



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 11740

To cite this version :

Fages Julien. *Les répercussions oculaires des maladies à prions expérimentales et spontanées chez l'animal*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 119 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

LES REPERCUSSIONS OCULAIRES DES MALADIES A PRIONS EXPERIMENTALES ET SPONTANÉES CHEZ L'ANIMAL

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

FAGES Julien

Né, le 7 juin 1989 à RODEZ (12)

Directeur de thèse : M. REGNIER Alain

JURY

PRESIDENT :

M. Pierre FOURNIE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :

M. Alain REGNIER

M. Jean SAUTET

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. Alain MILON

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

Remerciements

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre FOURNIE,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Ophthalmologie

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Alain REGNIER,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiopathologie oculaire

Qui nous a guidé et conseillé dans l'élaboration de ce travail,
Qu'il trouve ici toute l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Jean SAUTET,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,
Qu'il trouve ici nos sincères remerciements et toute notre reconnaissance.

Au Docteur Jean-Yves DOUET,

Pour son aide précieuse à la réalisation de ce travail et sa grande disponibilité
Sincères remerciements.

A mes parents,

Dédicaces

A ma famille, véritable port pour le marin que je tâche d'être,

A mes parents, pour m'avoir toujours soutenu, cru en moi et m'avoir permis de réussir ce que j'ai entrepris. Je sais tout ce que je vous dois. **A ma mère**, pour ta patience, ton attention, ton soutien moral inconditionnel, pour ta présence pendant le concours et tout ce que tu as assuré avant et même après. **A mon père**, pour tout ce que tu bâtis et représentes, pour ton analyse juste en toutes circonstances, pour tous ces concours où tu m'as accompagné, pour toutes nos sorties VTT. **A ma sœur**, ma belle poulette, parce que Little Jack est devenue grande. Je serai toujours là pour toi. Je vous aime,

A mes grands-parents, à mon papi, toi qui m'as tant appris et inculqué la soif de savoir, **à ma mamie Popo**, pour ton soutien sans faille et ta gentillesse éternelle, **à mamie Aline et papi André**, pour votre accueil toujours bienveillant,

A mes oncles et à mes tantes, à Sylvie et Thierry, pour tous vos supers plans voyages, **à Seb et So**, pour ces fins d'après-midi à parler de tout et de rien, **à Gérard et Françoise**, pour votre attention et votre soutien, **à Joël et Joëlle**, pour votre sympathie,

A mes cousins, à Alex, sacré couze, pour toutes celles qu'on a fait ensemble et toutes celles à venir, **à Maxou**, pour ton imperturbable gentillesse, **à Thomas, Axel, Mathis et Raphaël** vrais petits phénomènes en devenir, parce que je ne vous vois pas autant que j'aimerais,

A mes amis,

A mes frères Miramariens, qui ont bien failli se retrouver dans la section précédente, **à Jérem**, dit Le Gitan, toujours plus complice de toujours, **à Bastaro** dit La Bastarde, pote d'or à Melun en 92, **à Wawan** dit la Chotasse, du trèfle power au sécateur c'est toi le meilleur, **à Langeois**, dit Saint-Denis, des barrières aux nuits blanches on fait pas le poids, à The Fat dit **Legros**, pour ta légendaire lourdeur contagieuse. A ces trois merveilleuses années, désormais inoubliables, qu'on a partagées et durant lesquelles vous avez dû supporter mon tænia et ma passion culinaire. Aux années à venir,

A Edouard, vieux frère de la première heure, pour cette amitié incomparable que les kilomètres et les années n'usent pas, **à Pilou**, fidèle ami au poing rageur imprécis, **à Béber**, en hommage aux pingouins rouges et tout ce qu'ils représentent finalement. J'espère toujours qu'un jour nous repartirons en vacances tous les quatre,

A la Sainte Marie Team, synonyme de vacances réussies, **à Marine**, Miss Favourite, pour ta grande gueule, ta présence, tes plans en or et tous ces fous rires, **à Claire**, pour ta bonne humeur, ta légèreté et pour toujours être là dans les moments difficiles, **à Marine**, pour ta joie communicative, **à Manon**, pour toutes ces pépites que tu nous distille et dont on se régale, **à Marie**, pour ton jeu d'acteur légendaire, **à Sophie**, kékette officielle, **à Myriam**, pour ton amour de la mousica et des brumes d'oreillers de l'espace, **à Chouchounet**, pour ton flegme conciliateur et ta descente de pâtes à faire

pâlir toute l'Italie, à **Thibault**, pour toutes ces soirées de folie, pour cette initiation à la chute libre et pour ces futures virées en Z4,

A Hélène, la Lucky Luke du stylo bic, la maîtresse qu'on a malheureusement jamais eue, à **Arnaud**, futur prof le jour et boysband la nuit, roi des quizz du Dispensary à ses heures,

Aux Blédards, éternels envieux, aux excellents hôtes qu'ils sont, à **Guitou** la Machine, le noir roux, parce que t'es vraiment un mec « soin », à **Toinou**, tacleur au grand cœur, à **Salim**, pour ta tentative vaine de dévaliser MacDo chaque fois que tu y vas, à **Hugo**, pour tes séances documentaires du samedi soir que tu animes avec brio et pour ton récent amour du calva,

Aux Pin-ups de la Chatterie, à **Soso** la Zouczouc, pour ton rire communicatif même en pleine nuit, pour t'avoir fait découvrir cette coutume désormais célèbre, à **Marie**, pour ton amour légendaire des olives et ton mimétisme des lamas, à **Mymy**, pour ces nuits toulousaines et notre année à l'AFVACjr, à **Maylis**, pour tes rhums arrangés qualité coco,

A Cuquos, sacré bon vieux Cuquemelle, parce que tu es simplement un mec en or, pour tous les services que tu nous as rendus durant ces cinq ans, pour ton accueil dans cette Normandie que tu chéries à juste titre,

A Flo, dit le spoiler en chef, pour toutes tes vanes sur les belges dans l'espoir de nous faire oublier que t'es ch'ti,

A Vincent, l'Alforchien converti, pour ton goût partagé des bières autrichiennes, je te souhaite bon courage pour ta résidence

A tous ceux de **la promo Trouillet** avec qui j'ai partagé plus que 5 années,

A cette tribu qu'on nomme **le Jungle**, à Flo dit **Chauveiiii-oux**, partenaire de thèse, hommage à son coiffeur, à **Dodie**, en souvenir de ces semaines à la Madeleine, à **Delphine**, dit l'Usain Bolt blonde, à **Fanny**, et sa paire de tongues, à **Samuel**, et sa romance avortée avec Pica Pica, à **Sarah**, à **Clément**, pour ses buffets de chefs,

A Diane, notre Loana à nous, à **Simon**, pour ton accent qui me chante le pays, à **Brugel**, l'incassable, à **Darty**, l'homme-short, à **Chloé**, la nudiste occasionnelle de fin de boom, à **Camille**, à **Emilie**, pour tous ces bons souvenirs de congrès et de confs, à **Aurélien**, à **Jennifer**, à **Tifenn**, à **Dédé**, à **Julie**, à **Lucien**, à **Claudia**, à **Pauline**, à **Claire**, à **Bibo**, **Sandra**, **Marion** et **Maëlle**, pour votre raffinement et votre délicatesse,

Aux nouveaux Miramariens, à **Girbal** le bel poulot, le pilier du Royal's, à **Condemine** le rider au nez d'acier, à **Mika** le rugbyman, à **Perrin**, le bar-man soliiiiide. Je sais que vous prendrez soin de cette noble demeure.

Aux poulots, pour ces brimades inoubliables, à **Ptit Bastaro**, hommage à ta carrière de rappeur, à **Fab la Bagarre**, et son imitaion du Wawan national, à **Soulié**, qui assure seul les 50% du chiffre d'affaire annuel de Paul Ricard, à **Autuoro**, le musicos posé, à **Bassine**, et nos discussions de coin de bar, à **Vincent**, l'ami des poules, à **Flavie** notre beurette adorée, pour sa tentaive râtée de m'assassiner, à **Bracquemaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaard**, à **Alma**, la danseuse rousse, à **Salomé**, l'infatiguable, à **Caro** et ses siestes en clandesté, à **Mathilde**,

membre émérite du toujours plus, à **Marine**, et ses tartelettes bio, à **Chloé et Gadenne**, partenaires de vos boomettes

A Burger, pour tout ce que tu entreprends à 400%, pour ce club magnifique que tu as monté, j'ai nommé **le VAC**

A Griffeuille, la Mini-Griffe, à **Carlac** le Roux, à **Serrand** le modeste, à **Patard** la gâchette, à **la Chatte** le bridé, pour croire qu'ils sont bons au ping-pong. **A the Master**, pour capturer l'instant présent, à **Albert'**, le clandestin monégasque,

Aux jeunes docs, à **JB**, l'amoureux des morts-vivants, à **Hirsch**, le jacky-tunning, à **Jeff**, le sage, à **Malek**, ce grand farceur, à **Moreau**, le taureau landais, à **Adjo**, paix à ses yeux, à **Piiiiiiiiii-er'**, à **Thomas** dou braasiil, à **Yanis**, le rameur, à **H**, le fin du fin, à **Anaïs**, pour ces souvenirs de prépa, à **Fanny et Morgane**, les pouffes équines, à **Chloé**, la relève de l'AFVAC et de la dentisterie,

A Julie et Caro, pour ces samedis soirs d'anthologie,

A Paul et Franck, ou Franck et Paul je sais plus, pour votre folie et votre disponibilité en clinique,

Aux vieux, à **Nico le Belge**, à **Bala**, à **Françou**, à **Greg**, à **Ximun**, à **Perrin**, à **Bodow**, à **Trnka**, à **Rou**, à **Muhlac**, à **Leroy**, à **Charroin**, à **Andraud**, à **Cheyland**, à **Bla**, à **Aude**, à **Soaï**, à **Agnès**, à **Marine**, à **Pauline**, à **Elodie**, à **Lili**, à **Léa**, à **Amandine**, à **Annabelle**, pour toutes ces soirées et weekends d'intellectuels,

Aux vieux Miramariens, à **Gued**, la blonde moustache, à **Fixou**, la panse rousse, à **Mumu**, l'aveyronnais, à **Zézette** aux grandes oreilles et à la bonne maman, à **Martichou** et son Get de papy, pour tout ce qu'ils nous ont inculqué et que nous sommes fiers de transmettre,

A mes docs, pour ces brimades mémorables et tout ce qui a suivi, à **Gaston**, à **Ed' la Menace**, à **Bep**, à **Evence**, à **Pinpin**, à **Laz'**, à **Michou**, à **Trappou**, à **Lulu**, à **Matthieu**, à **Tata Lolo**, à **Fraselle**, à **la Pince**, **Fauchon**, à **Julie**, à **Claire**,

A Marion, dit Didier Big Boule, et à **Thomas**, le Parmentoché, pour tout ce qu'on a vécu durant ces 4 mois au Québec et tout ce qui est à venir,

A Romain, pour m'avoir si bien accueilli en bon toulousain au Québec, pour tout ce que tu as fait et pour toutes ces soirées d'exilés ; bon courage pour cette dernière année,

A Laetitia, pour tout ce qu'on a vécu ensemble et que je n'oublierai pas,

A mes maîtres de stages, à **Christian** qui m'a initié et m'a toujours reçu royalement, à **Guy**, pour m'avoir enseigné avec passion les bases de la dentisterie des carnivores domestiques, à **Romain**, pour ta disponibilité, ta sympathie et tout ce que tu m'as appris, à **Thomas**, pour ton accueil inoubliable durant tout ce mois à Lapalisse et ton enseignement de l'art des césariennes façon Indiens,

A Monsieur Andriot, pour avoir marqué ma scolarité et pour tout ce que vous représentez,

A Monsieur Regnier, pour votre grande disponibilité malgré des délais difficiles, pour l'enseignement que vous nous avez dispensé,

A Jean-Yves Douet, pour ta sympathie, pour tes corrections à 3h du matin, pour ta pédagogie et pour être à l'origine de ce projet,

A MIRAMAR, la seule, l'unique. Vieille dame bienveillante, gardée par une vieille dame qui vieillit mal, cette bâtisse érigée en l'an de grâce 1726 par le comte Langeois de Saint Denis est toujours une référence en terme d'insonorisation. Equipée d'une mezzanine à manouche mal huilée, d'un escalier avec détecteur de Belge lourd, d'une cuisine où les premières carbo d'or furent servies en 92 et d'un écran LED dolby surround trônant dans un salon où le king de Mario-kart s'exerce en mode miroir et où les plus indésaouls se réveillent (même s'ils n'ont pas dormi) en regardant Youpi matin, cette demeure puise sa force dans les festins quotidiens que l'on y sert, rythmés par de nombreuses bas-tarades et autres calembours de toujours plus. Longue vie à toi, on te laisse entre de bonnes mains,

A l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, cette belle Ecole.

Table des matières

Liste des enseignants.....	p.2
Remerciements.....	p.4
Dédicaces.....	p.6
Table des matières.....	p.10
Liste des abréviations.....	p.13
Liste des figures.....	p.14

INTRODUCTION.....	p.15
-------------------	------

I. GENERALITES SUR LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES.....	p.17
--------------------------------------------------------------------------	------

I.1. Historique.....	p.17
-----------------------------	-------------

I.2. Les caractéristiques communes aux encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines et animales.....	p.18
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------

I.3. Les prions.....	p.20
-----------------------------	-------------

<i>I.3.1. Définition.....</i>	<i>p.20</i>
-------------------------------	-------------

<i>I.3.2. La PrPc.....</i>	<i>p.20</i>
----------------------------	-------------

<i>I.3.3. Les PrPsc.....</i>	<i>p.23</i>
------------------------------	-------------

<i>I.3.4. La conversion conformationnelle de PrPc en PrPsc.....</i>	<i>p.25</i>
---------------------------------------------------------------------	-------------

<i>I.3.5. L'accumulation de PrPsc et la formation de substance amyloïde.....</i>	<i>p.26</i>
----------------------------------------------------------------------------------	-------------

<i>I.3.6. la notion de souches de prions.....</i>	<i>p.27</i>
---------------------------------------------------	-------------

<i>I.3.7. la notion de barrière d'espèce.....</i>	<i>p.28</i>
---------------------------------------------------	-------------

I.4. La pathogénie des maladies à prions.....	p.29
------------------------------------------------------	-------------

<i>I.4.1. La transmission des maladies à prions.....</i>	<i>p.29</i>
----------------------------------------------------------	-------------

<i>I.4.2. De la protéine PrPsc à la pathologie cellulaire.....</i>	<i>p.31</i>
--------------------------------------------------------------------	-------------

<i>I.4.3. La sensibilité de l'hôte est influencée par son génome.....</i>	<i>p.33</i>
---------------------------------------------------------------------------	-------------

I.5. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales.....	p.33
----------------------------------------------------------------------------	-------------

<i>I.5.1. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales spontanées.....</i>	<i>p.33</i>
-----------------------------------------------------------------------------------------	-------------

1.5.1.1. La tremblante.....	p.34
1.5.1.2. L'encéphalopathie spongiforme bovine.....	p.36
1.5.1.3. La maladie du dépérissement chronique des cervidés.....	p.39
1.5.1.4. L'encéphalopathie transmissible du vison.....	p.41
1.5.1.5. L'encéphalopathie spongiforme féline.....	p.42
1.5.1.6. L'encéphalopathie des ongulés exotiques.....	p.43
1.5.2. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales expérimentales.....	p.43
I.6. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines.....	p.43
I.7. Perspectives thérapeutiques des maladies à prions.....	p.44
II. PREREQUIS NECESSAIRES A L'ETUDE DE L'ATTEINTE OCULAIRE DES MALADIES A PRIONS.....	p.46
II.1. La rétine des mammifères.....	p.46
II.1.1. Un organe multicellulaire très organisé.....	p.46
II.1.2. Les différentes couches rétiniennes.....	p.47
II.1.3. Le concept de « rétine inversée »	p.50
II.1.4. Les cellules de la neurorétine.....	p.50
II.1.4.1. Les différents types cellulaires de la neurorétine.....	p.50
II.1.4.2. Les marqueurs protéiques spécifiques des cellules rétiniennes.....	p.52
II.2. Méthodes diagnostiques et techniques expérimentales fréquemment utilisées dans les études concernées.....	p.53
II.2.1. Le diagnostic lésionnel histologique.....	p.53
II.2.2. Le bio-essai.....	p.54
II.2.3. La recherche de PrPsc.....	p.55
II.2.3.1. L'immunohistochimie.....	p.55
II.2.3.2. Le Western-Blot.....	p.56
II.2.3.3. Les tests ELISA.....	p.57
II.2.3.4. Le Paraffin Embeded Tissue Blot.....	p.58
II.2.4. L'électrorétinographie.....	p.59

III. LES REPERCUSSIONS OCULAIRES DES MALADIES A PRIONS.....	p.62
III.1. Les premières découvertes.....	p.62
III.2. Les résultats de l'examen ophtalmologique lors des maladies à prions chez l'animal.....	p.63
<i>III.2.1. L'examen de la fonction visuelle.....</i>	<i>p.63</i>
<i>III.2.1.1. Eléments de réponse chez l'animal.....</i>	<i>p.63</i>
<i>III.2.1.2. Mise en parallèle avec les données disponibles chez l'Homme.....</i>	<i>p.64</i>
<i>III.2.2. L'examen des structures oculaires.....</i>	<i>p.65</i>
III.3. La localisation des prions dans l'oeil.....	p.66
III.4. Aspects histologiques, immunohistochimiques et électrorétinographiques des rétino-	
pathies lors de maladies à prions chez l'animal.....	p.67
<i>III.4.1. Lors de tremblante.....</i>	<i>p.67</i>
<i>III.4.1.1. inoculée à des modèles murins.....</i>	<i>p.67</i>
<i>III.4.1.2. chez les petits ruminants.....</i>	<i>p.76</i>
<i>III.4.2. Lors d'encéphalopathie spongiforme bovine.....</i>	<i>p.84</i>
<i>III.4.3. Lors de maladie du dépérissement chronique des cervidés.....</i>	<i>p.87</i>
<i>III.4.4. Lors d'encéphalopathie transmissible du vison.....</i>	<i>p.88</i>
<i>III.4.5. Lors d'encéphalopathie spongiforme des félins.....</i>	<i>p.89</i>
III.5. La spectroscopie de fluorescence : une méthode diagnostique indirecte ?.....	p.89
III.6. La pathogénie des maladies à prions au niveau oculaire	p.92
<i>III.6.1. La dissémination des prions du cerveau à la rétine.....</i>	<i>p.92</i>
<i>III.6.1.1. via le nerf optique ?</i>	<i>p.92</i>
<i>III.6.1.2. une éventuelle infectiosité cornéenne ?</i>	<i>p.94</i>
<i>III.6.2. Les hypothèses concernant le rôle pathogène des prions au sein de l'œil.....</i>	<i>p.95</i>
CONCLUSION.....	p.97
BIBLIOGRAPHIE.....	p.99

Liste des abréviations

EST : encéphalopathies spongiformes transmissibles
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
MCI : maladie de Creutzfeldt-Jakob
(n)vMCI : (nouveau) variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
GSS : Gerstman-Straussler-Scheinker
IFF : insomnie fatale familiale
ESB : encéphalopathie spongiforme bovine
MDC : maladie du dépérissement chronique
ETV : encéphalopathie transmissible du vison
ESF : encéphalopathie spongiforme des félins
PrPc : protéine prion cellulaire
PrPsc : conformère anormal de la protéine prion
PrPc^{wd} : conformère anormal de la protéine prion lors de MDC (CWD en anglais)
PrP^{me} : conformère anormal de la protéine prion lors d'ETV (TME en anglais)
PK : protéinase K
GPI : glycosyl phosphatidyl inositol
KO : knock-out
SAF : fibrilles associées à la tremblante
GALT : tissu lymphoïde associé au tube digestif
PP : plaques de Peyer
FDC : cellules folliculaires dendritiques
RPE : épithélium pigmenté rétinien
PS : couche des photorécepteurs
ONL : couche nucléaire externe
OPL : couche plexiforme externe
INL : couche nucléaire interne
IPL : couche plexiforme interne
CG : cellules ganglionnaires
GFAP : protéine acide fibrillaire gliale
PKC α : isoforme α de la protéine kinase C
GS : glutamine synthase
VGLUT1 : protéine de transport vésiculaire du glutamate de type 1
ChAT : choline acétyltransférase
MAP2 : protéine associée aux microtubules de type 2
IHC : immunohistochimie
WB : western blot
PET-Blot : paraffin embeded tissue blot
ELISA : méthode immuno-enzymatique
ERG : électrorétinogramme
MPI : mois post inoculation

Liste des figures

Figure n°1a : Représentation schématique des caractéristiques biochimiques de la protéine prion humaine

Figure n°1b : Structure obtenue par résonance magnétique nucléaire de la PrPc recombinante de hamster

Figure n°2 : Modélisation de la structure du monomère PrP²⁷⁻³⁰.

Figure n°3 : Les voies de propagation du prion vers le SNC après une contamination périphérique.

Figure n°4a : Schéma de l'organisation simplifiée de la rétine.

Figure n°4b : Schéma d'un bloc en 3 dimensions de rétine.

Figure n°4c : Coupe histologique de rétine de brebis saine colorée à l'hématoxyline-éosine

Figure n°5 : Coupe histologique de cerveau d'un patient humain décédé de la vMCI, observée au microscope optique, coloration hématoxyline-éosine.

Figure n°6 : Typage biochimique des EST par Western Blot.

Figure n°7 : Coupe de cervelet et de tronc cérébral de souris expérimentalement inoculées par la tremblante (A), par l'ESB (B) ou témoins (C) et analysées par PET-Blot.

Figure n°8 : Mesure de l'amplitude (a) et des temps de culmination (t) des ondes-a et -b d'un ERG.

Figure n°9a : Réalisation d'un ERG sur une brebis anesthésiée.

Figure n°9b : Electrorétinogramme physiologique chez une brebis saine.

Figure n°10 : Fond d'œil d'une des deux brebis de Barnett & Palmer (1971).

Figure n°11 : Fond d'œil d'une brebis infectée par la tremblante.

Figure n°12 : Coupe histologique de rétine d'hamster inoculé expérimentalement par la tremblante et réalisée à 50 jours post-inoculation. Observation au microscope optique, grossissement x400, à l'immersion.

Figure n°13 : Electrorétinogrammes de souris expérimentalement infectées par la tremblante.

Figure n°14 : Coupes histologiques de rétine de souris inoculées expérimentalement par la tremblante. Observation au microscope optique, grossissement x260.

Figure n°15 : Coupes histologiques avec immunomarquage de la PrPsc de rétine de hamsters inoculés par voie intracérébrale par la souche de tremblante 263K. Observation au microscope optique, grossissement x400.

Figure n°16a : Coupes histologiques de rétines de brebis naturellement infectée par la tremblante. Observation au microscope optique, l'échelle correspond à 100µm.

Figure n°16b : Coupes histologiques de rétines de brebis naturellement infectée par la tremblante, avec immunomarquage de la PrPsc à gauche et de la GFAP à droite. Observation au microscope optique.

Figure n°17 : Electrorétinogrammes en réponse à des flashes de lumière bleue sur des yeux adaptés à l'obscurité d'une brebis atteinte de tremblante naturelle et présentant des signes cliniques (à gauche) et d'une brebis saine (à droite).

Figure n°18 : Schéma de la formation de lipofuscine à partir des segments externes des bâtonnets dans le RPE

INTRODUCTION

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) également appelées maladies à prions constituent une famille de maladies neurodégénératives affectant un grand nombre de mammifères. Contagieuses, elles sont considérées comme des zoonoses car elles présentent un danger de mortalité pour l'homme.

Ces maladies se caractérisent par une longue période d'incubation asymptomatique, suivie d'une phase clinique conduisant progressivement et systématiquement vers la mort. L'examen post-mortem du système nerveux central, seul moyen diagnostique de certitude actuel, révèle une triade lésionnelle caractéristique : spongieuse, perte neuronale et gliose astrocytaire. De telles lésions histologiques sont liées à l'accumulation d'un isoforme anormal de la protéine prion PrP^{sc}, découlant de changements conformationnels de la protéine cellulaire PrP^c.

Le système nerveux central (SNC), ainsi que la rétine, constituent les sites principaux de répllication des prions et de localisation des lésions.

Ces dernières années, et suite notamment à la crise de la vache folle, les recherches portant sur ces neuropathies ont été très nombreuses, ce qui a permis d'augmenter considérablement les connaissances à propos des maladies à prions. L'enjeu est bien évidemment de taille puisqu'il s'agit entre autres de mieux comprendre les mécanismes impliqués, de mettre au point des méthodes de diagnostic *ante mortem* et d'envisager des solutions thérapeutiques.

De telles avancées sont également très attendues pour progresser dans la prise en charge d'autres maladies neurodégénératives, qualifiées par certains auteurs de maladies « *prions-like* », telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou les tauopathies. En effet, bien que ces dernières ne possèdent pas de caractère infectieux, la pathogénie de ces maladies repose initialement sur une agrégation anormale de protéines (respectivement les protéines APP (A β precursor protein), α -synucléine et la protéine tau associée aux microtubules), ce qui leur confèrent une caractéristique commune aux EST.

Au sein des EST animales, la tremblante du mouton est la maladie la plus ancienne et représente le modèle d'infection naturelle le plus étudié. Ces dernières années, de nombreux travaux portant sur la pathologie et la pathogénie de la tremblante, ont principalement étudié les changements dans le cerveau et la moelle épinière où les lésions caractéristiques sont aisément identifiables. La rétine, considérée telle une extension du système nerveux central, est désormais de plus en plus présente dans les études en raison d'une architecture relativement simple et d'une physiologie largement décrite. Nombreux sont ceux ayant évalué l'atteinte oculaire et notamment de la rétine à partir de modèles expérimentaux ou spontanés. Une telle recherche sur les lésions rétinienne présentes lors des maladies à prions

s'inscrit pleinement dans la volonté de mise au point de méthodes diagnostiques indirectes et non-létales, ne serait-ce qu'en vue d'éventuels essais thérapeutiques où le suivi de la réponse au traitement dans le temps est primordial. Ces recherches ont également un rôle dans la quête continue de connaissances à propos de ces neuropathies. De par sa facilité d'accès, la rétine constitue un tissu très intéressant, contrairement au tronc cérébral à étudier, notamment parce que l'accumulation de PrP^{sc} y est observée avant l'apparition de signes cliniques chez l'animal.

La présente étude détaille tout d'abord les caractéristiques générales des maladies à prions animales. Elle rappelle ensuite les principes anatomiques fondamentaux de la rétine des mammifères ainsi que les méthodes diagnostiques employées dans les études qui ont envisagé les répercussions oculaires lors des maladies à prions chez l'animal, lesquelles sont exposées dans une troisième partie.

I. GENERALITES SUR LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

I.1. Historique

La tremblante du mouton, appelée « scrapie » en Angleterre, surnommée « gratte » en France, est la première EST décrite.

Elle est en effet connue depuis 1732 en Europe continentale et dans les îles britanniques où elle ravagea de nombreux troupeaux ovins et, de façon moindre, de caprins au cours du XVIIIème siècle. Elle est pour la première fois décrite avec précision en 1755 dans le Journal de la Chambre des Communes où elle est caractérisée par les démangeaisons et tremblements qu'elle occasionne, ayant pour conséquence des pertes importantes pour l'industrie de la laine, notamment lors d'épizooties (Ewka, 2013). Il est aussi rapporté que la mort survient alors inexorablement en quelques mois. Elle sera pour la première fois rapportée aux USA en 1947.

Dès lors, deux hypothèses quant à son origine s'affrontent : une prônant la cause infectieuse, l'autre la cause héréditaire.

Le 28 décembre 1936, deux vétérinaires français présentent à l'Académie des Sciences une note résumant leurs travaux menés entre juillet 1934 et octobre 1935 (Cuillé et Chelle, 1936).

Jean Cuillé (1872-1950) et Paul-Louis Chelle (1902-1943), professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ont en effet réussi à transmettre expérimentalement la maladie en inoculant un broyant de moelle épinière et de cerveau de brebis atteintes de tremblante directement dans les globes oculaires de deux brebis saines. Ils ont en fait inoculé 9 brebis mais 7 décèdent ou sont sacrifiées pour des raisons indépendantes de leur volonté et sans signe laissant présager la tremblante. Ils réussirent là où tous leurs prédécesseurs et contemporains avaient échoué, en particulier les Dr Bertrand, Carré et Lucam qui conclurent en 1937, après seulement 3 mois d'attente post-incubation et aucune observation, le postulat inverse et continuèrent d'alimenter la théorie héréditaire. Il faut noter que Cuillé et Chelle avaient gardé leur deux brebis quinze et vingt-deux mois en observation avant l'apparition des signes cliniques.

Les travaux de Sir John Mac-Fadyean en 1918 l'avait conduit à conclure au fait que si l'origine était infectieuse, l'incubation devait être au moins supérieure à 18 mois (Schwartz, 2001). Faute de résultats probants, l'hypothèse d'un temps d'incubation long était pourtant déjà avancée. Pour autant, c'est presque sans le vouloir que Sir Mac-Fadyean était sur la bonne voie puisqu'ayant inoculé du sang ou des substances autres que du tissu nerveux, son absence de résultat était probablement plutôt due à un pouvoir infectieux trop faible plutôt qu'à un temps d'incubation trop long. Une mauvaise maîtrise de la langue française, et donc une mauvaise compréhension des travaux de Pasteur sur la rage, serait-elle à l'origine de cette erreur ?... L'Histoire conserve sa part de mystère.

En 1938, Cuillé et Chelle réussirent même à transmettre la maladie à la chèvre, transgressant alors la barrière d'espèce. Malgré une forte résistance aux procédés classiques de stérilisation, ils avancent une hypothèse virale. La Seconde Guerre Mondiale et la mort prématurée de Paul-Louis Chelle interrompirent les travaux des deux vétérinaires français.

A partir des années 60, la recherche sur les encéphalopathies s'intensifie. L'hypothèse d'un agent infectieux reprise par John Stanley Griffith dans un article paru dans Nature en 1967 (Griffith 1967), fut confirmée par les travaux de Stanley Prusiner en 1982 (Prusiner 1982). Le prix Nobel de Médecine fut décerné à Stanley Prusiner en 1997 pour ses travaux sur l'ESB. Ce dernier formalisa la théorie selon laquelle une protéine peut mimer la pathogénie virale ou bactérienne et se transmettre à certains tissus du système nerveux. Bien qu'initialement difficilement acceptée par la communauté scientifique qui était encore baignée par le paradigme selon lequel une origine infectieuse ne pouvait être que virale, bactérienne ou parasitaire, l'hypothèse du Proteinaceous Infectious Only particle, ou prion, ne tardera pas à être adoptée comme agent responsable des EST.

Entre 1986 et 2000, la Grande Bretagne ainsi que certains de ses voisins européens est secouée par une crise sanitaire retentissante : la crise de la vache folle. Cette dernière a provoqué la mort de près de deux cent personnes au total, toutes atteintes du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD), résultant d'une transmission depuis des produits d'origine bovine infectée par l'ESB (Colby, Prusiner 2011).

I.2. Les caractéristiques communes aux encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines et animales

Les EST affectent un large spectre de mammifères, dont l'homme ; elles ont une origine spontanée, génétique ou infectieuse. Le tableau ci-après donne la liste des différentes EST humaines et animales.

Maladie	Hôte (principal)	Mécanisme pathogénique
MCJ familiale	Homme	Mutations germinales du gène <i>Prnp</i>
MCJ sporadique	Homme	Mutation somatique ou conversion spontanée de PrPc en PrPsc
variante de la MCJ	Homme	Infection par des prions d'origine bovine
MCJ iatrogénique	Homme	Iatrogénique
Kuru	Homme	Infection lors de rites cannibales
Syndrome de GSS	Homme	Mutations germinales du gène <i>Prnp</i>

IFF	Homme	Mutations germinales du gène <i>Prnp</i>
Tremblante	Mouton	Infection
ESB	Bovins	Infection ou sporadique
MDC	Cervidés	Infection
ETV	Vison	Infection avec des prions ovins ou bovins
ESF	Félins	Infection par des prions d'origine bovine
Encéphalopathie des ongulés exotiques	Ongilés exotiques (nyala, kudu, oryx,...)	Infection par des prions d'origine bovine

Tableau 1

MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob ; *GSS* : Gerstman-Straussler-Scheinker ; *IFF* : Insomnie Fatale Familiale ; *ESB* : Encéphalopathie Spongiforme Bovine ; *MDC* : Maladie du Dépérissement Chronique ; *ETV* : Encéphalopathie Transmissible du Vison ; *ESF* : Encéphalopathie Spongiforme des Félines

(d'après Colby & Prusiner, *Prions*, 2011)

Ces maladies partagent des caractéristiques communes permettant de les considérer comme une entité homogène.

On note ainsi tout d'abord une longue période d'incubation qui varie en fonction de la maladie, de l'hôte et notamment de son génotype qui influence sa sensibilité ainsi que de la souche des prions. Toutefois, on peut considérer de façon générale que celle-ci s'étend de quelques mois à plusieurs années. De plus, cette incubation est silencieuse : l'hôte contaminé, potentiellement contagieux, ne présente aucun signe clinique, aucune réaction immunitaire ou inflammatoire. Cette particularité rend la lutte contre la transmission de ces maladies particulièrement difficile.

Une phase clinique d'une durée de quelques semaines à quelques mois fait suite à l'incubation silencieuse. L'expression symptomatique des EST diffère légèrement selon les entités mais est à dominante neurologique. Des troubles moteurs, sensitifs ou cognitifs évoluent ainsi progressivement (Collinge, 2001).

L'issue est inéluctablement fatale et aucun traitement n'est actuellement possible.

De plus, le diagnostic de telles maladies ne peut malheureusement être établi qu'en *post mortem*, bien que de nombreux travaux aient été et soient menés pour mettre au point des méthodes de diagnostic *ante mortem*. Ces encéphalopathies sont dites spongiformes en raison de l'apparition de lésions vacuolaires dans le système nerveux central, combinée à des raréfactions neuronales ainsi qu'une astrocytose réactionnelle (Fraser & Dickinson, 1973).

I.3. Les prions

1.3.1. Définition

Le terme prion dérive de l'acronyme créé à partir de la définition proposée par Stanley Prusiner en 1982: **PR**oteinaceous **I**nfectious **ON**ly particle (Prusiner 1982).

Le terme de « prion » est utilisé pour désigner de façon générale le principe ou processus actif infectieux responsable des EST. Les prions sont des particules infectieuses de nature protéique, dépourvues d'acide nucléique, qui présentent donc des mécanismes de transfert et de propagation d'informations nouvelles (Prusiner, 1982).

Les prions sont des agents transmissibles non conventionnels. Ne possédant pas de génome, ils résistent à la chaleur sèche ainsi qu'aux procédés chimiques d'inactivation classiques et ne sont pas visibles en microscopie optique (Colby et Prusiner, 2011). En conséquence, les doses de rayonnement ultraviolets et de radiations ionisantes nécessaires pour les inactiver sont nettement supérieures à celles employées contre les agents infectieux classiques. Une de leurs caractéristiques est leur résistance partielle à la dégradation par la protéinase K (Aguzzi, Polymenidou 2004). Trente ans après cette découverte fondamentale, la recherche de fragment résistant à une hydrolyse ménagée par la protéinase K constitue toujours le *gold standard* en matière de diagnostic biochimique des EST.

1.3.2. La PrPc

La structure de la PrPc

La protéine PrPc (c pour cellulaire) est exprimée de façon physiologique dans de nombreuses cellules de l'organisme, en particulier dans les cellules nerveuses (Prusiner 1998).

Cette petite protéine complexe est constituée d'environ 250 acides aminés : 253 chez l'Homme, 254 chez la souris, 256 chez les ovins et les caprins et 264 chez les bovins (Buton, 2006). Cette sialoglycoprotéine est codée par un gène, nommé *Prnp*, découvert et séquencé en 1985 (Wietgreffe *et al.* 1985; Oesch *et al.* 1985; Basler *et al.* 1986). Ce gène est présent sur le bras court du chromosome 20 chez l'Homme et sur le chromosome 2 chez la souris. Le poids moléculaire de la PrPc est compris entre 33 et 45 kDa.

L'étude cristallographique (Knaus *et al.* 2001) et spectroscopique par résonance magnétique nucléaire (Riek *et al.* 1996) a permis de comprendre la conformation de la PrPc. Celle-ci comprend quatre régions principales.

La partie N-terminale de 95 acides aminés comprend des sites de fixation au cuivre, zinc et fer (Brown *et al.* 1997). Elle est flexible, n'est pas structurée et a la forme plus ou moins variable d'une queue, pouvant acquérir une conformation définitive une fois la fixation à la

membrane plasmique réalisée (Naslavsky *et al.* 1997). L'extrémité N-terminale de 23 acides aminés permet l'entrée dans le réticulum endoplasmique.

La région des acides aminés 96 à 135 est hydrophobe transmembranaire ; elle est hautement conservée chez les mammifères.

La région des acides aminés 135 à 230 est une partie globulaire, principalement constituée d'hélices α , au nombre de 3, et de 2 feuillets β antiparallèles. Deux sites de N-glycosylation sont présents au niveau des acides aminés 181 et 197 et servent d'ancrage pour deux chaînes oligo-saccharidiques (Riek, *et al.* 1996).

Enfin, la partie C-terminale, acides aminés 231 à 253, est constituée d'une séquence hydrophobe avec un site de fixation d'un glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), permettant l'ancrage de la PrPc à la face externe de la membrane plasmique (Aguzzi, Polymenidou 2004).

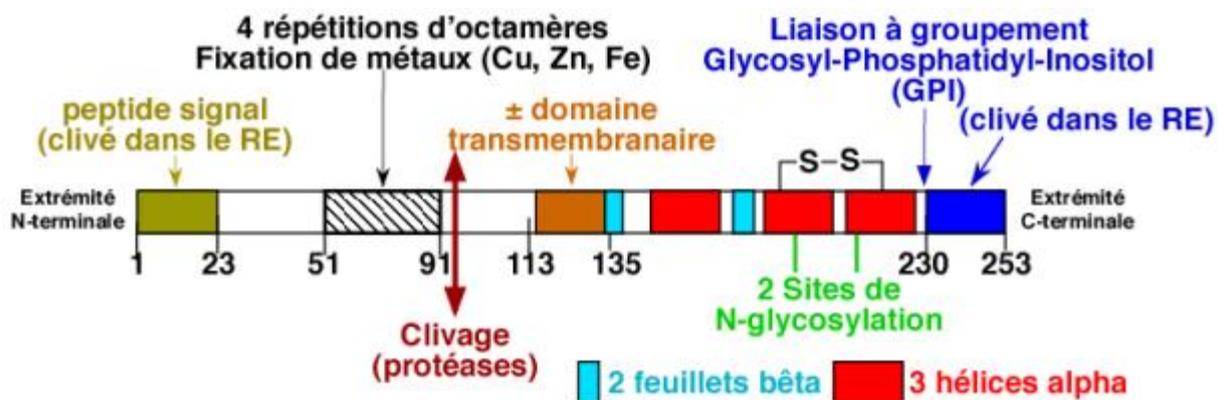


Figure n°1a :

Représentation schématique des caractéristiques biochimiques de la protéine prion humaine

(d'après http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/biocell/biopath_cell/prion/PrPnor.html)

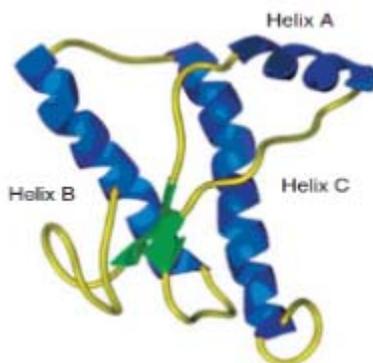


Figure n°1b :

Structure obtenue par résonance magnétique nucléaire de la PrPc recombinante de hamster Syrien. Les hélices α sont en bleu et les feuillets β en vert.

(d'après Colby et Prusiner, 2011)

La protéine PrPc est sensible à la digestion enzymatique par la protéinase K, contrairement aux PrPsc qui y sont partiellement résistantes.

Son expression est quasi-ubiquitaire au sein du SNC ; la PrPc se localise essentiellement dans les neurones et les astrocytes. Elle est fortement exprimée dans les terminaisons synaptiques et est également associée aux vésicules synaptiques. L'ARNm de la PrPc a également été retrouvé en plus faible quantité dans l'appareil génital, le cœur, les poumons et la rate, ainsi que dans le système lymphoïde.

Une fois synthétisée sur les ribosomes, elle est transportée dans le réticulum endoplasmique où elle subit des modifications post-traductionnelles, notamment des N-glycosylations. La PrPc possède deux sites de glycosylation. Plusieurs « glycoformes » coexistent en fonction de l'état de la protéine. L'étude des poids moléculaires permet de compléter la caractérisation de la molécule. La PrPc est ensuite exportée via l'appareil de Golgi sur la membrane plasmique où elle reste attachée par son ancre GPI et se localise principalement dans des domaines de la membrane plasmique riches en glycosphingolipides. Après avoir atteint la membrane, une partie de ces protéines cellulaires est ré-endocytée et clivée dans les lysosomes. *In vitro*, c'est durant son passage intracellulaire que la protéine pourrait être modifiée pour devenir PrPsc (Burthem, 2003 ; Harris, 2003).

Le rôle physiologique de la PrPc

Alors que de nombreuses études se sont penchées sur le rôle pathologique des PrPsc, le rôle physiologique de la PrPc n'a pas été clairement établi (Williams, *et al.* 2011).

Un rôle potentiel dans la neuroprotection et la survie cellulaire a souvent été évoqué, de même qu'un rôle dans la réponse immunitaire. Cependant, la façon dont ces deux fonctions interviennent lors de réponse auto-immune demeure peu claire. Dans l'étude de Williams *et al.* (2011), un modèle murin de névrite optique auto-immune a été utilisé avec des souris *knock-out* (KO) invalidées pour le gène *Prnp* qui n'expriment pas de PrPc, des souris surexprimant la PrPc et des souris de phénotype sauvage. Une exacerbation de la névrite optique, tant sur le plan clinique que lésionnel, a été observée pour les souris PrPc^{-KO} et celles surexprimant la PrPc. Toutefois, une protection significative des cellules ganglionnaires de la rétine a été notée pour les souris surexprimant PrPc. A l'inverse, les souris PrPc^{-KO} montrent plus de neurodégénérescence que les sauvages. De telles observations suggèrent une fonction neuroprotectrice de la PrPc indépendante de sa régulation de la réponse immunitaire.

Les références de cette étude rapportent un nombre important de processus cellulaires dans lesquels la PrPc serait impliquée, tels que l'adhésion neuronale ou la neuritogénèse, qui correspond à la production de tout prolongement cellulaire d'un neurone. La PrPc serait aussi impliquée dans la survie cellulaire en prévenant l'apoptose; seules des expériences réalisées *in vitro* ont cependant montré un tel effet. Elle serait également le récepteur présumé de

grand nombre de ligands, tels que la laminine, l'héparine ou des protéines synaptiques variées. Elle serait également nécessaire au maintien à long terme de la myéline.

Enfin, la PrPc aurait un rôle dans la régulation du sommeil et dans les rythmes circadiens (Huber, *et al.* 1999).

1.3.3. Les PrPsc

La structure des PrPsc

Il s'agit de composés protéiques constitués d'un conformère anormal de la Protéine Prion, notée PrPsc dans le cas de tremblante (sc pour *scrapie* en anglais). Cependant, ce terme est également employé pour désigner les conformères anormaux des Protéines Prions d'autres espèces. Des exceptions existent, et il est ainsi fréquent de rencontrer les abréviations de PrPcwd lors de Maladie du Dépérissement Chronique des cervidés (*Chronic Wasting Disease*) ou de PrPtme lors d'Encéphalopathie Transmissible du Vison (*Transmissible Mink Encephalopathy*).

Les PrPsc ne présentent pas de différence au niveau de leur structure primaire ni de modification post-traductionnelle avec les PrPc (Colby, Prusiner 2011).

L'unique différence réside dans leur structure conformationnelle. Dans leur partie structurée, elles contiennent essentiellement des feuillettes β . Ces feuillettes β sont très compacts, de plus, très peu d'épitopes permettant de fixer des anticorps spécifiques sont présents. La distinction entre la PrPsc et la PrPc par des anticorps est donc difficile, ce qui complique la détection des PrPsc.

La structure leur confère notamment une résistance partielle à la protéinase K. Cette propriété permet l'élaboration de profil électrophorétique particulièrement utile pour distinguer la PrPsc de la PrPc. En effet, lors du traitement à la protéinase K, seule la partie N-terminale de la PrPsc est digérée contrairement à la PrPc, intégralement dégradée. La partie C-terminale restante, appelée aussi corps résistant a un poids moléculaire de 27 à 30 kDa. Elle est pour cette raison fréquemment désignée par la dénomination PrP²⁷⁻³⁰.

Comme pour la PrPc, il existe différentes conformations des PrPsc appelées « glycoformes », selon le degré de N-glycosylation de la molécule. Plus la protéine est glycosylée, plus son poids moléculaire est élevé.



Figure n°2

Modélisation de la structure du monomère PrP²⁷⁻³⁰. Les flèches jaunes correspondent aux feuillets β , les hélices rouges aux hélices α .

(d'après Colby et Prusiner, 2011)

Leur conformation permet aux PrPsc de s'associer à une PrPc de l'hôte et de la convertir en PrPsc. La conversion de la PrPc en PrPsc sera détaillée plus loin mais il est à noter que, sous certaines conditions physico-chimiques, ces molécules peuvent se polymériser sous forme de fibrilles de 60 à 80 nm appelées « *Scrapie Associated Fibrils* » (SAF) ou « *prion rods* » (Merz *et al.* 1981 ; Prusiner *et al.* 1983). Les différentes glycoformes pourraient expliquer en partie le phénomène de souche (Notari *et al.* 2004) qui est détaillé plus loin. Le principe infectieux du prion reposerait donc dans la conformation anormale de la PrPsc.

La localisation des PrPsc

Elle varie en fonction de la maladie et de la condition d'infection, naturelle ou expérimentale.

La PrPsc est retrouvée dans l'encéphale, et ce même avant l'apparition de lésions. Le noyau moteur dorsal du nerf vague et le noyau du tractus solitaire sont des localisations précoces préférentielles lors d'inoculation par voie orale (McBride, Beekes 1999). La PrPsc se retrouve également dans la substance grise de la moelle épinière. Lors d'EST animales, une accumulation de PrPsc a lieu dans la rétine, projection rostrale du SNC, de modèles spontanés et expérimentaux (Foster, *et al.* 1999 ; Spraker *et al.* 2002 ; Hamir *et al.* 2004, 2005 ; Kercher *et al.* 2004). Cette accumulation sera détaillée dans le paragraphe III.4.

La localisation de la PrPsc dans le système nerveux périphérique (SNP) dépend fortement de la maladie ; lors de tremblante naturelle du mouton, elle peut être présente au niveau des nerfs sciatique, axillaire, ulnaire, médian, tibial, fibulaire et saphène (Groschup, *et al.* 1999).

Une détection de la PrPsc dans les tissus périphériques est possible, ce qui est particulièrement intéressant pour développer les tests diagnostiques *ante mortem*. Il est à noter que cette accumulation de PrPsc a lieu sans que des lésions histologiques des tissus en question ne soient détectables. La PrPsc se dépose ainsi particulièrement dans les organes lymphoïdes, notamment lors de vCJD. Elle n'a cependant pas été détectée dans la rate lors d'ESB. La PrPsc a été détectée dans l'iléon, le côlon, les nœuds lymphatiques, les amygdales, la rétine, le thymus, la moelle osseuse, le foie, les poumons, le pancréas. Dans le cas de tremblante transmise expérimentalement à des moutons et à des animaux de laboratoire, la PrPsc a également été mise en évidence dans le rein (Sisó, *et al.* 2006 ; Ligios, *et al.* 2007).

L'espèce de l'hôte influence le lymphotropisme, de même que la souche du prion (Sigurdson *et al.* 2002).

Une présence de la PrPsc a été démontrée dans le placenta de brebis lors d'infection naturelle par la tremblante au cours de la gestation (Andréoletti, *et al.* 2002), de même que dans les muscles striés squelettiques (Andréoletti, *et al.* 2004), et ce plusieurs mois avant l'apparition des signes cliniques. La présence dans les muscles est cependant moins fréquente lors de contamination naturelle et absente chez les génotypes ARR/ARR.

L'infectiosité du sang lors d'EST a également été démontrée dans les modèles animaux: la transmission expérimentale de la tremblante et de l'ESB à des moutons par transfusion sanguine a ainsi été réalisée (Houston *et al.* 2008). Cette « prionémie » présente toutefois une capacité de transmission 10^{-6} à 10^{-7} fois inférieure à celle de l'encéphale. Chez une patiente atteinte du vMCJ, l'infectiosité a été démontrée dans les érythrocytes, les leucocytes et le plasma (Douet *et al.* 2014)

La PrPsc a également été détectée dans les urines par PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) chez des hamsters infectés expérimentalement par la tremblante (Gonzalez-Romero *et al.* 2008) à des concentrations environ dix fois inférieures à celles du sang. Bien que l'origine de cette présence urinaire soit encore mal comprise, la présence de la PrPsc dans les urines de hamsters n'était pas associée à une néphrite ou une cystite, contrairement à ce qui avait été observé chez la souris (Seeger *et al.* 2005).

1.3.4. La conversion conformationnelle de PrPc en Prpsc

La conversion de la PrPc en PrPsc est un processus complexe, encore aujourd'hui incomplètement compris (Graham, *et al.* 2011).

Un modèle (auto)catalytique selon lequel les PrPsc exogènes « imposeraient » leur conformation aux PrPc naissantes, endogènes fait actuellement consensus. Ce modèle suppose une interaction entre de la PrPsc exogène et la PrPc endogène, qui se transforme par la suite elle-même en PrPsc. Une haute barrière énergétique pourrait empêcher une conversion spontanée. Le principal argument contre cette hypothèse est l'existence de nombreuses souches différentes de prions pouvant être transmises avec une grande fidélité de réplication à l'hôte contaminé et qui nécessite l'existence de nombreuses PrPsc stables sous différentes isoformes.

Des souris transgéniques exprimant la PrPc du hamster syrien (SHa-PrP, Syrian Hamster) ou surexprimant la séquence de la souris (MoPrP, Mouse) ont été récemment utilisées dans des expériences où leur étaient tout d'abord inoculés des prions provenant de souris (Colby, Prusiner 2011). La MoPrPc se transformait alors en MoPrPsc et il n'y avait pas de SHaPrPsc formée, par contre si sur d'autres souris de même phénotype (SHaPrP/MoPrP) l'inoculation

était réalisée avec des prions provenant de hamsters : on voyait alors la conversion de SHaPrPc en SHaPrPsc. Ce processus autocatalytique serait très probablement assisté par des cofacteurs (Graham *et al.* 2011), agissant soit de façon directe et spécifique en tant que protéines chaperonnes ou indirectement en réalisant un « échafaudage protéique » permettant un alignement spatial correct entre PrPc et PrPsc.

De récentes études *in vitro* (Graham *et al.* 2011) ont montré la présence de chaînes α des Na^+/K^+ ATP-ases issue de la purification de SAF provenant de trois souches de prions différentes et pouvant augmenter la conversion des PrPc en PrPsc ; les Na^+/K^+ ATP-ases pourraient donc faire partie de ces protéines chaperonnes. La surexpression de ces protéines chaperonnes devrait raccourcir le temps d'incubation et un *knock-out* devrait empêcher ou ralentir l'incubation de la maladie. Cependant, jusqu'à ce jour, de telles expériences se sont soldées par un échec (Colby, Prusiner 2011). Chez les levures, de nombreuses protéines chaperonnes ont pu être identifiées, notamment Hsp104, Hsp 40 et Hsp 70 (Colby, Prusiner, 2011).

Bien que la PrPsc soit « le principe infectieux » principal lors de maladie à prions, l'hypothèse du « tout-protéique » semble être aujourd'hui partiellement remise en question puisque d'autres molécules que la PrPsc sont suspectées nécessaires à la conversion de la PrPc en PrPsc *in vivo*. Un certain nombre de molécules non protéiques, telles que des acides nucléiques (Deleault *et al.* 2003), des polyanions (Wang *et al.* 2010), des lipides (Lühns *et al.* 2006 ; Wang *et al.* 2010), des glucanes (Wong *et al.* 2001), des métaux (Sing *et al.* 2010) et le lipopolysaccharide (LPS) (Saleem *et al.* 2014) semblent en effet essentielles *in vitro* pour permettre la réplication de PrPsc. Des études pour savoir si ces prions synthétiques ont une capacité infectieuse et neurotoxique sont encore en cours (Saleem *et al.* 2014).

Il existerait ainsi un état intermédiaire entre la PrPc et la PrPsc, noté PrP*, qui correspond à la PrPc plus des cofacteurs et dont la rencontre avec une PrPsc permet la transformation de la PrPc en PrPsc.

1.3.5. L'accumulation de PrPsc et la formation de substance amyloïde

La substance amyloïde est définie comme un agrégat protéique insoluble dans un tissu. L'origine des protéines en question est variable. La plus part du temps sérique, elle peut être, dans le cas des maladies à prions, la PrPsc.

La formation de substance amyloïde n'est pas nécessairement présente lors de maladie à prions (Colby, Prusiner 2011).

Il s'en forme ainsi dans 10% des cas lors sMCJ (maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique), 70% des cas de kuru, mais dans 100% des cas de vMCJ, variant de la maladie associée à

l'ESB. Ces dépôts amyloïdes entourés d'une couronne de vacuole sont appelés « *florid plaques* ».

L'inoculation des fibres amyloïdes recombinantes à des souris qui surexprimaient PrPc a permis de mettre en évidence que les fibres amyloïdes de haute stabilité conformationnelle entraînaient des maladies à prions à long temps d'incubation tandis que celles peu stables structurellement provoquaient des formes à court temps d'incubation. Autrement dit, plus les fibres amyloïdes ont une conformation instable et plus la maladie se développe vite.

1.3.6. La notion de souches de prions

Pour une maladie donnée, il n'existe pas un mais des prions. Dès 1976, Dickinson observe que deux isolats de tremblante inoculés à deux chèvres différentes donnent lieu à des signes cliniques extrêmement différents : soit un syndrome de somnolence, soit un syndrome prurigineux). Il présente ainsi cette notion de souches.

Celle-ci est cependant relativement difficile à expliquer étant donné la nature exclusivement protéique de l'agent pathogène.

Les premiers éléments soutenant l'hypothèse selon laquelle la PrPsc pourrait servir de support à la définition de souches ont été apportés par l'étude de deux isolats de prions issus du vison et propagés sur hamsters. Les souches « *drowsy* » (léthargie) et « *hyper* » (hyperexcitabilité) entraînent chez le hamster l'accumulation de deux types de PrPsc biochimiquement différentes par leur solubilité, leur résistance à la protéinase K et leur profil de migration (Bessen and Marsh, 1992 ; 1994). Des résultats similaires ont été obtenus avec différentes souches de tremblante (Bruce, 2003). Différents phénotypes cliniques observés lors de MCJ ont été associés à des PrPsc biochimiquement différenciables par le poids moléculaire des fragments et le ratio des trois glycoformes de la PrPsc après digestion par la protéinase K (Collinge *et al.* 1996). Il semble cohérent que la PrPsc serve de matrice pour la conversion de PrPc en PrPsc, et soit à l'origine de la création et de la propagation des souches de prion, via une transmission conformationnelle.

Selon l'hypothèse avancée par Prusiner de la nature purement protéique de l'agent infectieux, les différences obtenues lors du développement de maladies suite à l'inoculation de différentes souches dépendraient alors de la structure secondaire, tertiaire ou quaternaire de la PrPsc et/ou de son profil de glycosylation (Buschmann *et al.* 2004). Les feuilletts β semblent être un point clé dans ce phénomène (Thomzig *et al.* 2004). La diversité des souches résiderait donc dans la variabilité de conformation. Une telle étude de la conformation protéique est permise par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou spectroscopie IRTF (ou encore FTIR, de l'anglais *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*). Les différentes courbes de profil d'absorption obtenues permettent de différencier les souches entre elles.

Des profils pathologiques différents en fonction des EST sont donc identifiables, de même que leurs caractéristiques lésionnelles et biochimiques qui peuvent être maintenus et stabilisés lors d'inoculation en série sur souris. Par analogie avec les autres agents infectieux, ces variants ont été appelés « souche ». Une définition de souche de prions a ainsi été proposée comme correspondant à « un agent qui induit des modifications constantes en terme de lésions spongiformes et de période d'incubation lorsqu'il est administré régulièrement à des souris sensibles » par Gavier-Widen *et al.* (2005).

Le typage d'une souche se réalise en trois étapes (isolement, stabilisation et caractérisation) consistant en des passages successifs sur deux lignées de souris : la C57BL, associée à une période d'incubation courte et la VM associée à une période d'incubation longue. Les passages successifs permettent de stabiliser la souche de l'échantillon testé et d'en déterminer la durée d'incubation selon la lignée de souris. Des coupes histologiques pratiquées à des endroits précis du cerveau des souris inoculées avec cette souche permettent ensuite d'établir le profil lésionnel en se basant sur un score attribué en fonction de l'intensité de la vacuolisation dans neuf zones de substance grise et trois de substance blanche (Sarradin & Laude, 2004).

L'étude de la diversité des souches a souligné une certaine uniformité au sein des souches d'ESB chez les bovins, tandis que les souches de tremblante chez les petits ruminants présentent une grande diversité. Elle est également importante du point de vue sanitaire puisque que l'on sait que certaines souches de prions sont transmissibles à l'homme alors que d'autres ne le sont pas. Il faut noter que les durées d'incubation de la maladie sont intimement liées à la souche pathogène mais également à l'hôte, et en particulier à son génotype (Foster, 2001). Ce point sera détaillé ultérieurement.

1.3.7. La notion de barrière d'espèce

La barrière d'espèce est une notion relative au manque de sensibilité d'une espèce vis-à-vis des souches de prions issues d'autres espèces. La preuve en a été apportée par des expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant le gène de la PrP de hamster et qui étaient insensibles aux agents d'origine murine comme nous avons pu le voir précédemment (Colby et Prusiner, 2011), alors que l'inoculation d'un agent de hamster conduisait à l'infection de 100% des animaux avec un délai d'incubation comparable à celui observé chez le hamster. Un autre exemple de cette notion de barrière d'espèces nous vient des chevaux : aucun rapport ne fait état d'EST affectant le cheval. Ceci est d'autant plus remarquable qu'il s'agit d'une espèce chez laquelle les animaux atteignent la plupart du temps un âge avancé et que la période d'incubation des EST chez les autres espèces est longue : elle atteint par exemple 2 à 8 ans lors d'ESB chez les bovins.

Les homologues de séquence de la protéine PrP seraient un des critères déterminant de la barrière d'espèce. Ainsi, lors de l'injection d'un agent d'une espèce donnée à un animal

d'une autre espèce, la barrière d'espèces peut se traduire par une diminution parfois très importante de l'efficacité de la transmission ou un allongement significatif de la durée d'incubation augmentée, (Scott, 1999).

Selon la souche et l'hôte, la barrière d'espèce peut être franchie (Torres *et al.* 2014). L'agent de l'ESB est un des exemples de passage de la barrière d'espèces. Sa transmission naturelle à l'Homme avec le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) (Bruce *et al.* 1997) n'est pas la seule illustration : l'ESB peut aussi être transmise par voie naturelle aux chats, à un grand nombre d'animaux exotiques (Sigurdson *et al.* 2003) et même à des chèvres (Eloit *et al.* 2005). De plus, de nombreuses transmissions expérimentales à des espèces telles que le mouton, le porc, la souris et des primates non-humains ont été rapportées (Hunter 2003; Brown *et al.* 2003; Lasmézas *et al.* 2005). Ce potentiel passage de la barrière d'espèce implique de lourdes répercussions en santé publique. Il est intéressant de remarquer que, même après son passage vers une autre espèce hôte que le bovin, l'agent de l'ESB conserve ses caractéristiques de souche évaluées par bio-essai chez la souris. Plus récemment, il a été montré que l'agent de l'ESB provenant de moutons infectés se transmettait de façon plus efficace à des modèles transgéniques de souris exprimant la PrPc bovine, porcine et humaine. Cette transmission à des souris transgéniques exprimant la PrPc humaine est d'ailleurs encore plus efficace avec des agents de l'ESB provenant de moutons (Plinston *et al.* 2011). De telles observations soulèvent bien évidemment des questions cruciales sur l'agent de l'ESB après son passage par des espèces autres que les bovins (Torres *et al.* 2014).

I.4. La pathogénie des maladies à prions

I.4.1. La transmission des maladies à prions

Les voies de contamination

La transmission des maladies à prions se fait essentiellement par voie orale puis absorption intestinale. De manière beaucoup plus rare, une contamination par pénétration lors de plaies cutanées, conjonctivale ou de la muqueuse gingivale est possible (Beekes, McBride 2007).

Expérimentalement, les voies intracérébrale, intrapéritonéale, intrasplénique, intraveineuse, intramusculaire et intraoculaire permettent une inoculation. La voie intracérébrale permet l'apparition la plus précoce des signes cliniques, suivie de la voie intraoculaire, puis des autres voies (Kercher *et al.* 2004).

Il semblerait, d'après des travaux récents (Gregori, et al. 2008; Gonzalez-Romero, et al. 2008) qu'une excrétion urinaire des prions soit possible et donc que la contamination horizontale par les urines soit à considérer dans la transmission des maladies à prions. Dans le cas de la maladie du dépérissement chronique des cervidés, une contamination environnementale a

clairement été mise en évidence chez ces animaux où une excrétion fécale, urinaire et salivaire de prions existe (Haley *et al.* 2011 ; John *et al.* 2013).

Chez l'homme, des cas de transmission iatrogène de MCJ par injection intramusculaire ou intracérébrale ainsi que par transfusion sanguine ont été rapportés (Ponte, 2006).

La phase de lymphoinvasion

A la suite d'une contamination orale, l'agent infectieux s'accumule dans les plaques de Peyer, ainsi que dans les follicules primaires et les centres germinatifs des follicules secondaires à cellules B (Andréoletti, 2000).

Les plaques de Peyer de l'intestin grêle distal jouent un rôle primordial comme porte d'entrée précoce, chez le mouton exposé naturellement (Andréoletti *et al.* 2000) ou expérimentalement (Heggebo *et al.* 2000) à la tremblante. La PrPsc s'accumule rapidement dans l'ensemble des formations lymphoïdes digestives : le GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) et les noeuds lymphatiques de drainage.

A partir de la lumière intestinale, la prise en charge de l'agent de la tremblante est réalisée par les cellules M (Beekes et McBride 2000 ; Heppner *et al.* 2001), M pour *microfold*, qui sont des cellules épithéliales spécialisées dans la micropinocytose. Par un mécanisme de transcytose, elles conduisent le prion de la lumière intestinale jusqu'à une poche intra-épithéliale, où sont localisées les cellules clés du système immunitaire : macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes.

La dissémination à partir du tissu lymphoïde digestif

La capture et le transport de la PrPsc vers les centres germinatifs locaux et les autres lymphocentres seraient ensuite assurés par les phagocytes mononucléés (Aucouturier *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002).

La phase de neuroinvasion

Le SNC est un site majeur de réplication des prions. Deux voies de dissémination sont décrites: la voie hématogène et la voie neuronale. Bien que la première voie ne soit pas totalement exclue, les résultats des différentes études privilégient la seconde. Les fibres nerveuses disséminées dans la paroi intestinale et assurant la motricité intestinale sont contaminés en région iléale à partir des cellules folliculaires dendritiques (*Follicular Dendritic Cells* - FDC), des lymphocytes et des macrophages (Andréoletti *et al.* 2000). La relation anatomique et fonctionnelle existant entre le système nerveux entérique et les centres nerveux autonomes

favorise ensuite la dissémination au SNC. Le noyau dorsal du nerf vague et les segments thoraciques moyens (T6-T8) de la moelle épinière sont les premiers segments du nevraxe où la PrPsc est détectée. L'infection se généralise ensuite à l'ensemble de la moelle spinale pour finalement atteindre le cerveau, à l'origine des altérations neurodégénératives spécifiques.

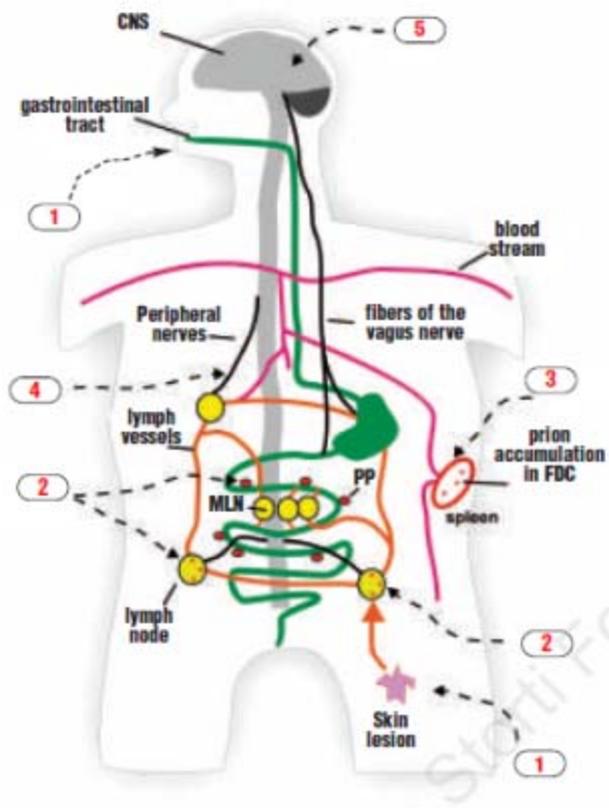


Figure n°3

Les voies de propagation des prions vers le SNC après une contamination périphérique :

- 1) L'infection périphérique par voie orale ou à travers la peau lésée est la principale voie de contamination dans les EST naturelles.
- 2) Les prions s'accumulent d'abord dans les cellules folliculaires dendritiques (FDC), localisées dans les centres germinatifs des tissus lymphoïdes drainant le site d'entrée dans l'organisme (plaques de Peyer (PP) et nœuds lymphatiques mésentériques (MLN) suite à une infection par voie orale).
- 3) Les prions sont ensuite rapidement détectés dans les autres tissus lymphoïdes, en particulier dans la rate, via la circulation sanguine et lymphatique.
- 4) Après son accumulation dans les FDC, les prions infectent les nerfs sympathiques et les fibres du nerf vague, et se propagent le long de ces voies vers le SNC.
- 5) L'accumulation des prions dans l'encéphale provoque une neurodégénérescence, et aboutit à la mort de l'individu.

(d'après Mabbott et Turner, 2005)

1.4.2. De la protéine PrPc à la pathologie cellulaire

Il existe encore aujourd'hui de nombreuses incompréhensions pour expliquer le lien entre le changement conformationnel de la PrPc en PrPsc et la mort neuronale finale. Nous ignorons en effet si les lésions neuronales résultent de la perte de la fonction physiologique de la PrPc, si la PrPsc possède un réel caractère toxique ou bien s'il existe d'autres facteurs à découvrir. En outre, il demeure incertain si ces mécanismes de mort neuronale sont primaires ou consécutifs à d'autres atteintes tissulaires, telles que celle de la microglie ou la réponse astrocytaire.

De façon générale, une bonne corrélation anatomique et temporelle entre l'accumulation de PrPsc et l'apparition de neuropathie est observée, ce qui semble être en faveur du caractère neurotoxique de la PrPsc (Unterberger *et al.* 2005).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à la neurodégénérescence sont nombreux et complexes (Kovacs, Budka 2008).

L'apoptose, processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal, se caractérise par une diminution de la taille des cellules, une condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques. Ces caractéristiques morphologiques de l'apoptose, ainsi que la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 mises en évidence lors de maladies à prions suggèrent que l'apoptose est un mécanisme impliqué dans ces maladies (Puig & Ferrer 2001; Unterberger *et al.* 2005). Cependant, la variabilité des résultats lors des différentes études ayant mis ces éléments en évidence suggère que cette voie n'est pas exclusive.

Lors de tremblante expérimentalement inoculée mais aussi lors de Maladie de Creutzfeldt-Jakob ou de syndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker, des vacuoles autophagiques ont été observées (Liberski *et al.* 2004). Elles résultent probablement de l'accumulation intraneuronale de PrP^{sc} qui dépasse alors les capacités cataboliques de la cellule. Ces vacuoles autophagiques précèdent l'apparition des lésions spongiformes, dont la répartition est variable en fonction de la maladie.

Dans les études immunohistochimiques menées *in vivo* sur des cerveaux de souris infectées expérimentalement, la présence de nitrotyrosine, une hème-oxygénase, et de marqueurs d'oxydation des lipides suggère qu'un stress oxydatif pourrait être un mécanisme de perte neuronale chez la souris lors de tremblante (Brown, 2005).

Les études microscopiques, immunohistochimiques, génétiques et biochimiques ont mis en évidence un rôle du système endosomal-lysosomal dans la pathogénie des maladies à prions. Celui-ci est en effet impliqué dans le traitement de la PrP^c et de la PrP^{sc} lorsque celles-ci sont internalisées. La mort neuronale lors des maladies neurodégénératives peut également être liée à l'activité du réticulum endoplasmique en réponse au stress cellulaire.

La PrP^c et la PrP^{sc} se localisent particulièrement dans les synapses, qui représentent de ce fait une cible privilégiée lors des maladies à prions. La dégénérescence et la perte synaptique ont été mises en évidence lors d'études immunohistochimiques et ultrastructurales, et elles précédaient toujours la dégénérescence neuronale. Cette perte synaptique peut avoir pour effet d'isoler les neurones des signaux électriques et des facteurs trophiques, ce qui pourrait déclencher des mécanismes autodestructeurs décrits ci-dessus (Fraser 2002; Unterberger *et al.* 2005). Cependant la suppression de l'expression de la protéine Bax ne permet pas d'éviter l'apoptose neuronale causée par la perte synaptique. Les thérapies anti-apoptotiques sont ainsi peu susceptibles de fonctionner, à moins d'être associées à des molécules permettant d'éviter les dommages synaptiques (Chiesa *et al.* 2005).

Les protéines chaperonnes, y compris les protéines de choc thermique (HSP) peuvent également avoir plusieurs rôles en relation avec les protéines PrP. Elles peuvent par exemple contribuer à stabiliser l'une des isoformes de la PrP et donc favoriser ou inhiber la formation de la conformation pathogène.

La pathogénie des maladies à prions est un processus complexe, mettant en jeu plusieurs voies dont la plupart se retrouvent dans d'autres neuropathies telles que la maladie d'Alzheimer. Il semble clair que l'accumulation intracellulaire de PrP^{sc} ait un rôle dans la neurodégénérescence ; par contre son caractère cytotoxique lorsqu'elle est extracellulaire demeure moins certain.

Une synthèse, volontairement simpliste et simplificatrice, de la pathogénie des maladies à prions peut être avancée comme suit (Kovacs, Budka 2008). Un événement non identifié, tel qu'une infection par des prions exogènes, conversion spontanée, ou l'éveil de prions endogènes jusqu'ici silencieux, initie le changement conformationnel de la PrP^c en PrP^{sc}, entraînant des déficiences fonctionnelles neuronales encore potentiellement réversibles. Au cours de ce processus, les formes oligomériques de la PrP^{sc} provoquent une cascade d'évènements toxiques pouvant mener jusqu'à l'apoptose cellulaire ou à l'autophagie, voire aux deux phénomènes simultanément. Ce processus est de plus potentiellement influencé par la perte de la fonction neuroprotectrice de la PrP^c. En fonction de l'espèce hôte, de la souche et de la voie de dissémination des prions au SNC, la pathologie tissulaire, qui inclut les changements spongiformes, la microglie et la réponse astrocytaire, sera variable. Etant donné la multiplicité des mécanismes pathogéniques impliqués, il est évident que le blocage seul d'une des voies comme perspective thérapeutique est illusoire.

1.4.3. La sensibilité de l'hôte est influencée par son génome

Dans de nombreuses EST humaines et animales, le génotype de l'hôte influence de manière plus ou moins importante la sensibilité à la maladie et l'expression de celle-ci (symptômes et lésions). Le polymorphisme génique ou les mutations du gène *Prnp*, codant pour la synthèse de la PrP^c, peuvent ainsi être déterminants.

Par exemple, les moutons de génotype ARQ/ARQ sont résistants à la souche SSBP/1 mais sensibles à l'isolat CH1641, issu d'une souche circulant dans un troupeau en 1970. Des moutons de même race et même génotype, et provenant du même troupeau, sont ainsi résistants à certaines souches naturelles et sensibles à d'autres. Cette influence sera développée plus en détail dans le paragraphe 1.6.1.1. Au contraire, d'autres maladies comme l'ESB (Somerville *et al*, 1997) semblent être moins influencées en fonction du génome de l'hôte.

1.5. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales :

1.5.1. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales spontanées

Contrairement à l'homme, la plupart du temps l'origine est exogène chez l'animal (Colby, Prusiner 2011).

1.5.1.1. La tremblante :

Importance et distribution géographique

En France, la tremblante est présente sur l'ensemble du territoire avec toutefois une prédominance dans le Sud, région qui comprend la plus forte densité d'élevages ovins (agriculture.gouv.fr). La tremblante est documentée et rapportée en Europe depuis plus de deux siècles et demi (1732). Elle affecte les moutons, chèvres et mouflons ; elle peut aussi être transmise expérimentalement à des hamsters, souris, rats, singes et autres animaux de laboratoire. Une forme atypique de tremblante, observée pour la première fois en Norvège en 1998 et baptisée Nor98, affecte les moutons et les chèvres génétiquement résistants à la forme classique. Il existe d'autres formes atypiques. La distribution de la tremblante est mondiale : Europe (incluant le Royaume-Uni), le Moyen-Orient, le Japon, le Canada, les USA, le Kenya, l'Afrique du Sud, la Colombie et une partie d'Asie. L'Australie et la Nouvelle-Zélande en demeurent indemnes : de faibles épisodes ont eu lieu mais la maladie a été éradiquée par des abattages d'animaux importés et de leurs troupeaux. Nor98 était détectée dans de nombreux pays européens dès 2002 et aux USA à partir de 2007.

Transmission

Elle peut avoir lieu dès la naissance via la mère. Les prions peuvent se localiser dans le placenta durant la gestation, toutefois le génotype du fœtus est déterminant quant à sa sensibilité. La transmission au nouveau-né se fait par léchage ou ingestion de membranes ou fluides fœtaux. Une transmission verticale stricte est également possible mais plus rare, de même que la contamination d'adultes non infectés à partir de fluides fœtaux. Elle peut aussi survenir par contact direct entre individus, les prions étant notamment détectés dans la salive, les sécrétions nasales et le côlon proximal, en plus du système nerveux, des amygdales, des nœuds lymphatiques, de la rate, des muscles et de l'iléon distal. L'excrétion urinaire a récemment été rapportée chez la souris et les hamsters mais non mise en évidence chez le mouton. La contamination environnementale est controversée. Certains rapports attestent d'une persistance de prions dans des granges islandaises pendant près de 16 années.

Signes cliniques

La période d'incubation est longue et varie entre 2 et 5 ans chez le mouton ; des cas de moutons âgés de moins d'un an sont rares. Les symptômes varient selon les souches de prions et les génotypes et races de moutons. Les premiers signes sont généralement comportementaux : les individus atteints se tiennent à l'écart du troupeau. Avec la progression de la maladie, l'animal tend vers un état d'hyperexcitabilité et présente une démarche ébrieuse en projetant les membres vers le haut lorsqu'il se déplace (« *high stepping* »). A l'inverse, les

animaux atteints peuvent présenter un état fixe avec un port de tête haut. De l'ataxie et des tremblements sont également rapportés (d'où le nom en français), de même que des convulsions pouvant être déclenchées notamment lors de la contention. Un intense prurit est très souvent associé (surnommée la « gratte » en français). Une réaction de mordillement est provoquée lorsqu'on gratte l'animal sur la ligne de dos ou à la base de la queue. La toison apparaît dépenaillée, sèche et cassante. Le prurit est cependant rare lors de Nor98. Une baisse de l'état corporel apparaît lors des stades précoces et évolue ensuite vers la cachexie. La toison est sèche et cassante. La mort survient généralement 2 à 6 mois après l'apparition des signes cliniques, parfois plus tardivement.

Chez la chèvre, les signes cliniques peuvent être moins nets : les seuls symptômes sont parfois juste une certaine fatigue, une perte de poids et un arrêt précoce de la lactation. Le prurit est moins fréquent que chez le mouton et s'il l'est son intensité est moindre et il se localise surtout à la queue et au garrot.

Sensibilité et génotype

Trois codons du gène *Prnp* sont susceptibles d'influencer la sensibilité de l'hôte chez le mouton ; ils sont situés dans une région de la protéine qui subit des changements conformationnels lors de la transformation de la PrPc en PrPsc ; il s'agit des codons 136, 154 et 171. Les codons 136 et 171 sont ceux ayant la plus grande influence (Laplanche *et al.* 1993 ; Goldmann *et al.* 1994 ; Andréoletti *et al.* 2002). Ainsi une alanine A en 136 est associée à une plus grande résistance de l'hôte alors qu'une valine l'est à une plus grande sensibilité. Il en va de même pour le codon 154, avec respectivement l'arginine A et l'histidine H, ainsi que pour le codon 171 avec respectivement la glutamine Q et l'arginine R. Cinq combinaisons d'allèles parmi les 8 possibles en théorie sont les plus fréquentes : A136R154R171 (abrégée ARR), ARQ, AHQ, ARH et VRQ. Les génotypes homozygotes ou hétérozygotes ARR sont hautement résistants à la tremblante (Cloucard *et al.* 1995 ; Hunter *et al.* 1996). Ceux-ci développeront alors des signes cliniques après une incubation bien plus longue ou n'auront pas de signe clinique, tandis que le génotype VRQ/VRQ est le plus sensible. Le génotype homozygote ARR est considéré résistant à la tremblante classique (Hunter *et al.* 1997 ; Andréoletti *et al.* 2002 ; Fediaevsky *et al.* 2010).

De plus, les foetus génétiquement résistants suppriment le portage placentaire de prions d'une mère sensible. A l'inverse, une mère résistante ne développe pas un placenta positif au prion si le foetus est sensible (Andréoletti, *et al.* 2002). Différents programmes de génotypages dans de nombreux pays ont déjà été menés (de Andrade *et al.* 2012 ; Hautaniemi *et al.* 2012), et ce afin notamment de sélectionner les individus ARR/ARR ; toutefois il semble que ceux-ci soient plus sensibles à la tremblante atypique Nor98 et donc que cette sélection ne soit pas idéale (Fediaevsky *et al.* 2010).

Chez la chèvre, ce sont essentiellement les codons 142, 143, 146, 154 et 222 qui influencent la susceptibilité ou la résistance (Valdez *et al.* 2003 ; White *et al.* 2008).

Diagnostic

La clinique seule ne permet qu'une suspicion. Le diagnostic différentiel inclut les parasitoses externes, la maladie d'Aujesky, le virus de Maedi-Visna, la listériose cérébrale, la toxémie de gestation, la rage, la nécrose cérébrocorticale, un abcès ou une tumeur cérébrale, le louping ill, différentes toxines, l'hypomagnésémie, l'entérotoxémie chronique et tout autre dégénérescence centrale ou autre cause de prurit.

Le diagnostic nécessite l'histopathologie ou des tests de laboratoire réalisés principalement sur des échantillons prélevés en post-mortem dans l'obex, voire dans les nœuds lymphatiques périphériques avec cependant une sensibilité plus faible, tels que l'IHC ou le Western Blot. A l'abattoir, l'encéphale et la moelle spinale, la rate, les amygdales et les nœuds lymphatiques sont prélevés. Des tests rapides sont également disponibles et reposent sur le principe ELISA ou l'immunoblotting. Les tests *ante mortem* chez l'animal sont peu représentés. La préoccupation principale est d'éviter la transmission à l'homme. Ainsi, chez l'animal, la priorité est plutôt l'élaboration de tests *post mortem* performants et utilisables à grande échelle. Des tests sanguins récemment développés sont basés sur l'électrophorèse par capillarité de la PrPsc. La sérologie n'est bien évidemment pas utile ici.

Des programmes de sélection génétique existent et permettent d'augmenter la résistance du cheptel et limiter aussi la transmission de la maladie puisque les placentas sont alors non contaminés.

1.5.1.2. L'encéphalopathie spongiforme bovine

Importance et distribution géographique

Elle a été rapportée pour la première fois au Royaume-Uni en 1986 (Gavier-Widen *et al.* 2005). Elle correspond au nouveau vMCJ chez l'homme. Son origine demeure inconnue ; l'ESB est probablement issue d'une mutation spontanée de la protéine PrPc ou provient peut-être d'une mutation de prions de la tremblante ovine. Cette dernière théorie est cependant aujourd'hui quasiment abandonnée : les expériences de transmission de tremblante à des bovins par voie naturelle n'ayant jamais provoqué la maladie. La transmission de tremblante à des bovins par voie intracérébrale fut cependant réalisée mais les signes cliniques de l'ESB et les modifications pathologiques associées ne furent pas notés. Il semble que la réutilisation de protéines animales pour l'alimentation du bétail soit à l'origine de l'épidémie explosive qu'a connue le Royaume-Uni dans les années 80/90. En effet, la production de farines animales à partir d'abats de moutons/bovins/poulets (*meat and bone*

meal) utilisées pour nourrir les vaches laitières comme supplément nutritionnel hautement protéique est mise en cause, et ce d'autant plus qu'à partir de la fin des années 70' le procédé de fabrication de ces farines a été modifié, ce qui a nettement augmenté son taux de matière grasse permettant la survie de prions d'origine bovine ou ovine et permettant ainsi la dissémination. Bien que des cas continuent d'être aujourd'hui détectés (Seuberlich *et al.* 2012), des mesures de contrôle et de surveillance, en plus de l'interdiction de l'utilisation des protéines de mammifères dans l'alimentation des animaux d'élevage dès 1988, ont permis de diminuer nettement la prévalence.

L'ESB peut en fait être au moins subdivisée en trois groupes : L'ESB « classique », le type-H et le type-L sur la base de signatures biochimiques différentes. Ces signatures pouvaient être différenciées en western blot de celle de l'ESB classique grâce à la masse moléculaire de la bande non glycosylée de la PrPres : plus faible dans les cas d'ESB-L (pour *Low*) et plus élevée lors d'ESB-H (pour *Heavy*). En outre, le glycoprofil typique de l'ESB, caractérisé par une nette prédominance de la PrPres non glycosylée, n'était pas retrouvé dans les cas d'ESB-L. La grande majorité des cas d'ESB, et notamment ceux lors de l'épizootie originaire de Grande-Bretagne sont de type classique (Greenlee, *et al.* 2012). Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer l'origine des formes atypiques de l'ESB. Il pourrait simplement s'agir de formes spontanées de la maladie, de même que la forme sporadique de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Lors de l'épidémie d'ESB, des foyers ont été signalés dans plusieurs pays européens. Le premier foyer est apparu au Royaume-Uni, où plus de 180 000 cas ont été confirmés depuis les années 1980. L'épidémie au Royaume-Uni a atteint un pic en 1992, avec près de 1000 nouveaux cas confirmés chaque semaine. À l'époque, l'incidence annuelle dans les troupeaux touchés était d'environ 2-3 %. À la suite de mesures de contrôle (surtout l'interdiction des farines animales), l'incidence était d'environ 5-10 nouveaux cas par semaine en 2004. Ce nombre a continué à baisser, l'incidence annuelle passant à 99 cas confirmés en 2006, 35 cas en 2008, et 7 à 11 cas par an entre 2009 et 2011. À partir de 2012, environ 60 cas d'ESB-L ou ESB-H ont été identifiés dans le monde en raison de la surveillance de l'ESB classique. L'incidence de l'ESB atypique semble être beaucoup plus faible que l'ESB classique. Sa prévalence chez les bovins en France et en Allemagne est d'environ 1 cas pour 3 millions de bovins adultes. Presque tous les cas d'ESB de type-L et de type-H ont été détectés chez les bovins âgés de plus de 8 ans, à l'exception d'un cas d'ESB-L chez un boeuf âgé de 23 mois au Japon.

De très rares cas naturels ont été rapportés chez la chèvre ainsi que chez des ongulés exotiques en captivité (nyala, oryx, bison). Expérimentalement, l'ESB a été inoculée à des moutons, des chèvres, des visons, des souris, des oustitis, des macaques et des saïmiris (Piccardo *et al.* 2012).

Transmission

L'ESB se transmet par l'ingestion de tissus contenant des prions d'un animal infecté. Les jeunes individus semblent être particulièrement sensibles. Les prions se répliquent initialement au niveau des plaques de Peyer de l'iléum puis sont transportés via les nerfs périphériques vers le système nerveux central. L'accumulation de prions dans le cerveau nécessite environ 24 mois post-infection chez les bovins. Chez les animaux naturellement infectés, des prions ESB sont détectés principalement dans le cerveau, mais également dans la moelle épinière, la rétine, l'iléum distal, les nerfs périphériques et les glandes surrénales. Il n'y a aucune preuve de transmission horizontale directe chez les bovins ou au pâturage, et la transmission verticale est très rare voire inexistante (seules quelques observations la rapportent).

Signes cliniques

La période d'incubation classique pour les bovins varie entre 2 et 8 ans (avec un pic aux alentours de 5 ans). Les signes cliniques comprennent des anomalies posturales et de la démarche, en particulier une ataxie des membres pelviens et l'amble. Une hyperréactivité aux stimuli extérieurs, des tremblements, un changement comportemental (agressivité) apparaissent aussi. Un prurit intense n'est pas rapporté chez les bovins, mais ceux-ci peuvent tout de même se lécher ou se frotter de manière répétitive. Les signes non spécifiques incluent une baisse de l'état corporel, du grincement de dents, une baisse de la production laitière. La bradycardie et des troubles du rythme cardiaque ont également été rapportés par certaines études. Ces signes évoluent progressivement jusqu'au coma et à la mort sur une période allant de plusieurs semaines à 6 mois.

Diagnostic

Aucun test fiable n'a encore été mis au point sur des animaux vivants. La détection de PrP^{Sc} dans le SNC permet le diagnostic. Celle-ci peut être faite à partir d'extraits de cerveau non fixés par immunoblotting, et dans les cerveaux fixés par immunohistochimie. En outre, plusieurs tests diagnostiques rapides basés sur la méthode immuno-enzymatique (ELISA), immuno-automatisés (Western blot) et dispositifs de flux latéral (LFD) sont disponibles. Les tests rapides permettent le screening d'un grand nombre d'échantillons et sont donc très utilisés dans la surveillance. Les échantillons positifs à des tests rapides sont traditionnellement confirmés par des tests plus spécifiques comme l'immunohistochimie ou immunoblotting (Western blot). Toutefois, l'OIE indique maintenant que la confirmation des résultats positifs avec un deuxième test rapide est acceptable dans certaines circonstances. Un résultat négatif au second test de confirmation n'est pas suffisant pour écarter l'ESB. Un diagnostic de l'ESB peut également être confirmé par la mise en évidence de fibrilles de prions ca-

ractéristiques appelées fibrilles associées à la tremblante (SAF) en microscopie électronique dans des extraits de cerveau. Cependant, les méthodes de diagnostic relatives aux prions ont toutefois une sensibilité limitée : les prions ne peuvent généralement être détectés dans le cerveau qu'à partir de 3 à 6 mois avant le début de la maladie clinique. L'examen histologique du cerveau peut être très utile dans le diagnostic, mais certains animaux dans les premiers stades de l'infection ont peu ou pas de changements spongiformes. En outre, l'ESB peut être détectée par des études de transmission chez la souris (bio-essai). Cependant, une période d'incubation de plusieurs mois, rend cette technique peu pratique pour le diagnostic de routine.

1.5.1.3. La maladie du dépérissement chronique des cervidés

Importance et distribution géographique

La maladie du dépérissement chronique (MDC) affecte le cerf mullet ou cerf hermione (*Odocoileus hemionus*), le cerf à queue noire (*O. hemionus columbianus*), le cerf à queue blanche (*O. virginianus*), et le wapiti des montagnes rocheuses (*Cervus elaphus nelsoni*). Récemment, des cas ont été rapportés sur des élans (*Alces alces*), ainsi que sur des cerfs élaphe (*Cervus elaphus elaphus*) et des caribous (*Rangifer tarandus*).

Détectée à l'origine dans l'Ouest Américain en 1967 chez un cerf mullet (*Odocoileus hemionus*) du Colorado puis en 1978 dans le Wyoming, elle s'est ensuite propagée à travers toute l'Amérique du Nord et a même été retrouvée en Corée du Sud (Buton, 2006). Dans des populations captives, l'incidence peut atteindre jusqu'à 90% ; en milieu sauvage celle-ci est estimée à 15% (Sigurdson *et al.* 2002). Le développement de souris transgéniques exprimant la PrP des cervidés a permis de mieux comprendre cette maladie et d'améliorer sa détection ainsi que l'estimation des titres infectieux.

Transmission

Une particularité est l'excrétion contaminante possible dans les fèces des cervidés, et ce même en phase présymptomatique. La transmission horizontale a ainsi lieu par contact direct ou par contamination environnementale. Les pâtures et les enclos seraient contaminés par les sécrétions des animaux malades avant même l'apparition des symptômes et contamineraient ainsi les animaux sains. Les wapitis, qui, contrairement aux cerfs, ont une plus faible accumulation de prions dans leur tissu lymphoïde, se transmettent moins la maladie entre eux. De même, la transmission horizontale n'a pas été mise en évidence chez l'élan. La transmission verticale est possible mais n'a pas été documentée et ne semble pas être une voie majeure de la dissémination. La transmission expérimentale de MDC à des bovins est possible par injection intracérébrale, suggérant qu'une transmission aux bovins par pâtures

contaminées est possible. Des prions ont été retrouvés dans les muscles squelettiques de certains cerfs, ainsi que dans le muscle cardiaque ; de plus, la présence de prions dans le sang dans le cas de MDC ne permet d'exclure aucun organe concernant une éventuelle contamination par des prions.

Signes cliniques

Comme toute autre EST, la MDC est toujours fatale. Des morts soudaines d'animaux en début de phase clinique ou même en phase pré-clinique sont rapportées. La maladie du dépérissement chronique doit être suspectée chez les cervidés âgés de plus de 16 mois qui ont une perte de poids ou dépérissement chronique, un comportement inhabituel, des signes nerveux, une salivation excessive, de la polyurie / polydipsie, des signes de pneumonie par fausse déglutition, un maintien inhabituel du poil d'hiver.

Diagnostic

En général, dans les troupeaux d'élevage, un seul animal est affecté à la fois. D'autres neuropathies doivent être écartées, incluant la maladie hémorragique épizootique et la fièvre catarrhale ovine, ainsi qu'une parasitose méningée (*Parelaphostrongylus tenuis*). Une intoxication à la locoweed (plante d'Amérique du Nord de la famille des astragales, produisant de la swainsonine, une substance phytotoxique) doit également être envisagée. L'examen anatomopathologique du cerveau peut être très utile dans le diagnostic, mais certains animaux dans les premiers stades de la maladie ont peu de lésions histologiques. Comme dans toutes les EST, la triade lésionnelle se retrouve dans le système nerveux central: dégénérescence puis disparition des neurones, lésions spongiformes avec vacuoles intracytoplasmiques dans les neurones, hyperplasie et hypertrophie astrocytaire, avec formation de plaques amyloïdes. La technique immunohistochimique révèle la présence de la PrP^{Sc} dans divers organes (tonsilles palatines, les nœuds lymphatiques rétro-pharyngés, nœuds lymphatiques le long du petit et du gros intestin, plaques de Peyer, rate) avant que le système nerveux central soit atteint.

La MDC est généralement diagnostiquée par détection de prions dans le système nerveux central et / ou les tissus lymphoïdes. L'immunohistochimie (IHC) est considérée comme le « *gold standard* » pour le diagnostic. L'immunoblotting (Western blot) et les tests rapides sont également utilisés pour cribler les cervidés. Dans les cerveaux autolysés, la MDC peut également être confirmée par la présence de fibrilles de prions caractéristiques appelées fibrilles associées à la tremblante (SAF) en microscopie électronique. Cependant, ce test a une faible sensibilité. La MDC peut être diagnostiquée sur des animaux vivants, notamment par biopsie des amygdales. Une approche dorso-latérale semble permettre une collecte d'un plus grand nombre de follicules. Toutefois, chez le wapiti, l'accumulation de prions dans le tissu lym-

phoïde est moindre, de sorte que le résultat de ces biopsies est souvent non concluant. Toutefois il s'agit d'une méthode invasive nécessitant évidemment une anesthésie générale qui limite sa réalisation en pratique.

Sensibilité et génotype

La sensibilité à la maladie serait liée au polymorphisme du gène *Prnp* (Gavier-Widen *et al.* 2005). La période minimale d'incubation est de 16 mois mais se situe en général entre 2 et 4 ans. Cette période d'incubation est également influencée par le génotype, et notamment le codon 132 du gène *Prnp*. Trois génotypes se distinguent ainsi : les individus homozygotes pour l'allèle codant une méthionine en position 132, correspondant au génotype le plus fréquent en nature et captivité, ont généralement une période d'incubation de 2.5 ans. Le génotype 132ML (L pour leucine) est beaucoup moins répandu et la période d'incubation associée est de 3,5 ans. Quant au génotype 132 LL, très rare, l'incubation dure 5 à 6 ans, voire plus (Spraker, *et al.* 2010).

1.5.1.4. L'encéphalopathie transmissible du vison

Importance et distribution géographique

Il s'agit d'une maladie rare, qui atteint les visons d'élevage.

En Amérique du Nord et en Europe, des visons d'élevage ont été contaminés par l'ingestion d'aliments préparés à partir de carcasses de viande ovine et bovine impropre à la consommation humaine. Elle est, à ce titre, le deuxième exemple de transmission alimentaire de la maladie. Elle a été décrite en Finlande, en Allemagne et en ex-Union Soviétique. Les cas rapportés aux USA ont eu lieu entre 1947 et 1985 (en particulier dans le Wisconsin, le Minnesota et l'Idaho). Le vison constitue un cul de sac épidémiologique pour l'agent infectieux.

Transmission

La transmission est horizontale et plus particulièrement par voie orale. Des blessures de la langue facilite la transmission de la maladie ; de même le comportement de cannibalisme pouvant parfois survenir en élevage favorise l'apparition d'épizooties. Toutefois, la transmission de vison à vison est rare car ces derniers sont maintenant le plus souvent seuls dans leur cage. La transmission verticale n'a jamais été mise en évidence.

Signes cliniques

La période d'incubation varie entre 6 et 12 mois en élevage ; en conditions expérimentales elle peut atteindre 5 mois. Les signes cliniques sont classiques : un changement comportemental, avec en particulier une souillure fécale du site de couchage, est tout d'abord noté, des difficultés pour déglutir apparaissent ensuite. Plus tard, les animaux atteints deviennent hyperexcitables et mordent de manière convulsive. La queue est portée relevée sur le dos, de l'incoordination apparaît, du tournis et les mâchoires se serrent. L'automutilation, en particulier de la queue, peut être notée. L'issue est toujours fatale, en général 2 à 8 semaines après le début des signes cliniques.

Diagnostic

Les lésions histopathologiques typiques se concentrent au niveau du SNC. Le diagnostic différentiel inclut la rage, la maladie d'Aujesky, différentes intoxications, la toxoplasmose, un déficit en thiamine,...

Les méthodes diagnostiques classiques sont employées *post-mortem*.

1.5.1.5. L'encéphalopathie spongiforme des félins

Cette affection est associée à la consommation de nourriture contenant des abats d'animaux contaminés par l'ESB. Des données expérimentales supportent clairement le lien entre l'ESF et l'ESB : des souris inoculées par voie intracérébrale avec des homogénats cérébraux de chats ESF-postifs ont développé des lésions histologiques avec des temps d'incubation tout à fait comparables avec ceux observés chez des souris inoculées avec l'ESB.

Les premiers cas d'ESF ont été pour la première fois rapportés en avril 1990 au Royaume-Uni durant l'épizootie d'ESB. Quatre-vingt-dix cas au total ont ainsi été décrits en Grande-Bretagne, 1 en Irlande, 1 en Norvège, 1 au Lichtenstein, 1 au Portugal et 2 en Suisse (Iulini *et al.* 2008).

Les chats domestiques atteints sont généralement âgés de 4 à 9 ans. Les signes classiques d'EST sont observés : changement comportemental avec timidité accrue ou agressivité, une posture anormale, une ataxie qui affectent initialement les membres pelviens (la démarche peut également être hypermétrique), de l'hyperesthésie. Une tête penchée, des tremblements et du tournis sont aussi rapportés.

Les prions se localisent classiquement dans le système nerveux central, la rétine, les nerfs périphériques et les organes lymphoïdes. Toutefois, une étude de 2003 a montré qu'ils pouvaient également être retrouvés dans la rate, l'iléum, les surrénales et les reins (Lezmi *et al.* 2003).

L'ESF a également été observée et diagnostiquée chez d'autres félins : le guépard (*Acinonyx jubatus*), l'ocelot (*Felis pardalis*), le chat de Temminck ou chat doré d'Asie (*Pardofelis temminckii*), le puma (*Felis concolor*), le lion (*Felis leo*), et le tigre (*Panthera tigris*).

1.5.1.6. L'encéphalopathie des ongulés exotiques

Il faut enfin signaler que des cas de maladies à prions ont été observés sur des mammifères exotiques vivant en captivité dans des zoos de Grande Bretagne. La maladie a ainsi été diagnostiquée chez des gazelles, oryx d'Arabie et nyalas à la fin des années 1980 dans un parc zoologique du Sud de l'Angleterre, ainsi que chez des gemsboks (aussi appelés oryx gazelles), des élans du Cap et des grand Koudou. Ces animaux recevaient une alimentation supplémentée en farines de viande et d'os et ont aussi été contaminés par l'agent de l'ESB (Buton, 2006).

1.5.2. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales expérimentales

La tremblante, l'ESB, la MDC et l'ETV furent transmises expérimentalement à des modèles murins lors de nombreuses études afin d'en étudier différents paramètres. Les voies d'inoculation diffèrent selon les protocoles expérimentaux ; la voie d'inoculation intracérébrale prédomine mais les voies intrapéritonéale, intrasplénique, intraoculaire ou intramusculaire sont également employées. La période d'incubation est également fonction de la souche de l'agent d'EST employée, de la souche de l'espèce hôte ainsi que de son génotype. Selon les modèles murins utilisés et les souches de tremblante, les périodes d'incubation varient par exemple de 56 jours pour la souche 263K de tremblante sur des hamsters Syriens (Hogan *et al.* 1986) à 328 jours pour la souche de tremblante ME7 sur des souris de souche VM (Foster *et al.* 1999). Suite à cette période d'incubation, des signes neurologiques progressent : tremblements, ataxie, mouvements de tête, difficulté à rester en décubitus dorsal, bradykinésie, léthargie, malaises (Hogan *et al.* 1986).

1.6. Les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines

Dans les années 1920, Creutzfeldt et Jakob ont décrit pour la première fois une maladie qui porte désormais leur nom (abrégée MCJ, *Creutzfeldt-Jakob Disease* en anglais, CJD) et qui est la plus importante des EST humaines.

Les patients atteints de MCJ développent des épisodes de démence, parfois précédés par de l'ataxie. La mort survient entre 3 et 12 mois (4 à 5 mois en moyenne) après le début des signes cliniques. Les caractéristiques pathologiques s'observent dans le cerveau : vacuolisa-

tion, perte neuronale et prolifération des astrocytes avec un dépôt de la PrPsc sous la forme de plaques discrètes (Armstrong, 2006).

La MCJ existe sous plusieurs formes : la forme génétique (fMCJ, pour familiale) qui correspond à 10-15% des cas, la forme sporadique (sMCJ), qui concerne environ 85% des cas, et la forme iatrogène (iMCJ), dont certains cas sont survenus à la suite de greffe cornéenne, d'utilisation d'électrodes implantées dans le cerveau, d'interventions neurochirurgicales, de greffes de dure-mère ou d'utilisation d'hormone de croissance extraite d'hypophyse humaine (Koch *et al.* 1985; Richard *et al.* 1994) et de gonadotropine. Celles-ci sont aujourd'hui produites par génie génétique.

L'âge moyen d'apparition des signes cliniques est de 60 ans. L'incidence de la MCJ est d'environ 1/1 000 000 (Araujo, 2013).

A partir de 1995, en plein cœur de la crise de la vache folle, une nouvelle forme de la MCJ a été découverte et a fait de nombreuses victimes ; elle est souvent notée (n)vMCJ pour (nouveau) variant de la MCJ. Ce variant diffère sensiblement des formes de MCJ précédemment décrites : l'âge moyen d'apparition des signes cliniques est de 28 ans et la mort survient plus tardivement, jusqu'à deux ans après l'apparition des symptômes.

Les signes cliniques sont principalement psychiatriques : les sujets sont anxieux, dépressifs et présentent des changements de comportement. Après quelques semaines voire mois, des troubles de la démarche et des mouvements apparaissent, ainsi que des problèmes de mémorisation. En fin d'évolution, le patient devient muet, incapable de se mouvoir et présente des épisodes de myoclonies. Les importants dépôts de PrPsc dans le cerveau sont dits en «florid plaques».

En plus de la MCJ, trois autres maladies humaines à prions ont été identifiées. Historiquement, la maladie du kuru fut décrite chez des indigènes de Papouasie et Nouvelle-Guinée peuplant les montagnes. Le kuru se transmettait très probablement suite à des rituels cannibales. Ces rites cessèrent dans les années 1950. L'insomnie fatale familiale (IFF) est une maladie génétique récemment décrite ; elle se caractérise par des troubles du sommeil, de l'insomnie, puis par l'apparition d'hallucinations, de stupeur et de coma. Le syndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker (GSS) est une maladie génétique rare décrite pour la première fois en 1936 (Collins, *et al.* 2001). Il se caractérise par une ataxie, des épisodes de démence (perte de mémoire à court terme, du jugement et de troubles émotionnels), par une faiblesse des membres et des troubles du langage.

I.7. Perspectives thérapeutiques des maladies à prions

Pour l'instant, aucun traitement n'est disponible pour stopper la progression ou traiter les maladies à prions.

Le blocage de la conversion de la PrPc en PrPsc constituerait l'approche thérapeutique la plus pratique, cependant, de nombreux mécanismes et intermédiaires existent et sont encore trop peu compris (cf 1.4.2.).

Des études *in vitro* ont montré une certaine efficacité de la quinacrine et la chlorpromazine, qui permettraient d'inhiber la formation de PrPsc dans une lignée cellulaire de neuroblastomes chroniquement infectées par des prions. Toutefois, ces molécules n'ont pas montré d'effet lorsqu'utilisées *in vivo* (Araujo, 2013).

Dernièrement, des études portant sur l'emploi des tétracyclines ont fourni quelques résultats (Tremblay *et al.* 1998; Noble *et al.* 2009; Forloni *et al.* 2009).

Les tétracyclines interagissent avec les agrégats formés par des peptides synthétiques PrP ou PrP pathologiques (PrPsc) extraits de cerveaux d'animaux atteints d'EST et déstabilisent la structure des fibrilles amyloïdes. Les tétracyclines inhiberaient le mauvais repliement de la protéine associée à la formation PrPsc. Les preuves se sont récemment accumulées quant à l'activité anti-amyloïdogène potentielle des composés polycycliques, dont beaucoup ont été proposés comme « molécules anti-prion ». La conformation chimique plane de ces composés affecterait la structure en feuillets β des PrPsc et interférerait avec leur repliement. Une analyse rétrospective du traitement de patients humains avec de la doxycycline depuis leur diagnostic de MCJ jusqu'à leur décès indiquait un prolongement des temps de survie et semblait ainsi appuyer ces données (Tagliavini, 2008). Toutefois, les résultats d'une récente étude clinique randomisée en double aveugle avec placebo montrent que l'emploi de doxycycline s'est soldé par un échec (Haïk *et al.* 2014).

II. PREREQUIS NECESSAIRES A L'ETUDE DE L'ATTEINTE OCULAIRE DES MALADIES A PRIONS

II.1. La rétine des mammifères

La rétine est une mince couche de tissu nerveux transparent spécialisé tapissant l'intérieur de la choroïde et permettant la transduction de la lumière en signaux neuronaux qui seront finalement perçus comme une image visuelle. Toute l'architecture anatomique de l'œil n'a pour but que de permettre à la lumière d'atteindre la rétine.

Plus spécifiquement, la lumière atteint les photorécepteurs, une couche de neurones spécialisés (comprenant les bâtonnets et les cônes) renfermant des photopigments et elle les stimule pour induire la naissance d'un signal électrique qui va cheminer le long des neurones des cellules bipolaires puis ganglionnaires, puis à travers les voies visuelles jusqu'au cortex. La rétine est un organe unique en ce sens que certaines de ses modifications pathologiques peuvent être visualisées par ophtalmoscopie alors que dans la plupart des autres organes, les altérations ne sont identifiées que par le moyen de l'anatomo-pathologie.

II.1.1. Un organe multicellulaire très organisé

Un modèle très simplificateur consiste à envisager la rétine comme une unité sensorielle à 3 neurones : les photorécepteurs relaient le message visuel via les cellules bipolaires puis les cellules ganglionnaires.

Toutefois, d'un point de vue histologique, la rétine est décrite comme possédant 10 couches. De l'extérieur (contre la choroïde) à l'intérieur (contre le vitré), la rétine comprend (Ofri, 2008):

1. l'Épithélium Pigmenté Rétinien
2. la Couche des Photorécepteurs
3. la Membrane Limitante Externe
4. la Couche Nucléaire Externe
5. la Couche Plexiforme Externe
6. la Couche Nucléaire Interne
7. la Couche Plexiforme Interne

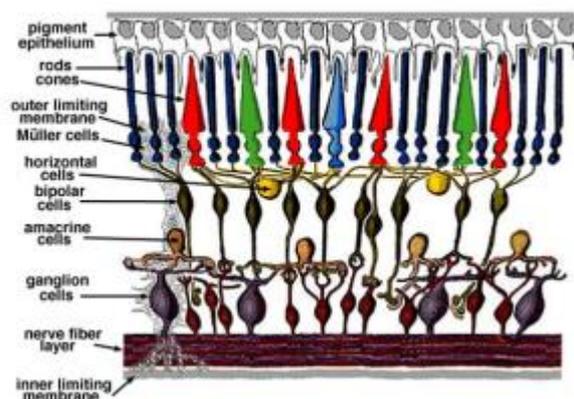


Figure n°4a

Schéma de l'organisation simplifiée de la rétine

<http://webvision.med.utah.edu/>

8. la Couche des Cellules Ganglionnaires

9. la Couche des Fibres Nerveuses

10. la Membrane Limitante Interne

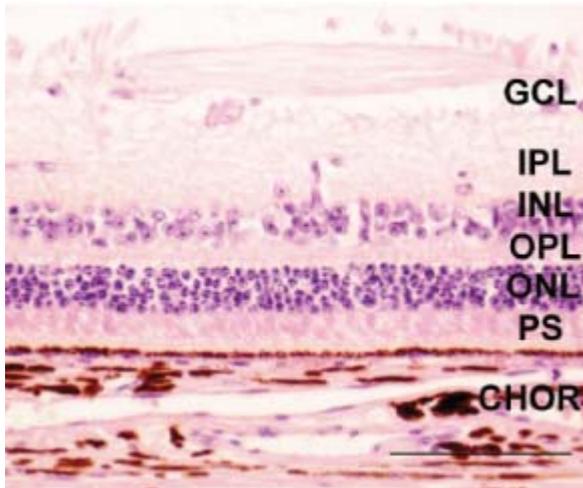


Figure 4c

Coupe histologique de rétine de brebis saine colorée à l'hématoxyline-éosine

GCL : couche des cellules ganglionnaires ; *IPL* : couche plexiforme interne ; *INL* : couche nucléaire interne ; *OPL* : couche plexiforme externe ; *ONL* : couche nucléaire externe ; *PS* : couche des photorécepteurs ; *CHOR* : choroïde

(d'après Regnier et al. 2011)

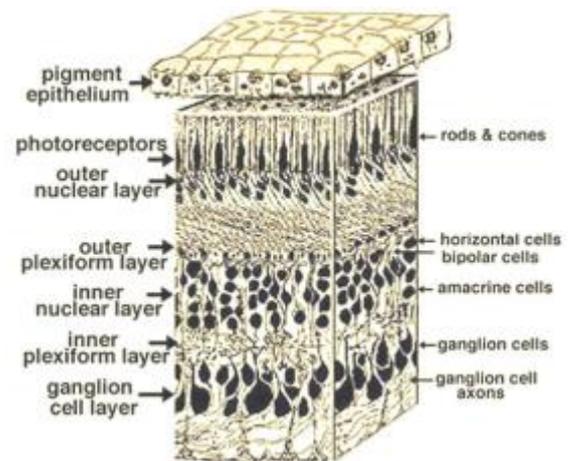


Figure n°4b

Schéma d'un bloc en 3 dimensions de rétine

www.webvision.med.utah.edu

II.1.2. Les différentes couches rétiniennes

L'épithélium pigmenté rétinien (Retinal Pigment Epithelium):

Il fait face à la choroïde. Le RPE est pigmenté dans la partie hors tapis du fond d'œil chez les animaux domestiques et il donne à cette zone une couleur une coloration noirâtre. Il se compose d'une rangée de cellules unies entre elles par des jonctions serrées, renfermant des granules pigmentaires et des phagosomes. L'espace sous-rétinien est constitué d'une matrice extracellulaire spécialisée permettant l'interaction entre les prolongements du pôle apical des cellules du RPE et les segments externes des photorécepteurs.

Le RPE est physiologiquement non pigmenté dans la région du tapis et ne peut être vu cliniquement. Cette absence de pigmentation permet aux faisceaux lumineux n'ayant pas atteint de photorécepteurs d'arriver jusqu'au tapis et donc d'être réfléchis.

Le RPE possède deux fonctions principales. Tout d'abord il constitue une interface métabolique entre la choroïde (donc l'apport vasculaire) et les photorécepteurs qu'il alimente en métabolites et dont il élimine les déchets. Sa seconde fonction principale consiste à recycler les photopigments « usagés ». Les disques contenus dans les photorécepteurs, synthétisés par les segments externes et permettant la transduction en signal neuronal sont effectivement phagocytés par le RPE dans les phagosomes. Ce rôle de phagocytose intervient également lors d'inflammation rétinienne.

En position interne par rapport au RPE se trouve la neurorétine constituée de couches cellulaires connectées par des couches synaptiques.

La couche des photorécepteurs (Photoreceptors Layer, PS):

Elle se compose des segments extérieurs des cônes et bâtonnets qui renferment les photopigments visuels contenus à l'intérieur de disques empilés comme un tas de pièces de monnaie. C'est l'endroit même où la vision prend sa source car c'est là que se déroule le processus de phototransduction, c'est-à-dire la conversion d'un signal lumineux/visuel en signal neuronal.

La membrane limitante externe (External Limiting Membrane):

Elle est formée par les extrémités des membranes cellulaires des cônes, bâtonnets et cellules de Müller. Ces cellules de Müller s'étendent sur l'ensemble de la rétine entre les membranes limitantes externe et interne et constituent en quelque sorte le squelette de la rétine. Ces cellules possèdent également un rôle important dans le stockage énergétique et la régulation ionique. Cette membrane limitante externe n'est pas véritablement une « membrane » au sens propre, mais plutôt une série de complexes jonctionnels entre les photorécepteurs et les cellules de Müller. Ces ponts sont formés par l'extrémité distale des cellules de Müller qui s'attachent aux photorécepteurs par des jonctions de type zonulaire. Le matériel filamentueux associé à ces adhérences zonulaires intercellulaires apparaît telle une membrane en microscopie, d'où le nom (Spraker *et al.* 2010).

La couche des noyaux externes (Outer Nuclear Layer, ONL) :

Elle correspond aux noyaux des bâtonnets et des cônes.

La couche plexiforme externe (Outer Plexiform Layer, OPL) :

C'est une couche synaptique : les extensions axonales des photorécepteurs se dilatent pour former des expansions synaptiques, qui font synapse avec les dendrites des cellules bipolaires, ainsi qu'avec les photorécepteurs adjacents. Il s'agit du site de la première synapse (sur les 3 existants dans la rétine).

La couche des noyaux internes (Inner Nuclear Layer, INL) :

Elle se compose des noyaux des quatre types cellulaires suivants : les cellules bipolaires, les cellules de Müller, les cellules horizontales et les cellules amacrines (ces deux derniers types cellulaires permettent une modulation du signal neuronal).

La couche plexiforme interne (Inner Plexiform Layer, IPL):

Il s'agit de la seconde couche synaptique, constituée des axones des cellules bipolaires, horizontales et amacrines et des dendrites des cellules ganglionnaires.

La couche des cellules ganglionnaires (Ganglion Cells, GC):

Il s'agit des corps cellulaires des cellules ganglionnaires. A l'exception de la rétine centrale, cette couche est monocellulaire.

La couche des fibres nerveuses (Nerve Fiber Layer):

Elle est formée par les axones des cellules ganglionnaires. Ils cheminent de façon parallèle à la surface de la rétine et convergent tous vers la papille où ils forment alors des faisceaux nerveux qui constituent le nerf optique qui « sort » de l'œil à travers la lame criblée (*lamina cribrosa*). Les axones des cellules ganglionnaires font ensuite synapse dans les corps genouillés latéraux (une fraction de ceux-ci fait synapse au niveau des noyaux pré-tectaux).

La membrane limitante interne (Internal Limiting Membrane) :

Accolée au vitré, elle constitue la couche la plus interne de la rétine.

II.1.3. Le concept de « rétine inversée »

L'orientation anatomique des couches rétinienne peut sembler illogique au premier abord puisque les photorécepteurs sont en position la plus externe et que la lumière doit donc cheminer à travers toute la rétine avant de les atteindre. Cette disposition anatomique, appelée rétine inversée, s'explique en fait par les hauts besoins métaboliques des photorécepteurs nécessaires à leur bon fonctionnement. Ainsi disposés, c'est-à-dire juste à côté du RPE qui est lui-même accolé à la choroïde, ils sont situés au plus près de l'apport vasculaire (Ofri, 2008).

II.1.4. Les cellules de la neurorétine

II.1.4.1. Les différents types cellulaires de la neurorétine

L'étude des différentes couches rétiniennes a révélé l'existence de cinq types de cellules neuronales et trois types de cellules gliales dans la neurorétine des mammifères. La phototransduction naît en effet dans les photorécepteurs, qui émettent alors un signal neuronal transmis par les cellules bipolaires puis les cellules ganglionnaires dont les axones cheminent dans le nerf optique. Les cellules horizontales et amacrines jouent un rôle modulateur dans la transmission de ce signal et constituent les deux derniers types de cellules neuronales de la rétine.

Les neurones de la rétine:

Comme mentionné précédemment, les segments externes des bâtonnets et des cônes contiennent des photopigments sensibles à la lumière, capables d'absorber l'énergie de particules de lumière (photons). Toutefois, les pigments des bâtonnets et ceux des cônes sont différents, ce qui conduit à des rôles différents de ces deux types de photorécepteurs. Les photopigments des bâtonnets sont beaucoup plus sensibles que ceux des cônes à de faibles niveaux de lumière et à des petits changements d'intensité lumineuse. Par conséquent, ils sont particulièrement sollicités lorsque l'individu se situe dans un environnement sombre ou la nuit (vision scotopique). Les cônes sont eux peu sensibles aux faibles variations d'éclairage, et fonctionnent principalement lorsque celui-ci est important (vision photopique). D'autre part, les cônes sont capables d'une plus grande discrimination visuelle que les bâtonnets, offrant ainsi une résolution plus haute de la vision. Chez de nombreuses espèces, les cônes contiennent également des photopigments permettant la vision des couleurs.

De plus, la différence de sensibilité entre les bâtonnets et les cônes s'explique par le concept de la sommation rétinienne : on dénombre non loin de 130 millions de photorécepteurs en moyenne dans la rétine humaine pour seulement 1.2 million d'axones dans le nerf optique.

Cela signifie donc que des axones ont plus d'un photorécepteur, et c'est particulièrement le cas avec les bâtonnets. En faisant converger plusieurs photorécepteurs (plusieurs bâtonnets et un cône) d'une même localisation rétinienne sur une seule (grosse) cellule bipolaire et en faisant converger plusieurs cellules bipolaires sur une cellule ganglionnaire, l'amplification de faibles niveaux de lumière est ainsi possible par les bâtonnets (sollicités dans ce cas). Cependant, cette amplification se produit bien évidemment au détriment de la discrimination fine puisqu'il n'est alors pas possible pour la cellule ganglionnaire de « savoir » de quel bâtonnet provient exactement le message neuronal et donc quelle zone précisément a été stimulée par la lumière. C'est la notion de convergence rétinienne ; elle est à la base d'une vision dite périphérique, moins précise mais fonctionnelle malgré de faibles intensités lumineuses. Inversement, un cône est relié à une seule cellule bipolaire, elle-même reliée à une seule cellule ganglionnaire : cette disposition permet une discrimination visuelle maximale et se retrouve au niveau de la fovéa (cf plus bas). Par contre, la quantité de photons requise pour l'activation de ce système est supérieure, d'où la bonne acuité visuelle par forte intensité lumineuse seulement.

Les rétines des oiseaux et des primates possèdent un domaine spécialisé appelé la fovéa. Les photorécepteurs de cette région sont uniquement des cônes. Elle permet une haute résolution visuelle avec une grande définition des couleurs. Chez les Mammifères non-primates cette fonction est assurée par l'area centralis, cependant bien que la densité en cônes soit plus élevée qu'ailleurs dans la rétine, leur présence dans cette zone n'est pas exclusive.

Chez tous les animaux, y compris ceux qui possèdent une fovéa, le ratio bâtonnets/cônes est de l'ordre de 17/1 mais celui-ci varie en fonction de la localisation rétinienne : il s'élève vers la périphérie de la rétine (la résolution visuelle y est donc la plus faible). On peut enfin noter que certains animaux nocturnes ont une rétine ne comportant que des bâtonnets, tandis que certains rapaces possèdent deux foveas.

Un troisième type de photorécepteurs existe dans la rétine des mammifères. Il s'agit en fait d'une sous-population de cellules ganglionnaires, qui représente à 1 à 3% des cellules ganglionnaires totales. Ces photorécepteurs font donc directement synapse dans les corps géniculés latéraux. Le photopigment qu'ils contiennent, la mélanopsine, a une sensibilité à la lumière et une résolution bien moindres que celles des photopigments des cônes et des bâtonnets. Ces photorécepteurs, appelés cellules ganglionnaires rétinienne photosensibles intrinsèquement (*ipRGCs*), régulent les fonctions visuelles n'intervenant pas dans la formation d'une image ; ils interviennent par exemple lors des réflexes pupillaires photomoteurs et influencent de nombreux mécanismes impliqués dans la régulation des rythmes circadiens en fonction notamment de l'environnement lumineux du sujet.

Les cellules gliales

Les cellules gliales de Müller, principales cellules gliales rétiniennes, possèdent des extensions radiales à travers l'épaisseur de la rétine qui forment un support structural. Les cellules de Müller participent au métabolisme anaérobie des neurones en leur fournissant les métabolites nécessaires. Elles éliminent les déchets, tels que le CO₂ et l'ammoniac et phagocytent les substances neuroactives telles que le GABA, la taurine ou la dopamine. Elles joueraient un rôle dans la modulation de la transmission synaptique (Newman, 2004), outre leur fonction neuroprotectrice : elles favorisent notamment la régénération cellulaire (Garcia et Vecino, 2003). Les cellules de Müller assurent aussi le recyclage du glutamate, neurotransmetteur dont l'exposition excessive est toxique pour les neurones.

La concentration des astrocytes est maximale dans la tête du nerf optique. Leurs corps cellulaires et leurs prolongements se concentrent dans la couche des fibres nerveuses. Les prolongements des astrocytes s'agencent de manière à former un tube dans lequel passent les axones des cellules ganglionnaires ; ils entourent également les vaisseaux sanguins de la couche des fibres nerveuses (Triviño *et al.* 1996). Comme les cellules de Müller, les astrocytes contiennent des réserves en glycogène et fourniraient un support métabolique aux neurones. Ils participeraient aussi à la régulation de l'homéostasie ionique en régulant la concentration extracellulaire en potassium.

Les cellules microgliales ont de petits corps cellulaires et des prolongements courts et irréguliers. Une lésion rétinienne stimule leur activité macrophagique : ces cellules phagocytent les neurones dégénérés.

II.1.4.2. Les marqueurs protéiques spécifiques des cellules rétiniennes

La localisation histologique et les caractéristiques morphologiques de ces cellules permettent de les différencier, mais il ne s'agit pas des seuls moyens. Certains marqueurs protéiques spécifiques (Smith *et al.* 2008), dont l'expression est spécifique d'un type cellulaire donné, peuvent en effet être recherchés par immunohistochimie (technique détaillée plus loin) pour mettre en évidence d'éventuelles atteintes cellulaires.

La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) est un indicateur du stress rétinien et l'augmentation de son expression survient de façon concomitante à l'hypertrophie des cellules de Müller suite à un dommage rétinien (Greenlee *et al.* 2006). L'expression de la GFAP dans la rétine normale se produit dans les astrocytes de la couche des fibres optiques et dans la couche des cellules ganglionnaires, avec une certaine expression dans les cellules de Müller. L'expression accrue de la GFAP dans les cellules de Müller est considérée comme un indicateur de dégénérescence rétinienne. La Glutamine Synthase (GS) est également exprimée par les cellules de Müller et permet la conversion du glutamate en glutamine, prévenant ainsi une excitotoxicité induite par le glutamate.

L'isoforme α de la protéine kinase C (PKC α) est un marqueur protéique des bâtonnets (Greferath et al. 1990; Haverkamp and Wassle, 2000). La protéine de transport vésiculaire du glutamate de type 1 (VGLUT1) constitue un marqueur des terminaux glutaminergiques des photorécepteurs au niveau de l'OPL donc et au travers de l'IPL dans les terminaux des cellules bipolaires (Johnson *et al.* 2003). La Syntaxine 1 se retrouve quant à elle dans les processus des cellules horizontales donc au niveau de l'OPL (Hirano *et al.* 1996), ainsi que dans les cellules amacrines (Morgans *et al.* 2006). La choline acétyltransférase (ChAT) est un marqueur spécifique des cellules amacrines et plus précisément d'un type particulier : les cellules amacrines cholinergiques (Haverkamp et Wassle, 2000). La présence des cellules ganglionnaires peut être mise en évidence par la protéine associée aux microtubules de type 2 (MAP2), qui constitue d'ailleurs également un marqueur de certaines cellules amacrines et horizontales (Okabe *et al.* 1989)

II.2. Méthodes diagnostiques et techniques expérimentales fréquemment utilisées dans les études concernées

II.2.1. Le diagnostic lésionnel histologique

Le diagnostic de l'ESB, de la tremblante, ou de la MDC était historiquement basé sur l'examen histopathologique du système nerveux central. Celui-ci se caractérise par une triade lésionnelle typique : spongieuse, perte neuronale et gliose astrocytaire.

Des changements caractéristiques vacuolaires, dits de spongieuse, sont en effet observés dans le cerveau et ont une distribution neuroanatomique typique. Cette spongieuse peut être diffuse ou former localement des amas de vacuoles rondes ou ovales. Les lésions siègent dans le neuropile, partie du tissu nerveux située entre les principales cellules constituant la substance grise du système nerveux central. Il s'agit donc d'un enchevêtrement des protrusions cytoplasmiques issues des neurones (axones et dendrites) et des cellules gliales des couches profondes du cortex, dans le cortex du cervelet ou dans la substance grise sous corticale.

Les autres caractéristiques histologiques d'EST sont l'astrogliose et la perte neuronale. Toutefois, bien que fortement évocateurs, ces derniers signes ne peuvent permettre de faire un diagnostic en l'absence de spongieuse. Dans un tel cas de figure, c'est-à-dire lorsque la vacuolisation est absente ou si des changements autolytiques sont présents (Clark et Moar, 1992), le diagnostic doit être confirmé par des méthodes plus sensibles telles que l'immunohistochimie ou le Western Blot basées sur le rôle central joué par la protéine prion dans la pathogenèse des EST. La caractérisation de PrPsc est ainsi finalement devenue l'approche diagnostique principale.

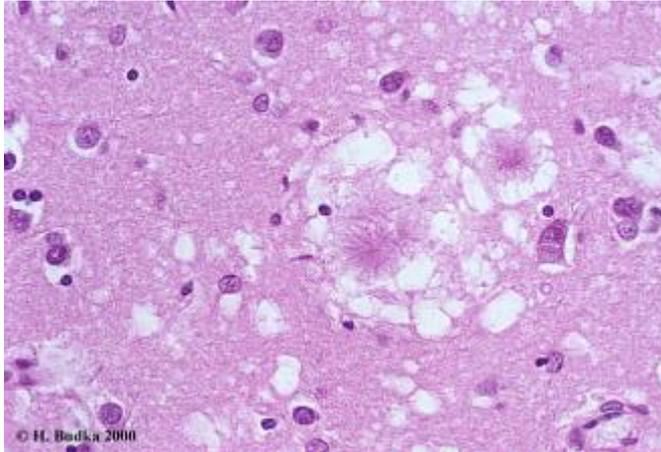


Figure n°5

Coupe histologique de cerveau d'un patient humain décédé de la vMCJ, observée au microscope optique, coloration hématoxyline-éosine.

Les vacuoles spongiformes entourent les plaques amyloïdes (*florid plaques*).

(d'après Budka, 2000)

II.2.2. Le bio-essai

Le principe du bio-essai est simple: il s'agit d'inoculer à un animal sensible à la maladie un homogénat de cerveau d'un animal que l'on suspecte infecté.

Le principal inconvénient en pratique de cette méthode est dû au long temps d'incubation et donc au délai nécessaire avant l'obtention des résultats. Il n'est donc pas utilisé pour le diagnostic de routine mais reste le test référence au plan expérimental. En effet, Le typage des souches à l'aide de rongeurs conventionnels est resté pendant longtemps la méthode de référence pour étudier la diversité des agents des EST. Pourtant, il est rapidement apparu que le recours à ces modèles animaux n'était pas dépourvu d'inconvénients. En effet, beaucoup d'isolats d'EST ne sont pas transmissibles à la souris et de nombreuses interrogations sur les conséquences de la transmission interspécifique des prions, en termes de propriétés biologiques et biochimiques, ont été soulevées. Cet obstacle peut aujourd'hui être partiellement contourné grâce aux modèles animaux transgéniques pour le gène *Prnp* qui ont été créés suite à l'étude des facteurs influant sur l'efficacité de la transmission interspécifique des prions.

Après l'homogénéisation des échantillons prélevés (provenant le plus souvent du cerveau, mais aussi d'oeil ou d'autres tissus) et dilution avec tampon phosphate contenant de l'albumine, les échantillons sont alors prêts à être inoculés (Hogan *et al.* 1987 ; Smith, Greenlee 2014).

Pour réaliser l'inoculation intracérébrale, un inoculum de 20 μ L est injecté à l'aide d'une aiguille 30G à travers le crâne de souris anesthésiées.

Le bio-essai permet également de déterminer le titre en agent infectieux d'un échantillon donné en utilisant la méthode de dilution. Des dilutions successives de l'échantillon sont inoculées à des souris. Le titre en agent infectieux est donné par la dilution qui ne provoque plus la mort des souris. La méthode des intervalles de temps d'incubation établie par Prusiner (1982) permet aussi d'estimer le titre infectieux de l'échantillon testé. Les intervalles

de temps entre l'incubation et l'apparition des premiers signes cliniques et entre l'incubation et la mort sont mesurés. Le logarithme de ces intervalles moins un facteur correctif est une fonction linéaire du logarithme de la dose inoculée.

II.2.3. La recherche de PrPsc

Au fil du temps, de nombreux anticorps spécifiques contre les PrPsc, seules marqueurs véritables des EST, ont été produits. Des techniques basées sur l'immunologie, telles que l'IHC et le Western Blot, et l'ELISA sont ainsi largement utilisés pour faciliter le diagnostic, que ce soit à des fins de dépistage, pour étudier la pathogénie ou fournir des informations au niveau moléculaire (Gavier-Widen *et al.* 2005).

La plupart des méthodes de diagnostic pour la détection de la PrPsc reposent sur la résistance partielle de celle-ci à la protéinase K et l'identification par l'utilisation d'anticorps anti-PrP. Cependant, une difficulté fondamentale avec les anticorps employés est que la discrimination spécifique entre PrPc et PrPsc reste difficile car il n'existe pas de réactifs spécifiques de la PrPsc. Un traitement des tissus par la protéinase K afin de détruire la PrP cellulaire normale est associé à une technique immunologique de détection de la PrPres. Après un traitement par des enzymes protéolytiques, des étapes de démasquage de la PrP (acide formique, autoclavage) favorisent la fixation des anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisés.

L'extrémité C-terminale de la PrPsc peut se condenser pour former un épitope conformationnel spécifique de la PrPsc. C'est ainsi que l'anticorps monoclonal V5B2 reconnaît spécifiquement cet épitope et peut mettre en évidence uniquement la PrPsc chez l'homme, les bovins et les ovins atteints respectivement de MCJ, ESB et tremblante (Serbec, 2003).

La PrPsc étant capable de se condenser en une structure appelée SAF (*Scrapie Associated Fibrils*), cette dernière peut être immunoprécipitée spécifiquement à l'aide de plusieurs anticorps monoclonaux qui ne se lient qu'aux PrPsc précipitées (Morel *et al.* 2004).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la sensibilité de la détection des anticorps. La configuration de la protéine, l'orientation et la présentation de l'épitope, les sites de clivage précis des protéinases peuvent faire qu'un anticorps adapté pour la technique immunohistochimique peut ne pas l'être pour le Western Blot ou l'ELISA (Gavier-Widen *et al.* 2005).

II.2.3.1. L'immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) a été décrite pour la première fois en 1941 par Albert Coons. Il s'agit d'un procédé permettant la détection d'antigènes dans leur localisation anatomique d'origine. L'IHC exploite le principe de la fixation d'anticorps spécifiques de l'antigène visé et

couplés à des enzymes ou des fluorophores, et permettant une réaction en vue de la visualisation et donc du repérage de l'antigène cherché dans le tissu étudié. Elle est largement utilisée dans les études récentes des maladies à prions (O'Rourke, *et al.* 1998 ; Valdez, *et al.* 2003 ; Hamir, *et al.* 2004 ; Hilbe, *et al.* 2009 ; ...).

Le premier des deux temps principaux de l'IHC consiste en la préparation de l'échantillon : après avoir collecté le tissu en question de façon adéquate pour respecter son intégrité il faut ensuite le fixer. Le paraformaldéhyde est pour cela souvent utilisée, mais une dénaturation à l'acide formique peut parfois la supplanter (Regnier *et al.* 2011). Le tissu alors fixé en paraffine afin de maintenir sa forme originale et permettre de fines coupes de tissu réalisées à l'aide d'un microtome (environ 4 µm) qui sont alors déposées sur des lames (recouverte d'un adhésif, tel que l'APTS ou la poly-L-lysine) et déshydratées en réalisant des lavages à l'alcool ou un passage à l'autoclave.

La prochaine étape consiste ensuite à marquer l'antigène. Un solvant organique volatil est tout d'abord utilisé afin d'enlever la paraffine des lames ; un traitement enzymatique ou par la chaleur est ensuite aussi souvent nécessaire pour casser les ponts de méthylène engendrés par la fixation et pouvant masquer les épitopes antigéniques. Les anticorps primaires (mono ou polyclonaux) sont alors déposés, puis, éventuellement, les anticorps secondaires : la détection est alors indirecte, elle offre une meilleure sensibilité avec un meilleur pouvoir d'amplification du signal. Si les anticorps secondaires sont conjugués à des molécules de biotine, une plus grande amplification encore peut être réalisée. Parfois, deux anticorps monoclonaux primaires peuvent être utilisés. Dans le cadre de la recherche de PrPsc, une séquence de la protéine est visée et constitue l'épitope antigénique visé par les anticorps primaires.

La révélation peut être réalisée soit par la fluorescence (un fluorophore a été fixé aux anticorps secondaires), on parle alors d'immunofluorescence, ou par une réaction enzymatique chromogénique (immunopéroxydase).

Une contre coloration standard comme l'hémaluntoxyline-éosine ou est également réalisée pour permettre une meilleure visualisation cellulaire.

II.2.3.2. Le Western-Blot

Il est possible d'établir le profil électrophorétique de la PrPsc extraite de tissus contaminés par migration sur gel en conditions dénaturantes (western blot). Toutefois, en l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement la PrP anormale, il est nécessaire d'éliminer la PrPc de l'échantillon avant d'effectuer l'électrophorèse. Pour cela, les propriétés biochimiques respectives des deux isoformes de la PrP sont exploitées. L'homogénat est soumis à une digestion ménagée à la protéinase K en milieu détergent. La PrPc est ainsi complètement dégradée alors que seule la partie N-terminale de la PrPsc est lysée. La PrPsc, insoluble

dans les détergents non-ioniques, est ensuite récupérée par centrifugation/précipitation. L'électrophorèse est effectuée en conditions dénaturantes (SDS) et réductrices (β -mercaptoéthanol) de manière à ce que la vitesse de migration des protéines dépende « uniquement » de leur masse moléculaire. Après le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur membrane, la révélation immunologique (voir immunohistochimie) permet de visualiser un profil composé classiquement de trois bandes, correspondant aux formes bi-, mono- et non glycosylées de la PrPsc.

Le Western Blot constitue une méthode très répandue (Schneider *et al.* 2012) et très sensible pour détecter la PrPsc, et ce sur tout type de tissus. La sensibilité peut être multipliée par 4 en utilisant l'acide phosphotungstique pour faire précipiter la PrPsc avant l'électrophorèse (Aguzzi et Polymenidou 2004). La bonne sensibilité du Western Blot est liée aux trois volets de l'identification de la molécule : la reconnaissance par l'anticorps, le poids moléculaire, et l'aspect typique en trois bandes dû aux divers degrés de glycosylation de la PrPsc (Raeber et Oesch, 2006). Cette méthode permet ainsi de différencier différentes formes d'EST en fonction notamment du poids moléculaire des fragments et de l'abondance relative des bandes hautement, faiblement et non-glycosylées. Dans le cas de la MCJ sporadique, le WB permet ainsi de différencier les deux glycotypes les plus fréquents, le type 1 et le type 2a, caractérisés respectivement par des fragments non-glycosylés de 21 kDa et 19 kDa.

Le WB est toutefois une méthode présentant certains inconvénients. Celui-ci doit être réalisé sur des échantillons frais, il ne révèle aucun caractère anatomique et reste chronophage.

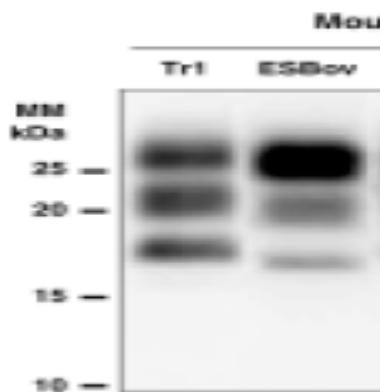


Figure n°6

Typage biochimique des EST par Western Blot.

Chez le mouton, par exemple, le profil de la PrPres de l'ESB inoculée expérimentalement (ESBov) ou celui de la souche de tremblante atypique norvégienne (Nor98) sont particulièrement caractéristiques et se distinguent d'autres souches de tremblante plus classiques (Tr1 et Tr2).

(d'après Collinge *et al.* 1996).

II.2.3.3. Les tests ELISA

Le principe du test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) repose sur l'adsorption d'antigènes recherchés au fond de puits remplis ensuite par une solution contenant les anticorps spécifiques sur lesquels, ou sur des anticorps secondaires, est fixée une enzyme qui

catalyse une réaction colorimétrique ou chémoluminescente. La fixation des antigènes au fond des puits peut être obtenue suite à des interactions non-spécifiques avec la surface du puit, ELISA direct, ou en utilisant des anticorps spécifiques préalablement fixés au fond du puit, ELISA indirect ou sandwich.

Les tests ELISA ont pour intérêt leur grande sensibilité et leur automatisation aisée. Plusieurs tests ont été proposés ces dernières années pour le diagnostic de routine des EST animales, grâce aux efforts de plusieurs laboratoires européens pour l'obtention d'excellents anticorps monoclonaux (Deslys *et al.* 2001). Leur simplicité d'utilisation a entraîné le large développement des tests ELISA dans le dépistage à grande échelle des animaux positifs à l'abattoir et à l'équarrissage. Néanmoins, les autres tests gardent tout leur intérêt, d'une part pour confirmer avec d'autres méthodes les tests positifs, et d'autre part en tant qu'outils de recherche, par exemple dans les études de pathogénie.

II.2.3.4. Le Paraffin Embeded Tissue Blot

Ce test permet de détecter la PrPsc sur des coupes histologiques fixées par du formol puis incluses dans de la paraffine (Schulz-Schaeffer *et al.* 2000).

Des tranches de 5µm d'épaisseur sont réalisées au niveau de l'obex la plupart du temps et placées ensuite sur une membrane de nitrocellulose humide puis séchée (5h à 55°C). La membrane est alors débarrassée de la paraffine (xylène), réhydratée et de nouveau séchée. Les prélèvements peuvent alors être conservés longtemps à température ambiante.

Les prélèvements sont alors réhydratés et incubés avec la protéinase K et traités avec des dénaturants, pour ici encore éliminer la PrPc. Des anticorps primaires puis secondaires sont alors ensuite utilisés (principe de l'immunomarquage) afin de permettre la révélation immunologique de la localisation de la PrPsc dans la coupe de tissu étudiée, alors observée au microscope.

Cette technique, mise au point par (Schultz-Schaeffer *et al.* 2000) peut se faire de façon concomitante à l'immunohistochimie, cependant il s'agit d'une méthode compliquée et longue. Son avantage principal est sa très haute sensibilité, supérieure à celle de l'IHC et du Western Blot, d'après (Schultz-Schaeffer *et al.* 2000). De plus, le PET-Blot permet une bonne résolution anatomique. La résolution microscopique est cependant meilleure avec l'IHC. Le PET-Blot permet l'étude de prélèvements réalisés il y a plusieurs années.

En outre, contrairement à l'IHC où l'emploi de protéinase K est possible mais rarement fait en pratique car elle endommage les fines coupes sur lame et y est plutôt remplacé par des traitements hydrolysant à l'autoclave, celui-ci est fait à grande concentration dans le cas du PET-Blot et permis ainsi de s'affranchir d'une image mal définie, due à une mixture mal définie de PrPsc et de PrPc non digérée.

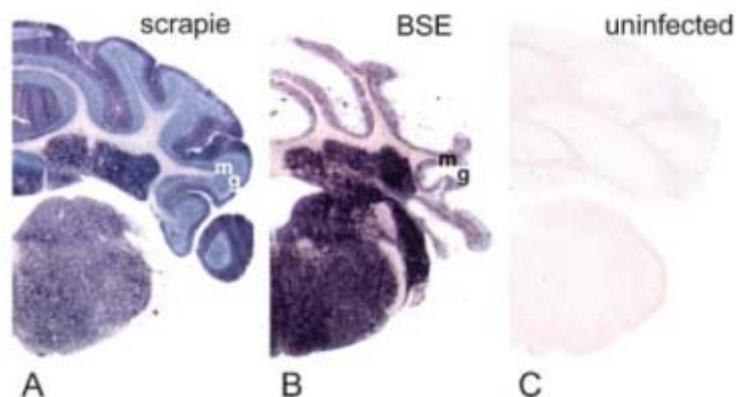


Figure n°7

Coupe de cervelet et de tronc cérébral de souris expérimentalement inoculées par la tremblante (A), par l'ESB (B) ou témoins (C) et analysées par PET-Blot. Les dépôts bleu foncé traduisent la présence de PrPsc.

(d'après Lezmi et al. 2006)

II.2.4. L'électrorétinographie

L'électrorétinographie consiste à étudier les potentiels électriques produits par la rétine lorsqu'elle est stimulée par de la lumière.

Le principe repose sur l'emploi de lumières de différentes intensités, longueurs d'onde et durées (Ofri, 2008). Celles-ci sont produites par un photostimulateur et dirigées vers la rétine. Elles engendrent alors des potentiels électriques détectés par des électrodes disposées autour de l'œil (au nombre de trois et généralement disposées comme suit, c'est-à-dire une au contact de la cornée par l'intermédiaire d'une lentille, une à proximité du cantus latéral en position sous-cutanée et la troisième en région occipitale également en sous-cutané). Ces signaux électriques produits par la rétine nécessitent d'être amplifiés pour être visualisables sur le support d'enregistrement choisi (papier ou informatique). Ils forment alors des ondes caractéristiques dont l'étude des amplitudes et des temps de culmination constitue l'interprétation d'un électrorétinogramme. Dans un contexte d'étude expérimentale des EST, l'électrorétinographie permet d'évaluer les répercussions oculaires sur la fonction rétinienne.

L'ERG permet en effet d'apprécier le fonctionnement et l'intégrité des photorécepteurs et des couches rétinienne en contact avec ceux-ci. Ceci étant les réponses des différents types cellulaires sont surimposées sur le tracé de l'ERG ce qui rend son interprétation parfois difficile. Des protocoles lumineux particuliers peuvent toutefois permettre de séparer la réponse des cônes de celle des bâtonnets. Des stimuli de lumière blanche non atténuée dirigés vers des yeux dans un environnement lumineux permettent l'enregistrement d'une réponse rétinienne dans laquelle celle des cônes prédomine. Pour obtenir une réponse où les bâtonnets prédominent, des flashes lumineux de lumière bleue atténuée sont dirigés vers les yeux après une adaptation à l'obscurité de durée variable. Enfin, pour évaluer la réponse commune des cônes et des bâtonnets, une lumière blanche non atténuée est généralement utilisée sur des yeux ayant été adaptés à l'obscurité.

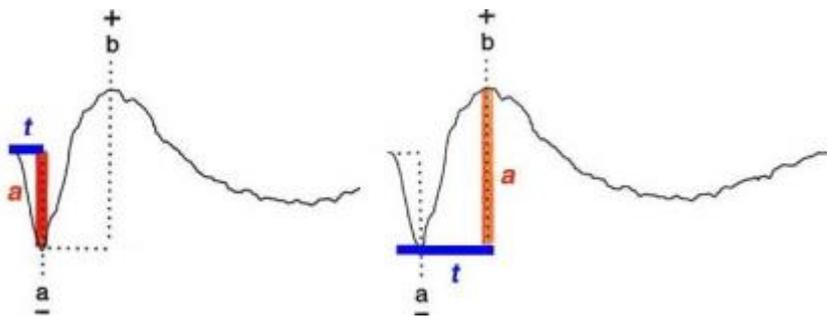


Figure n°8

Mesure de l'amplitude (a) et des temps de culmination (t) des ondes-a et -b d'un ERG

<http://webvision.med.utah.edu/>

Un ERG « physiologique » se compose classiquement de deux/trois ondes appelées onde-a, onde-b et onde-c (cette dernière est non incluse dans les protocoles animaux en général).

Deux types de mesures sont classiquement repérés sur une ERG : l'amplitude (a) des ondes (de la ligne de base au pic négatif de l'onde-a pour l'onde-a et du pic de l'onde-a à celui de l'onde-b pour l'onde-b) et les temps de culmination (t) qui traduisent la latence entre le flash lumineux et le pic des ondes (on relève un temps de culmination de l'onde-a et un pour l'onde-b).

L'onde-a traduit l'hyperpolarisation des photorécepteurs provoquée par la lumière. L'explication de l'onde-b a longtemps été controversée et attribuée à la dépolarisation des cellules de Müller faisant suite à celle des cellules bipolaires. Toutefois, des travaux récents ont permis de montrer qu'il s'agissait en réalité de la traduction directe de la dépolarisation des cellules bipolaires. Quant à l'onde-c, elle traduit l'hyperpolarisation de la membrane apicale du RPE et des cellules de Müller.

Toutefois, conclure alors que l'onde-a teste la fonction des cônes et des bâtonnets, que l'onde-b teste celle de cellules bipolaires et l'onde-c teste le RPE et les cellules de Müller revient à adopter un modèle simplificateur d'un procédé complexe et encore incomplètement compris.

Basé sur les indications cliniques de la réalisation d'un ERG, deux protocoles classiques sont habituellement employés : le protocole « oui-non », visant à démontrer le fonctionnement global rétinien ou son absence (notamment lors de suspicion de SARD, *sudden acquired retinal degeneration*, ou en vue d'une chirurgie de cataracte). L'autre protocole, plus complexe, cherche à évaluer et différencier le fonctionnement des cônes et des bâtonnets. Ce dernier nous intéresse davantage dans le cadre de l'étude des EST.



Figure n°9a
Réalisation d'un ERG sur une brebis anesthésiée

(d'après Regnier et al. 2011, photographies non publiées)

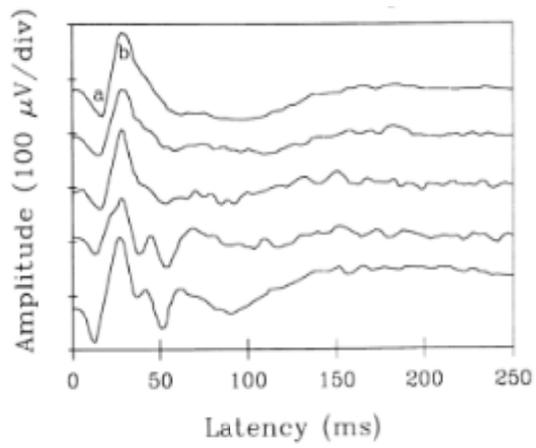


Figure n°9b
Electrorétinogramme physiologique chez une brebis saine

(d'après Strain et al. 1991)

III. LES REPERCUSSIONS OCULAIRES DES MALADIES A PRIONS

III.1. Les premières découvertes

En 1956, Bosquet *et al.* mentionnèrent que les réflexes pupillaires et la réponse à la menace étaient normaux chez des moutons infectés naturellement par la tremblante. Pourtant, un an plus tard, Palmer a observé des troubles de la vision chez des moutons naturellement infectés de tremblante qui étaient en fin de phase clinique. Aucun changement rétinien n'était alors encore rapporté à cette époque.

En 1961, Hadlow suggéra que la cécité qu'il observe chez des chèvres infectées naturellement par la tremblante pouvait être attribuée à des lésions présentes dans le corps genouillé latéral plutôt que dans la rétine.

Sept ans plus tard, Palmer décrivit des dégénérescences de type Wallérienne au sein du tractus optique. La dégénérescence Wallérienne est un processus qui se produit lorsqu'une fibre nerveuse est coupée ou écrasée, et dont la partie de l'axone située distalement par rapport à la lésion dégénère (Beirowski *et al.* 2005). Certaines études suggèrent que le défaut d'apport en quantité suffisante de la protéine NMNAT2, essentielle aux axones, est un événement déclencheur clé. La dégénérescence Wallérienne, qui peut concerner le système nerveux périphérique (SNP) comme le système nerveux central (SNC), débute dans les 24 à 36 heures suivant la lésion. Le squelette axonal se désintègre et la membrane axonale se brise. Cette dégénérescence est suivie par la dégradation de la gaine de myéline et d'une infiltration par des macrophages qui, accompagnés des cellules de Schwann, éliminent les débris de la dégénérescence. Le neurolemme de la fibre nerveuse (la gaine Schwann) ne dégénère pas et demeure sous la forme d'un tube creux.

Dans les quatre jours suivant une lésion affectant le SNP, des racines nerveuses émergent de l'extrémité distale de la fibre nerveuse située proximale à la lésion, attirées par les facteurs de croissance produits par les cellules de Schwann vers les tubes creux situés distalement à la lésion. Ainsi, une ré-innervation est possible, à moins que la distance séparant les deux extrémités ne soit trop importante. Une telle « cicatrisation » n'a cependant pas lieu au niveau du SNC. L'activité des macrophages y est en effet suivie par une prolifération des astrocytes et la formation à l'intérieur des cellules gliales de filaments constitués de GFAP, venant combler les espaces laissés par la dégénérescence des axones et de la gaine de myéline. Cette cicatrisation astrocytaire empêche la recolonisation de l'extrémité distale à la lésion par des racines nerveuses comme dans le cas de lésions affectant le SNP.

En 1971, Barnett et Palmer étudient le cas de deux brebis Suffolk de 4 et 5 ans naturellement atteintes de tremblante. Des troubles visuels étaient présents : les animaux heurtaient des objets lors de leurs déplacements, et bien que les réflexes pupillaires photomoteurs fussent présents, la réponse à la menace ne l'était pas, laissant suspecter une atteinte des voies visuelles. A l'examen ophtalmoscopique, la papille et les vaisseaux rétiniens sont apparus

normaux, mais quelques plages bien circonscrites et d'aspect réfléchissant furent observées en regard du tapis. Ces modifications du fond d'œil n'avaient jamais été décrites jusqu'alors. Sur le plan histologique, les auteurs les ont fait correspondre à du matériel lipidique complexe avec parfois en plus un matériel amorphe, protéique et éosinophile présent entre la couche des articles externes des photorécepteurs et celle de l'épithélium pigmentaire de la rétine.

Parallèlement aux études menées sur les animaux, la communauté scientifique commençait à découvrir des cas de transmission iatrogène oculaire de la MCJ lors de chirurgie ophtalmologique (Masters *et al.* 1979): 4 cas rapportés lors de greffe cornéenne (Duffy *et al.* 1974) et 2 lors de chirurgie de cataracte (Ghetti *et al.* 1978).

III.2. Les résultats de l'examen ophtalmologique lors des maladies à prions chez l'animal

III.2.1. L'examen de la fonction visuelle

III.2.1.1. Éléments de réponse chez l'animal

Les observations de Hadlow (1968) et Barnett et Palmer (1971) semblaient indiquer qu'une atteinte de la vision était présente lors de tremblante ovine ou caprine. Il s'agissait cependant des premiers travaux réalisés sur cette maladie et il est intéressant de prendre en compte les résultats des études ultérieures avant d'émettre toute conclusion.

Dans leur étude de 2003, Healy *et al.* ont constaté une réponse à la menace absente chez 15 des 129 animaux confirmés positifs à la tremblante (dont 9 de façon bilatérale).

Dans l'étude de (Regnier *et al.* 2011), aucune mydriase n'a été rapportée, les réflexes pupillaires photomoteurs étaient normaux sur tous les animaux confirmés positifs à la tremblante après analyse *post mortem* de cerveau. Chez trois d'entre eux seulement, ainsi que chez un animal du groupe contrôle, la réponse à la menace était incomplète. Aucun changement ophtalmologique, neurologique ou comportemental en faveur d'une baisse de la vision n'a été observé au cours de cette étude.

De façon analogue, dans la majorité des études récentes sur la tremblante, si la réponse à la menace est parfois notée comme absente, aucun trouble visuel similaire à ceux rapportés par Palmer en 1971 n'a été observé (Foster *et al.* 2001, 2008 ; Healy *et al.* 2003).

Nous pouvons toutefois noter les observations rapportées par Greenlee *et al.* en 2006. Lors d'expériences menées sur des primates inoculés par voie intracérébrale avec des extraits de cerveaux d'autres primates infectés par l'ESB, ils ont constaté une apparition de signes cliniques en 16 à 18 semaines, dont notamment l'absence de réponse à des stimuli visuels et la perte des réflexes pupillaires photomoteurs.

Aussi, dans le cas de MDC, Spraker *et al.* (2010) ont remarqué que, contrairement aux éléments rapportés par Williams *et al.* (1980 et 1982), une gêne visuelle était notée dans les stades terminaux. Les animaux atteints détectaient effectivement les mouvements mais lorsque les auteurs s'approchaient tout doucement sans faire de bruit, ils constataient que les cerfs ne les voyaient pas.

III.2.1.2. Mise en parallèle avec les données disponibles chez l'Homme

Parmi des sujets atteints de la variante de la MCJ, des troubles de la vision sont décelables chez 10% d'entre-eux en début de manifestation clinique et chez 50% lors de la phase d'état de la maladie (Armstrong, 2006).

Les signes oculaires sont souvent les premiers détectés et les cas de vMCJ sont souvent vus en premier par un ophtalmologiste. Les signes et symptômes suivants ont été rapportés : une diplopie, c'est-à-dire la perception simultanée de deux images d'un simple objet qui peuvent se déplacer horizontalement, verticalement ou en diagonale, une vision floue, une hémianopsie homonyme, c'est-à-dire la perte visuelle du côté droit ou gauche de chaque œil selon l'axe vertical), un nystagmus intermittent, voire une amaurose. Des hallucinations sont aussi rapportées et peuvent être confondues avec des troubles visuels. On note aussi parfois des mouvements oculaires en saccade ainsi qu'une lenteur, voire des retards du regard pour suivre des objets en mouvement. Ces derniers sont souvent précoces et disparaissent avec l'évolution de la maladie. Enfin, on observe parfois une « *periodic alternating gaze deviation* », qui demeure très rare : après avoir tourné la tête dans une direction le regard est dévié dans cette direction pendant un court moment.

Une perturbation des fonctions visuelles complexes est parfois notée associée à une atteinte du cortex visuel. Elle se matérialise par une difficulté d'identification des objets, une baisse de la perception de la profondeur, mais aussi des troubles de reconnaissance des visages, des difficultés de lecture, un syndrome de Balint, des hallucinations, et peut aller jusqu'à l'amaurose corticale.

Le syndrome de Balint, décrit en 1909 par Rezső (Rudolf) Balint sous le nom de « paralysie psychique du regard », et dénommé sous son nom actuel en 1954, associe trois éléments sémiologiques cumulatifs : l'apraxie optique (paralysie dite psychique du regard, elle correspond à une difficulté à fixer une cible), l'ataxie optique (trouble de la coordination visuo-manuelle, prédominant en périphérie du champ visuel) et la simultagnosie (déficit de l'attention visuelle, se traduisant notamment par une incapacité à percevoir deux objets en même temps) (Chechlac, Humphreys 2014). Différentes étiologies ont été rapportées, telles que des accidents vasculaires cérébraux, des tumeurs intracérébrales ou des maladies neurodégénératives. Lorsque les malades survivent, ils présentent des troubles complexes de l'utilisation du regard (difficultés à déplacer le regard d'un objet à un autre, impossibilité à comp-

ter le nombre d'objets visibles dans un champ donné, incapacité à saisir la signification d'une image complexe alors que chacun des composants est parfaitement identifié...)

La présence de tels signes n'a pas été évaluée chez l'animal mais ces derniers pourraient exister sans qu'une expression clinique ne soit remarquée. Par ailleurs, le développement de signes nerveux généraux (ataxie,...) peut aussi masquer l'expression clinique de troubles de la vision. Il n'est donc pas possible d'exclure ou d'affirmer leur existence chez l'animal dans l'état actuel de nos connaissances, même si leur identification a un intérêt limité dans le cadre du diagnostic *ante mortem* des EST chez l'animal.

III.2.2. L'examen des structures oculaires

Aucune anomalie des structures oculaires n'est rapportée lors des différentes études, à l'exception des lésions du fond d'œil identifiées chez 2 moutons Suffolk atteints de tremblante par Barnett et Palmer (1971) exposées précédemment. Celles-ci correspondaient à une accumulation de matériel entre le RPE et la couche des photorécepteurs. Microscopiquement, il s'agissait d'un matériel éosinophile séparant le RPE et la couche des photorécepteurs qui, eux, étaient intacts. Différentes réactions chimiques (acide périoxde de Schiff, bleu de toluidine,...) ont conduit les auteurs à avancer l'hypothèse d'un matériel lipidique complexe avec parfois en plus un matériel amorphe, protéique et éosinophile et ne prenant pas les colorations lipidiques.

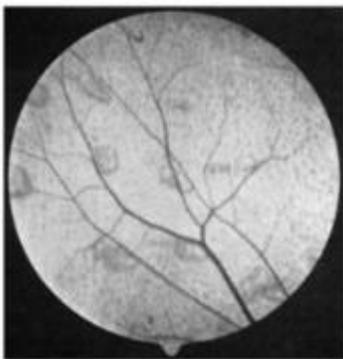


Figure n°10

Fond d'œil d'une des deux brebis de Barnett & Palmer (1971).

On note la présence de plages bien circonscrites et d'aspect réfléchissant

(d'après Barnett & Palmer, 1971)

Les auteurs ont rapporté que ces observations n'avaient jamais été faites préalablement et qu'ils n'en avaient jamais observé de telles lors de l'étude d'une autre rétinopathie. Ils envisagèrent la possibilité que ce matériel lipidique soit en fait le résultat d'une dégénérescence des cônes et des bâtonnets précédemment rapportée dans d'autres travaux, et soit de la même nature que la substance neurosecrétée découverte au sein du rhomencéphale par Bignami *et al.* (1970).

Ces lésions parsemées en regard du tapis rapportées dans les deux cas par Barnett et Palmer n'ont pas été observées par ailleurs, ou du moins n'étaient pas aussi marquées et plus rares (Regnier *et al.* 2011) ; elles correspondent probablement à une très forte accumulation de ce matériel éosinophile amorphe également décrite dans une étude plus récente.

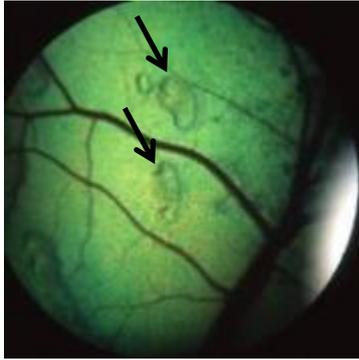


Figure n°11

Fond d'œil d'une brebis infectée par la tremblante, montrant quelques plages bien circonscrites

(d'après Regnier *et al.* 2011, photographie non publiée)

III.3. La localisation des prions dans l'œil

Dans l'étude d'Hogan *et al.* (1986), des titres faibles en agent de tremblante ont été identifiés dans la cornée, l'uvée et le cristallin d'animaux inoculés par voie intracérébrale, et cela même avant le développement des signes cliniques. Ces titres infectieux étaient cependant près de 10 000 fois plus faibles que ceux détectés dans le cerveau et la rétine. La même différence entre les titres infectieux de l'épithélium cornéen et du cerveau d'hamsters inoculés par l'ETV par voie intracérébrale fut notée par Marsch et Hanson en 1975. Les rares publications disponibles relatives à l'infectiosité de la cornée lors d'EST sont anciennes ; le développement et la maîtrise de la transgénèse à partir des années 1990 pourrait contribuer à acquérir de nouvelles connaissances dans ce domaine, en s'affranchissant notamment du problème de la barrière d'espèce, comme ce fut le cas dans l'étude de Manuelidis (1977).

Malgré ce manque de donnée concernant les titres infectieux en prions dans les cornées humaines lors d'EST, cette information a comme prolongement clinique d'inciter à la prudence, notamment lors des greffes cornéennes, comme en témoignent les cas de contamination iatrogène rapportés par Duffy (1974).

La présence de PrP^{sc} dans l'œil n'a donc été que très rarement détectée ailleurs que dans la rétine lors de maladies à prions. On peut considérer ce point comme un avantage en vue de l'étude de la rétine, qui de par sa position anatomique dans l'œil, est ainsi bio-contenue, ce qui constitue un avantage non négligeable, vis-à-vis notamment du personnel d'abattoir et des personnes menant des travaux de recherche, ainsi qu'un argument supplémentaire pour développer des tests diagnostiques à partir d'échantillons rétinien (Surguchev, Surguchov 2010). Ceci étant, il est important de garder en tête une approche de biosécurité et d'adopter des procédures appropriées de confinement lors la manipulation des échantillons de tissus oculaires d'animaux suspects d'EST (Smith, Greenlee 2014).

III.4. Aspects histologiques, immunohistochimiques et électrorétinographiques des rétino-pathies lors de maladies à prions chez l'animal

III.4.1. Lors de tremblante

III.4.1.1. *inoculée à des modèles murins*

Hogan *et al.* furent parmi les premiers à rechercher les répercussions oculaires lors de tremblante inoculée à des hamsters (1981).

Dans cette étude, des hamsters ont été inoculés par voie intracérébrale et ont été euthanasiés en série pour déterminer l'évolution en fonction du temps du titre en agent infectieux et des changements pathologiques présents au niveau oculaire. Les résultats ont révélé que le titre infectieux s'élève progressivement dans l'œil pour atteindre un niveau maximal entre 6 et 8 semaines après l'inoculation et se stabilise ensuite.

Des anomalies rétiniennes ont été observées dès 8 semaines après l'inoculation, soit une fois le titre maximal atteint. Elles consistaient initialement en une perte progressive des segments externes des bâtonnets ; puis les segments internes et les noyaux des photorécepteurs.

A partir de 10 semaines, seul un vestige de l'ONL subsistait : l'atteinte spécifique de cette couche rétinienne conduisit les auteurs de l'étude à la considérer comme potentiellement importante lors du mécanisme pathogénique des rétinoopathies dues aux EST.

La destruction neuronale est de plus couplée à un recrutement de macrophages, ainsi que, plus tardivement, des cellules de Müller.

L'étude de (**Kozlowski *et al.* 1982**) constitue la première publication rapportant des rétinoopathies chez des souris inoculées expérimentalement avec la tremblante.

Il est intéressant de noter que les auteurs rapportent une variabilité dans la présence de rétinoopathie chez les souris inoculées par voie intracérébrale par l'agent de la tremblante.

Les cas les plus sévères présentaient une perte complète de l'ONL et des photorécepteurs. Dans la majorité des cas, l'INL et la couche des CG sont épargnés.

Les auteurs ont ici utilisé deux souches de souris : la souche classique C57BL/6J pigmentée, et les souches VM ou IM (albinos). Les souris C57BL/6J homozygotes pour l'allèle s7 du gène *Sinc* ont un court temps d'incubation pour la souche ME7 ; tandis que les VM et IM sont homozygotes pour l'allèle p7 et ont un temps d'incubation prolongé avec ME7 et raccourci avec 87V par rapport à C57BL/6J. Ainsi les souris de souches VM et IM furent euthanasiées environ 10 mois post-inoculation (MPI), tandis que celles de souches C57BL/6J le furent seulement 5 MPI.

Les auteurs ont ici relevé 23% de rétinopathies chez les souris C57BL/6J et 28.5% chez les VM et IM.

Ces rétinopathies ont débuté par une perte de photorécepteurs suivie d'une perte progressive des cellules de l'ONL et de quelques cellules ganglionnaires, alors que l'INL était épargné. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par (Hogan *et al.* 1981) chez le hamster, à l'exception des quelques cellules ganglionnaires atteintes.

Les observations histologiques des rétinopathies observées semblaient être similaires à celles présentes en cas de rétinopathie induite par la lumière. Chez les souris non pigmentées (VM ou IM), l'iris est moins efficace et le RPE non pigmenté, si bien que la rétine reçoit plus de lumière. Cependant, aucune différence n'a ici été observée entre les souris de souches pigmentées et les non-pigmentées. Toutefois, étant donné la forte ressemblance histopathologique des rétines de souris infectées par la tremblante avec celles observées lors de rétinopathie induite par la lumière, les auteurs ont ici avancé l'hypothèse d'une atteinte fonctionnelle possible du contrôle pupillaire induite par la tremblante, et notamment du système parasympathique, dont les fibres du nerf ciliaire innervent le sphincter de l'iris. Une insuffisance dans la réponse pupillaire consécutive à une atteinte de l'innervation parasympathique entraînerait un éclairage lumineux trop important au niveau de la rétine à l'origine des rétinopathies observées. Cette théorie n'a pas été reprise par la suite.

Un protocole similaire à l'étude de Hogan *et al.* (1981) a été suivi par **Buyukmihci *et al.* (1982)**. Les auteurs ont en outre comparé les hamsters inoculés avec des suspensions de cerveaux d'hamsters infectés par la tremblante avec des hamsters nourris avec de la cuprizone (agent chélateur et inhibiteur des amine-oxidase, qui cause des encéphalopathies similaires à la tremblante). La souche de tremblante utilisée ici était la souche 263K, qui donne de très hauts taux infectieux chez les hamsters avec des temps d'incubation courts (Kimberlin & Walker, 1977), contrairement à la souche 87V dont l'incubation est bien plus longue (quasiment 1 an).

Aucune lésion rétinienne n'a été observée chez les animaux nourris à la cuprizone ; seule une spongiose cérébrale fut notée chez ces derniers. Les auteurs considérèrent que les lésions observées chez les hamsters inoculés par voie intracérébrale étaient bien dues à la tremblante.

Ces changements se caractérisaient par une perte du segment interne des photorécepteurs (ainsi que du segment externe en cas de dégénérescence fortement avancée). La dégénérescence rétinienne se localisait donc au sein de la couche des photorécepteurs. Dans celle-ci d'ailleurs, une infiltration macrophagique et une augmentation du tissu glial ont été notées.

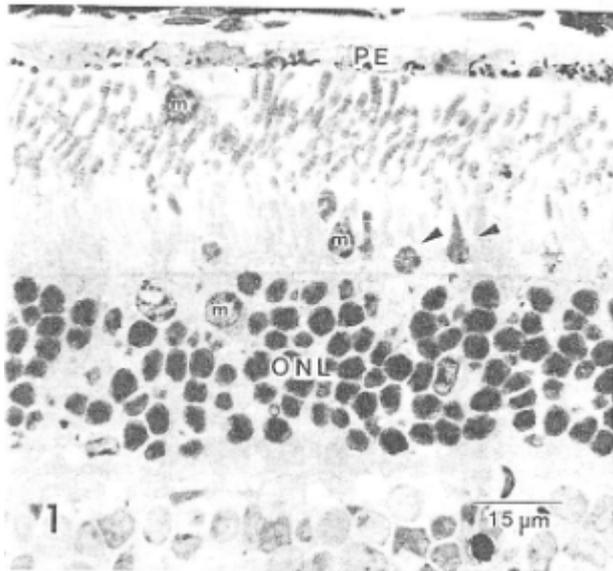


Figure n°12

Coupe histologique de rétine d'hamster inoculé expérimentalement par la tremblante et réalisée à 50 jours post-inoculation. Observation au microscope optique, grossissement x400, à l'immersion. La densité des segments internes et externes est diminuée, l'ONL est réduit. Les flèches pointent des segments internes dégénérés.

(d'après *Buyukmihci et al. 1982*)

La rétine était plus atteinte dans sa partie centrale que dans la partie para-centrale.

L'épaisseur de la rétine était parfois divisée par trois ; cet amincissement résultait de celui de l'ONL et de l'INL.

Les auteurs ont été surpris de constater que le RPE était épargné. Par la suite, aucune étude sur des rétinopathies lors de maladie à prions n'a fait état d'une atteinte du RPE.

Cette étude a conclu que les changements rétiens observés lors de tremblante chez des hamsters expérimentalement infectés étaient dus à la tremblante et concernaient la couche des photorécepteurs. Une atteinte du métabolisme des photorécepteurs par l'agent de la tremblante pourrait être à l'origine de leur dégénérescence. Les moyens techniques de l'époque n'ont pas permis de caractériser cette atteinte à un niveau moléculaire, et il s'avère qu'elle demeure toujours mal comprise à l'heure actuelle.

En 1985, **Buyukmihci et al. (1985a)** ont montré que la dégénérescence rétinienne est universelle chez les hamsters chez lesquels la tremblante a été inoculée expérimentalement, et ce quelle que soit la voie d'inoculation. En effet, l'inoculation par voies intrapéritonéale et sous-cutanée a également provoqué des rétinopathies chez le hamster.

L'atteinte de la couche externe de la neurorétine y était comparable à celle observée lors d'inoculation par voie intracérébrale et s'étendait de façon diffuse dans la rétine, épargnant partiellement la zone périphérique extrême. Aucune différence n'a ici été notée entre l'œil droit et gauche d'un même animal, contrairement aux observations faites par la même équipe la même année lors de travaux menés sur le hamster mais avec une inoculation in-

tracérébrale (**Buyukmihci et al. 1985b**). La rétine controlatérale à l'hémisphère cérébral choisi pour l'inoculation concentrait plus de lésions que la rétine ipsilatérale.

La même équipe a publié un an plus tard les résultats d'une étude visant à déterminer si la souche de tremblante utilisée avait un effet sur les rétinopathies observées (**Buyukmihci et al. 1986b**).

En effet, **Foster et al. (1986)** avaient montré que, chez la souris, les rétinopathies dépendent de la souche de tremblante employée ainsi que du génotype de la souris. Les souches de tremblante 22C, ME7, 87A et 87V provoquent ainsi des changements pathologiques minimes voire aucun selon le génotype des souris testées, alors que la souche 79A et la souche 139A provoquent une perte de photorécepteurs chez de nombreux voire tous les génotypes.

Le protocole de **Buyukmihci et al. (1986b)** était semblable à celui utilisé en 1982. Des hamsters furent inoculés par voie intracérébrale dans l'hémisphère droit avec les trois mêmes souches de tremblante que celles utilisées par **Foster et al. (1986)** dans leur étude sur les souris (22C, 79A et ME7). Les auteurs souhaitaient en outre comparer leurs résultats avec ceux obtenus en 1982 avec la souche de tremblante 263K.

Il est intéressant de noter tout d'abord que, malgré l'absence d'anomalie avant l'apparition des signes cliniques, les réflexes pupillaires photomoteurs étaient ensuite incomplets et les fonds d'œil apparaissaient pâles et mouchetés avec des vaisseaux atténués.

Une dégénérescence des photorécepteurs plus tardive et plus faible qu'avec la souche 263K fut notée. Les résultats histologiques furent similaires pour les 3 souches testées. La dégénérescence des photorécepteurs était évidente dans les deux yeux de tous les animaux. Les changements initiaux concernaient la couche des photorécepteurs dans sa globalité (segment interne et externe), ainsi que l'ONL (dont les noyaux étaient pycnotiques), et ce de façon plus marquée en partie centrale de la rétine. Une infiltration macrophagique de la couche des photorécepteurs se retrouvait à nouveau et accompagnait la perte progressive des photorécepteurs.

Dans les cas les plus sévères, l'ONL était réduite à une rangée incomplète de noyaux et l'OPL était absent. En revanche, l'INL était ici intact, comme lors de l'étude de **Kozlowski et al. (1982)**, tout comme le RPE. Il faut se souvenir que lors de leurs expériences précédentes avec la souche 263K, l'épaisseur de l'INL était réduite (**Buyukmihci et al. 1982**).

Mise à part l'INL, les résultats étaient tout à fait comparable à ceux observés avec la souche 263K.

Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence des rétinopathies différentes en fonction de la souche employée de tremblante utilisée et inoculée expérimentalement chez le hamster. Cependant, les différences en fonction du génotype des hamsters n'ont pas été explorées.

Le fait que l'œil gauche soit le plus atteint chez un plus grand nombre d'animaux suggère qu'une voie de dissémination le long de voies neuronales (résultats similaires avec la souche 263K lors des études de 1982) serait possible, ce qui sera rediscuté dans le paragraphe III.6.1.

Nous disposons également des résultats de l'étude d'**Hogan *et al.* (1986)** qui ont déterminé les titres en agent infectieux dans les yeux de hamsters inoculés expérimentalement par voie intracérébrale (région pariétale gauche) avant l'apparition des signes cliniques (soit 50 jours post inoculation) et après (70 jours post inoculation, soit juste après l'apparition des signes cliniques).

En *post mortem*, les yeux furent disséqués et la cornée, le cristallin, la neuro-rétine, le complexe RPE-choroïde-sclère et le nerf optique furent mis séparément dans des tubes d'homogénéisation afin que le titre en agent de tremblante soit déterminé par la méthode décrite par Prusiner *et al.* (1980, 1982).

Les titres en agent de tremblante chez les hamsters euthanasiés 50 jours post-inoculation étaient environ les mêmes dans le cerveau et dans la rétine ou le nerf optique. En revanche, ceux dans la cornée, le cristallin et le complexe RPE-choroïde-sclère étaient 20 fois plus faibles que dans le cerveau. Aucun changement histologique microscopiquement visible n'était présent.

Soixante-dix jours post-inoculation, les titres étaient les mêmes dans la rétine que ceux à 50 jours, de même que ceux dans le nerf optique et la cornée ; ils étaient multipliés par 10 dans le cerveau ainsi que dans le cristallin et le RPE. Par contre, une dégénérescence rétinienne avec perte des photorécepteurs, matérialisée notamment par un amincissement de l'ONL, est notée. L'OPL est aussi aminci, mais l'INL et l'IPL ne sont pas atteints. Aucune atteinte du nerf optique n'est mise en évidence.

Cette étude apporte ici la preuve que, comme dans le cerveau, la réplication de prions dans la rétine précède la dégénérescence rétinienne. Les titres en agent de tremblante sont les plus élevés dans le cerveau et la rétine, localisations correspondantes aux changements histopathologiques. Une corrélation entre la réplication des prions et les rétinopathies existe donc bien.

Contrairement à diverses viroses oculaires où le complexe RPE-choroïde est le site de réplication primaire suite à une dissémination hématogène, les titres en agent de tremblante

sont près de dix fois supérieurs au sein de la neurorétine comparativement à ceux du complexe RPE-choroïde-sclère. L'hypothèse d'une dissémination neuronale semble donc plus probable dans le cas de la tremblante. Toutefois, la contamination hématogène de la rétine ne peut pas être exclue sur ces seules observations.

A ce stade, il était encore impossible de savoir si un type cellulaire rétinien était le lieu préférentiel de réplication des prions ; par contre la dégénérescence rétinienne semblait en général se localiser dans la couche des photorécepteurs, l'ONL et l'OPL chez les rongeurs inoculés expérimentalement par la tremblante, c'est-à-dire dans les couches les plus externes de la neurorétine.

L'apport de l'électrorétinographie, (**Curtis et al. 1989**), fut ici majeur puisqu'elle permit pour la première fois d'évaluer la fonction des rétines de souris inoculées par voie intracérébrale avec la tremblante.

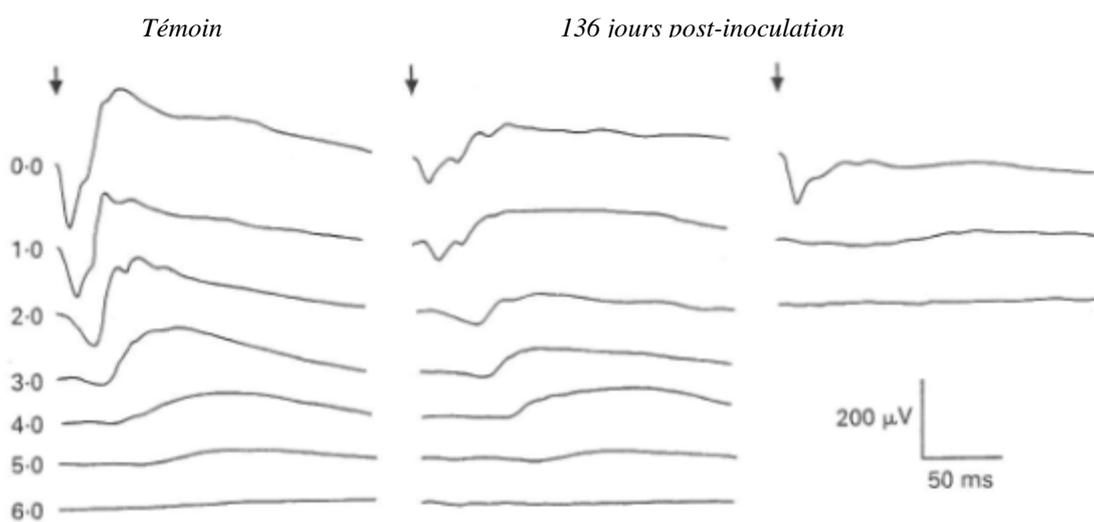


Figure n°13

Electrorétinogrammes de souris expérimentalement infectées par la tremblante.

A 136 jours post-inoculation, l'amplitude de l'onde-b (et de l'onde-a) est clairement diminuée pour la souris de gauche ; à droite, l'atteinte est encore plus sévère et l'onde-b n'est presque plus détectable.

(d'après Curtis et al. 1989)

Les auteurs ont ici noté que, lors des phases cliniques précoces, une réduction progressive de l'amplitude des ondes-b était présente et coïncidait avec l'apparition des premières modifications histologiques. Les amplitudes des ondes-a et -b diminuaient toutes les deux avec la progression de la maladie, avec cependant une diminution plus rapide pour celle de l'onde-b. Cette baisse d'amplitude n'était cependant pas associée à des changements significatifs des temps de culmination de ces deux ondes. La disparition du tracé ERG rapportée chez la

moitié des souris à 144 jours après inoculation correspondait à un stade de rétinopathie où l'ONL n'atteignait plus que quatre voire trois rangées de noyaux.

Les changements électrophysiologiques reflètent tant une perte primaire de la phototransduction (attestée par la baisse d'amplitude de l'onde-a) qu'un problème de neurotransmission du signal électrique rétinien. La diminution des ondes-b atteste probablement d'une déficience fonctionnelle des cellules bipolaires, ainsi que de la contribution des cellules de Müller. Nous verrons plus tard des observations tout à fait différentes chez les ruminants atteints d'EST.

Les changements morphologiques précoces suggèrent que les lésions primaires concernent l'intégrité des photorécepteurs : en effet, les auteurs ont noté une dégénérescence initiale de la couche des photorécepteurs, menant à une perte des segments internes et externes, et ce en accord avec les études précédentes. De plus, les noyaux des photorécepteurs, c'est-à-dire l'ONL, présentaient des stades variables de dégénérescence. Le maintien d'une quantité plus ou moins régulière des disques dans les segments externes suggère que le site de lésion primaire pourrait se situer dans le segment interne ou en pourtour des noyaux de l'ONL.

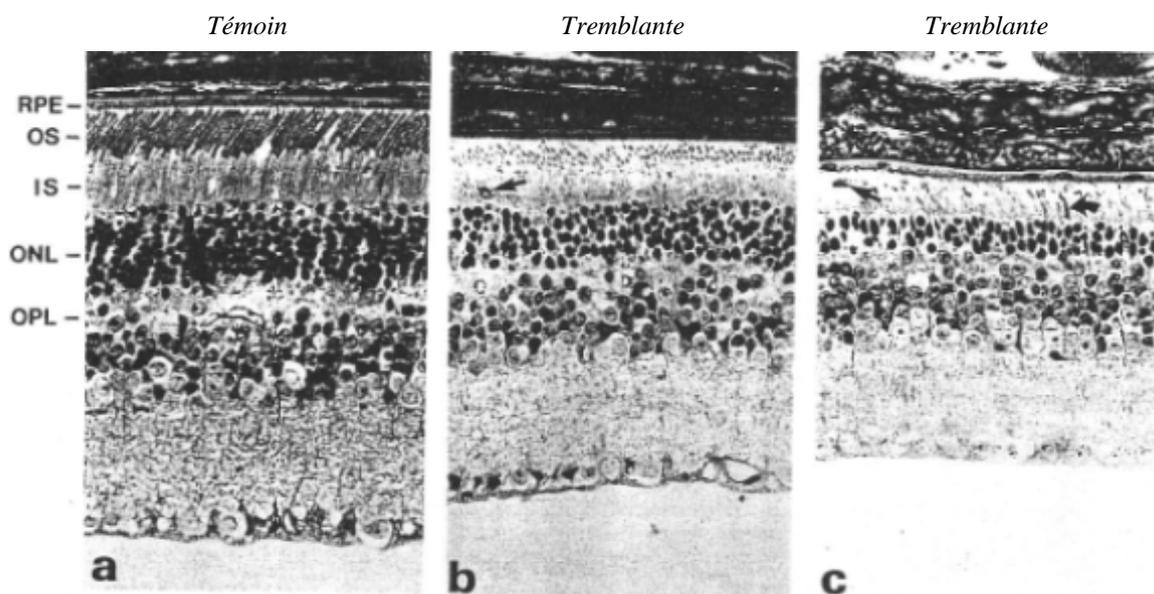


Figure n°14

Coupes histologiques de rétine de souris inoculées expérimentalement par la tremblante. Observation au microscope optique, grossissement x260. L'ONL est réduit à une épaisseur de quatre (b) et trois (c) rangées de noyaux chez les souris infectées. La flèche large (c) pointe un segment interne dégénéré. Les autres flèches montrent une infiltration macrophagique.

(d'après Curtis et al. 1989)

Dix ans plus tard, le développement de nouvelles techniques de laboratoire a permis un approfondissement des connaissances des rétinopathies associées aux maladies à prions.

Foster *et al.* (1999) ont mis en évidence, grâce à l'immunohistochimie et le Western Blot, une accumulation de la PrPsc dans les rétines de rongeurs inoculés avec la tremblante par voie intrapéritonéale ou intracérébrale.

Toutefois, cette accumulation diffère selon le modèle étudié.

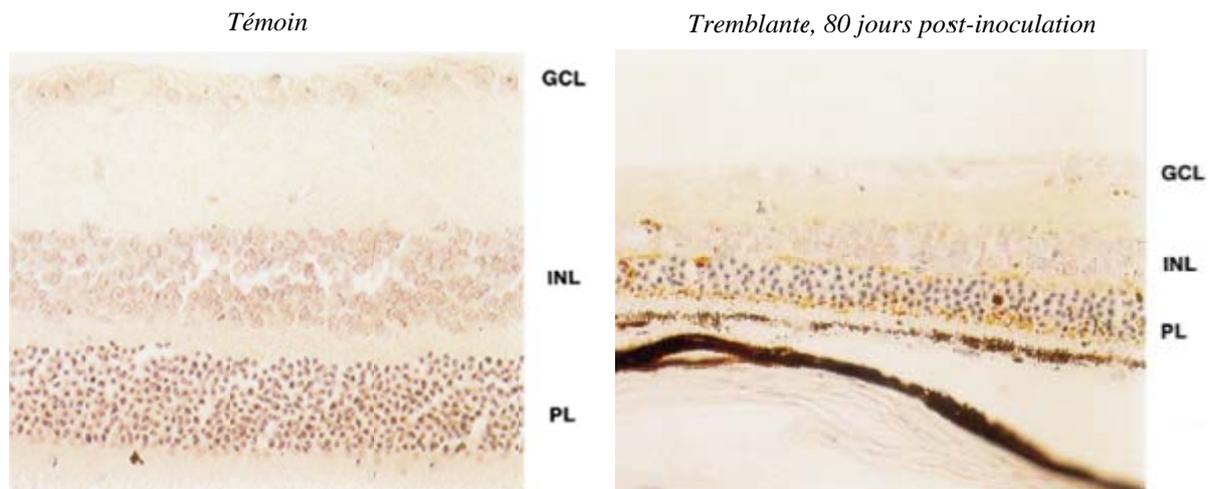


Figure n°15

Coupes histologiques avec immunomarquage de la PrPsc de rétine de hamsters inoculés par voie intracérébrale par la souche de tremblante 263K. Observation au microscope optique, grossissement x400.

La PrPsc s'observe dans la couche des photorécepteurs (PL), dans l'INL et l'IPL des hamsters inoculés. (Elle est absente chez les hamsters témoins).

(d'après Foster et al. 1999)

Chez des hamsters, pour lesquels la souche de tremblante n'a pas d'influence sur les rétinopathies diffuses observées lors de tremblante, la PrPsc se localise de façon étendue dans la rétine en phase terminale de la maladie. Elle est présente en particulier dans la couche des photorécepteurs, dans l'INL et dans l'IPL, et ce quelle que soit la voie d'inoculation (intrapéritonéale ou intracérébrale). Cette localisation diffère légèrement des couches atteintes par la dégénérescence rétinienne (Buyukmihci et al. 1986) puisqu'elle ne comprend pas l'ONL, mais inclut l'INL.

Chez les souris, la présence de PrPsc dans les rétines est moins systématique. Elle dépend du couple souche de tremblante-souche de souris utilisé. Une faible immunoréactivité de la PrPsc est ainsi observée chez les souris de souche VL inoculées avec un agent de tremblante de souche ME7. Une très faible immunoréactivité est présente chez les souris C57 avec les souches de tremblante ME7 et 79A ainsi que sur les souris VM avec la souche de tremblante ME7. En 1986, Foster *et al.* avaient montré que seule la souche 79A pouvait provoquer une dégénérescence rétinienne chez la souris. Leur étude de 1999 révèle finalement des lésions

rétiniennes, certes plus modérées, également possibles avec la souche ME7 utilisée sur des souris VL et VM.

La corrélation entre les titres infectieux, l'accumulation de la PrPsc (localisée essentiellement au sein des couches des PS, de l'INL et de l'IPL) et les rétinopathies (changements surtout observés au niveau de l'ONL) consécutives aux inoculations intracérébrale ou intrapéritonéale semble être variable chez les rongeurs : elle est présente chez les hamsters mais peu chez les souris.

Synthèse de l'étude des rétinopathies lors de tremblante chez les modèles murins

Au vu des différentes études précédemment exposées, plusieurs caractéristiques des rétinopathies associées aux modèles murins infectés par la tremblante peuvent être dégagées.

Une dégénérescence des couches les plus externes de la neurorétine survient lors d'inoculation de tremblante à des souris et des hamsters, et ce quelle que soit la voie utilisée pour réaliser l'inoculation. Cette dégénérescence, qui est corrélée à la réplication des prions, concerne tout d'abord la couche des photorécepteurs puis s'étend à l'ONL et à l'OPL qui s'amincissent. Il semblerait que les modifications soient plus marquées en région centrale de la rétine controlatérale à l'hémisphère cérébral choisi pour l'inoculation lorsque celle-ci est intracérébrale. Une infiltration macrophagique et par les cellules de Müller dans les couches concernées accompagne la dégénérescence rétinienne. La PrPsc s'accumule dans la couche des photorécepteurs, dans l'INL et dans l'IPL ; mise à part les photorécepteurs, cette localisation diffère donc de celle des lésions rétinienne. La dégénérescence rétinienne et l'accumulation rétinienne de la PrPsc varient cependant légèrement selon le modèle murin étudié. Chez le hamster, celles-ci semblent ne pas dépendre de la souche de tremblante employée et se retrouvent ainsi systématiquement dans les différentes études. Chez la souris en revanche, ces deux paramètres sont moins marqués et leur intensité est fonction du couple souche de souris/souche de tremblante employé. D'un point de vue électrorétinographique, une baisse d'amplitude des ondes-a et -b existe chez les souris inoculées par un agent de tremblante et traduit une diminution de la sensibilité à la lumière, pouvant s'expliquer par les lésions présentes au niveau de la couche des photorécepteurs, ainsi qu'un problème de neurotransmission du signal électrique rétinien au niveau des cellules bipolaires, pouvant s'expliquer par les lésions présentes au niveau de l'OPL.

Il est temps de comparer ces observations avec celles réalisées chez les espèces hôtes naturelles de la tremblante.

III.4.1.2. chez les petits ruminants

Dans les rétines de moutons infectés par la tremblante, l'accumulation de PrPsc s'observe principalement dans les différentes couches rétinienne (Hardt *et al.* 2000; Jeffrey *et al.* 2001; Valdez *et al.* 2003) ; sa localisation varie selon les études et les modèles et sera détaillée ci-après. Des études récentes ont signalé quelques (Hortells *et al.* 2006) ou aucune (Greenlee *et al.* 2006) lésion histologique dans ces rétines. Cependant, des changements morphologiques dans des types spécifiques de cellules rétinienne ont été démontrés (Smith *et al.* 2008). En dépit de conséquences morphologiques de l'accumulation rétinienne de PrPsc chez les ovins (Barnett et Palmer 1971 ; Smith *et al.* 2008), l'impact fonctionnel sur la rétine de ces animaux était peu connu, mais les travaux de certaines équipes évaluant la fonction rétinienne grâce notamment à l'électrorétinographie ont permis de progresser dans ce domaine.

Le paragraphe qui suit détaille ces aspects histologiques, immunohistochimiques et électrorétinographiques récemment décrits.

L'étude d'**Hortells *et al.* (2006)**, menée sur 26 brebis de race *Rasa Aragonasa* de génotype ARQ/ARQ (dont 6 étaient des animaux contrôles, 6 étaient en phase pré-clinique, 6 en phase clinique et 8 en phase terminale), a révélé la présence de PrPsc dans les rétines de 19 des 20 animaux confirmés positifs. Les couches rétinienne les plus concernées par cette accumulation étaient l'IPL et la couche des cellules ganglionnaires, où elle était la plus précoce à se manifester. De même, seuls les animaux en phase clinique ou terminale présentaient une augmentation du nombre de cellules de Müller exprimant la GFAP ainsi que de l'intensité de cette expression.

De façon générale, les auteurs ont noté que les lésions rétinienne n'étaient pas réellement sévères, ce qui semblait confirmer les observations de Barnett, Palmer (1971) et celles de Valdez *et al.* (2003). Les lésions histologiques concernaient les rétines de 7 des 14 animaux en phase clinique. Les cônes et les bâtonnets étaient rarement atteints chez les brebis naturellement infectées, contrairement à ce qui est observé chez les modèles murins. Les cellules ganglionnaires n'étaient pas dégénérées, ce qui correspondait aux résultats préalables de Scott et Fraser (1989) qui n'en avaient pas détecté malgré une injection intraoculaire d'agent de tremblante. Par contre le cytoplasme de ces cellules avait accumulé de la PrPsc, ce qui est très peu observé dans les modèles murins. Les auteurs ont considéré que cette accumulation de PrPsc pouvait cependant affecter le métabolisme des CG sans causer de changement morphologique ou alors qu'il s'agissait d'une propriété des CG de permettre la diffusion des prions sans en être affectées. Les lésions histologiques se localisaient principalement au sein de l'OPL qui était atrophié, de la membrane limitante externe qui apparaissait mal définie et de l'INL et de l'ONL, désorganisés et dont la densité cellulaire était diminuée. Seul un cas, qui

était celui le plus atteint tant sur le plan clinique qu'histologique, présentait une atteinte de la couche des photorécepteurs.

La même année, **Greenlee et al. (2006)** ont publié une étude faite avec 13 brebis Suffolk inoculées par voie intracérébrale. Elle fut la première décrivant l'accumulation de PrPsc dans la rétine associée à une pathologie rétinienne en l'absence de modification morphologique manifeste indiquant une dégénérescence rétinienne.

Cette absence de lésion histologique différait des précédentes observations rapportées dans l'étude d'Hortells *et al.* (2006). Toutefois, plusieurs points sont à considérer à ce sujet. En effet, l'intégrité structurale de la rétine est parfois compromise par le degré de fixation dans le formol des tissus étudiés, ce qui peut conduire à des différences d'interprétation. En outre, ces deux études ont examiné les rétines de différentes races de moutons: *Rasa aragonasa* dans l'étude d'Hortells *et al.* (2006) et des Suffolk dans celle de Greenlee *et al.* (2006). Enfin, la voie de contamination n'est également pas la même : modèle spontané chez (Hortells *et al.* 2006) alors qu'ici il s'agit d'une inoculation expérimentale. Il n'est effectivement pas exclu que le génotype de l'hôte ainsi que la souche de tremblante impliquée aient des répercussions sur d'éventuelles différences de changements histopathologiques (Smith, *et al.* 2008).

Dans la rétine des moutons présentant le moins de foyers d'immunoréactivité à PrPsc, celle-ci se retrouvait principalement dans la partie externe de la couche plexiforme interne (IPL), avec de rares foyers dans la couche plexiforme externe (OPL). L'IPL semblait être la première couche rétinienne où s'accumule la PrPsc. Lorsque l'immunoréactivité de PrPsc était plus importante, les couches plexiformes internes et externes (IPL et OPL) étaient diffusément atteintes et l'intensité de coloration diminuait de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe. Une telle localisation de l'immunoréactivité suggèrait clairement une accumulation de PrPsc au sein des synapses. En outre, il a été montré que la réplication de PrPsc pouvait modifier la répartition de la machinerie synaptique (Russelakis-Carneiro, *et al.* 2004), ce qui est également en faveur d'une atteinte fonctionnelle de cette dernière.

Contrairement aux résultats de Scott et Fraser (1989), l'inoculation intra-oculaire de certaines souches de tremblante chez la souris avait provoqué une dégénérescence des cellules ganglionnaires lors des travaux de Russelakis-Carneiro *et al.* (1999). Tandis que Marella *et al.* (2004) ont montré que suite à une injection intra-oculaire de prions chez le hamster ou la souris, avait lieu un recrutement de cellules microgliales dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la couche plexiforme interne (IPL), dans l'étude de Greenle *et al.* (2006) aucun recrutement de microglie, de changement morphologique compatible avec une dégénérescence cellulaire ou de perte cellulaire (en particulier des bâtonnets) n'a été noté.

Dans cette étude, toutes les rétines présentant une accumulation de PrPsc avaient aussi une augmentation de l'immunoréactivité de la GFAP, qui se retrouvait dans l'ensemble de la rétine et non seulement dans les aires d'accumulation de PrPsc.

Malgré l'absence de lésion histologique, cette immunoréactivité de la GFAP atteste d'un stress rétinien, très probablement consécutif à l'accumulation de la PrPsc.

A la différence de la majorité des études portant sur l'étude de la rétine lors d'EST expérimentales ou spontanées qui se focalisaient jusqu'ici essentiellement sur la distribution de la PrPsc dans la rétine et de la présence associée ou non de lésions microscopiques indicatives de dégénérescence rétinienne, l'étude de **Smith *et al.* (2008)** a comparé la distribution de marqueurs cellulaires rétiens spécifiques lors d'inoculation expérimentale par la tremblante chez le mouton.

Quatre brebis Suffolk de 4 mois furent inoculées par voie intracérébrale avec l'agent de la tremblante ovine et furent euthanasiées au stade clinique terminal. L'immunoréactivité de la PrPsc au niveau cérébral a permis de confirmer que ces animaux étaient atteints de tremblante ovine.

De même que dans l'étude de Greenlee *et al.* (2006), aucune modification histologique pouvant évoquer une dégénérescence rétinienne n'a été identifiée.

La localisation primaire de l'accumulation de la PrPsc se situait dans les couches synaptiques (IPL et OPL), ce qui est en accord avec de nombreuses autres observations (telles que celles faites par Hortells *et al.* en 2006).

Dans les rétines présentant une immunoréactivité à la PrPsc, les profils d'immunoréactivité de l' α -isoforme de la protéine kinase C (PKC α) et du transporteur glutamate vésiculaire 1 (VGLUT1), tous deux marqueurs des cellules bipolaires de la rétine, étaient clairement diminués. Une immunoréactivité altérée de la protéine associée aux microtubules 2 (MAP2), marqueur d'un sous-ensemble de cellules ganglionnaires de la rétine, fut également observée ; quant à celle de la glutamine synthétase (GS), marqueur des cellules gliales de Müller, elle était augmentée. En revanche, la distribution des marqueurs cellulaires des cellules amacriques n'était pas altérée par l'accumulation rétinienne de PrPsc. Ces résultats démontrent l'altération des immunoréactivités de protéines associées à des types cellulaires rétiens spécifiques (cellules bipolaires et cellules ganglionnaires) et ce en dépit de dégénérescence rétinienne visible en microscopie.

La diminution de l'immunoréactivité de la PKC α a été observée précisément dans les bâtonnets de zones d'IPL où la PrPsc s'accumulait, suggérant que la connectivité synaptique y était perturbée. Dans l'IPL, l'expression de VGLUT1 était diminuée du côté de la face vitréenne de l'IPL, ce qui peut s'expliquer par une baisse du nombre d'extrémités axonales des cellules

bipolaires associées aux bâtonnets. De telles données suggèrent que les cellules bipolaires associées aux bâtonnets constituent un type cellulaire spécifiquement affecté par l'accumulation de PrPsc dans les rétines de moutons atteints de tremblante. Ces animaux auraient donc potentiellement une vision scotopique diminuée. L'étude électrorétinographique apparaît déjà comme très intéressante pour approfondir les connaissances dans ce domaine. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, l'étude de l'onde-b de l'électrorétinogramme traduit en quelque sorte l'activité de ces cellules bipolaires. Les résultats de telles études sont discutés un peu plus loin. Une expression augmentée de Glutamate Synthase est notée dans les rétines où s'accumule la PrPsc ; ceci peut être consécutif à des niveaux extracellulaires augmentés en glutamate et/ou à une hypertrophie des cellules gliales de Müller en réponse à un stress/atteinte rétinienne. Cette hypertrophie cellulaire est également à l'origine d'une surexpression de la GFAP (surexpression déjà mise en évidence dans les études de Kercher *et al.* (2004), Greenlee *et al.* (2006) et Hortells *et al.* (2006).

Cette étude de Smith *et al.* (2008) met ainsi en évidence la modification de l'immunoréactivité de marqueurs spécifiques des cellules bipolaires associées aux bâtonnets, des cellules ganglionnaires et des cellules de Müller. Les fonctions neuronales de ces cellules sont altérées avant même que la détection de la dégénérescence rétinienne ne soit possible, suggérant que des altérations des profils d'expression des protéines dans ces cellules de la rétine puisse induire cette dégénérescence.

Dans l'étude de **Regnier *et al.* (2011)** portant sur 17 brebis de race Manech infectées naturellement par la tremblante et étant à des stades cliniques différents (avec 6 brebis saines comme témoins), les auteurs ont réalisé un examen ophtalmologique, électrophysiologique et morphométrique et immunohistochimique de la rétine, en différenciant 3 zones anatomiques : centrale, paracentrale, périphérique, dans lesquelles ils ont réalisé des comptages cellulaires dans les différentes couches pour en déterminer la densité cellulaire.

De nets changements électrophysiologiques et histomorphométriques en faveur d'une dégénérescence rétinienne ont été vus chez tous les animaux naturellement infectés inclus dans l'étude. De telles lésions, décrites ci-après, étaient systématiquement associées à un dépôt de PrPsc et une altération des cellules gliales mise en évidence par une augmentation de l'expression de la GFAP. Ces deux phénomènes étaient principalement localisés au niveau de l'IPL et de la couche des CG (régions synaptiques). Ces résultats diffèrent de ceux préalablement décrits dans l'étude de Hortells *et al.* (2006), où 50% seulement des moutons présentant des signes de tremblante naturelle avaient aussi des lésions dégénératives de la rétine.

Une accumulation multifocale de matériel amorphe a d'ailleurs ici aussi été remarquée dans l'espace sous-rétinien. Leur intensité était cependant nettement moins marquée que celle rapportée par Barnett et Palmer en 1971. Elle correspondrait à la conséquence de l'allonge-

ment et de la désorganisation des segments des photorécepteurs (externes et internes), qui se traduisait également par l'amincissement et la baisse de la densité cellulaire de l'ONL. Cette baisse de la densité cellulaire, repérée par une baisse du nombre de noyaux et un amincissement de cette couche anatomique, affectait aussi l'INL. Ces changements étaient plus sévères au niveau central de la rétine et étaient associés à un recrutement de cellules phagocytaires, vraisemblablement des macrophages. Cependant, une perte complète de la couche des photorécepteurs n'a pas été observée comme celle rapportée chez les souris et hamsters infectés expérimentalement (Buyukmihci *et al.* 1987a). En outre, le RPE n'est pas atteint, ce qui n'a d'ailleurs jamais été rapporté chez aucun modèle testé.

La dégénérescence rétinienne semble être toujours possible lors d'infection naturelle chez le mouton mais il existe des différences morphologiques des lésions qui semblent liées à l'espèce hôte, la race et la souche de tremblante incriminées.

La perte cellulaire qui affecte l'INL et l'ONL, qui sont donc amincis, mais qui épargne la couche des cellules ganglionnaire (CG), se produit probablement par apoptose, consécutivement à l'exposition à la PrPsc et/ou à ses produits de dégradation, tels le fragment protéique de PrPsc 106 -126 (Ettaiche 2000).

La réaction des cellules gliales est une réponse fondamentale du système nerveux central lors d'infection par la tremblante du mouton (Fraser 1993), et il s'agit d'une caractéristique de premier plan dans les rétinopathies des animaux atteints (Ettaiche 2000 ; Hortells, *et al.* 2006 ; Smith *et al.* 2008). La réponse des cellules de Müller se produit dans diverses affections rétiniennes et peut augmenter la sensibilité des neurones à d'autres stimuli délétères pour la rétine malade (Bringmann *et al.* 2006). Dans le cas de la tremblante ovine, il reste encore à découvrir si la gliose rétinienne participe à la mort des neurones de la rétine ou représente un événement secondaire résultant justement de cette perte neuronale.

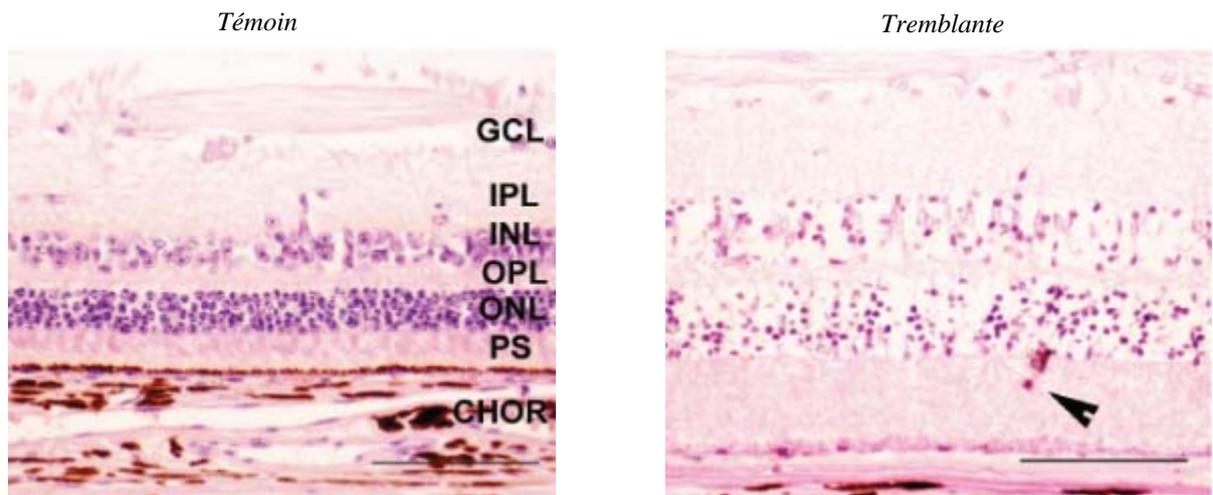


Figure n°16a

Coupes histologiques de rétines de brebis naturellement infectée par la tremblante. Observation au microscope optique, l'échelle correspond à 100µm.

Chez la brebis infectée, on note une désorganisation et un amincissement de la couche des photorécepteurs ainsi qu'une baisse de la densité cellulaire dans l'INL et l'ONL.

(d'après Regnier et al. 2011)

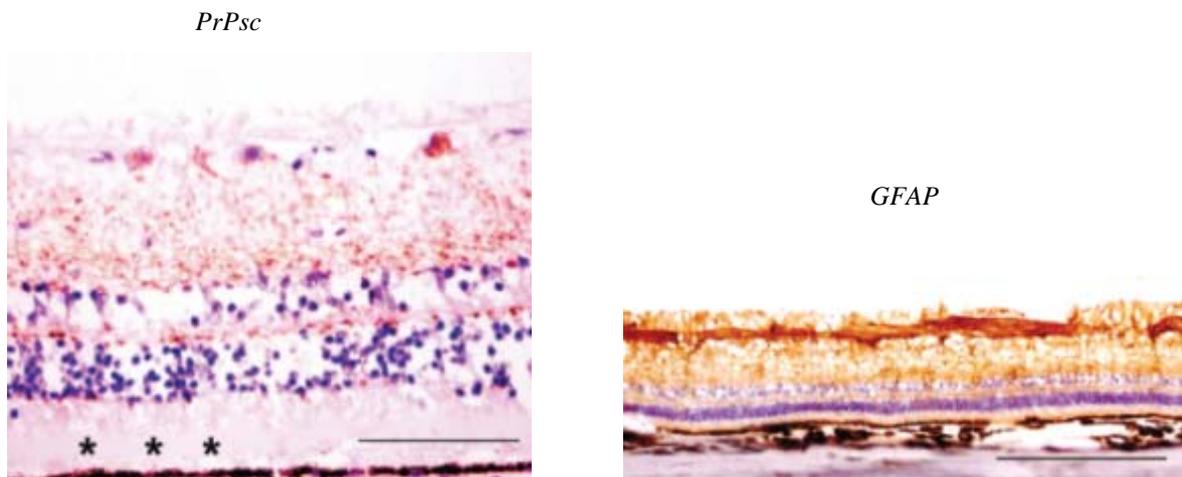


Figure n°16b

Coupes histologiques de rétines de brebis naturellement infectée par la tremblante, avec immunomarquage de la PrPsc à gauche et de la GFAP à droite. Observation au microscope optique, l'échelle correspond à 100µm à gauche et à 300µm à droite.

La PrPsc et la GFAP s'accumulent au niveau de l'IPL et de la couche des CG. Sur la photo de gauche, les astérisques indiquent le matériel amorphe.

(d'après Regnier et al. 2011)

Pour la chèvre, nous disposons des résultats de l'étude de **Valdez et al. (2003)** qui rapporte les observations réalisées sur une femelle angora de 3 ans, atteinte de tremblante clinique.

L'accumulation de PrPsc dans la rétine concernait presque toutes les couches rétinienne. En effet, l'immunoréactivité de la PrPsc a été mise en évidence dans les bâtonnets et les cônes, la membrane limitante externe, l'ONL, l'OPL, l'INL, l'IPL, la couche des cellules ganglionnaires et celle des fibres efférentes. Il est impossible de savoir à quel stade d'évolution de la maladie se trouvait la chèvre, mais on peut suspecter, au vu de la clinique générale et de l'étendue de la PrPsc accumulée dans les couches rétinienne qu'elle était plutôt à un stade avancé de la maladie.

Ces résultats de Valdez *et al.* (2003) furent les premiers à mettre en évidence le dépôt de la PrPsc dans la rétine de petits ruminants naturellement infectés par la tremblante. Ce dépôt avait été mis en évidence chez une brebis inoculée expérimentalement par la tremblante (Hardt *et al.* 2000) et chez une autre infectée expérimentalement par l'ESB (Foster *et al.* 2001). Ces derniers auteurs (Foster *et al.* 2001) avaient montré une distribution de la PrPsc dans différents tissus (et notamment la rétine) de moutons inoculés expérimentalement par voie orale par l'ESB. Un immunomarquage modéré de l'OPL et de l'INL fut noté au niveau d'une seule rétine d'un des 13 animaux infectés.

Lors d'inoculation intracérébrale de tremblante ovine sur des wapitis des montagnes rocheuses (*Cervus elaphus nelsoni*), une extension multifocale dans la CG, en plus de celle dans l'IPL et l'OPL, fut notée (Hamir *et al.* 2004).

Telle qu'annoncée précédemment, l'étude électrorétinographique des animaux infectés par la tremblante a récemment enrichi le champ des connaissances des répercussions oculaires lors des maladies à prions en permettant notamment d'envisager les répercussions fonctionnelles des prions dans les rétines.

La courte communication de Smith *et al.* (2009) a rapporté les résultats de l'étude menée sur une brebis Suffolk, inoculée expérimentalement par voie intracérébrale à l'aide d'homogénat cérébral d'une autre brebis atteinte (et confirmée) par la tremblante. Un ERG fut réalisé 10 MPI, soit avant l'apparition des signes cliniques et répété à 12.5 MPI, c'est-à-dire après l'apparition de signes cliniques (cachexie et ataxie sévère). Une analyse histologique des rétines avec immunomarquage de la PrPsc et de la GFAP fut réalisée en post mortem, juste après le second ERG.

Lors du premier ERG (10MPI), l'amplitude de l'onde-b et le temps de culmination étaient semblables à celles du témoin, ainsi qu'aux tracés physiologiques réalisés chez le mouton (Strain *et al.* 1991). En revanche, lors de l'ERG réalisé 12.5MPI (c'est-à-dire en phase clinique), une diminution nette de l'amplitude de l'onde-b (54.3%) lors de l'ERG scotopique, un ERG photopique non enregistrable et un allongement du temps de culmination de l'onde-b (de 86.5%) étaient notés, sans que toutefois l'histologie n'ait révélé le moindre changement significatif de la rétine (pas de spongiose ni de noyau picnotique).

L'immunohistochimie révéla là aussi une accumulation nette de la PrPsc dans les couches synaptiques de la rétine, c'est-à-dire l'IPL et l'OPL, et modérée dans cytoplasme des CG, ce

qui corrobore les observations des études précédentes. L'immunoréactivité de la GFAP était augmentée dans la rétine, en particulier dans l'INL.

L'étude précédente de ce même groupe de chercheurs (Smith *et al.* 2008) avait déjà montré possible l'atteinte morphologique des cellules bipolaires associées aux bâtonnets et des cellules de Müller sur une brebis Suffolk expérimentalement inoculée par la tremblante sans signe histologique de dégénération rétinienne. Or, le bon fonctionnement de ces cellules est nécessaire au tracé physiologique de l'onde-b. De telles observations suggèrent de potentielles altérations de la fonction rétinienne, pouvant être détectées par l'étude de l'onde-b de l'ERG. L'accumulation de la PrPsc est probablement responsable d'un problème de transmission synaptique à l'origine d'une baisse d'amplitude de l'onde-b.

Dans l'étude de **Regnier *et al.* (2011)**, les ondes-a et -b des ERG réalisés sur des brebis présentant des signes cliniques de la tremblante avaient une amplitude significativement plus faible que celle des ERG des animaux témoins. La baisse d'amplitude des ondes-a signifie que les anomalies de photorécepteurs impliquent à la fois les bâtonnets et les cônes, ce qui est en accord avec les modifications morphométriques observées et la diminution du nombre de noyaux de l'ONL. La diminution des ondes-b atteste de la contribution des cellules de Müller et probablement des cellules bipolaires, ce qui est en accord avec le changement de la couche des cellules bipolaires. Des résultats similaires (c'est-à-dire une baisse sélective des ondes-b) avaient été observés par Katz *et al.* (2000) sur une patiente atteinte de MCJ confirmée à l'autopsie.

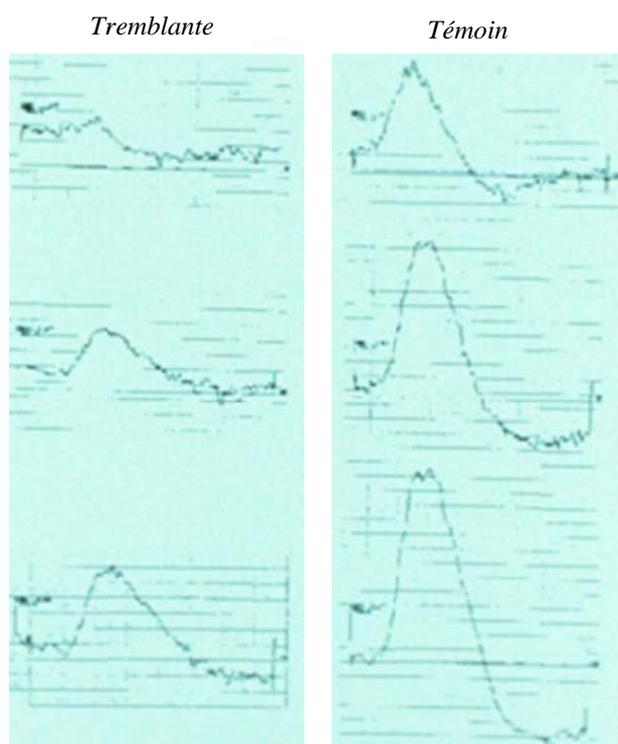


Figure n°17

Electrorétinogrammes en réponse à des flashes de lumière bleue sur des yeux adaptés à l'obscurité d'une brebis atteinte de tremblante naturelle et présentant des signes cliniques (à gauche) et d'une brebis saine (à droite).

L'amplitude de l'onde-b est significativement diminuée

(d'après Regnier *et al.* 2011, résultats non publiés)

Cependant, malgré les baisses d'amplitude, les formes des ondes-a et -b étaient normales : cela est surprenant au vu des lésions histomorphométriques rencontrées et nous aurions pu nous attendre à ce que celles-ci soient modifiées.

Des observations similaires ont été faites dans l'étude de **Curtis *et al.* (1989)** menée sur des souris inoculées expérimentalement avec la tremblante. Cela signifie que les photorécepteurs assurent un minimum de fonction normale et est en accord avec la distribution inégale des lésions au niveau de la rétine, ainsi qu'avec le fait que très peu voire pas de signes de baisse ou de troubles de la vision ne soient rapportés lors d'EST animales.

Synthèse de l'étude des rétinopathies lors de tremblante chez les petits ruminants

Contrairement à ce qui a pu être observé chez les modèles murins, les lésions histologiques de la rétine ne sont pas toujours présentes chez les petits ruminants. Quand elles le sont, leur intensité est moindre, elles n'affectent que très rarement les photorécepteurs, se concentrant surtout dans les couches de l'ONL, l'OPL et l'INL des parties centrale et paracentrale de la rétine et sont associées à une infiltration macrophagique. Dans certains cas, seule une accumulation de PrPsc est présente (aucune lésion associée); elle se localise dans l'IPL et l'OPL, ainsi que dans la couche des CG. Les couches synaptiques sont donc le site d'accumulation préférentiel de la PrPsc chez les petits ruminants lors de tremblante. L'étude de marqueurs spécifiques cellulaires a révélé l'atteinte sélective des cellules bipolaires associées aux bâtonnets. Cette atteinte fut corroborée par l'approche fonctionnelle des répercussions de l'atteinte rétinienne qui se traduit principalement par une diminution de l'amplitude de l'onde-b sur le tracé électrorétinographique. La réaction des cellules de Müller, mis notamment en évidence par l'hypperréactivité de la GFAP, est également une des caractéristiques à retenir ici.

III.4.2. Lors d'encéphalopathie spongiforme bovine

Bons *et al.* (2002) ont inoculé l'agent de l'ESB ou une souche variante isolée à partir de macaques (*macaque-adapted BSE*) à des lémurins par voie intracérébrale ou orale. Ceux-ci ont alors développé des signes cliniques ainsi qu'une accumulation de PrPsc dans l'encéphale et d'autres tissus, en particulier la rétine. L'accumulation se localisait dans les cellules ganglionnaires rétinienne, et ce quelle que soit la voie d'inoculation ou la souche employées.

Lezmi *et al.* (2006) ont inoculé deux brebis de race *Lacaune* de génotype ARQ/ARQ par voie intrapéritonéale ou intrasplénique avec l'agent de l'ESB isolé à partir d'une vache affectée afin d'étudier la pathogénie de l'ESB chez les petits ruminants. Une autre brebis de race *Lacaune* de génotype ARR/ARR fut également inoculée intrapéritonéalement. Aucun échantillon provenant du SNC, d'organes lymphoïdes, du tractus digestif, du SNP, des yeux ou autres

n'avait relevé la présence de PrPsc, que ce soit lors de l'IHC, du WB ou de l'ELISA. De tels résultats concordent avec la plus grande résistance génétique envers les EST des moutons de génotype ARR/ARR, que ce soit lors d'infection naturelle par la tremblante (Elsen *et al.* 1999) ou par inoculation par voie orale par l'ESB (Jeffrey *et al.* 2001).

Chez les deux brebis de génotype ARQ/ARQ, les résultats de l'accumulation de PrPsc furent tout autres. En effet, outre une accumulation retrouvée dans le SNC, le système lymphoïde et le système nerveux autonome, celle présente dans la rétine était véritablement majeure. Les niveaux y étaient comparables avec ceux dans le cortex frontal et le cervelet, c'est-à-dire ++, contre +++ dans le tronc cérébral selon leur échelle de score. L'accumulation de PrPsc dans la rétine était essentiellement détectée dans les couches des CG, dans l'IPL et l'OPL, soit là encore au niveau des couches synaptiques de la rétine.

Fait surprenant, chez la brebis inoculée par voie intrapéritonéale, le test ELISA était positif dans le vitré et l'humeur aqueuse. De même, chez la brebis inoculée par voie intrasplénique, l'ELISA était douteux (+/-) dans l'iris et la cornée.

L'étude de **Hamir *et al.* (2006)** avait permis de montrer que la transmission expérimentale par voie intracérébrale de l'ETV à des bovins était à l'origine de lésions histologiques quasiment indiscernables de celles causées par l'ESB. Trois ans plus tard, **Smith *et al.* (2009)** ont publié les résultats des électrorétinogrammes et de l'IHC pratiqués sur cinq vaches adultes de race Holstein inoculées par voie intracérébrale avec l'agent de l'ETV.

Des modifications des ERG furent notées avant l'apparition des signes cliniques, associées à des changements histologiques et immunohistochimiques. Les temps de culmination de l'onde-b étaient en moyenne augmentés en condition photopique ou scotopique, indiquant que les bâtonnets et les cônes étaient potentiellement impliqués. Une différence d'amplitude de l'onde-b ne fut pas notée lors des phases précliniques, par contre elle était significativement diminuée chez deux des cinq vaches lors du stade clinique de la maladie sous conditions photopique et scotopique ; par contre le temps de culmination de l'onde-b de ces deux vaches n'était prolongé qu'en condition scotopique. Lors de la progression de la maladie, la PrPtme s'accumule davantage dans les couches plexiformes et la transmission synaptique en est perturbée, ce qui expliquerait probablement cette baisse d'amplitude.

Par ailleurs, l'immunoréactivité de marqueurs spécifiques des cellules bipolaires associées aux bâtonnets (PKC α et VGLUT1) (Smith *et al.* 2008) était altérée, de même que celle des marqueurs des cellules de Müller, la Glutamine Synthase et la GFAP. Les auteurs conclurent donc là aussi que l'accumulation de PrPtme dans la rétine survient avant l'apparition des signes cliniques et est très probablement à l'origine d'une atteinte des cellules bipolaires associées aux bâtonnets. Cette atteinte limiterait la fonction synaptique de ces cellules bipolaires. L'accumulation de la PrPtme altérerait en outre les mécanismes homéostatiques des cellules de Müller, tels que la régulation de neurotransmetteurs extracellulaires. La perte du

rôle fonctionnel de la PrPc, notamment de ses propriétés antioxydantes ou son implication dans la transduction de signaux neuroprotecteurs (Chiarini *et al.* 2002), peut également intervenir.

De même que Lezmi *et al.* (2006), **Okada *et al.* (2011)** détectèrent une immunoréactivité de la PrPsc intense et granuleuse dans la couche des CG et dans l'IPL et l'OPL, ainsi que dans le de l'ESB, isolé à partir d'une vache canadienne de race Charolaise.

L'équipe de **Greenlee *et al.* (2012)** travailla également avec un veau inoculé par voie intracérébrale par un agent d'ESB de type-H. Ce dernier a déclaré des signes cliniques à 9.4 MPI et a été euthanasié à 9.8MPI. L'analyse des résultats de l'IHC a là aussi révélé une accumulation rétinienne de PrPsc de même localisation, c'est-à-dire dans la couche des CG, dans l'IPL et dans l'OPL, ainsi qu'une réponse à un stress rétinien traduit par l'immunoréactivité de la GFAP dans la rétine. La fonction rétinienne de ce veau a été évaluée par électrorétinographie à 6 MPI, répétée à 9 MPI, soit 1 semaine avant l'apparition de signes neurologiques univoques. L'amplitude de l'onde-b ne fut pas affectée, ce qui semble être en accord avec les observations précliniques réalisées par Smith *et al.* (2009) sur des vaches adultes de race Holstein inoculées par l'agent l'ETV. Le temps de culmination de l'onde-b était prolongé, suggérant un problème de neurotransmission du signal électrique.

L'épaisseur de la rétine fut évaluée à 0 MPI et 9 MPI par la tomographie en cohérence optique. La tomographie en cohérence optique (OCT, *optical coherence tomography*) est une technique d'imagerie du fond d'oeil non invasive développée dès le début des années 90 et permettant d'obtenir *in vivo* des coupes optiques de la rétine avec une résolution très fine (de l'ordre de 5 à 10 μ m). L'OCT permet la mesure de l'épaisseur rétinienne ; grâce à ses données quantitatives, elle est particulièrement utile au suivi de rétinopathies diverses et fut ainsi employée ici. Cette technique a permis de constater qu'un jour avant l'inoculation, la rétine mesurait 371 μ m contre 273 μ m à 9 MPI (soit une diminution de 26.4%), tandis que la rétine d'un veau témoin du même âge mesurait 310 μ m. De tels résultats permettent d'objectiver un amincissement rétinien consécutif à la maladie. Toutefois, les auteurs n'ont pas précisé quelles couches rétiniennes étaient particulièrement concernées par cet amincissement, comme ce fut rapporté chez la brebis lors de tremblante avec l'ONL et l'INL (Regnier *et al.* 2011).

Synthèse de l'étude des rétinopathies lors d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine

Il apparaît donc que, lors d'ESB, la PrPsc s'accumule dans les mêmes couches rétiniennes que lors de tremblante : la couche des cellules ganglionnaires et les deux couches plexiformes.

Les études dont nous disposons ne font pas état de dégénérescence rétinienne notable, ce qui semble en faire une caractéristique commune supplémentaire avec la tremblante des petits ruminants même si ce n'est pas une constante lors de tremblante. L'étude électrorétinographique a seulement révélé un allongement du temps de culmination de l'onde-b lors d'ESB, mais trop peu de données sont actuellement disponibles pour avancer toute conclusion.

III.4.3. Lors de maladie du dépérissement chronique des cervidés

Les travaux d'**Hamir et al. (2008)** réalisés sur 15 cerfs à queue blanche inoculés par voie intracrânienne par l'agent de la MDC avaient mis en évidence par IHC une immunoréactivité de la PrP^{Sc} localisée au niveau de l'IPL, de l'OPL et de la couche des CG, bien qu'elle y était légèrement moins intense que dans les couches plexiformes. C'est également ce qu'avaient constaté **Keane et al. (2008)** sur des cerfs à queue blanche naturellement infectés. Cependant, seul quatre des 63 animaux inclus dans l'étude présentaient de la PrP^{Sc} dans leurs rétines.

Spraker et al. (2010) avaient analysés, en plus de l'obex, les rétines et voies visuelles de 30 wapitis des montagnes rocheuses de différents génotypes (132 MM, ML et LL) naturellement infectés.

Un score proportionnel à la quantité de PrP^{Sc} présente dans les obex était attribué pour chaque animal. La présence de PrP^{Sc} dans la rétine était associée à des scores dans l'obex plus élevés qu'au niveau des voies visuelles (nerf optique, chiasma optique, tractus optique, noyau géniculé latéral, radiations optiques, cortex visuel occipital, noyaux oculomoteur et collicule supérieur). Les auteurs conclurent ainsi que la PrP^{Sc} s'accumulait d'abord dans les voies visuelles puis dans la rétine au cours de l'évolution de la maladie. De plus, au niveau de la rétine, l'IPL était la couche la première colonisée par la PrP^{Sc}, puis l'OPL, puis les couches restantes dans une moindre mesure. Une telle cinétique dans l'accumulation rétinienne de la PrP^{Sc} rappelle celle de la PrP^{Sc} dans l'étude de Greenlee *et al.* (2006).

Toutefois, il est intéressant de remarquer une différence dans l'immunoréactivité de la PrP^{Sc} en fonction du génotype des wapitis. En effet, aucun animal 132 MM n'a montré d'accumulation de la PrP^{Sc} dans la couche des CG, contrairement aux animaux 132 ML où elle était légère et marquée chez les wapitis 132 LL. De même, des lésions de dégénérescence rétinienne ne se retrouvaient que chez les animaux ML ou LL. L'absence d'immunoréactivité intraneuronale chez le génotype 132 MM semble être liée à une expression minimale de la PrP^C. Inversement, la présence d'au moins un allèle codant pour la leucine au codon 132 du gène *Prnp* pourrait augmenter le niveau d'expression de la PrP^{Sc}. La

leucine pourrait donc jouer un rôle dans le métabolisme ou l'expression de la PrP^{Sc} dans les CG et cellules de Müller.

La surface interne de la membrane limitante externe des animaux de génotype 132LL présentait des petits agrégats de PrP^{Sc}. Ce point n'a pas été observé pour les génotypes 132MM ou ML. Une hypothèse pour expliquer la présence de tels agrégats peut être avancée en se basant sur la structure anatomique même de la membrane limitante externe. Cette dernière est constituée d'une série de complexes jonctionnels entre les photorécepteurs et les cellules de Müller. Ces ponts sont formés par la fin distale des cellules de Müller qui s'attachent aux photorécepteurs par des jonctions de type zonula-adhérente. Le matériel filamenteux associé à ces adhérences zonulaires intercellulaire apparaît telle une membrane en microscopie, d'où le nom. Il apparaît donc possible que ce matériel et ces jonctions gênent le mouvement de la PrP^{Sc} et expliquent donc l'accumulation observée qui se traduit par les petits agrégats.

Synthèse de l'étude des rétinopathies lors de Maladie du Dépérissement Chronique

Chez les cervidés atteints de MDC, il semble que la localisation de la PrP^{Sc} soit identique à celle de la PrP^{Sc} décrite lors de tremblante ovine ou d'ESB. En plus de la période d'incubation, il semblerait que notamment le codon 132 du gène *Prnp* influence la présence de PrP^{Sc} dans les cellules ganglionnaires et de lésions de dégénérescence rétinienne.

III.4.4. Lors d'encéphalopathie transmissible du vison

Les hamsters inoculés par voie intracérébrale avec l'agent de l'ETV présentèrent les mêmes changements rétiens que ceux décrits dans les études travaillant avec des hamsters inoculés par la tremblante (Buyukmihci *et al.* 1982), bien qu'étant moins étendus (**Buyukmihci *et al.* 1987a**). La dégénérescence des photorécepteurs était évidente dans les deux rétines - l'inoculation avait eu lieu dans l'hémisphère cérébral droit- mais son intensité était systématiquement plus importante dans les rétines gauches, c'est à dire dans la rétine controlatérale à l'hémisphère cérébral d'inoculation. Une dégénérescence éparses des segments interne et externe, associée à de la pycnose dans l'ONL, était initialement notée. Les changements étaient plus marqués dans l'aire centrale rétinienne. Les animaux ayant été euthanasiés les plus tardivement présentaient une perte marquée de photorécepteurs. Là encore, l'OPL était quasiment absent alors que l'INL était intact. Dans les stades avancés de tremblante chez le hamster, l'INL s'amincit, alors qu'il reste intact lors d'ETV. Ce dernier point constitue probablement l'unique différence entre les rétinopathies observées consécutivement à la tremblante et à l'ETV chez les hamsters inoculés expérimentalement par voie intracérébrale.

Lors d'une étude visant à démontrer la possibilité d'inoculer expérimentalement à des rats laveurs l'agent de la tremblante ou celui de l'ETV et caractériser par la même occasion les temps d'incubation de ces deux maladies chez cette espèce, ainsi que la distribution des lésions lors de l'IHC, **Hamir et al. (2005)** ont pu constater que la rétine était l'un des tissus les plus concernés par l'accumulation de la PrPsc. C'est dans les couches synaptiques plexiformes, l'IPL et l'OPL, que celle-ci fut détectée à l'IHC.

III.4.5. Lors d'encéphalopathie spongiforme des félins

L'analyse immunohistochimique des rétines du premier cas d'ESF sur un guépard né en France en captivité révélèrent une forte accumulation de PrPsc dans les couches synaptiques, ainsi qu'une accumulation plus faible dans l'INL et la couche des photorécepteurs (**Lezmi et al. 2003**).

Six ans plus tard, **Hilbe et al. (2009)** ont décrit les lésions histopathologiques et immunohistochimiques du SNC de deux chats domestiques ayant présenté des signes nerveux centraux et dont l'autopsie et les résultats *post portem* ont confirmé qu'ils étaient atteints d'ESF. Une accumulation marquée de PrPsc fut notée dans l'IPL, ainsi que dans l'OPL plus modérément. De petits dépôts étaient également présents dans les photorécepteurs, dans les cellules ganglionnaires et dans les axones du nerf optique.

Le peu de données disponibles sur les retinopathies associées à la FSE semble toutefois confirmer les observations précédemment exposées à propos des ruminants atteints d'EST: la PrPsc s'accumule dans les couches synaptiques de la rétine.

III.5. La spectroscopie de fluorescence : une méthode diagnostique indirecte ?

Schönenbrücher *et al.* (2008) ont montré que la spectrofluorométrie, technique courante d'analyse en chimie organique, permettait une détection en temps réel de tissus du SNC présents en très faible quantité dans des carcasses bovines. Les tissus du SNC sont hautement fluorescents contrairement aux autres tissus de l'organisme. Cette fluorescence est principalement due à une grande quantité de lipofuscine. La lipofuscine est un pigment autofluorescent de haut poids moléculaire qui s'accumule progressivement dans les lysosomes de cellules post-mitotiques. Le mécanisme de cette accumulation n'est pas complètement élucidé mais elle affecte tout particulièrement les neurones du SNC (**Bose et al. 2013**) et s'intensifie avec l'âge. Cette accumulation pourrait être une résultante du vieillissement cellulaire associé à une diminution de l'autophagocytose, de la dégradation intraly-

sosomiale et/ou de l'exocytose (Terman, Brunk 1998). Dans la rétine, la lipofuscine se retrouve dans le RPE et provient de la digestion incomplète des segments externes des photorécepteurs (Kennedy *et al.* 1995).

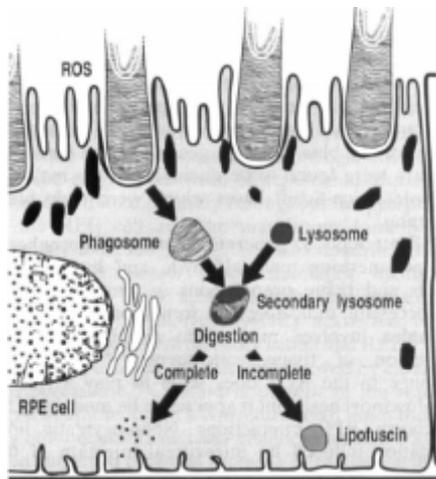


Figure n°18

Schéma de la formation de lipofuscine à partir des segments externes des bâtonnets dans le RPE

(d'après Kennedy, *et al.* 1995)

La quantité de lipofuscine dans le SNC augmente lors de MCJ ou lors de modèles murins inoculés expérimentalement par l'agent de la MCJ (Boellaard *et al.* 1989). La détection de lipofuscine dans les rétines d'animaux atteints d'EST semble intéressante à envisager et est ainsi discutée dans les deux études suivantes qui employèrent la spectrofluorométrie. En spectroscopie de fluorescence, l'échantillon est tout d'abord excité par absorption d'un photon de son état fondamental vers un état excité de plus haut niveau d'énergie : il s'agit de la propriété de fluorescence. La molécule se conforme ensuite dans un des états vibrationnels de l'état fondamental et émet un photon. Lors de ce processus, les photons acquièrent différentes énergies, et par conséquent différentes fréquences. Les fréquences de lumière fluorescente émises par l'échantillon sont mesurées avec une source lumineuse excitatrice de longueur d'onde constante. Un « spectre d'émission » est ainsi obtenu.

La spectroscopie de fluorescence fut utilisée par **Adhikary *et al.* (2010)** qui travaillaient alors avec des brebis naturellement infectées par la tremblante. Ils ont analysé les résultats spectrofluorométriques des rétines de 73 animaux, 35 d'entre eux étant atteints de tremblante. Les yeux furent disséqués et les rétines étalées sur une lame de microscope. Les spectres de fluorescence des rétines furent ensuite enregistrés pour différentes longueurs d'onde et de nettes différences furent notées entre les rétines d'animaux atteints par la tremblante par rapport aux animaux témoins. L'intensité de fluorescence des rétines des animaux positifs était significativement supérieure et deux pics intenses à 560 et 600 nm furent notés sur les spectres enregistrés pour une longueur d'onde excitatrice de 470 nm. Ces résultats n'étaient pas influencés par la polarisation de la radiation excitatrice, ni par le facteur âge. Les auteurs

concluent alors que l'augmentation de l'intensité de la fluorescence des rétines de brebis atteintes de tremblante pouvait s'expliquer par l'accumulation de lipofuscine dans le RPE rapportée lors de maladies à prions.

La microscopie par fluorescence hyperspectrale (MFH) est une technique permettant la visualisation directe des tissus étudiés. Elle permet notamment de visualiser les différentes régions de la rétine. Le principe repose sur la formation d'une image par détection de la lumière émise une fois l'échantillon excité par l'absorption de photons.

Dans l'étude de Adhikary *et al.* (2010), des zones de plus forte intensité de fluorescence dans les rétines d'animaux infectés furent notées. Les auteurs décrivent en outre une certaine hétérogénéité de la fluorescence avec des zones de forte brillance et des agrégats de fluorescence, suggérant une accumulation hétérogène de la lipofuscine dans le RPE.

Cette étude suggère l'existence d'une corrélation entre le spectre d'émission de fluorescence des rétines de moutons et la présence ou l'absence de tremblante.

Trois ans plus tard, **Bose *et al.* (2013)** ont cherché la présence de telles caractéristiques spectrales chez des modèles murins. Cette étude décrit les résultats de spectrofluorométrie, selon un protocole similaire au précédent, des rétines de 74 souris de même âge (et de 25 témoins) de souche C57BL/DK inoculées expérimentalement avec l'agent de la tremblante. Plusieurs longueurs d'onde excitatrices furent testées tour à tour. Pour des longueurs d'onde de 410 et 470 nm, l'intensité de la fluorescence des échantillons rétinien était deux à trois fois plus importante chez les animaux atteints de tremblante. Dans l'étude d'Adhikary *et al.* (2010), elle était environ 100 fois plus intense. Ici, l'intensité de fluorescence variait cependant selon les souris testées : l'hétérogénéité de distribution de lipofuscine peut en partie expliquer ces différences. Les résultats de la microscopie par fluorescence hyperspectrale furent similaires à ceux de l'étude de Adhikary *et al.* (2010). Toutefois, l'hétérogénéité de la fluorescence lors de la MFH était moins marquée chez la souris.

Bien que certaines caractéristiques spectrales soient moins marquées chez les souris, il semblerait tout de même que la souris, qui constitue un modèle nettement plus simple d'un point de vue pratique et logistique pour l'expérimentateur, soit appropriée pour l'étude spectrofluorométrique de la tremblante.

Les données de spectrofluoroscopie de fluorescence impliquant le RPE sont cependant encore trop peu nombreuses pour être affirmatif sur la valeur diagnostique de ces résultats. On peut cependant s'étonner qu'aucune lésion du RPE n'ait été rapportée dans l'ensemble des études décrites dans des chapitres précédents.

III.6. La pathogénie des maladies à prions au niveau oculaire

III.6.1. La dissémination des prions du cerveau à la rétine

III.6.1.1. *via le nerf optique ?*

Nous avons pu voir lors de l'étude des rétinopathies chez les ruminants atteints d'EST que la PrPsc se localisait préférentiellement dans les couches plexiformes de la rétine et dans la couche des cellules ganglionnaires. Une telle accumulation dans les synapses rétiniennes, que l'on retrouve d'ailleurs chez l'Homme atteint de MCJ (Head, 2003), est en faveur d'une propagation centrifuge des prions depuis le cerveau vers l'œil par l'intermédiaire du nerf optique (Head, 2005). De plus, les observations de lésions histologiques plus sévères dans les zones centrale et paracentrale de la rétine sont en accord avec l'hypothèse d'une dissémination nerveuse des prions du cerveau vers la rétine (Regnier *et al.* 2011).

Lors de leurs différents travaux, Buyukmihci *et al.* (1982 ; 1985a ; 1987a) ont constaté que lorsqu'ils inoculaient un agent de tremblante par voie intracérébrale à des hamsters, les lésions rétiniennes étaient plus marquées du côté controlatéral au site d'inoculation intracérébrale. Contrairement à l'Homme où 50% des fibres nasales du nerf optique décussent au niveau du chiasma optique, celles qui croisent chez l'animal sont majoritaires (75% chez le chien environ, 65% chez le chat). Compte tenu de cette particularité anatomique, les observations de Buyukmihici *et al.* suggèrent une dissémination des prions de l'encéphale vers la rétine par l'intermédiaire du nerf optique. De plus, lorsque cette même équipe a inoculé la maladie aux hamsters par voie intrapéritonéale ou intrasplénique, aucune différence lésionnelle entre les deux rétines n'a été notée, ce qui respecterait l'hypothèse précédente. En effet, lors d'inoculation intrapéritonéale ou intrasplénique, chaque hémisphère cérébral était atteint de façon similaire par les prions après dissémination, ce qui appuie également l'hypothèse du nerf optique comme voie de dissémination.

La validation d'une telle hypothèse nécessite cependant la mise en évidence de la présence de PrPsc dans le nerf optique. Les récentes études sur les espèces hôtes naturelles de tremblante n'ont pas, ou très peu, détecté de PrPsc par immunohistochimie dans le nerf optique, et n'ont donc pas validé l'hypothèse.

Hamir *et al.* (2004), dans leur étude sur la transmission de la tremblante ovine au wapiti par inoculation intracérébrale, détectèrent la PrPsc dans les rétines de 3 des 6 animaux inoculés ; par contre, aucune immunoréactivité ne fut notée dans les nerfs optiques. Jeffrey *et al.* (2001) ainsi que Regnier *et al.* (2011) ont fait un constat similaire sur des moutons naturellement atteints de tremblante.

Hortells *et al.* (2006), dans leur étude portant sur 20 brebis infectées naturellement par la tremblante, n'ont de même détecté la PrPsc que dans 3 nerfs optiques sur les 20 brebis étudiées, suggérant possiblement une autre voie de dissémination.

Cette absence d'immunoréactivité de PrPsc dans le nerf optique nous amène à considérer deux hypothèses : soit la présence de PrPsc n'est que transitoire et détectable qu'en début d'évolution de la maladie, ce qui expliquerait qu'elle n'ait pas été détectée sur les animaux cliniques, soit la dissémination nerveuse des prions se fait par un autre mode de propagation que le nerf optique. Une propagation par les cellules gliales associée aux fibres du nerf optique, en position intracellulaire ou extracellulaire, peut être envisagée (Fraser, 1982).

Une telle dissémination dans les cellules gliales du nerf optique fut également suggérée suite à une partie des résultats de l'expérience de Kercher *et al.* réalisée en 2004. De part la voie d'inoculation employée, le sens de la dissémination des prions est certes inversé mais l'étude séquentielle de la localisation de PrPsc dans les voies visuelles a également permis de tester la transmission par le nerf optique. Une souche de tremblante adaptée au hamster fut inoculée intraoculairement à des souris transgéniques exprimant la protéine prion de hamster (SHa-PrP) dans certains types cellulaires seulement. Chez les souris tgGFAP, qui n'exprimaient la SHa-PrP que dans les astrocytes, la PrPsc fut tout d'abord détectée de façon simultanée dans la rétine et le corps genouillé latéral à 140 jours post inoculation, mais fut ensuite détectée 200 jours post inoculation dans des régions non associées aux voies visuelles telles que l'hippocampe, l'hypothalamus ou le cervelet, avant d'être finalement détectée dans le cortex visuel 280 jours post inoculation. La dissémination n'a donc pas eu lieu dans les neurones, et un rôle potentiel des cellules gliales adjacentes a été suggéré.

Chez la chèvre expérimentalement infectée par la tremblante, quelques cellules du nerf optique ressemblant morphologiquement à des cellules de Schwann présentaient, de façon très dispersée, une faible immunoréactivité cytoplasmique (Valdez *et al.* 2003).

Etant donné les très faibles taux de PrPsc dans les tissus périphériques, Okada *et al.* (2012) utilisèrent l'immunofluorescence par double marquage, afin d'optimiser la sensibilité de la détection immunohistochimique, ce qui leur permit de démontrer le dépôt de PrPsc dans le nerf optique de bovins naturellement et expérimentalement infectés par l'ESB. Cette technique leur permit également d'identifier l'emplacement exact de la PrPsc dans le nerf optique.

Il est important de relever que, malgré cette technique très sensible, l'intensité de l'immunomarquage était significativement moindre dans le nerf optique que dans les rétines.

Dans les coupes transversales de nerf optique, la technique d'immunofluorescence par double marquage montra une accumulation granuleuse, qui semblait incluse dans des lysosomes, et périneuronale, localisée dans le cytoplasme des astrocytes, des cellules microgliales et dans les gaines de myéline. Des agrégats de PrPsc étaient aussi présents, associés aux cellules microgliales et aux astrocytes du nerf optique. De tels résultats suggèrent que la PrPsc peut se propager de manière centrifuge depuis le cerveau à l'intérieur et entre les cellules gliales et/ou en position non-axonale le long des axones du nerf optique.

III.6.1.2. une éventuelle infectiosité cornéenne ?

La voie intraoculaire est particulièrement efficace dans la transmission des maladies à prions. Trois cas de transmission iatrogène de la MCJ dus à des greffes de la cornée ont été décrits (Duffy, 1974). Un cas de MCJ iatrogène est également rapporté chez une patiente de 45 ans, trente ans après avoir reçu une greffe cornéenne suite à un kératocône (Hogan, 1995). Le risque d'une telle situation est cependant très faible ; le nombre de donneurs d'organes atteints de MCJ a par exemple été estimé entre 0.5 et 4 sur la population totale des Etats-Unis d'Amérique (Armstrong, 2006). Le recueil de l'anamnèse auprès des donneurs de cornée constitue un critère d'exclusion suffisant et adéquat pour gérer un tel risque selon la *Eye Bank Association of America*.

Suite aux cas de transmission iatrogène de MCJ lors de greffe cornéenne (Duffy, 1974), Marsh et Hanson (1975) décidèrent de reproduire expérimentalement une telle situation. Ils disséquèrent les yeux de hamsters en phase clinique avancée d'ETV et recherchèrent les titres infectieux des cornées, de l'humeur aqueuse, ainsi que des échantillons de cerveau. L'épithélium cornéen fut disséqué sous microscope et les fragments obtenus furent soumis à quatre cycles de congélation/décongélation pour une partie, tandis que l'autre fut mise à incuber dans une boîte de Pétri pendant 3 semaines. Les fragments furent ensuite inoculés par voie intracérébrale à des hamsters en croissance selon un protocole classique de bio-essai. Les auteurs détectèrent ainsi des titres en agent infectieux non nuls dans les épithéliums cornéens ; ceux-ci étaient 10 000 fois inférieurs à ceux du cerveau. Les résultats du bio-essai montrèrent en outre que l'infectiosité de l'épithélium cornéen était plus élevée dans ceux non soumis à incubation avant l'inoculation.

Les auteurs conclurent que l'épithélium cornéen était infectieux. La différence entre les titres infectieux des épithéliums cultivés et non cultivés peut s'expliquer par une absence de division cellulaire *in vitro* des cellules infectées. La durée de vie des cellules de l'épithélium cornéen étant de 7 à 10 jours, celles-ci ont un fort pouvoir de réplication *in vivo* ; cependant celui-ci est bien plus faible *in vitro*. Comme le temps de réplication de l'agent de la tremblante *in vitro* coïncide avec celui des cellules de l'épithélium (Clarke & Haig, 1970), celui-ci est sans doute capable de supporter *in vivo* un niveau d'infection modéré. Une seconde explication réside sûrement dans le fait que l'épithélium cornéen contient des terminaisons nerveuses non myélinisées au niveau desquelles les prions pourraient se répliquer.

La transmission des maladies à prions lors de greffe cornéenne est donc possible, toutefois cela représente un risque extrêmement faible.

Les greffes cornéennes ne sont pas pour autant le seul moyen de transmission de prions par voie oculaire. En raison du caractère potentiellement infectieux de la cornée lors de maladie à prions, la transmission iatrogène de MCJ par voie oculaire superficielle avec des matériels réutilisables comme les tonomètres constitue également un risque en ophtalmologie (Davanipour *et al.* 1985). Une étude rétrospective de cas de MCJ sporadiques a en effet montré

une proportion élevée de patients ayant eu des examens tonométriques dans les trois ans précédents l'apparition des signes cliniques. Cependant, le développement de systèmes récents intégrant des protections à usage unique permettent de minimiser un risque déjà minime. L'utilisation répétée en ophtalmologie de lentilles de contact rigides perméables pour des essais de tolérance constitue également un risque potentiel de contamination croisée entre patients, étant donné la capacité d'adsorption des prions sur des surfaces. Un tel cas serait survenu en Grande-Bretagne en juin 1999 (Armstrong, 2006). Dans leur étude de 2003, Comoy *et al.* ont évalué expérimentalement l'efficacité de différentes modalités de désinfection des lentilles rigides perméables vis-à-vis des prions. Celles-ci ont été contaminées sur leur face interne avec une quantité connue de matériel infectieux, issu de la souche 263K de tremblante adaptée au hamster, adsorbé par séchage pendant 18 heures. Les différents traitements de désinfection ont été réalisés selon les recommandations du fabricant ou de l'OMS. La détection de la présence résiduelle de prions a ensuite été réalisée par bio-essai en inoculant des hamsters par voie intracérébrale soit avec le matériel désorbé des lentilles selon les méthodes habituellement préconisées soit directement avec les lentilles réduites en poudre. Les résultats ont confirmé que les prions peuvent s'adsorber très efficacement sur des surfaces et que les protocoles de désorption habituellement préconisés ne permettent pas nécessairement de les désorber totalement. Les traitements de désinfection des lentilles ophtalmologiques utilisés (titrant 0,4 à 0,5 % en chlore actif) diminuaient d'au moins un facteur 10 000 000 la charge infectieuse retenue sur la surface de lentilles contaminées expérimentalement et constitueraient donc un élément important de protection contre une infection potentielle avec une souche de prion par voie oculaire. L'emploi actuel de lentilles à usage unique pour les essais de tolérance à permis toutefois de s'affranchir de ce risque.

Aucune étude n'a mis en évidence la présence de prions dans les larmes (Hogan, 2003) ; la transmission par contact direct n'a jamais été démontrée et semble peu probable.

Si le caractère infectieux, quoique faible, de la cornée a été démontré, la transmission de maladie à prions se produit avec un risque extrêmement faible lors de greffe cornéenne. Il faut cependant noter que le nombre d'études ayant recherché l'infectiosité de la cornée est très limité et celles qui sont disponibles ne bénéficient pas des techniques diagnostiques récentes. L'utilisation de matériel d'ophtalmologie constitue également un risque très faible de transmission par la cornée. L'utilisation de matériel à usage unique et le respect de protocoles de désinfection permettent de minimiser ce risque.

III.6.2. Les hypothèses concernant le rôle pathogène des prions au sein de l'oeil

Dans le cadre de l'étude de la pathogénie des maladies à prions dans la rétine, **Kercher *et al.* (2004)** ont examiné les rétines de souris transgéniques exprimant la PrP de hamster (SHa-PrP) de façon sélective dans différents types cellulaires. Les souris transgéniques *tg7* expri-

maient la SHa-PrP sous contrôle du promoteur tg7 dans les cellules neuronales, les cellules de Müller et les cellules microgliales. Les souris tgNSE ne l'exprimaient que dans les cellules neuronales et les souris tgGFAP uniquement dans les cellules astrocytaires.

Les souris ont été inoculées par voie intraoculaire avec une souche 263K de tremblante adaptée au hamster. Cette inoculation locale fut choisie afin de mettre en évidence des différences éventuelles dans les changements histologiques précoces. Bien que les trois lignées de souris développèrent la maladie et présentèrent des lésions de spongiose et de neurodégénération dans le cerveau, des différences significatives d'étendue des lésions rétiniennes furent notées.

Les souris tg7 présentèrent des signes de hyalite, de vascularite rétinienne, d'apoptose et d'atrophie rétinienne et de hauts niveaux d'accumulation rétinienne de PrPsc : 6 souris sur 7 à 42 jours post inoculation et 5 sur 5 à 90 jours. Les souris tgNSE montrèrent seulement des signes minimes d'apoptose rétinienne et une accumulation de PrPsc légèrement plus faible que pour les tg7. Cependant, cette différence dans les niveaux d'accumulation n'était pas significative. Les signes histologiques des souris tgGFAP étaient similaires à ceux des tgNSE, c'est-à-dire minimes, et l'accumulation rétinienne de PrPsc était nettement plus faible que pour les précédents types de souris.

Ces différences histologiques s'expliquent probablement par le fait que l'atteinte de plusieurs types cellulaires rétiens soit nécessaire à la dégénérescence rétinienne. L'accumulation de PrPsc dans les neurones uniquement serait suffisante au développement de la neurodégénérescence dans le cerveau mais n'induirait pas des sévères rétinoopathies. Il faudrait pour cela que la PrPsc se localise dans les cellules gliales de Müller et les cellules microcytaires.

Les résultats de cette étude impliqueraient donc plusieurs types cellulaires dans la pathogénie des rétinoopathies lors des maladies à prions.

CONCLUSION

Notre travail a permis d'exposer l'état actuel des connaissances scientifiques concernant les répercussions oculaires des maladies à prions chez l'animal.

Nous avons constaté que des modifications de la fonction visuelle étaient parfois rapportées. Chez l'homme, des troubles visuels complexes et subtils surviennent notamment lors de vMCJ. De tels troubles sont cependant difficilement évaluables chez l'animal mais ces derniers pourraient exister sans qu'une expression clinique ne soit remarquée. Par ailleurs, le développement de signes nerveux généraux sévères peut masquer leur expression clinique. L'existence de troubles de la fonction visuelle ne peut donc être exclue dans l'état actuel de nos connaissances.

De rares et inconstantes lésions du fond d'œil constituent les seules anomalies rapportées lors de l'examen oculaire d'animaux atteints d'EST. Celles-ci traduiraient la présence d'un matériel complexe éosinophile situé entre la couche des articles externes des photorécepteurs et celle de l'épithélium pigmentaire de la rétine.

La PrPsc ne s'accumulerait que dans la neurorétine, exception faite des rares et anciennes études qui ont rapporté une faible infectivité de la cornée. Cette accumulation est liée au développement de rétinopathies, qui peuvent être détectées avant l'apparition des signes cliniques généraux. Selon le modèle animal étudié, le génotype de l'hôte et la souche de prions employée, les aspects histologiques, immunohistochimiques et électrorétinographiques de ces rétinopathies varient. La dégénérescence rétinienne n'est pas systématique chez les ruminants, contrairement à certains modèles murins. L'accumulation systématique de PrPsc dans les couches synaptiques de la neurorétine des ruminants semble être couplée à une atteinte sélective des cellules bipolaires associées aux bâtonnets.

La pathogénie des maladies à prions dans la rétine impliquerait, en plus des neurones, les cellules de Müller et les cellules microcytaires. Il semblerait que l'atteinte oculaire survienne de manière centrifuge depuis le cerveau, avec une propagation des PrPsc à l'intérieur et entre les cellules gliales et/ou en position non-axonale le long des axones du nerf optique.

Une récente étude (Smith et Greenlee, 2014) a permis de montrer que des échantillons rétiens pouvaient être utilisés pour des tests commerciaux de détection rapide mais uniquement sur des animaux atteints cliniquement. Ils ne peuvent à ce jour remplacer ceux pratiqués sur des échantillons de tronc cérébral réalisés dans le cadre des programmes de surveillance.

De tels résultats traduisent l'intérêt actuel de l'étude des répercussions oculaires lors de maladies à prions chez l'animal. Il est ainsi très probable que de nouvelles études viennent compléter l'état actuel de nos connaissances dans un futur proche.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Alain REGNIER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **FAGES Julien** intitulée « *Les répercussions oculaires lors des maladies à prions expérimentales et spontanées chez l'animal* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

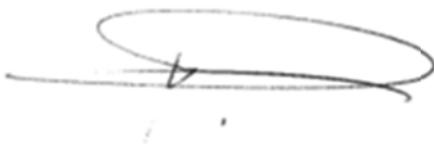
Fait à Toulouse, le 12 mai 2014
Professeur Alain REGNIER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Pierre FOURNIE



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



M. Julien FAGES
a été admis(e) sur concours en : 2009
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013
a validé son année d'approfondissement le : 06/03/2014
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE :

ADHIKARY, Ramkrishna, MUKHERJEE, Prasun, KRISHNAMOORTHY, Govindarajan, KUNKLE, Robert A., CASEY, Thomas A., RASMUSSEN, Mark A. et PETRICH, Jacob W. Fluorescence Spectroscopy of the Retina for Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Analytical Chemistry* 2010, 82 : 4097-4101.

AGUGLIA, U, GAMBARELLI, D, FARNARIER, G et QUATTRONE, A. Different susceptibilities of the geniculate and extrageniculate visual pathways to human Creutzfeldt-Jakob disease (a combined neurophysiological-neuropathological study). *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1991, 78 : 413-423.

AGUZZI, Adriano et POLYMENIDOU, Magdalini. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*. 2004, 116 : 313-327.

ANDRÉOLETTI, Olivier, BERTHON, Patricia, MARC, Daniel, SARRADIN, Pierre, GROSCLAUDE, Jeanne, VAN KEULEN, Lucien, SCHELCHER, François, ELSÉN, Jean-Michel et LANTIER, Frédéric. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 2000, 81 : 3115-3126.

ANDRÉOLETTI, Olivier, LACROUX, Caroline, CHABERT, Armelle, MONNEREAU, Laurent, TABOURET, Guillaume, LANTIER, Frédéric, BERTHON, Patricia, EYCHENNE, Francis, LAFOND-BENESTAD, Sylvie et ELSÉN, Jean-Michel. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*. 2002, 83 : 2607-2616.

ANDRÉOLETTI, O, SIMON, S, LACROUX, C, MOREL, N, TABOURET, G, CHABERT, A, LUGAN, S, CORBIÈRE, F, FERRÉ, P, FOUCRAS, G, LAUDE, H, EYCHENNE, F, GRASSI, J et SCHELCHER, F. PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nature medicine*. 2004, 10 : 591-593.

ANDREOLETTI, O. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *Journal of General Virology*. 2006, 87 : 1043-1046.

ARAUJO, Abelardo Q-C. Prionic diseases. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2013, 71 : 731-737.

ARMITAGE, W. J., TULLO, A. B. et IRONSIDE, J. W. Risk of Creutzfeldt-Jakob disease transmission by ocular surgery and tissue transplantation. *Eye*. 2009, 23 : 1926-1930.

ARMSTRONG, Richard A. Creutzfeldt-Jakob disease and vision. *Clinical and Experimental Optometry*. 2006, 89 : 3-9.

AUCOUTURIER, P, GEISSMANN, F, DAMOTTE, D, SABORIO, G P, MEEKER, H C, KASCSAK, R, KASCSAK, R, CARP, R I et WISNIEWSKI, T. Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *The Journal of clinical investigation*. 2001, 108 : 703-708.

BARNETT, K C et PALMER, A C. Retinopathy in sheep affected with natural scrapie.

Research in veterinary science. 1971, 12 : 383-385.

BASLER, K, OESCH, B, SCOTT, M, WESTAWAY, D, WÄLCHLI, M, GROTH, D F, MCKINLEY, M P, PRUSINER, S B et WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell.* 1986, 46 : 417-428.

BASTIAN, Frank O. et FERMIN, Cesar D. Slow virus disease: Deciphering conflicting data on the transmissible spongiform encephalopathies (TSE) also called prion diseases. *Microscopy Research and Technique.* 2005, 68 : 239-246.

BEEKES, Michael et MCBRIDE, Patricia A. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *The FEBS journal.* 2007, 274 : 588-605.

BEIROWSKI, Bogdan, ADALBERT, Robert, WAGNER, Diana, GRUMME, Daniela S., ADDICKS, Klaus, RIBCHESTER, Richard R. et COLEMAN, Michael P. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC neuroscience.* 2005, 6 : 6.

BESSEN, R A et MARSH, R F. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *The Journal of general virology.* 1992, 73 (Pt 2) : 329-334.

BESSEN, R A et MARSH, R F. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of virology.* 1994, 68 : 7859-7868.

BIGNAMI, A, BECK, E et PARRY, H B. Neurosecretion-like material in the hindbrain of ageing sheep and sheep affected with natural scrapie. *Nature.* 1970, 225 : 194-196.

BOELLAARD, J W, SCHLOTE, W et TATEISHI, J. Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta neuropathologica.* 1989, 78, 410-418.

BONS, Nöelle, LEHMANN, Sylvain, MESTRE-FRANCÈS, Nadine, DORMONT, Dominique et BROWN, Paul. Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion.* 2002, 42 : 513-516.

BOSE, Sayantan, SCHÖNENBRÜCHER, Holger, RICHT, Jürgen A., CASEY, Thomas A., RASMUSSEN, Mark A., KEHRLI, Marcus E. et PETRICH, Jacob W. Fluorescence Spectroscopy of the Retina from Scrapie-Infected Mice. *Photochemistry and Photobiology.* 2013, 89 : 864-868.

BOZZETTA, E., ACUTIS, P. L., MARTUCCI, F., NAPPI, R., CASALONE, C., MAZZA, M. et CARAMELLI, M. Evaluation of rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats. *Acta Neuropathologica.* 2004, 107 : 559-562.

BRINGMANN, Andreas, PANNICKE, Thomas, GROSCHE, Jens, FRANCKE, Mike, WIEDEMANN, Peter, SKATCHKOV, Serguei N, OSBORNE, Neville N et REICHENBACH, Andreas. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research.* 2006, 25 : 397-424.

BROWN, P, CATHALA, F, RAUBERTAS, R F, GAJDUSEK, D C et CASTAIGNE, P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France

and review of the world literature. *Neurology*. 1987, 37 : 895-904.

BROWN, D R, QIN, K, HERMS, J W, MADLUNG, A, MANSON, J, STROME, R, FRASER, P E, KRUCK, T, VON BOHLEN, A, SCHULZ-SCHAEFFER, W, GIESE, A, WESTAWAY, D et KRETZSCHMAR, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*. 1997, 390 : 684-687.

BROWN, D A, BRUCE, M E et FRASER, J R. Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2003, 29 : 262-272.

BROWN, David R. Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuroopathol*. 2005, 43 : 229-243.

BRUCE, M E, WILL, R G, IRONSIDE, J W, MCCONNELL, I, DRUMMOND, D, SUTTIE, A, MCCARDLE, L, CHREE, A, HOPE, J, BIRKETT, C, COUSENS, S, FRASER, H et BOSTOCK, C J. Transmissions to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997, 389 : 498-501.

BRUCE, Moira E. TSE strain variation An investigation into prion disease diversity. *British Medical Bulletin*. 2003, 66 : 99-108.

BUDKA, H. Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Archives of virology. Supplementum*. 2000, 135-142.

BÜELER, H, AGUZZI, A, SAILER, A, GREINER, R A, AUTENRIED, P, AGUET, M et WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993, 73 : 1339-1347.

BURTHEM, John et ROBERTS, David J. The pathophysiology of variant Creutzfeldt-Jacob disease: the hypotheses behind concerns for blood components and products. *British journal of haematology*. 2003, 122 : 3-9.

BUYUKMIHCI, N., MARSH, R. F., ALBERT, D. M. et ZELINSKI, K. Ocular effects of scrapie agent in hamsters: preliminary observations. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1977, 16 : 319-324.

BUYUKMIHCI, Ned, RORVIK, Marie et MARSH, Richard F. Replication of the scrapie agent in ocular neural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980, 77 : 1169-1171.

BUYUKMIHCI, N, GOEHRING-HARMON, F et MARSH, R F. Retinal degeneration during clinical scrapie encephalopathy in hamsters. *The Journal of comparative neurology*. 1982, 205 : 153-160.

BUYUKMIHCI, N, GOEHRING-HARMON, F et MARSH, R F. Asymmetry of retinal lesions in experimental scrapie after intracerebral inoculation of hamsters. 1985a, 87 : 172-176.

BUYUKMIHCI, N, GOEHRING-HARMON, F et MARSH, R F. Retinal degeneration in experimental scrapie after intraperitoneal or subcutaneous inoculation of hamsters. *Experimental neurology*. 1985b, 88 : 461-466.

BUYUKMIHCI, N C, GOEHRING-HARMON, F et MARSH, R F. Photoreceptor degeneration in experimental transmissible mink encephalopathy of hamsters. *Experimental neurology*. 1987a, 96 : 727-731.

BUYUKMIHCI, N C, GOEHRING-HARMON, F et MARSH, R F. Photoreceptor degeneration during infection with various strains of the scrapie agent in hamsters. *Experimental neurology*. 1987b, 97 : 201-206.

CHECHLACZ, Magdalena et HUMPHREYS, Glyn W. The enigma of Bálint's syndrome: neural substrates and cognitive deficits. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014. 8.

CHIARINI, Luciana B, FREITAS, Adriana R O, ZANATA, Silvio M, BRENTANI, Ricardo R, MARTINS, Vilma R et LINDEN, Rafael. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO journal*. 2002, 21 : 3317-3326.

CHIESA, Roberto, PICCARDO, Pedro, DOSSENA, Sara, NOWOSLAWSKI, Lisa, ROTH, Kevin A., GHETTI, Bernardino et HARRIS, David A. Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102 : 238-243.

CLOUSCARD, C., BEAUDRY, P., ELSÉN, J. M., MILAN, D., DUSSAUCY, M., BOUNNEAU, C., SCHELCHER, F., CHATELAIN, J., LAUNAY, J. M. et LAPLANCHE, J. L. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 1995. 76, 2097-2101.

COLBY, D. W. et PRUSINER, S. B. Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011.

COLLINGE, J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annual review of neuroscience*. 2001, 24 : 519-550.

COLLINGE, J, SIDLE, K C, MEADS, J, IRONSIDE, J et HILL, A F. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. *Nature*. 1996, 383 : 685-690.

COLLINS, S, MCLEAN, C A et MASTERS, C L. Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2001, 8 : 387-397.

COMOY, E, BONNEVALLE, C, MÉTAIS, A, AUVRÉ, F, LETESSIER, F, LAMOURY, F, SPITTLER, J, DORMONT, D et DESLYS, J-P. Disinfection of gas-permeable contact lenses against prions. *Journal français d'ophtalmologie*. 2003, 26 : 233-239.

CURTIS, R, FRASER, H, FOSTER, J D et SCOTT, J R. The correlation of electroretinographic and histopathological findings in the eyes of mice infected with the 79A strain of scrapie. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1989, 15 : 75-89.

DAVANIPOUR, Z, ALTER, M, SOBEL, E, ASHER, D et GAJDUSEK, D C. Creutzfeldt-Jakob disease: possible medical risk factors. *Neurology*. 1985, 35 : 1483-1486.

DE SEZE, J, HACHE, J C, VERMERSCH, P, ARNDT, C F, MAURAGE, C A, PASQUIER, F, LAPLANCHE, J L, RUCHOUX, M M, LEYS, D, DESTÉE, A et PETIT, H. Creutzfeldt-Jakob disease: neurophysiologic visual impairments. *Neurology*. 1998, 51 : 962-967.

DELEAULT, Nathan R, LUCASSEN, Ralf W et SUPATTAPONE, Surachai. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. 2003, 425 : 717-720.

DESLYS, J P, COMOY, E, HAWKINS, S, SIMON, S, SCHIMMEL, H, WELLS, G, GRASSI, J et MOYNAGH, J. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*. 2001, 409 : 476-478.

DICKINSON, A G, FRASER, H, MEIKLE, V M et OUTRAM, G W. Competition between different scrapie agents in mice. *Nature: New biology*. 1972, 237 : 244-245.

DOHERR, Marcus G. Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine*. 2007, 25 : 5619-5624.

DOUET, Jean Yves, ZAFAR, Saima, PERRET-LIAUDET, Armand, LACROUX, Caroline, LUGAN, Séverine, ARON, Naima, CASSARD, Herve, PONTO, Claudia, CORBIÈRE, Fabien, TORRES, Juan Maria, ZERR, Inga et ANDREOLETTI, Olivier. Detection of Infectivity in Blood of Persons with Variant and Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, 20 : 114-117.

DOWLING, J. Current and future prospects for optoelectronic retinal prostheses. *Eye*. 2009, 23 : 1999-2005.

DUFFY, P, WOLF, J, COLLINS, G, DEVOE, A G, STREETEN, B et COWEN, D. Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *The New England journal of medicine*. 1974, 290 : 692-693.

EIDEN, M., HOFFMANN, C., BALKEMA-BUSCHMANN, A., MULLER, M., BAUMGARTNER, K. et GROSCHUP, M. H. Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *Journal of General Virology*. 2010, 91 : 2874-2883.

ELOIT, Marc, ADJOU, Karim, COULPIER, Muriel, FONTAINE, Jean Jacques, HAMEL, Rodolphe, LILIN, Thomas, MESSIAEN, Sebastien, ANDREOLETTI, Olivier, BARON, Thierry, BENCSEK, Anna, BIACABE, Anne Gaele, BERINGUE, Vincent, LAUDE, Hubert, LE DUR, Annick, VILOTTE, Jean Luc, COMOY, Emmanuel, DESLYS, Jean Philippe, GRASSI, Jacques, SIMON, Stephanie, LANTIER, Frederic et SARRADIN, Pierre. BSE agent signatures in a goat. *The Veterinary record*. 2005, 156 : 523-524.

ELSEN, J M, AMIGUES, Y, SCHELCHER, F, DUCROCQ, V, ANDREOLETTI, O, EYCHENNE, F, KHANG, J V, POIVEY, J P, LANTIER, F et LAPLANCHE, J L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of virology*. 1999, 144 : 431-445.

ENARI, M, FLECHSIG, E et WEISSMANN, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001, 98 : 9295-9299.

ETTAICHE, M. In Vivo Cytotoxicity of the Prion Protein Fragment 106-126. *Journal of Bio-*

logical Chemistry. 2000, 275 : 36487-36490.

FEDIAEVSKY, Alexandre, CALAVAS, Didier, GASQUI, Patrick, MOAZAMI-GOUDARZI, Katayoun, LAURENT, Pascal, ARSAC, Jean-Noël, DUCROT, Christian et MORENO, Carole. Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie. 2010,

FORLONI, Gianluigi, SALMONA, Mario, MARCON, Gabriella et TAGLIAVINI, Fabrizio. Tetracyclines and prion infectivity. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*. 2009, 9 : 23-30.

FOSTER, J, FARQUHAR, C, FRASER, J et SOMERVILLE, R. Immunolocalization of the prion protein in scrapie affected rodent retinas. *Neuroscience letters*. 1999, 260 : 1-4.

FOSTER, J, TOOVEY, L, MCKENZIE, C, CHONG, A, PARNHAM, D, DRUMMOND, D et HUNTER, N. Atypical scrapie in a sheep in a closed UK flock with endemic classical natural scrapie. *The Veterinary record*. 2008, 162 : 723-724.

FOSTER, J D, FRASER, H et BRUCE, M E. Retinopathy in mice with experimental scrapie. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1986, 12 : 185-196.

FOSTER, J D, PARNHAM, D, CHONG, A, GOLDMANN, W et HUNTER, N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *The Veterinary record*. 2001, 148 : 165-171.

FOSTER, J. D., PARNHAM, D. W., HUNTER, N. et BRUCE, M. Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *Journal of General Virology*. 2001, 82 : 2319-2326.

FOSTER, James, FARQUHAR, Christine, FRASER, Janet et SOMERVILLE, Robert. Immunolocalization of the prion protein in scrapie affected rodent retinas. *Neuroscience letters*. 1999, 260 : 1-4.

FRASER, H et DICKINSON, A G. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *Journal of comparative pathology*. 1973, 83 : 29-40.

FRASER, H. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*. 1982, 295 : 149-150.

FRASER, H et DICKINSON, A G. Targeting of scrapie lesions and spread of agent via the retino-tectal projection. *Brain research*. 1985, 346 : 32-41.

FRASER, H. Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *British medical bulletin*. 1993, 49, 792-809.

FRASER, J R. What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? *Neuropathology and applied neurobiology*. 2002, 28 : 1-11.

GARCIA, M. et VECINO, E. Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the

retina.

GAVIER-WIDEN, D., STACK, M. J., BARON, T., BALACHANDRAN, A. et SIMMONS, M. Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in Animals: A Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005, 17 : 509-527.

GIBBS, C J, Jr, ASHER, D M, KOBRINE, A, AMYX, H L, SULIMA, M P et GAJDUSEK, D C. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1994, 57 : 757-758.

GNANAJOTHY, Rosana, UMASHANKER, Devika, VEGA, Maria C Franco et WU, Barry J. A case of Creutzfeldt-Jakob disease following cataract surgery: sporadic versus iatrogenic cause. *Connecticut medicine*. 2013, 77 : 335-337.

GOLDMANN, Wilfred, HUNTER, Nora, SMITH, Grace, FOSTER, James et HOPE, James. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *Journal of General Virology*. 1994, 75 : 989-996.

GONG, Jie, JELLALI, Abdeljelil, FORSTER, Valérie, MUTTERER, Jérôme, DUBUS, Elisabeth, ALTROCK, Wilko D., SAHEL, José A., RENDON, Alvaro et PICAUD, Serge. The Toxicity of the PrP106-126 Prion Peptide on Cultured Photoreceptors Correlates with the Prion Protein Distribution in the Mammalian and Human Retina. *The American Journal of Pathology*. 2007, 170 : 1314-1324.

GONZÁLEZ, Lorenzo. High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of *PRNP* genotype and age. *Veterinary Research*. 2009, 40 : 65.

GONZALEZ-ROMERO, Dennisse, BARRIA, Marcelo A., LEON, Patricia, MORALES, Rodrigo et SOTO, Claudio. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Letters*. 2008, 582 : 3161-3166.

GOUGH, Kevin C. et MADDISON, Ben C. Prion transmission: Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*. 2010, 4 : 275-282.

GOURAS, Peter. Symposium on Electrophysiology: Electroretinography: Some Basic Principles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1970, 9 : 557-569.

GRAHAM, James F., KURIAN, Dominic, AGARWAL, Sonya, TOOVEY, Lorna, HUNT, Lawrence, KIRBY, Louise, PINHEIRO, Teresa J. T., BANNER, Steven J. et GILL, Andrew C. Na⁺/K⁺-ATPase Is Present in Scrapie-Associated Fibrils, Modulates PrP Misfolding In Vitro and Links PrP Function and Dysfunction. 2011, 6 : e26813.

GRANT, M P, COHEN, M, PETERSEN, R B, HALMAGYI, G M, MCDOUGALL, A, TUSA, R J et LEIGH, R J. Abnormal eye movements in Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of neurology*. 1993, 34 : 192-197.

GREENLEE, J. J., HAMIR, A. N. et GREENLEE, M. H. W. Abnormal Prion Accumulation Associated with Retinal Pathology in Experimentally Inoculated Scrapie-Affected Sheep. *Veterinary Pathology*. 2006, 43 : 733-739.

GREENLEE, Justin J., SMITH, Jodi D., WEST GREENLEE, M. Heather et NICHOLSON, Eric M. Clinical and Pathologic Features of H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy Associated with E211K Prion Protein Polymorphism. 2012, 7, e38678.

GREFERATH, U, GRÜNERT, U et WÄSSLE, H. Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *The Journal of comparative neurology*. 1990, 301 : 433-442.

GREGORI, Luisa, KOVACS, Gabor G., ALEXEEVA, Irina, BUDKA, Herbert et ROHWER, Robert G. Excretion of Transmissible Spongiform Encephalopathy Infectivity in Urine. *Emerging Infectious Diseases*. 2008, 14 : 1406-1412.

GRIFFITH, J S. Self-replication and scrapie. *Nature*. 1967, 215 : 1043-1044.

GROSCHUP, M H, BEEKES, M, MCBRIDE, P A, HARDT, M, HAINFELLNER, J A et BUDKA, H. Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta neuropathologica*. 1999, 98 : 453-457.

GROSCHUP, Martin H., LACROUX, Caroline, BUSCHMANN, Anne, LÜHKEN, Gesine, MATHEY, Jacinthe, EIDEN, Martin, LUGAN, Séverine, HOFFMANN, Christine, ESPINOSA, Juan Carlos et BARON, Thierry. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging infectious diseases*. 2007, 13 : 1201.

HADLOW, W J et EKLUND, C M. Scrapie--a virus-induced chronic encephalopathy of sheep. *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*. 1968, 44 : 281-306.

HAÏK, Stéphane, MARCON, Gabriella, MALLET, Alain, TETTAMANTI, Mauro, WELARATNE, Arlette, GIACCONE, Giorgio, AZIMI, Shohreh, PIETRINI, Vladimiro, FABREGUETTES, Jean-Roch, IMPERIALE, Daniele, CESARO, Pierre, BUFFA, Carlo, AUCAN, Christophe, LUCCA, Ugo, PECKEU, Laurène, SUARDI, Silvia, TRANCHANT, Christine, ZERR, Inga, HOUILLIER, Caroline, REDAELLI, Veronica, VESPIGNANI, Hervé, CAMPANELLA, Angela, SELLAL, François, KRASNIANSKI, Anna, SEILHEAN, Danielle, HEINEMANN, Uta, SEDEL, Frédéric, CANOVI, Mara, GOBBI, Marco, DI FEDE, Giuseppe, LAPLANCHE, Jean-Louis, POCCHIARI, Maurizio, SALMONA, Mario, FORLONI, Gianluigi, BRANDEL, Jean-Philippe et TAGLIAVINI, Fabrizio. Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet neurology*. 2014, 13 : 150-158.

HAKONEN, Pertti J. et SILLANPÄÄ, Mika A. Condensed-matter physics: Coupled vibrations. *Nature*. 2009, 459 : 923-924.

HALEY, N. J., MATHIASON, C. K., CARVER, S., ZABEL, M., TELLING, G. C. et HOOVER, E. A. Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Salivary, Urinary, and Intestinal Tissues of Deer: Potential Mechanisms of Prion Shedding and Transmission. *Journal of Virology*. 2011, 85 : 6309-6318.

HAMIR, A. N., MILLER, J. M., CUTLIP, R. C., KUNKLE, R. A., JENNY, A. L., STACK, M. J., CHAPLIN, M. J. et RICHT, J. A. Transmission of Sheep Scrapie to Elk (*Cervus Elaphus Nelsoni*) by Intracerebral Inoculation: Final Outcome of the Experiment. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2004. 16, 316-321.

HAMIR, A. N., KUNKLE, R. A., MILLER, J. M. et RICHT, J. A. Second Passage of Sheep Scrapie and Transmissible Mink Encephalopathy (TME) Agents in Raccoons (*Procyon lotor*). *Veterinary Pathology*. 2005. 42, 844-851.

HAMIR, A. N., KUNKLE, R. A., RICHT, J. A., MILLER, J. M., CUTLIP, R. C. et JENNY, A. L. Experimental Transmission of Sheep Scrapie by Intracerebral and Oral Routes to Genetically Susceptible Suffolk Sheep in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2005. 17, 3-9.

HAMIR, A. N., KUNKLE, R. A., MILLER, J. M., BARTZ, J. C. et RICHT, J. A. First and Second Cattle Passage of Transmissible Mink Encephalopathy by Intracerebral Inoculation. *Veterinary Pathology*. 2006, 43 : 118-126.

HAMIR, A. N., RICHT, J. A., MILLER, J. M., KUNKLE, R. A., HALL, S. M., NICHOLSON, E. M., O'ROURKE, K. I., GREENLEE, J. J. et WILLIAMS, E. S. Experimental Transmission of Chronic Wasting Disease (CWD) of Elk (*Cervus elaphus nelsoni*), White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*), and Mule Deer (*Odocoileus hemionus hemionus*) to White-tailed Deer by Intracerebral Route. *Veterinary Pathology*. 2008. 45, 297-306.

HAMIR, A. N., KEHRLI, M. E., KUNKLE, R. A., GREENLEE, J. J., NICHOLSON, E. M., RICHT, J. A., MILLER, J. M. et CUTLIP, R. C. Experimental interspecies transmission studies of the transmissible spongiform encephalopathies to cattle: comparison to bovine spongiform encephalopathy in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011, 23 : 407-420.

HAMMERSMITH, Kristin M, COHEN, Elisabeth J, RAPUANO, Christopher J et LAIBSON, Peter R. Creutzfeldt-Jakob disease following corneal transplantation. *Cornea*. 2004, 23 : 406-408.

HARDT, M, BARON, T et GROSCHUP, M H. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of comparative pathology*. 2000, 122 : 43-53.

HARRIS, David A, CHIESA, Roberto, DRISALDI, Bettina, QUAGLIO, Elena, MIGHELI, Antonio, PICCARDO, Pedro et GHETTI, Bernardino. A murine model of a familial prion disease. *Clinics in laboratory medicine*. 2003, 23 : 175-186.

HAUTANIEMI, Maria, TAPIOVAARA, Hannele, KORPENFELT, Sirkka-Liisa et SIHVONEN, Liisa. Genotyping and surveillance for scrapie in Finnish sheep. *BMC veterinary research*. 2012, 8 : 122.

HAVERKAMP, S et WÄSSLE, H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*. 2000, 424 : 1-23.

HEAD, M W. Abnormal prion protein in the retina of the most commonly occurring subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *British Journal of Ophthalmology*.

2005, 89 : 1131-1138.

HEAD, M. W. Prion Protein Accumulation in Eyes of Patients with Sporadic and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003, 44 : 342-346.

HEALY, Anne M., WEAVERS, Edwin, MCELROY, Maire, GOMEZ-PARADA, Mercedes, COLLINS, J. Dan, O'DOHERTY, Elaine, SWEENEY, Torres et DOHERTY, Michael L. The Clinical Neurology of Scrapie in Irish Sheep. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003, 17 : 908-916.

HECKMANN, J. G., LANG, C. J. G., PETRUCH, F., DRUSCHKY, A., ERB, C., BROWN, P. et NEUNDÖRFER, B. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1997, 63 : 388-390.

HEGGEBØ, R, PRESS, C M, GUNNES, G, LIE, K I, TRANULIS, M A, ULVUND, M, GROSCHUP, M H et LANDSVERK, T. Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *The Journal of general virology*. 2000, 81 : 2327-2337.

HEPPNER, F L, PRINZ, M et AGUZZI, A. Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells. *Progress in brain research*. 2001, 132 : 737-750.

HERMS, Jochen, TINGS, Tobias, GALL, Stefan, MADLUNG, Axel, GIESE, Armin, SIEBERT, Heike, SCHÜRMAN, Peter, WINDL, Otto, BROSE, Nils et KRETZSCHMAR, Hans. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *The Journal of neuroscience*. 1999, 19 : 8866-8875.

HETZ, Claudio, RUSSELAKIS-CARNEIRO, Milene, MAUNDRELL, Kinsey, CASTILLA, Joaquin et SOTO, Claudio. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *The EMBO journal*. 2003, 22 : 5435-5445.

HILBE, Monika M, SOLDATI, Guido G, ZLINSZKY, Kati K, WUNDERLIN, Sabina S et EHRENSPERGER, Felix F. Immunohistochemical study of PrPSc distribution in neural and extraneural tissues of two cats with feline spongiform encephalopathy. *BMC Veterinary Research*. 2009, 5 : 11.

HIRANO, Arlene A., BRANDSTÄTTER, Johann H. et BRECHA, Nicholas C. Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*. 2005, 488 : 70-81.

HOGAN, R N, BARINGER, J R et PRUSINER, S B. Progressive retinal degeneration in scrapie-infected hamsters: a light and electron microscopic analysis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1981, 44 : 34-42.

HOGAN, R N, BOWMAN, K A, BARINGER, J R et PRUSINER, S B. Replication of scrapie prions in hamster eyes precedes retinal degeneration. *Ophthalmic research*. 1986, 18 : 230-235.

HOGAN, R N et CAVANAGH, H D. Transplantation of corneal tissue from donors with diseases of the central nervous system. *Cornea*. 1995, 14 : 547-553.

- HOGAN, R. Nick. Potential for transmission of prion disease by contact lenses: an assessment of risk. *Eye & contact lens*. 2003, 29 : S44–S48.
- HORTELLS, P, MONZÓN, Marta, MONLEÓN, Eva, ACÍN, Cristina, VARGAS, Antonia, BOLEA, Rosa, LUJÁN, Lluís et BADIOLA, Juan José. Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep. *Brain Research*. 2006, 1108 : 188–194.
- HOUSTON, F., MCCUTCHEON, S., GOLDMANN, W., CHONG, A., FOSTER, J., SISO, S., GONZALEZ, L., JEFFREY, M. et HUNTER, N. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*. 2008, 112 : 4739–4745.
- HUANG, Fang-Ping, FARQUHAR, Christine F, MABBOTT, Neil A, BRUCE, Moira E et MACPHERSON, G Gordon. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *The Journal of general virology*. 2002, 83 : 267–271.
- HUBER, Reto, DEBOER, Tom et TOBLER, Irene. Prion protein: a role in sleep regulation? *Journal of sleep research*. 1999, 8 : 30–36.
- HUNTER, N, FOSTER, J D, GOLDMANN, W, STEAR, M J, HOPE, J et BOSTOCK, C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of virology*. 1996, 141 : 809–824.
- HUNTER, N, MOORE, L, HOSIE, B D, DINGWALL, W S et GREIG, A. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *The Veterinary record*. 1997, 140 : 59–63.
- HUNTER, Nora. Scrapie and experimental BSE in sheep. *British medical bulletin*. 2003, 66 : 171–183.
- IULINI, B., CANTILE, C., MANDARA, M. T., MAURELLA, C., LORIA, G. R., CASTAGNARO, M., SALVADORI, C., PORCARIO, C., CORONA, C., PERAZZINI, A. Z., MARONI, A., CARAMELLI, M. et CASALONE, C. Neuropathology of Italian Cats in Feline Spongiform Encephalopathy Surveillance. *Veterinary Pathology*. 2008, 45 : 626–633.
- JAMES, Thomas L., LIU, He, ULYANOV, Nikolai B., FARR-JONES, Shauna, ZHANG, Hong, DONNE, David G., KANEKO, Kiyotoshi, GROTH, Darlene, MEHLHORN, Ingrid et PRUSINER, Stanley B. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, 94 : 10086–10091.
- JEFFREY, M et GONZÁLEZ, L. Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Current topics in microbiology and immunology*. 2004, 284 : 65–97.
- JEFFREY, M., MARTIN, S., THOMSON, J.R., DINGWALL, W.S., BEGARA-MCGORUM, I. et GONZÁLEZ, L. Onset and Distribution of Tissue PrP Accumulation in Scrapie-affected Suffolk Sheep as Demonstrated by Sequential Necropsies and Tonsillar Biopsies. *Journal of Comparative Pathology*. 2001, 125 : 48–57.
- JOHN, Theodore R., SCHÄTZL, Hermann M. et GILCH, Sabine. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion*. 2013, 7 : 253–258.

JOHNSON, Juliette, TIAN, Ning, CAYWOOD, Matthew S., REIMER, Richard J., EDWARDS, Robert H. et COPENHAGEN, David R. Vesicular neurotransmitter transporter expression in developing postnatal rodent retina: GABA and glycine precede glutamate. *The Journal of neuroscience*. 2003, 23 : 518–529.

KATZ, B J, WARNER, J E, DIGRE, K B et CREEL, D J. Selective loss of the electroretinogram B-wave in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 2000, 20 : 116–118.

KAWASAKI, Y., KAWAGOE, K., CHEN, C.-j., TERUYA, K., SAKASEGAWA, Y. et DOH-URA K. Orally Administered Amyloidophilic Compound Is Effective in Prolonging the Incubation Periods of Animals Cerebrally Infected with Prion Diseases in a Prion Strain-Dependent Manner. *Journal of Virology*. 2007. 81, 12889–12898.

KEANE, D. P., BARR, D. J., BOCHSLER, P. N., HALL, S. M., GIDLEWSKI, T., O'ROURKE, K. I., SPRAKER, T. R. et SAMUEL, M. D. Chronic Wasting Disease in a Wisconsin White-Tailed Deer Farm. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008, 20 : 698–703.

KENNEDY, C J, RAKOCZY, P E et CONSTABLE, I J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (London, England)*. 1995, 9 (Pt 6) : 763–771.

KERCHER, L., FAVARA, C., STRIEBEL, J. F., LACASSE, R. et CHESEBRO, B. Prion Protein Expression Differences in Microglia and Astroglia Influence Scrapie-Induced Neurodegeneration in the Retina and Brain of Transgenic Mice. *Journal of Virology*. 2007. 81, 10340–10351.

KERCHER, Lisa, FAVARA, Cynthia, CHAN, Chi-Chao, RACE, Richard et CHESEBRO, Bruce. Differences in scrapie-induced pathology of the retina and brain in transgenic mice that express hamster prion protein in neurons, astrocytes, or multiple cell types. *The American journal of pathology*. 2004, 165 : 2055–2067.

KIMBERLIN, Richard H. et WALKER, Carol A. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *Journal of General Virology*. 1986. 67, 255–263.

KNAUS, K J, MORILLAS, M, SWIETNICKI, W, MALONE, M, SUREWICZ, W K et YEE, V C. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nature structural biology*. 2001, 8 : 770–774.

KOCH, T K, BERG, B O, DE ARMOND, S J et GRAVINA, R F. Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. *The New England journal of medicine*. 1985, 313 : 731–733.

KONOLD, T, BONE, G, RYDER, S, HAWKINS, S A C, COURTIN, F et BERTHELIN-BAKER, C. Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *The Veterinary record*. 2004, 155 : 659–666.

KOVACS, Gabor G. et BUDKA, Herbert. Prion Diseases: From Protein to Cell Pathology.

The American Journal of Pathology. 2008, 172 : 555-565.

KOZLOWSKI, P B, MORETZ, R C, CARP, R I et WISNIEWSKI, H M. Retinal damage in scrapie mice. *Acta neuropathologica*. 1982, 56 : 9-12.

LANG, C J, HECKMANN, J G et NEUNDÖRFER, B. Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. *Journal of the neurological sciences*. 1998, 160 : 128-139.

LAPLANCHE, J L, CHATELAIN, J, WESTAWAY, D, THOMAS, S, DUSSAUCY, M, BRUGERE-PICOUX, J et LAUNAY, J M. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*. 1993, 15 : 30-37.

LASMÉZAS, Corinne Ida, COMOY, Emmanuel, HAWKINS, Stephen, HERZOG, Christian, MOUTHON, Franck, KONOLD, Timm, AUVRÉ, Frédéric, CORREIA, Evelyne, LESCOU-TRA-ETCHEGARAY, Nathalie, SALÈS, Nicole, WELLS, Gerald, BROWN, Paul et DESLYS, Jean-Philippe. Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet*. 2005, 365 : 781-783.

LESSER, R L, ALBERT, D M, BOBOWICK, A R et O'BRIEN, F H. Creutzfeldt-Jakob disease and optic atrophy. *American journal of ophthalmology*. 1979, 87 : 317-321.

LEZMI, S. PET-blot Analysis Contributes to BSE Strain Recognition in C57Bl/6 Mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2006, 54 : 1087-1094.

LEZMI, Stephane, BENCSIK, Anna, MONKS, Eoin, PETIT, Thierry et BARON, Thierry. First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP^{Sc} analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochemistry and cell biology*. 2003, 119 : 415-422.

LEZMI, Stéphane, RONZON, Frédéric, BENCSIK, Anna, BEDIN, Alexandre, CALAVAS, Didier, RICHARD, Yves, SIMON, Stéphanie, GRASSI, Jacques et BARON, Thierry. PrP^d accumulation in organs of ARQ/ARQ sheep experimentally infected with BSE by peripheral routes. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*. 2006, 53 : 399.

LIBERSKI, Pawel P, SIKORSKA, Beata, BRATOSIEWICZ-WASIK, Jolanta, GAJDUSEK, D Carleton et BROWN, Paul. Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004, 36 : 2473-2490.

LIGIOS, Ciriaco, CANCEDDA, Giovanna Maria, MARGALITH, Ilan, SANTUCCIU, Cinzia, MADAU, Laura, MAESTRALE, Caterina, BASAGNI, Massimo, SABA, Mariangela et HEIKENWALDER, Mathias. Intraepithelial and Interstitial Deposition of Pathological Prion Protein in Kidneys of Scrapie-Affected Sheep. *PLoS ONE*. 2007, 2 : e859.

LIU, He, FARR-JONES, Shauna, ULYANOV, Nikolai B., LLINAS, Manuel, MARQUSEE, Susan, GROTH, Darlene, COHEN, Fred E., PRUSINER, Stanley B. et JAMES, Thomas L. Solution Structure of Syrian Hamster Prion Protein rPrP(90-231)[†]. *Biochemistry*. 1999, 38 : 5362-5377.

LÜHRS, Thorsten, ZAHN, Ralph et WÜTHRICH, Kurt. Amyloid formation by recombinant full-length prion proteins in phospholipid bicelle solutions. *Journal of molecular biology*. 2006, 357 : 833-841.

- MABBOTT, Neil et TURNER, Marc. Prions and the blood and immune systems. *haematologica*. 2005, 90 : 542–548.
- MANUELIDIS, E E, ANGELO, J N, GORGACZ, E J, KIM, J H et MANUELIDIS, L. Experimental creutzfeldt-jakob disease transmitted via the eye with infected cornea. *The New England journal of medicine*. 1977, 296 : 1334–1336.
- MARELLA, M. Neurons and Astrocytes Respond to Prion Infection by Inducing Microglia Recruitment. *Journal of Neuroscience*. 2004, 24 : 620–627.
- MARSH, R F et HANSON, R P. Transmissible mink encephalopathy: infectivity of corneal epithelium. *Science (New York, N.Y.)*. 1975, 187 : 656.
- MASTERS, Colin L., HARRIS, Jonathan O., GAJDUSEK, D. Carleton, GIBBS, Clarence J., BERNOULLI, Christoph et ASHER, David M. Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Annals of neurology*. 1979, 5 : 177–188.
- MCBRIDE, P A et BEEKES, M. Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neuroscience letters*. 1999, 265 : 135–138.
- MERZ, P A, SOMERVILLE, R A, WISNIEWSKI, H M, MANUELIDIS, L et MANUELIDIS, E E. Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*. 1983, 306 : 474–476.
- MOLÉCULAIRES, Domaine de Vilvert. P. SARRADIN', H. LAUDE. *Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles animales*. 2004, 13.
- MOORE, Richard C., LEE, Inyoul Y., SILVERMAN, Gregory L., HARRISON, Paul M., STROME, Robert, HEINRICH, Cornelia, KARUNARATNE, Amila, PASTERNAK, Stephen H., CHISHTI, M. Azhar et LIANG, Yan. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of molecular biology*. 1999, 292 : 797–817.
- MOREL, Nathalie, SIMON, Stéphanie, FROBERT, Yveline, VOLLAND, Hervé, MOURTON-GILLES, Chantal, NEGRO, Alessandro, SORGATO, Maria Catia, CRÉMINON, Christophe et GRASSI, Jacques. Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by nonspecific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *The Journal of biological chemistry*. 2004, 279 : 30143–30149.
- MORGANS, Catherine W., BRANDSTÄTTER, Johann H., KELLERMAN, Joseph, BETZ, Heinrich et WÄSSLE, Heinz. A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina. *The Journal of neuroscience*. 1996, 16 : 6713–6721.
- NASLAVSKY, N, STEIN, R, YANAI, A, FRIEDLANDER, G et TARABOULOS, A. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *The Journal of biological chemistry*. 1997, 272 : 6324–6331.
- NEWMAN, Eric A. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia*. 2004, 47 : 268–274.

NOBLE, Wendy, GARWOOD, Claire J. et HANGER, Diane P. Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterised by protein misfolding. *Prion*. 2009, 3: 78–83.

NOTARI, Silvio, CAPELLARI, Sabina, GIESE, Armin, WESTNER, Ingo, BARUZZI, Agostino, GHETTI, Bernardino, GAMBETTI, Pierluigi, KRETZSCHMAR, Hans A et PARCHI, Piero. Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *The Journal of biological chemistry*. 2004, 279 : 16797–16804.

O’ROURKE, Katherine I., BASZLER, Timothy V., MILLER, Janice M., SPRAKER, Terry R., SADLER-RIGGLEMAN, Ingrid et KNOWLES, Donald P. Monoclonal antibody F89/160.1. 5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, 36 : 1750–1755.

OESCH, B, WESTAWAY, D, WÄLCHLI, M, MCKINLEY, M P, KENT, S B, AEBERSOLD, R, BARRY, R A, TEMPST, P, TEPLOW, D B et HOOD, L E. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 1985, 40 : 735–746.

OFRI, R. Retina, *SLATTER’S FUNDAMENTALS OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY, EDITION 4*. 2008, 285-317

OKABE, S, SHIOMURA, Y et HIROKAWA, N. Immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins 1A and 2 in the rat retina. *Brain research*. 1989, 483 : 335–346.

OKADA, Hiroyuki, IWAMARU, Yoshifumi, IMAMURA, Morikazu, MASUJIN, Kentaro, MATSUURA, Yuichi, SHIMIZU, Yoshihisa, KASAI, Kazuo, MOHRI, Shirou, YOKOYAMA, Takashi et CZUB, Stefanie. Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial-and stellate-type prion protein deposits. *Vet Res*. 2011. 42, 79.

OKADA, Hiroyuki, IWAMARU, Yoshifumi, FUKUDA, Shigeo, YOKOYAMA, Takashi et MOHRI, Shirou. Detection of disease-associated prion protein in the optic nerve and the adrenal gland of cattle with bovine spongiform encephalopathy by using highly sensitive immunolabeling procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012. 60, 290–300 O’ROURKE, Katherine I, SPRAKER, Terry R, ZHUANG, Dongyue, GREENLEE, Justin J, GIDLEWSKI, Thomas E et HAMIR, Amir N. Elk with a long incubation prion disease phenotype have a unique PrP^d profile. *Neuroreport*. 2007, 18 : 1935–1938.

P. DE ANDRADE, C., L. DE ALMEIDA, L., A. DE CASTRO, L., DRIEMEIER, D. et C. DA SILVA, S. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for single nucleotide polymorphism genotyping codons 136, 154, and 171 of the prnp gene and application to Brazilian sheep herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012.

PERETZ, D, WILLIAMSON, R A, KANEKO, K, VERGARA, J, LECLERC, E, SCHMITT-ULMS, G, MEHLHORN, I R, LEGNAME, G, WORMALD, M R, RUDD, P M, DWEK, R A, BURTON, D R et PRUSINER, S B. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*. 2001, 412 : 739–743.

PICCARDO, P, CERVENAK, J, YAKOVLEVA, O, GREGORI, L, POMEROY, K, COOK, A, MUHAMMAD, F S, SEUBERLICH, T, CERVENAKOVA, L et ASHER, D M. Squirrel

monkeys (*Saimiri sciureus*) infected with the agent of bovine spongiform encephalopathy develop tau pathology. *Journal of comparative pathology*. 2012, 147 : 84-93.

PLINSTON, C., HART, P., CHONG, A., HUNTER, N., FOSTER, J., PICCARDO, P., MANSON, J. C. et BARRON, R. M. Increased Susceptibility of Human-PrP Transgenic Mice to Bovine Spongiform Encephalopathy Infection following Passage in Sheep. *Journal of Virology*. 2011, 85 : 1174-1181.

PONTE, Maya L. Insights into the management of emerging infections: regulating variant Creutzfeldt-Jakob disease transfusion risk in the UK and the US. *PLoS medicine*. 2006. 3, e342. PRUSINER, S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*. 1982, 216 : 136-144.

PRUSINER, S B, COCHRAN, S P, GROTH, D F, DOWNEY, D E, BOWMAN, K A et MARTINEZ, H M. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Annals of neurology*. 1982, 11 : 53-58.

PRUSINER, S B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, 95 : 13363-13383.

PRUSINER, S B, GROTH, D F, COCHRAN, S P, MASIARZ, F R, MCKINLEY, M P et MARTINEZ, H M. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*. 1980, 19 : 4883-4891.

PUIG, B et FERRER, I. Cell death signaling in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta neuropathologica*. 2001, 102 : 207-215.

PURDEY, M. Does an ultra violet photooxidation of the manganese-loaded/copper-depleted prion protein in the retina initiate the pathogenesis of TSE? *Medical Hypotheses*. 2001, 57 : 29-45.

RAEBER, A J et OESCH, B. Diagnostics for TSE agents. *Developments in biologicals*. 2006, 123 : 313-323;

REGNIER, Alain, ANDREOLETTI, Olivier, ALBARIC, Olivier, GRUSON, Delphine C., SCHELCHER, François et TOUTAIN, Pierre-Louis. Clinical, electroretinographic and histomorphometric evaluation of the retina in sheep with natural scrapie. *BMC veterinary research*. 2011, 7 : 25.

RICHARD, P, RENAULT, F, OSTRÉ, C et AUZOUX-CHEVÉ, M. Neurophysiological follow-up in two children with Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1994, 91 : 100-107.

RIEK, R, HORNEMANN, S, WIDER, G, BILLETER, M, GLOCKSHUBER, R et WÜTHRICH, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*. 1996, 382 : 180-182.

RUSSELAKIS-CARNEIRO, M, BETMOUNI, S et PERRY, V H. Inflammatory response and retinal ganglion cell degeneration following intraocular injection of ME7. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1999, 25 : 196-206.

RUSSELAKIS-CARNEIRO, Milene, HETZ, Claudio, MAUNDRELL, Kinsey et SOTO,

Claudio. Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *The American journal of pathology*. 2004, 165 : 1839–1848.

SAFAR, Jiri G, DEARMOND, Stephen J, KOCIUBA, Katarzyna, DEERING, Camille, DIDORENKO, Svetlana, BOUZAMONDO-BERNSTEIN, Essia, PRUSINER, Stanley B et TREMBLAY, Patrick. Prion clearance in bigenic mice. *The Journal of general virology*. 2005, 86 : 2913–2923.

SALEEM, Fozia, BJORND AHL, Trent C, LADNER, Carol L, PEREZ-PINEIRO, Rolando, AMETAJ, Burim N et WISHART, David S. Lipopolysaccharide induced conversion of recombinant prion protein. *Prion*. 2014, 8.

SHELCHER, F., ANDRÉOLETTI, O., TABOURET, G., LACROUX, C., FOUCRAS, G., EYCHENNE, F., BERTHON, P., SARRADIN, P., LANTIER, F. et ELSEN, J. M. Pathogénèse des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles: apports du modèle ovin. *Productions Animales, Numéro hors série*. 2004, 23–30.

SCHMITZ-VALCKENBERG, Steffen, HOLZ, Frank G, BIRD, Alan C et SPAIDE, Richard F. Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 2008, 28 : 385–409.

SCHNEIDER, D.A., HARRINGTON, R.D., ZHUANG, D., YAN, H., TRUSCOTT, T.C., DASSANAYAKE, R.P. et O'ROURKE, K.I. Disease-associated Prion Protein in Neural and Lymphoid Tissues of Mink (*Mustela vison*) Inoculated with Transmissible Mink Encephalopathy. *Journal of Comparative Pathology*. 2012, 147 : 508–521..

SCHÖNENBRÜCHER, Holger, ADHIKARY, Ramkrishna, MUKHERJEE, Prasun, CASEY, Thomas A, RASMUSSEN, Mark A, MAISTROVICH, Frank D, HAMIR, Amir N, KEHRLI, Marcus E, Jr, RICHT, Jürgen A et PETRICH, Jacob W. Fluorescence-based method, exploiting lipofuscin, for real-time detection of central nervous system tissues on bovine carcasses. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, 56 : 6220–6226.

SCHULZ-SCHAEFFER, Walter J., TSCHÖKE, Stefan, KRANEFUSS, Nina, DRÖSE, Wolfgang, HAUSE-REITNER, Dorothea, GIESE, Armin, GROSCHUP, Martin H. et KRETZSCHMAR, Hans A. The Paraffin-Embedded Tissue Blot Detects PrP^{Sc} Early in the Incubation Time in Prion Diseases. *The American journal of pathology*. 2000, 156 : 51–56.

SCOTT, J R et FRASER, H. Transport and targeting of scrapie infectivity and pathology in the optic nerve projections following intraocular infection. *Progress in clinical and biological research*. 1989, 317 : 645–652.

SCOTT, M R, WILL, R, IRONSIDE, J, NGUYEN, H O, TREMBLAY, P, DEARMOND, S J et PRUSINER, S B. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, 96 : 15137–15142.

SEEGER, Harald, HEIKENWALDER, Mathias, ZELLER, Nicolas, KRANICH, Jan, SCHWARZ, Petra, GASPERT, Ariana, SEIFERT, Burkhardt, MIELE, Gino et AGUZZI, Adriano. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science (New York, N.Y.)*. 2005, 310 : 324–326.

SERBEC, V. C. Monoclonal Antibody against a Peptide of Human Prion Protein Discriminates between Creutzfeldt-Jacob's Disease-affected and Normal Brain Tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 279 : 3694-3698.

SEUBERLICH, Torsten, GSPONER, Michaela, DRÖGEMÜLLER, Cord, POLAK, Miroslaw P, MCCUTCHEON, Sandra, HEIM, Dagmar, OEVERMANN, Anna et ZURBRIGGEN, Andreas. Novel prion protein in BSE-affected cattle, Switzerland. *Emerging infectious diseases*. 2012, 18 : 158-159.

SIGURDSON, Christina J et MILLER, Michael W. Other animal prion diseases. *British medical bulletin*. 2003, 66 : 199-212.

SIGURDSON, Christina J., BARILLAS-MURY, Carolina, MILLER, Michael W., OESCH, Bruno, VAN KEULEN, Lucien JM, LANGEVELD, Jan PM et HOOVER, Edward A. PrPCWD lymphoid cell targets in early and advanced chronic wasting disease of mule deer. *Journal of General Virology*. 2002, 83 : 2617-2628.

SIGURDSON, Christina J., SPRAKER, Terry R., MILLER, Michael W., OESCH, Bruno et HOOVER, Edward A. PrPCWD in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Journal of General Virology*. 2001, 82 : 2327-2334.

SIGURDSON, Christina J., WILLIAMS, Elizabeth S., MILLER, Michael W., SPRAKER, Terry R., O'ROURKE, Katherine I. et HOOVER, Edward A. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). 1999

SINGH, Neena, DAS, Dola, SINGH, Ajay et MOHAN, Maradumane L. Prion protein and metal interaction: physiological and pathological implications. *Current issues in molecular biology*. 2010, 12, 99-107.

SINGH, Neena, SINGH, Ajay, DAS, Dola et MOHAN, Maradumane L. Redox control of prion and disease pathogenesis. *Antioxidants & redox signaling*. 2010, 12 : 1271-1294.

SISÓ, Sílvia, GONZÁLEZ, Lorenzo, JEFFREY, Martin, MARTIN, Stuart, CHIANINI, Francesca et STEELE, Philip. Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. *The Veterinary record*. 2006, 159 : 327-328.

SMITH, J. D., GREENLEE, J. J., HAMIR, A. N., RICHT, J. A. et GREENLEE, M. H.W. Retinal Function and Morphology Are Altered in Cattle Infected with the Prion Disease Transmissible Mink Encephalopathy. *Veterinary Pathology*. 2009, 46 : 810-818.

SMITH, J.D., GREENLEE, J.J., HAMIR, A.N. et WEST GREENLEE, M.H. Retinal Cell Types are Differentially Affected in Sheep with Scrapie. *Journal of Comparative Pathology*. 2008, 138 : 12-22.

SMITH, Jodi D. et GREENLEE, Justin J. Detection of misfolded prion protein in retina samples of sheep and cattle by use of a commercially available enzyme immunoassay. *American journal of veterinary research*. 2014, 75 : 268-272.

SOMERVILLE, R A, BIRKETT, C R, FARQUHAR, C F, HUNTER, N, GOLDMANN, W, DORNAN, J, GROVER, D, HENNION, R M, PERCY, C, FOSTER, J et JEFFREY, M. Im-

munodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *The Journal of general virology*. 1997, 78 (Pt 9) : 2389-2396.

SPRAKER, T. R., O'ROURKE, K. I., BALACHANDRAN, A., ZINK, R. R., CUMMINGS, B. A., MILLER, M. W. et POWERS, B. E. Validation of Monoclonal Antibody F99/97.6.1 for Immunohistochemical Staining of Brain and Tonsil in Mule Deer (*Odocoileus Hemionus*) with Chronic Wasting Disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002, 14 : 3-7.

SPRAKER, T. R., ZINK, R. R., CUMMINGS, B. A., SIGURDSON, C. J., MILLER, M. W. et O'ROURKE, K. I. Distribution of Protease-resistant Prion Protein and Spongiform Encephalopathy in Free-ranging Mule Deer (*Odocoileus hemionus*) with Chronic Wasting Disease. *Veterinary Pathology*. 2002, 39 : 546-556.

SPRAKER, T. R., O'ROURKE, K. I., GIDLEWSKI, T., POWERS, J. G., GREENLEE, J. J. et WILD, M. A. Detection of the Abnormal Isoform of the Prion Protein Associated With Chronic Wasting Disease in the Optic Pathways of the Brain and Retina of Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Veterinary Pathology*. 2010, 47 : 536-546.

STRAIN, G. M., CLAXTON, M. S., PRESCOTT-MATHEWS, J. S. et LAPHAND, D. J. Electroretinogram and visual-evoked potential measurements in sheep. *Canadian journal of veterinary research*. 1991, 55 : 1.

SURGUCHEV, Alexei et SURGUCHOV, Andrei. Conformational diseases: Looking into the eyes. *Brain Research Bulletin*. 2010, 81 : 12-24.

TAGLIAVINI F. Prion therapy: Tetracyclic compounds in animal models and patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Alzheimers Dement* 2008, 4 (suppl): T149-T150.

TERMAN, A et BRUNK, U T. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1998, 106 : 265-276.

THOMZIG, A., SPASSOV, S., FRIEDRICH, M., NAUMANN, D. et BEEKES, M. Discriminating Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy Isolates by Infrared Spectroscopy of Pathological Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279 : 33847-33854.

TORRES, Juan-Maria, ESPINOSA, Juan-Carlos, AGUILAR-CALVO, Patricia, HERVA, María-Eugenia, RELAÑO-GINÉS, Aroa, VILLA-DIAZ, Ana, MORALES, Mónica, PARRA, Beatriz, ALAMILLO, Elia, BRUN, Alejandro, CASTILLA, Joaquín, MOLINA, Susana, HAWKINS, Steve A. C. et ANDREOLETTI, Olivier. Elements Modulating the Prion Species Barrier and Its Passage Consequences. 2014, 9 : e89722.

TREMBLAY, Patrick, MEINER, Zeev, GALOU, Maria, HEINRICH, Cornelia, PETROMILLI, Chris, LISSE, Thomas, CAYETANO, Juliana, TORCHIA, Marilyn, MOBLEY, William et BUJARD, Hermann. Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, 95 : 12580-12585.

TRIVIÑO, A, RAMÍREZ, J M, SALAZAR, J J, RAMÍREZ, A I et GARCÍA-SÁNCHEZ, J. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision research*. 1996, 36 : 2015-2028.

- UNTERBERGER, Ursula, VOIGTLANDER, Till et BUDKA, Herbert. Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuropathologica*. 2005, 109 : 32-48.
- VALDEZ, R. A., ROCK, M. J., ANDERSON, A. K. et O'ROURKE, K. I. Immunohistochemical Detection and Distribution of Prion Protein in a Goat with Natural Scrapie. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2003, 15 : 157-162.
- VARGAS, M E, KUPERSMITH, M J, SAVINO, P J, PETITO, F, FROHMAN, L P et WARREN, F A. Homonymous field defect as the first manifestation of Creutzfeldt-Jakob disease. *American journal of ophthalmology*. 1995, 119 : 497-504.
- WANG, Fei, WANG, Xinhe, YUAN, Chong-Gang et MA, Jiyan. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science (New York, N.Y.)*. 2010, 327 : 1132-1135.
- WELLS, G. A. H. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Journal of General Virology*. 2003, 84 : 1021-1031.
- WESTAWAY, David, DAUDE, Nathalie, WOHLGEMUTH, Serene et HARRISON, Paul. The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Topics in current chemistry*. 2011, 305 : 225-256.
- WESTERGARD, Laura, CHRISTENSEN, Heather M. et HARRIS, David A. The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2007, 1772 : 629-644.
- WHITE, Stephen, HERRMANN-HOESING, Lynn, O'ROURKE, Katherine, WALDRON, Daniel, ROWE, Joan et ALVERSON, Janet. Prion gene (PRNP) haplotype variation in United States goat breeds (*Open Access publication*). *Genetics Selection Evolution*. 2008, 40 : 553-561.
- WIETGREFE, S, ZUPANCIC, M, HAASE, A, CHESEBRO, B, RACE, R, FREY, W, 2nd, RUSTAN, T et FRIEDMAN, R L. Cloning of a gene whose expression is increased in scrapie and in senile plaques in human brain. *Science (New York, N.Y.)*. 1985, 230 : 1177-1179.
- WILLIAMS, E S et YOUNG, S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of wildlife diseases*. 1980, 16 : 89-98.
- WILLIAMS, E S et YOUNG, S. Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *Journal of wildlife diseases*. 1982, 18 : 465-471.
- WILLIAMS, Sarah K. Neuroprotective Effects of the Cellular Prion Protein in Autoimmune Optic Neuritis. *The American Journal of Pathology*. 2011, 178 : 2823-2831.
- WONG, C, XIONG, L W, HORIUCHI, M, RAYMOND, L, WEHRLY, K, CHESEBRO, B et CAUGHEY, B. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *The EMBO journal*. 2001, 20 : 377-386.
- YOKOTA, T, TSUCHIYA, K, YAMANE, M, HAYASHI, M, TANABE, H et TSUKAGOSHI, H. Geotropic ocular deviation with skew and absence of saccade in Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of the neurological sciences*. 1991, 106, 175-178.

Résumé :

Les prions, agents transmissibles non conventionnels provoquent des maladies neurodégénératives contagieuses mortelles. Après une dissémination entre et dans les cellules gliales du nerf optique, les conformères anormaux de la protéine prion, les PrPsc, qui sont les principes infectieux de ces encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), atteignent la rétine, véritable extension du système nerveux central. Possédant une organisation anatomique simple qui en fait un tissu de choix pour l'étude des maladies à prions, la rétine concentre les répercussions oculaires de ces maladies. Les lésions rétinienne varient selon les modèles animaux, les souches de prions et le génotype de l'hôte envisagés. Chez les ruminants, la dégénérescence rétinienne n'est pas systématique, contrairement à l'accumulation de PrPsc dans les couches synaptiques de la neuro-rétine. Cette accumulation semble être couplée à une atteinte sélective des cellules bipolaires associées aux bâtonnets.

Abstract :

Prions are non conventional transmissible agents, causing fatal neurodegenerative diseases. After a centrifugal spread within or between glial cells of the optic nerve, the infectious principles of these transmissible spongiform encephalopathies which are abnormal prion protein conformers, referred to as PrPsc, reach the retina, that represents an extension of the central nervous system. Retina is an interesting tissue for studying prions diseases due to its simple anatomical organization and as it focuses eye involvement. Retinal lesions depend on animal model, prion strain and host genotype. In ruminants, retinal degeneration does not develop systematically, while PrPsc accumulation always occurs in synaptic layers of the neuroretina and seems more specifically linked with selective impairment of rod associated bipolar cells.

Mots-clés :

Maladies à prions, PrPsc, ruminants, animaux de laboratoire, rétine, rétinopathies