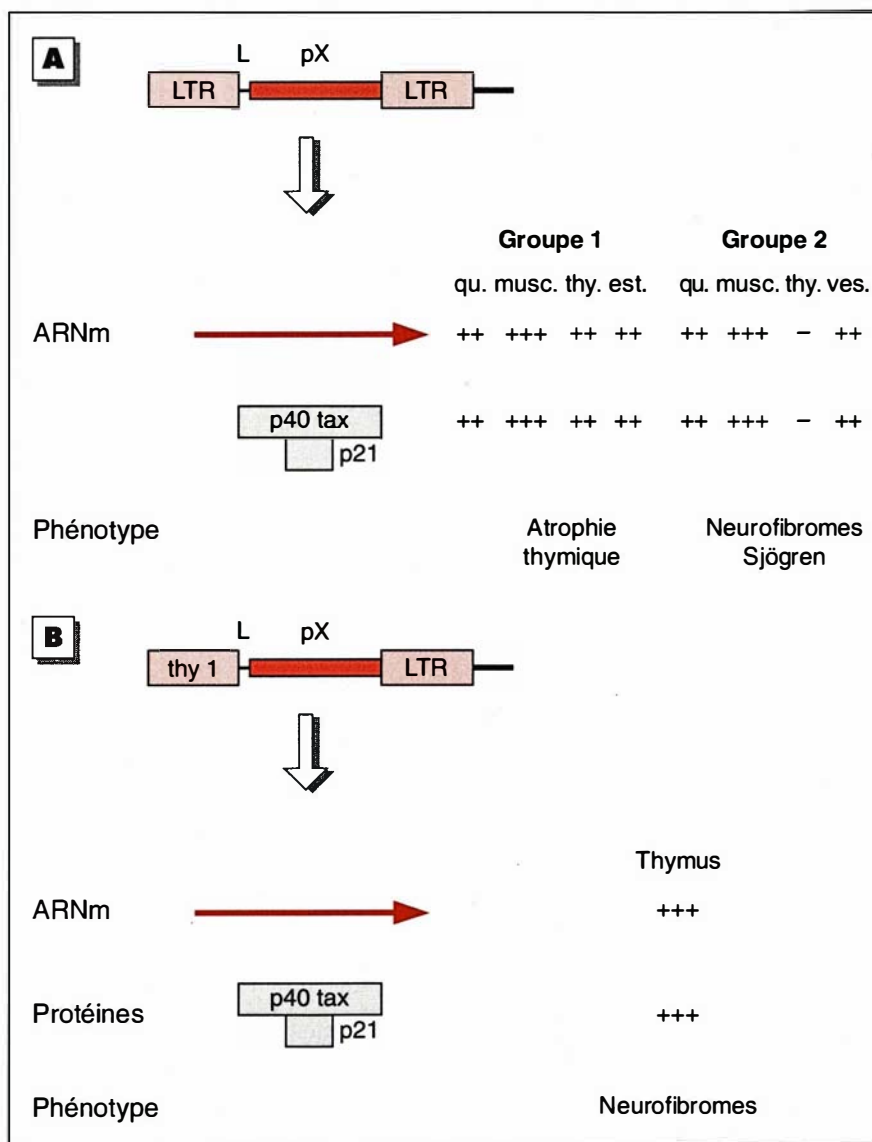


Figure 2. **Produits attendus des transgènes LTR-pX et thy-1pX et phénotypes correspondants.** A. Transgène n° 1 : la séquence LTR-pX a été injectée dans des embryons de souris C57BL/6XDBA2 F1 X CD1. Les femelles transgéniques ont ensuite été accouplées avec des mâles C57BL/6 et les mâles avec des femelles CD1. Deux phénotypes ont été obtenus (Ph 1 et Ph 2) correspondant à des profils différents de l'expression du transgène en particulier dans le thymus. Les phénotypes des deux groupes d'animaux sont indiqués sur la figure. B. Transgène n° 2 : le LTR viral en 5' a été remplacé par les séquences régulatrices du gène *thy-1*. mus : muscle ; thy : thymus ; ves : vessie ; qu : queue ; - : unité de terminaison de SV40.



gène *tax* expriment tous le facteur de croissance NGF (*nerve growth factor*), qui pourrait être impliqué dans ce processus. J. Green (Frederick, MD, USA) put de fait, mettre en évidence une expression élevée de NGF dans toutes les tumeurs étudiées [4]. Le récepteur au NGF étant aussi exprimé, on peut donc supposer que Tax pourrait activer un mécanisme autocrine en transactivant le gène *NGF* dont le promoteur comporte des éléments de réponse à la protéine. Outre l'induction du gène *NGF*, la protéine Tax transactive les gènes codant pour le GM-CSF (*granulocyte-monocyte-colony stimulating factor*) et le récepteur à l'IL-2 dans les fibroblastes des tumeurs péri-neurales [7], expliquant en particulier le recrutement massif des neutrophiles observé au niveau des tumeurs.

### Effets cytopathiques dégénératifs

A côté des syndromes prolifératifs, le virus HTLV-1 est responsable, chez l'homme, de rares dégénérescences inflammatoires musculaires. On retrouve également chez les souris LTR-*tax* (figure 2A), une atrophie des fibres musculaires oxydatives mais non accompagnée, dans ce cas, d'infiltrat lymphocytaire [8]. Il est intéressant de constater que les effets opposés de la protéine Tax selon les types cellulaires correspondent à des localisations subcellulaires différentes de la protéine, l'effet prolifératif correspondant à une localisation nucléaire alors que l'induction d'une dégénérescence est corrélée à une localisation cytoplasmique. La dégénérescence sans inflammation des fibres oxydatives pourrait être liée à un phénomène non spécifique de toxicité par surcharge en protéines transgéniques, comme cela fut décrit dans d'autres modèles [9-11], ou plus probablement à un mécanisme d'action spécifique de la protéine Tax sur la fibre musculaire. En effet, alors que la protéine n'est pas présente en quantité extrêmement abondante, on retrouve chez l'homme cet effet cytopathique sur la fibre musculaire, associée, là aussi, à une localisation cytoplasmique de la protéine [12]. Dans la plupart des modèles, une atrophie thymique est aussi rappor-

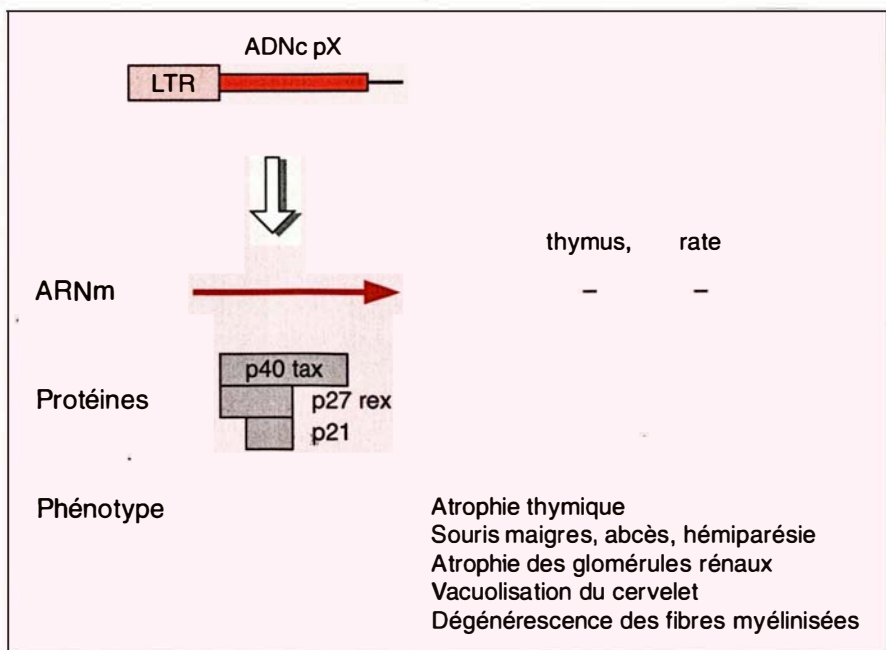


Figure 3. **Produits attendus du transgène LTR-ADNcpX et phénotype observé.** Le transgène LTR-ADNcpX a été injecté dans des embryons C57BL6XCD1 et les souris transgéniques croisées avec des animaux C57BL/6. Malgré l'impossibilité de mettre en évidence l'expression du transgène, un phénotype anormal indiqué sur la figure apparaît chez les animaux âgés de plus de huit mois. (— : unité de terminaison de SV40).

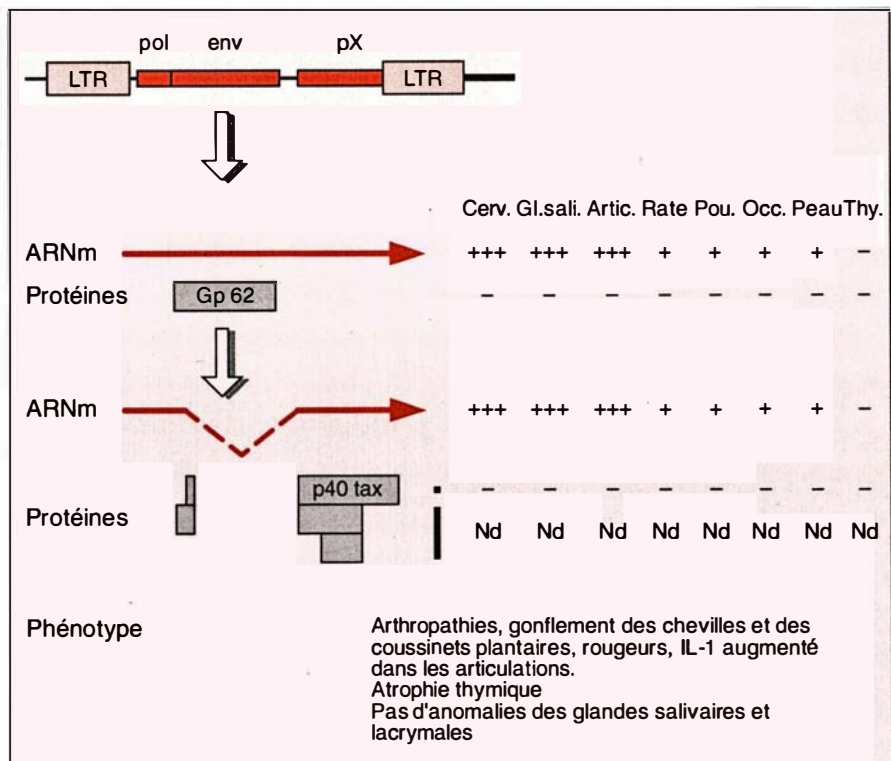


Figure 4. **Produits attendus du transgène LTRpX et phénotype observé.** Le transgène LTR pX a été injecté dans des embryons (C3H/HeNXC57BL6J) F2. Le profil d'expression dans les différents tissus est indiqué sur la figure. Nd : non déterminé ; Cer : cerveau ; Gl sali : glandes salivaires ; Artic : articulation ; Pou : poumons ; Occ : globes oculaires ; Thy : thymus.

## RÉFÉRENCES

11. Yoshioka T, Feigenbaum L, Jay G. Transgenic mouse model for central nervous system demyelination. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 5479-86.
  12. Wiley CA, Nerenberg M, Cros D, Soto-Aguilar M. HTLV-1 polymyositis in a patient also infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 992-5.
  13. Furuta Y, Aizawa S, Suda Y, *et al.* Thymic atrophy characteristic in transgenic mice that harbor pX genes of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 1989 ; 63 : 3185-9.
  14. Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, *et al.* Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-1. *Science* 1991 ; 253 : 1026-8.
  15. Gonzalez-Dunia D, Grimber G, Briand P, Brahic M, Ozden S. Expression pattern directed by the LTR of an HTLV-1 provirus isolated from a case of tropical spastic paraparesis. *Virology* 1992 (sous presse).
  16. Leonard JM, Abramczuk JW, Pezen DS, *et al.* Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing HIV proviral DNA. *Science* 1988 ; 242 : 1665-70.
  17. Vogel J, Hinrichs SH, Reynolds RK, Luciw PA, Jay G. The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 1988 ; 335 : 606-11.
  18. Dickie P, Felser J, Eckhaus M, *et al.* HIV associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes. *Virology* 1991 ; 185 : 109-19.
  19. Bothe K, Aguzzi A, Lassmann H, Rethwilm A, Horak I. Progressive encephalopathy and myopathy in transgenic mice expressing human foamy virus genes. *Science* 1991 ; 253 : 555-7.
- tée. Ainsi, chez les animaux qui portent des transgènes codant pour les protéines Tax, p21 et p27 [2, 10, 13], on observe cette symptomatologie, que l'expression soit dirigée par les LTR viraux du HTLV-1, du MMTV, ou le *enhancer* des immunoglobulines. Cette atrophie se manifeste même lorsque les niveaux d'expression des transgènes sont en dessous des seuils de détectabilité [10,13]. L'une des explications proposées est que les cellules exprimant le transgène auraient été rapidement éliminées. En revanche, le ciblage par les séquences *thy-1* des protéines Tax et p21 dans les thymocytes (*figure 2B*) ne provoque aucune altération du thymus [6] alors que ces mêmes protéines exprimées fortement dans le thymus grâce aux séquences régulatrices viraux (LTR) (*figure 2A*) provoquent une atrophie massive de cet organe, entraînant la mort précoce des animaux [2]. Des études complémentaires permettant de comparer les cellules exprimant les transgènes LTR-*pX* et *Thy-1-pX*, et le moment au cours du développement à partir duquel ils s'expriment, seraient nécessaires pour pouvoir interpréter correctement ces résultats. Enfin, des atrophies des glomérules rénaux et des vacuolisations au niveau du système nerveux central, particulièrement dans le cervelet, ont aussi été rapportées. Dans tous ces cas, il serait intéressant de déterminer si, comme dans la fibre musculaire, l'effet dégénératif est corrélé à une localisation cytoplasmique de la protéine Tax.

### Induction d'arthropathies

Iwakura *et al.* (Kawasaki, Japon) utilisèrent, plus récemment, un transgène codant pour la protéine d'enveloppe Gp62, les protéines p27rex, p21 et Tax. L'expression des deux ARN transgéniques (*figure 4*) fut détectée dans la rate, le cerveau, le rein, le poumon, les globes oculaires, les glandes salivaires, le muscle, la peau et les articulations [14]. L'expression élevée dans les articulations fut corrélée à l'apparition d'une arthrite inflammatoire [14]. Ce résultat prend toute son importance si l'on considère la très forte incidence d'arthrite chronique chez les patients infectés,

atteints de paraparésie spastique. Chez les animaux les plus atteints, les modifications histopathologiques sont très proches de celles observées dans les arthrites rhumatoïdes humaines : prolifération synoviale associée à une stratification des cellules bordantes, dégénérescence des cartilages... Dans un faible pourcentage des animaux transgéniques, la présence de facteur rhumatoïde ou d'anticorps anti-ADN, corrélée dans ce dernier cas à une symptomatologie très sévère, a été observée. En revanche, aucun anticorps dirigé contre les antigènes viraux n'est détecté. Il semble donc peu probable qu'une réaction immunitaire dirigée contre les cellules exprimant le transgène soit à l'origine de la symptomatologie. La présence de quantités élevées de messagers codant pour la protéine de régulation Tax du virus dans les cellules synoviales et l'activité transactivatrice de cette protéine sur un certain nombre de gènes cellulaires (IL-2, GM-CSF) [7] permettent de suggérer que, *via* l'activation de cytokines, elle pourrait induire l'inflammation et la destruction des articulations. Il n'est pas exclu que la protéine d'enveloppe codée par le transgène puisse aussi jouer un rôle dans l'apparition de la symptomatologie articulaire.

### Spécificité tissulaire conférée par les séquences régulatrices HTLV-1

A côté des études visant à préciser les effets cytopathogènes des protéines viraux, la transgénèse permet d'analyser la spécificité tissulaire conférée par les séquences régulatrices d'un virus. Des divers modèles que nous avons décrits, il ressort que les LTR (*long terminal repeat*) HTLV-1 utilisés peuvent contrôler une expression transcriptionnelle dans de nombreux tissus (*voir figures 2, 3 et 4*). Un modèle supplémentaire vient d'être créé par D. Gonzalez-Dunia *et al.* (laboratoire de Michel Brahic, Institut Pasteur, Paris). Le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase (*lac-Z*) a été placé sous la dépendance d'un LTR viral isolé à partir d'un patient atteint de paraparésie spastique tropicale (PST). Dans les trois lignées de souris transgéniques obtenues, le trans-

gène est exprimé de façon prédominante dans le système nerveux central (plexus choroïdes, hippocampe et cervelet) [15]. Cette spécificité pouvant être importante dans la pathogénie des PST, il serait intéressant de savoir si l'infection des cellules des plexus choroïdes par HTLV-1 peut constituer une voie de dissémination du virus au niveau du système nerveux central.

En conclusion, les lignées de souris transgéniques exprimant les protéines Tax et p21 — seules ou associées aux protéines p27rex et Gp62 du virus HTLV-1 —, ne constituent pas des modèles des leucémies à cellules T de l'adulte. En revanche, on peut observer avec une plus ou moins forte incidence, en fonction des niveaux et des lieux d'expression des divers transgènes, des anomalies prolifératives et dégénératives respectivement corrélées à une localisation nucléaire ou cytoplasmique de la protéine Tax, localisation cytoplasmique retrouvée comme nous l'avons mentionné plus haut dans des fibres musculaires dégénératives humaines [8]. Les modèles murins pourraient donc permettre de comprendre comment s'effectue la compartimentation sub-cellulaire et quelle est la relation avec le déclenchement soit de mécanismes de prolifération, qui n'impliquent qu'une partie des cellules exprimant Tax dans le noyau, soit de mécanismes de dégénérescence qui semblent affecter l'ensemble des cellules musculaires oxydatives. Les modèles murins apportent aussi la preuve que, *in vivo*, la protéine Tax peut transactiver un certain nombre de gènes cellulaires (NGF, IL-2, GM-CSF) dont l'hyperexpression est donc directement liée à la présence du virus et peut expliquer certaines particularités cliniques. Enfin, comme chez l'homme infecté, la latence et la faible incidence de certaines des symptomatologies (arthropathies, évolution vers la tumeur maligne neurofibromateuse, exocrinopathies) sont des caractéristiques communes aux différentes souris transgéniques HTLV-1, qui offrent donc la possibilité d'étudier ces propriétés essentielles des rétrovirus humains.

Il faut aussi souligner que les effets oncogéniques et dégénératifs décrits ci-dessus peuvent être rapprochés de

ceux provoqués dans divers tissus par l'expression chez la souris de séquences appartenant à d'autres rétrovirus humains, qu'il s'agisse du virus HIV-1 [16-18] ou du virus Foamy [19] ■

## Summary

### Transgenic mice and HTLV-1 induced disease

Transgenesis is now frequently used to create animal models of human diseases. In the special case of viral diseases, transgenic mice allow to identify the tissue specificity of the expression directed by the regulatory sequences of the virus, the factors able to activate or inactivate the viral expression and the cytopathological effects of each viral protein. For HTLV-1, the different transgenic mice carrying part of viral genome has lead to the conclusion that the Tax regulatory protein was oncogenic and was able to induce arthropathies and myelodegenerative disorders. These symptomatologies, also observed in human, are late and of variable incidence. Finally, a reporter gene controlled by the long terminal repeat of a virus isolated from a case of tropical spastic paraparesis (TSP), was found to be highly expressed in choroïd plexus. This specificity might be of importance in the pathogenesis of this disease. Indeed the infection of the choroid plexus could constitute a dissemination way for the virus toward the central nervous system.

## TIRÉS A PART

P. Briand.