

TREMBLANTE CAPRINE
*EVALUATION DES PERFORMANCES DES OUTILS
DIAGNOSTIQUES ET CARACTERISATION DE L'INFLUENCE
DES POLYMORPHISMES DU GENE PRP SUR LA
SENSIBILITE A LA MALADIE*

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

Christine, Germaine, Geneviève DAMAY
Née le 01 janvier 1981 à AMIENS

Directeur de thèse : M. le Professeur François SCHELCHER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. François SCHELCHER
Melle Caroline LACROUX

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M. M. M.	G. VAN HAVERBEKE J. FERNEY P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M. M. M. M. M. M. M. M. Mme M. M. M.	L. FALIU C. LABIE C. PAVAU F. LESCURE A. RICO D. GRIESS A. CAZIEUX V. BURGAT J. CHANTAL J.-F. GUELF M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *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 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

INGÉNIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du bétail*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. **NOUVEL Laurent-Xavier**, *Pathologie de la reproduction*
M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VOLMER Romain**, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*

A notre Jury de thèse,

A Monsieur le professeur Jacques IZOPET

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de thèse

Hommages respectueux

A Monsieur le professeur François SCHELCHER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie du bétail

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse

Sincère reconnaissance

A Mademoiselle le docteur Caroline LACROUX

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie pathologie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre Jury de thèse

Sincères remerciements

A Monsieur le docteur Olivier ANDREOLETTI

Ingénieur de recherche INRA

UMR INRA ENVT 12-25

Interaction Hôte Agent Pathogène

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce sujet et nous a suivi tout au long de ce travail

Sincères remerciements

A Monsieur le docteur Fabien CORBIERE

Assistant d'enseignement et de recherche contractuel à l'Ecole Nationale

Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui a contribué à ce projet

Sincère reconnaissance

A toutes les personnes de l'AFSSA Niort qui ont contribué au volet expérimental.

A ma famille et mes amis qui sont toujours là pour moi.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	6
TABLES DES ABREVIATIONS.....	9
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	12
I. CARACTERISTIQUES DES EST	15
A. CARACTERES CLINIQUES.....	15
B. CARACTERES LESIONNELS.....	15
1. Lésions macroscopiques.....	15
2. Lésions microscopiques.....	15
C. TRANSMISSIBILITE ET TITRE INFECTIEUX.....	16
II. DIVERSITE BIOLOGIQUE DES AGENTS DES EST	17
A. NOTION DE SOUCHES.....	17
B. DUREE D'INCUBATION.....	18
C. PROFILS LESIONNELS.....	18
D. NOTION DE BARRIERE D'ESPECE.....	19
III. UN AGENT TRANSMISSIBLE NON CONVENTIONNEL : LE PRION	20
A. ABSENCE DE REPONSE IMMUNE HUMORALE.....	20
B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ATNC.....	20
C. PROCEDES PHYSIQUES DE DECONTAMINATION.....	21
1. Radiations.....	21
2. Chaleur sèche.....	21
3. Chaleur humide.....	21
D. PROCEDES CHIMIQUES.....	22
1. Détergents, agents alkylants, solvants organiques, oxydants.....	22
2. Hypochlorite de sodium.....	22
3. Acides et bases.....	23
E. PROCEDES ENZYMATIQUES.....	23

F. MORPHOLOGIE DE L'AGENT.....	23
1. Estimation de la taille.....	23
2. Les particules tubulo-vésiculeuses.....	24
3. Les Scrapie Associated Fibrils (SAF).....	24
G. PrPc ET PrPsc : DEUX ISOFORMES D'UNE MEME PROTEINE.....	25
1. Le gène PRP.....	25
2. La PrPc.....	26
a. Structure de la PrPc.....	26
b. Biosynthèse de la PrPc.....	28
c. Une protéine ubiquiste.....	29
d. Des fonctions mal connues.....	30
3. L'isoforme anormal : la PrPsc.....	31
H. VERS UN AGENT INFECTIEUX PROTEIQUE.....	33
1. L'hypothèse virale : la théorie du virino.....	33
2. La théorie du tout protéique.....	34
I. LE PRION, UN CONCEPT COHERANT.....	36
1. Une explication à la dualité des EST.....	36
2. Expression du gène PRP et sensibilité à la maladie.....	36
3. PrPc et biodiversité des souches.....	36
4. PrP et barrière d'espèce.....	38
5. Les limites du concept prion.....	38
IV. PATHOGENESE DES EST.....	40
A. CONTAMINATION ET LYMPHO-INVASION.....	40
1. Contamination.....	40
2. Cellules présentatrices d'antigène et dissémination vers les centres germinatifs.....	41
3. Implication des cellules folliculaires dendritiques (FDC).....	42
4. Rôle des lymphocytes.....	43
5. Lympho-invasion et interaction souche/fond génétique de l'hôte.....	44
B. NEUROINVASION.....	45
1. Atteinte du système nerveux autonome (SNA) digestif.....	45
2. Dissémination au système nerveux central.....	46
3. Translocation de la PrPsc par les fibres nerveuses.....	47

C. PROCESSUS NEURODEGENERATIF : PERTURBATION DE L'HOMEOSTASIE TISSULAIRE ET MORT NEURONALE LORS DES MALADIES A PRION.....	48
1. Activation gliale.....	48
2. Radicaux libres et stress oxydatif.....	49
3. Perte neuronale.....	50
V. DIAGNOSTIC DES EST.....	52
A. EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE.....	53
1. Distribution des lésions dans l'encéphale.....	53
a. Cas de l'espèce humaine.....	53
b. Animaux domestiques.....	54
2. Un outil spécifique, mais peu robuste et peu sensible.....	55
B. IDENTIFICATION DES SAF.....	55
C. ANALYSES IMMUNOCHIMIQUES.....	56
1. Détection immunohistochimique (IHC).....	56
2. Western-blot (WB).....	57
3. Détection par ELISA.....	58
4. Electrophorèse capillaire.....	59
D. TESTS D'INFECTIOSITE SUR RONGEURS DE LABORATOIRE.....	59
E. VERS UN DIAGNOSTIC PRECLINIQUE.....	60
1. Recherche de prion dans les fluides biologiques.....	60
2. Recherche de PrPsc sur biopsie tissulaire.....	61
VI. SUSCEPTIBILITE GENETIQUE DES PETITS RUMINANTS AUX EST.....	63
A. EXEMPLE DE LA TREMBLANTE OVINE.....	63
1. Données historiques.....	63
2. Implication du gène PRP et de son polymorphisme.....	63
3. Modulation de la sensibilité par le génotype PRP.....	65
a. Ovins de génotype ARR/ARR.....	66
b. Ovins de génotype ARR/X ou AHQ/X.....	67
c. Ovins porteurs de l'allèle VRQ ou ARQ.....	67
4. Utilisation de l'outil génétique dans la lutte contre les EST chez les ovins.....	70

B. POLYMORPHISME DU GENE PRP ET SENSIBILITE A LA TREMBLANTE DANS L'ESPECE CAPRINE.....	71
1. Variabilité du gène PrP caprin.....	71
2. Gène PRP caprin et sensibilité aux EST.....	72
C. LUTTE CONTRE LA TREMBLANTE CAPRINE EN L'ABSENCE D'OUTIL GENETIQUE.....	73
Conclusion et objectifs du travail expérimental.....	74
 <i>PARTIE EXPERIMENTALE.....</i>	 <i>75</i>
I. MATERIEL ET METHODES.....	76
A. ANIMAUX.....	76
B. PRELEVEMENTS EFFECTUES SUR LES ANIMAUX DANS L'ELEVAGE.77	
1. Biopsie d'amygdale.....	77
2. Prélèvement sanguin et génotypage aux codons 142, 154, 211, 222 et 240 du gène PRP.....	78
C. PRELEVEMENTS SUR LES ANIMAUX A L'EQUARRISSAGE.....	78
D. DETECTION DE LA PrPsc.....	79
1. Immunohistochimie.....	79
2. ELISA.....	80
a. Homogénéisation.....	80
b. Extraction et mesure de la PrPsc.....	81
3. Tests rapides.....	81
 II. RESULTATS.....	 82
A. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE DE LA TREMBLANTE DANS LES 6 TROUPEAUX ETUDIES.....	83
1. Prévalence globale et prévalence par troupeaux.....	83
2. Prévalence par race.....	84
3. Prévalence par classe d'âge.....	84

B. PERFORMANCES COMPAREES DES OUTILS DIAGNOSTIQUES.....	86
1. Concordances IHC/ELISA et sensibilité comparée des deux techniques...	86
2. Performances comparées du diagnostic réalisé sur tissu lymphoïde et système nerveux central.....	89
3. Evaluation des performances du diagnostic basé sur la biopsie d'amygdale.....	91
C. POLYMORPHISMES AUX CODONS 142-154-211-222 ET 240 DU GENE PRP CAPRIN ET SENSIBILITE A LA TREMBLANTE.....	93
1. Structure génotypique des populations dans les élevages étudiés.....	93
2. Polymorphismes du gène PRP et infection par la tremblante.....	98
a. Analyse univariée par codon	98
b. Analyse multivariée.....	101
III. DISCUSSION.....	107
CONCLUSION.....	115
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	<i>116</i>

ANNEXES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

Tableau 1 : Les allèles connus du gène PRP ovin.....	64
Tableau 2 : Polymorphisme du gène PrP chez les ovins.....	65
Tableau 3 : Génotypes de 35 animaux atteints de tremblante (décédés entre 1986 et 1995)...	68
Tableau 4 : Polymorphisme du gène PRP chez les caprins.....	72
Tableau 5 : Répartition des animaux de l'étude par race et par élevage.....	76
Tableau 6 : Prévalence observée dans les 6 élevages.....	83
Tableau 7 : Prévalence de la tremblante en fonction de l'âge.....	85
Tableau 8 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour l'amygdale.....	87
Tableau 9 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour le nœud lymphatique mésentérique.....	87
Tableau 10 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour l'iléon.....	87
Tableau 11 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour l'obex.....	88
Tableau 12 : Comparaison des résultats par IHC et par ELISA tous organes confondus.....	88
Tableau 13 : Sensibilité comparée ELISA/IHC.....	89
Tableau 14 : Sensibilité associée aux différents organes pour le diagnostic post-mortem.....	90
Tableau 15 : Comparaison des sensibilités associées à chaque organe pour le diagnostic post- mortem.....	91
Tableau 16 : Visualisation des performances de la biopsie d'amygdale.....	92
Tableau 17 : Comparaison biopsie/prélèvements post-mortem.....	92
Tableau 18 : Visualisation des délais biopsie-équarrissage pour les animaux ayant une biopsie négative et un résultat sur amygdale positif en post-mortem.....	93
Tableau 19 : Polymorphisme génétique aux 5 codons (142, 154, 211, 222, 240) du gène PrP au sein des 6 élevages.....	95
Tableau 20 : Répartition allélique dans les 6 élevages.....	96
Tableau 21 : Fréquences génotypiques dans chaque élevage.....	97
Tableau 22 : Répartition des caprins génotypés des 3 élevages enzootiques selon leur statut infectieux et leur typage aux codons 142, 154, 211, 222, 240.....	100
Tableau 23 : Regroupements effectués pour l'analyse multivariée.....	101

Tableau 24 : Comparaison des pourcentages d'animaux infectés selon le génotype par rapport au groupe de référence IRRQS/IRRQS et rapport de cotes associé.....	103
Tableau 25 : Résultats de l'analyse multivariée.....	105

Annexes

Tableau I : Présentation des résultats de chaque test par élevage

Tableau II : Comparaison des sensibilités de toutes les techniques prises 2 par 2

Tableau III : Répartition des caprins génotypés des 3 élevages enzootiques (n=641) selon leur statut infectieux et leur génotype global

FIGURES

Figure 1 : Comparaisons spatiales 3D entre les PrPc de différentes espèces.....	26
Figure 2 : Structure 3D d'une protéine recombinante de PrPc.....	27
Figure 3 : Représentation 3 D de la PrPc.....	32
Figure 4 : Représentation schématique des changements conformationnels de la PrPc, induits par la PrPsc.....	35
Figure 5 : Représentation schématique du trajet du prion à travers la barrière intestinale jusqu'au SNP et de la localisation des différents acteurs cellulaires.....	42
Figure 6 : Schéma de la maturation des FDC sous l'influence des lymphocytes.....	44
Figure 7 : Quelques aspects cellulaires et moléculaires de la propagation du prion.....	45
Figure 8 : Fréquence d'animaux morts de tremblante naturelle selon leur génotype au locus PRP (codons 136, 154 et 171), dans un troupeau d'ovins de race Romanov.....	68
Figure 9: Diagramme de répartition des cas pour chaque classe d'âge.....	85

TABLE DES ABREVIATIONS

- A : Alanine
- Ac : Anticorps
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- ARM : Acide ribonucléique
- ARMm : Acide ribonucléique messenger
- ATNC : Agent transmissible non conventionnel
- bp : paire de bases
- C : Cystéine
- CEA : Commissariat à l'énergie atomique
- Cellule M : cellule microfold
- CLO : Contrôle laitier officiel
- CPA : Cellule présentatrice d'antigène
- Cu : Cuivre
- CWD : Chronic Wasting Disease
- D : Acide aspartique
- DC : Cellules dendritiques
- DGAL : Direction générale de l'alimentation
- DL50 : Dose létale pour 50 % des animaux
- DSV : Direction des services vétérinaires
- EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
- ELISA : Enzym Link Immunosorbant Assay
- ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine
- EST : Encéphalopathies spongiformes transmissibles
- F : Phénylalanine
- FAE : Entérocytes associés aux follicules
- FDC : Cellules folliculaires dendritiques
- G : Glycine
- GALT : Gut associated lymphoid tissu

- GPI : Glycosyl Phosphatidyl inositol
- GSS : Syndrome de Gertsman-Straüssler-Scheinker
- H : Histidine
- I : Isoleucine
- IC : Intervalle de confiance
- IFF : Insomnie fatale familiale
- IHC : Immunohistochimie
- IL : Interleukine
- INRA : Institut national de recherche agronomique
- K : Lysine
- kB : kilobase
- Kd : constante de dissociation
- kDa : kilodalton
- KO : Knock out
- L : Leucine
- M : Méthionine
- MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob
- N : Asparagine
- NF : Nuclear Factor
- NLM : Nœud lymphatique mésentérique
- NPU : Neuropathogenesis Unit
- nv-MCJ : nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
- OD : Optic density
- ORF : Open reading fram
- P : Proline
- pA : prolonged incubation
- PCR : Polymerase chain reaction
- PGE : Prostaglandines E
- PK : Protéine Kinase
- ppm : partie par million
- PrP : Protease resistant protein
- PrPc : PrP cellulaire

- PrPres : PrP résistante = PrPsc : PrP scrapie
- Q : Glutamine
- R : Arginine
- RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- S : Sérine
- sA : short incubation
- SAF : Scrapie associated fibrils
- SCID : Severe Combined Immunodeficiency Disorder
- SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
- Sinc : Scrapie incubation
- Sip : Scrapie incubation period
- SNA : Système nerveux autonome
- SNC : Système nerveux central
- SNP : Système nerveux périphérique
- SOD : Superoxyde dismutase
- SSBP : Sheep Scrapie Brain Pool
- T : Thréonine
- Tg : Transgénique
- TME : Transmissible mink encéphalopathy
- TNF : Tumor necrosis factor
- UMR : Unité mixte de recherche
- V : Valine
- W : Tryptophane
- WB : Western blot

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles ou EST sont un groupe de maladies neurodégénératives progressives rencontrées chez de nombreux mammifères. Des cas d'EST ont notamment été décrits à la fois chez différentes espèces de ruminants (bovins - Encéphalopathie Spongiforme Bovine-ESB-, ovins et caprins -treiblante-), ainsi que chez l'Homme (maladie de Creutzfeldt-Jakob -MCJ- et son nouveau variant -nv-MCJ-).

La treiblante des ovins est une maladie connue depuis plus de 200 ans (McGowan, 1922) et représente à ce titre l'archétype des EST.

La première description de la treiblante caprine remonte à 1942 (Chelle, 1942). Toutefois les données disponibles dans cette espèce demeurent rares. Outre les petits ruminants domestiques (chèvres et moutons), la treiblante semble également affecter certains petits ruminants sauvages (mouflons).

L'intérêt concernant les EST a été, au cours des années 80, relancé par l'identification du caractère zoonotique de l'ESB (Bruce, et al., 1997 ; Hill, et al., 1997) et son incrimination dans l'émergence du nv-MCJ. Contrairement à l'ESB, la treiblante des petits ruminants ne semble pas affecter l'homme (van Duijn, et al., 1998). Toutefois certains isolats de treiblante ont été transmis avec succès à des primates (Gibbs, et al., 1980). Par ailleurs, l'ESB a été transmise (en conditions expérimentales) à des ovins et des caprins (Foster, et al., 1993). La maladie résultante étant cliniquement indifférenciable de la treiblante, la possibilité d'une dissémination de l'ESB dans le cheptel de petits ruminants a été à l'origine de la mise en place de mesures sanitaires strictes dans l'Union Européenne visant à identifier et éradiquer les foyers d'EST chez les petits ruminants.

Ces mesures n'ont toutefois pas suffi à prévenir la survenue de l'ESB qui a été formellement identifiée en 2005 sur un caprin français. Depuis, deux autres cas probables de la maladie chez des chèvres ont été identifiés en Grande Bretagne (Eloit, et al., 2005).

Dans ce contexte, le peu de données disponibles concernant (i) l'épidémiologie de la maladie, (ii) les performances des outils diagnostiques, et (iii) la modulation de la sensibilité aux EST chez les caprins, apparaissent comme autant de handicaps à la définition de stratégies de maîtrise relatives aux maladies à prion dans cette espèce.

L'objectif de cette thèse a été de préciser ces éléments manquants à travers l'étude de six troupeaux caprins naturellement atteints de tremblante. Dans un premier temps, un point sur la tremblante des petits ruminants a été réalisé, en soulignant les données actuellement disponibles en tremblante caprine (partie bibliographique). La seconde partie (partie expérimentale) présente les résultats du travail expérimental, avec les différentes orientations pré-citées (épidémiologiques, diagnostiques et génétiques) et leurs conséquences pratiques dans la lutte contre la tremblante caprine.

I. CARACTERISTIQUES DES EST

Les EST possèdent différents caractères communs.

A. CARACTERES CLINIQUES

Toutes ces maladies débutent après une période d'incubation (asymptomatique), considérée comme longue lorsqu'elle est rapportée à l'espérance de vie moyenne de l'espèce. Cette période se chiffre en dizaines de mois chez les petits et grands ruminants et en années ou dizaines d'années chez l'Homme (Fraser, 1976).

Dans leur phase symptomatique, ces maladies sont d'évolution progressive et chronique. La phase clinique dure généralement plusieurs semaines à plusieurs mois, et se traduit par une aggravation lente de symptômes nerveux. Ceux-ci sont éminemment variables selon les espèces, associant des troubles :

- moteurs (incoordination motrice, instabilité posturale, tremblements, myoclonies),
- de la sensibilité (démangeaisons incoercibles),
- des facultés cognitives (démence, accès d'humeur).

Dans tous les cas, l'issue de la maladie est fatale.

B. CARACTERES LESIONNELS

1. Lésions macroscopiques

Hormis des lésions non spécifiques (amaigrissement, amyotrophie liée aux déplacements limités, pneumonie suite à une fausse déglutition chez l'homme), aucune lésion macroscopique directement imputable à la maladie n'est décelable.

2. Lésions microscopiques

En histologie conventionnelle les lésions se cantonnent généralement au système nerveux central (SNC). L'apparition des lésions microscopiques dans le système nerveux central ne précède que de peu les manifestations cliniques de la maladie.

Les EST se caractérisent par une vacuolisation neuronale périkaryonique et neuropilaire. Une vacuolisation artéfactuelle peut toutefois être observée dans des groupes particuliers de neurones chez certains individus sains.

De discrètes images de dégénérescence neuronale ont également été rapportées (Fraser, et al., 1973).

L'autre dominante du tableau lésionnel est une gliose. Cette gliose correspond à une hypertrophie et à une hyperplasie astrocytaire et microgliale. L'étude des marqueurs liés aux astrocytes (GFAP) et aux cellules microgliales (CD68 et CD11) confirme la forte activation de ces cellules (Giese, et al., 1998).

La présence de dépôts amorphes, généralement péri-vasculaires et de taille réduite, est parfois notée dans la substance grise. Ces dépôts amyloïdes (fixant le rouge Congo) peuvent prendre l'allure de plaques de grande taille intra-parenchymateuses (Wood, et al., 1992). En revanche, contrairement à d'autres grandes maladies neuro-dégénératives centrales (démence liée au SIDA, sclérose en plaque), aucun infiltrat lymphocytaire ou macrophagique n'est observé (Fraser, 1976).

C. TRANSMISSIBILITE ET TITRE INFECTIEUX

Ce n'est que dans les années 1930 que le caractère transmissible par inoculation de ces maladies a été démontré, par Jean Cuillé et Paul Louis Chelle, qui reproduisirent une tremblante clinique chez des ovins 24 mois après injection d'un broyat de cerveaux issus d'ovins atteints (Cuillé, et al., 1936).

De même, l'inoculation de système nerveux central issu d'individus atteints, à des individus de la même espèce ou d'espèce différente (rongeurs de laboratoire) permet généralement de reproduire la maladie, ou du moins une maladie neuro-dégénérative fatale avec des caractères lésionnels typiques d'EST (Chandler, 1961 ; Fraser, 1976).

L'inoculation de broyat de tissu dilué en série, à différents groupes de souris permet de déterminer une Dose Létale 50 (DL50 - dose pour laquelle la moitié des souris inoculées vont mourir) et un titre infectieux (Dickinson, 1983). Toutefois, certains isolats connus pour être infectieux en transmission homo spécifique, peuvent être difficiles, voir impossibles, à transmettre aux rongeurs (Kimberlin, et al., 1978).

Les échecs répétés d'isolement de l'agent transmissible par les méthodes classiques bactériologiques et virologiques ont historiquement conduit les expérimentateurs à utiliser les modèles de transmission à l'animal pour étudier ces agents.

II. DIVERSITE BIOLOGIQUE DES AGENTS DES EST

A. NOTION DE SOUCHES

Le passage en série de deux isolats de tremblante ovine à des chèvres a conduit à l'apparition de deux « lignées » stables développant des signes cliniques très différents ; l'une dite « scratchy » (démangeaison) et l'autre dite « drowsy » (sommolence) (Pattison, 1957).

A partir de ces constatations et de nombreux autres éléments tels que :

- (i) la variété des symptômes observés chez des souris (Carp, et al., 1984) ou des moutons (Foster, et al., 1988) inoculés avec différents isolats d'EST,
- (ii) la possibilité ou l'impossibilité de transmettre certains isolats lors d'inoculation hétérosécifique (Kimberlin, et al., 1978),
- (iii) l'extrême variabilité de thermostabilité de l'agent issu d'isolats différents (Dickinson, et al., 1978),

s'est développé le concept de diversité biologique de l'agent causal des EST, aboutissant à la notion de souche, aujourd'hui universellement reconnue dans son principe. En l'absence de toute connaissance précise sur la nature biologique de l'agent, les travaux menés dans les années 1960 – 1970 par l'équipe de Dickinson au NPU (Neuropathogenesis Unit) (Dickinson, 1976), ont fait de la transmission à des lignées de souris l'outil de référence pour le typage (caractérisation de souche) et l'étude de la biodiversité de ces agents infectieux.

Lorsqu'un isolat d'EST est inoculé en série sur la même lignée de souris, on constate, en cas de transmission effective, une réduction progressive de la durée d'incubation de la maladie et une augmentation de l'efficacité de la transmission (nombre de souris atteintes /nombre de souris inoculées). Ces caractères se stabilisent généralement après 3 ou 4 passages en série (Fraser, et al., 1973 ; Bruce, 1979).

Ainsi, après plusieurs passages en série d'un isolat sur 5 lignées de souris standards, la durée d'incubation et le profil lésionnel sont les deux paramètres quantifiables qui permettent classiquement de caractériser une souche (Bruce, et al., 1991).

B. DUREE D'INCUBATION

Lors d'inoculation en série d'un isolat de tremblante à des lignées de souris différentes, après les 3 ou 4 premiers passages à haute dose par voie intracérébrale, les durées d'incubation chez les souris issues de la même lignée sont stables, mais peuvent différer d'une lignée à l'autre (Dickinson, 1976). Les mesures réalisées, si le matériel biologique (souris et inoculum) est identique, sont hautement répétables. Toutefois, la durée d'incubation apparaît comme liée au titre infectieux présent de l'inoculum. La diminution du titre infectieux se traduit par un allongement de la durée d'incubation (Bruce, et al., 1991 ; Taylor, et al., 2000).

L'effet « lignée de souris » a très rapidement été attribué à l'existence d'un gène d'effet majeur, le gène Sinc (pour Scrapie incubation period) (Dickinson, et al., 1968 ; Dickinson, et al., 1972). Deux allèles de ce gène ont été identifiés, l'allèle s7 (chez les souris C57Bl6) et p7 (chez les souris VM). La durée d'incubation pour certains isolats sera plus courte sur des souris homozygotes s7 que sur des homozygotes p7, alors que pour d'autres isolats les résultats seront inversés.

La mesure des durées d'incubation sur des souris de génotypes Sinc différents (s7, p7 et croisement F1), après stabilisation, est un paramètre discriminant qui permet de distinguer de façon répétable les isolats entre eux (Dickinson, 1976 ; Outram, 1976 ; Bruce, et al., 1991).

C. PROFILS LESIONNELS

De la même façon que les durées d'incubation de deux isolats passés en série sur la même lignée de souris peuvent être différents, la distribution et l'intensité des lésions vacuolaires cérébrales sont des paramètres distinctifs des isolats après inoculation à une même lignée de souris (Fraser, 1976).

L'utilisation d'une méthode standardisée de gradation de l'intensité des lésions, dans 12 zones (9 zones de la substance grise et 3 de la substance blanche) observables sur 4 plans de sections cérébrales pré-établis, permet d'établir des profils lésionnels hautement répétables lors d'utilisation d'un matériel biologique standardisé (inoculum et souris) (Fraser, et al., 1973 ; Fraser, 1976).

D'autres critères morphologiques, tels que la présence de plaques amyloïdes ou la sévérité de la perte neuronale de la région hippocampale (Scott, et al., 1984) peuvent venir compléter le profil lésionnel. Le passage en série d'un grand nombre d'isolats de tremblante sur ces lignées

aurait permis d'isoler en Grande Bretagne une vingtaine de souches différentes (Bruce, et al., 1991).

D. NOTION DE BARRIERE D'ESPECE

Lors de l'inoculation d'une souche issue d'une espèce animale à une autre espèce animale, différents phénomènes sont susceptibles de se produire.

Il est tout d'abord possible qu'aucune transmission ne soit observée sur l'espèce inoculée ou que la maladie ne soit transmise en premier passage qu'à un faible pourcentage des animaux.

Certaines espèces comme le lapin semblent ainsi totalement réfractaires aux EST, et d'autres, comme le porc -inoculé par voie intracérébrale avec de l'ESB issue de bovin-, ou la souris - avec la souche 263K de hamster, ne semblent que partiellement et peu réceptifs (Kimberlin, et al., 1978 ; Ryder, et al., 2001).

Ensuite, au fur et à mesure des passages sur la nouvelle espèce hôte, la durée d'incubation va progressivement diminuer et l'efficacité de la transmission augmenter, jusqu'à devenir stable (Fraser, 1976).

Certaines souches passées à une autre espèce semblent se modifier avec un phénotype radicalement différent de celui de la souche originelle. Ainsi, le passage en série de la souche murine 22C sur le hamster, puis sa ré-inoculation à la souris amène à une variation du phénotype et à l'émergence d'une nouvelle souche chez la souris (Kimberlin, et al., 1989).

Toutefois, ce phénomène n'est pas absolu. Certaines souches comme la souche 139A (stable sur la souris), est modifiée lors d'un passage en série sur le hamster, tandis qu'elle demeure stable lors d'un passage en série sur le rat (Kimberlin, et al., 1987). De même, des souches telles que celle de l'ESB (Bruce, et al., 2002) ou la souche murine ME7 (Kimberlin, et al., 1978), possèdent un phénotype extrêmement stable après passages interspécifiques.

L'ensemble des phénomènes observés lors du passage trans-spécifique des souches est attribué à l'existence d'une barrière d'espèce (Pattison, 1965). Cependant cette notion de barrière d'espèce dépend aussi bien des facteurs liés à la souche elle-même, qu'à certaines composantes de l'hôte.

III. UN AGENT TRANSMISSIBLE NON CONVENTIONNEL : LE PRION

La transmissibilité de la maladie par inoculation prouve le caractère infectieux des EST. Cependant, l'agent transmissible s'illustre par son caractère atypique qui lui a valu la qualification d'Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC), par opposition aux agents conventionnels que sont virus, bactéries ou agents parasitaires.

A. ABSENCE DE REPOSE IMMUNE HUMORALE

L'une des caractéristiques principales de l'infection par l'agent de la tremblante est l'absence de réponse immunitaire humorale (Porter, et al., 1973 ; Kascsak, et al., 1987). Une telle propriété implique l'impossibilité de la détection de la maladie par des techniques sérologiques usuelles, mais aussi une 'immuno-tolérance' de l'hôte vis-à-vis de l'agent pathogène.

B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ATNC

L'ATNC se montre particulièrement résistant aux différents procédés utilisés pour inactiver les agents conventionnels. Cette exceptionnelle résistance aux procédés physico-chimiques de décontamination varie en fonction des isolats d'ATNC, mais également de l'état physique du matériel biologique soumis à la décontamination (lyophilisation préalable, taille de l'échantillon...) (Kimberlin, et al., 1983).

L'essentiel des travaux a utilisé des encéphales de rongeurs (souris, hamster ou cobaye) inoculés avec des isolats provenant de brebis atteintes de tremblante, de bovins atteints d'ESB ou encore d'humains atteints de MCJ. Cependant, peu de données sont disponibles sur les isolats primaires.

C. PROCÉDES PHYSIQUES DE DECONTAMINATION

1. Radiations

Les rayons ultra-violet (254 nm) ont été inefficaces (Latarjet, et al., 1970), tout comme les micro-ondes, les rayons X et les ultrasons, pour l'inactivation de tissus infectés (Gibbs, et al., 1978).

2. Chaleur sèche

L'efficacité du traitement en chaleur sèche dépend beaucoup de l'état d'hydratation de l'échantillon soumis au procédé. La déshydratation d'un tissu infectieux renforce la thermostabilité de l'ATNC. Ainsi, le traitement d'un échantillon de cerveau de hamster, infecté par la souche 263K, lyophilisé en milieu anoxique pendant 1h à 360°C n'a pas permis d'éliminer la totalité de son infectiosité (Brown, et al., 1990), alors que le même tissu, préalablement macéré, était totalement décontaminé après 1h à 200°C. En revanche, pour des traitements plus courts (200°C pendant 20 min) ou à des températures inférieures (160°C pendant 24h), un titre infectieux restait décelable (Dickinson, et al., 1978).

En outre, l'efficacité des traitements en chaleur sèche est variable en fonction de la souche : par exemple, l'ESB adaptée préalablement à des souris VM a pu être transmise après un traitement à 600°C pendant 15 min (Brown, et al., 2000).

3. Chaleur humide

L'autoclavage (chaleur humide) donne des résultats variables en fonction :

- de la nature du matériel biologique utilisé : certains isolats de tremblante passés en série sur souris (22A) (Dickinson, et al., 1978 ; Kimberlin, et al., 1983) ou hamsters (263K) (Taylor, et al., 1994) ou encore des isolats d'ESB passés sur souris VM (301V) (Taylor, 2000) se sont avérés particulièrement résistants aux traitements par autoclave à charge poreuse.
- de l'état d'hydratation et de fixation du tissu : à masse de tissu égale des traitements efficaces sur des tissus macérés semblent inefficaces pour des tissus déshydratés.
- de la nature du traitement : un chauffage à 136°C pendant 4 minutes a permis une inactivation totale (Kimberlin, et al., 1983 ; Taylor, 2000) de 50 mg d'encéphale infecté par la souche 22A (isolat de tremblante passé en série sur souris), qui est

pourtant considérée comme particulièrement thermostable (Dickinson, et al., 1978). Paradoxalement, un autoclavage à 138°C pendant 9 minutes n'a pas permis une décontamination totale (Taylor, 2000). Pour la souche 301V (ESB passée en série sur la lignée de souris VM), une meilleure persistance de l'infectiosité a même été observée pour un traitement à 138°C plutôt qu'à 134°C (Taylor, 2000).

D. PROCÉDES CHIMIQUES

Comme pour les procédés physiques de décontamination, l'activité des procédés chimiques est liée à la nature de la souche et les données obtenues pour une souche ne sont pas forcément transposables à toutes les autres.

1. Détergents, agents alkylants, solvants organiques, oxydants

Ces produits se sont révélés globalement peu efficaces et ne font chuter que faiblement le titre infectieux (Millson, et al., 1976 ; Dickinson, et al., 1978 ; Taylor, 1991 ; Fraser, et al., 1992 ; Taylor, et al., 1998).

Toutefois, il est intéressant de souligner que les agents détergents-dénaturants comme le sodium dodecyl sulfate (SDS), bien qu'imparfaitement efficaces (Taylor, et al., 1999), semblent réduire de façon importante le titre infectieux des tissus contaminés (Millson, et al., 1976 ; Kimberlin, et al., 1983). En outre, ce traitement inactivateur semble plus efficace s'il est effectué à ébullition (Tateishi, et al., 1991) ou à l'autoclave (Taylor, et al., 1999).

Le formol (Taylor, et al., 1988) ou l'éthanol (Taylor, 1996) renforcent la résistance de l'agent aux autres procédés de décontamination.

2. Hypochlorite de sodium

Les solutions d'hypochlorite de sodium ont montré leur capacité à inactiver complètement certaines souches, telles que les souches 263K (Brown, et al., 1986), 22A et 139A (Kimberlin, et al., 1983) ainsi que des isolats d'ESB (Taylor, et al., 1994). Un traitement d'1 heure à 20 000 ppm de chlore libre a été suffisant pour obtenir une inactivation de ces agents, le facteur crucial étant la disponibilité en chlore libre (Taylor, et al., 1994).

3. Acides et bases

Les solutions d'acides et de bases dont les pH sont compris entre 2 et 10 ne semblent avoir que peu d'effet sur les ATNC. Seul l'acide formique, qui solubilise les protéines, est capable de réduire de façon importante le titre infectieux de tissus fixés au formol (Brown, et al., 1990 ; Taylor, 1995). Ce procédé est intéressant pour réduire les risques liés à la manipulation des prélèvements destinés à l'histologie.

Une exposition d'1 heure à la soude molaire détruit la plus grande partie de l'infectiosité. Une très forte réduction des titres infectieux a été observée pour toutes les souches testées. Des souches comme la 263K ou l'ESB (Taylor, et al., 1994) conservent une partie de leur pouvoir infectieux après un tel traitement.

Il est cependant intéressant de noter que si l'autoclavage ou le traitement à la soude, réalisés séparément, s'avèrent incapables de détruire la totalité de l'infectiosité, leur combinaison (application séquentielle ou simultanée) semble pouvoir détruire les souches les plus résistantes. C'est le cas pour les souches 263K -121°C durant 90 min en soude molaire (Prusiner, et al., 1984)- ou 301V -1 min d'ébullition en soude molaire (Taylor, et al., 1999)-.

E. PROCEDES ENZYMATIQUES

Les nucléases ne modifient pas sensiblement les titres infectieux (Prusiner, et al., 1980). En revanche, des protéases telles que la Pronase (Millson, et al., 1976) ou la Protéinase K (Prusiner, et al., 1981), après des temps de contact prolongés avec les tissus contaminés, réduisent significativement les titres infectieux.

F. MORPHOLOGIE DE L'AGENT

1. Estimation de la taille

A partir d'expérimentations d'irradiation (Alper, et al., 1966 ; Alper, et al., 1968), la taille de l'agent avait été estimée à quelques nanomètres. Les premières tentatives d'ultrafiltration, ainsi que la réévaluation des données d'irradiation, ont montré que cette taille était probablement 10 fois supérieure aux premières estimations. Les tentatives les plus récentes d'ultrafiltration ont révélé que la taille de l'agent était de l'ordre de 15 à 25 nm (Manuelidis, 1994 ; Pocchiari, 1994).

Toutefois, ces données sont à considérer avec réserve compte tenu des problèmes techniques liés à l'agrégation probable de l'agent qui favoriserait la surestimation de sa taille.

2. Les particules tubulo-vésiculeuses

Au microscope électronique, des particules tubulo-vésiculeuses d'environ 35 nanomètres de diamètre sont décelables dans les processus neuronaux des individus en incubation d'EST, que ce soit dans des formes naturelles ou expérimentales de la maladie (Narang, 1973 ; Narang, et al., 1987).

Bien que certains auteurs aient remis en cause ces observations (Baringer, et al., 1978), la présence de ces particules est décelable très tôt dans la phase d'incubation de la maladie sur des modèles rongeurs (Jeffrey, et al., 1996) et leur nombre semble augmenter avec le stade d'incubation et le titre infectieux (Liberski, et al., 2000).

Au final, la nature exacte de ces structures ainsi que le rôle qu'elles jouent dans la maladie restent à déterminer.

3. Les Scrapie Associated Fibrils (SAF)

L'observation au microscope électronique en contraste négatif de la fraction synaptosomale-mitochondriale de préparations digérées par la protéinase K de (i) cerveaux de brebis atteintes de tremblante (Merz, et al., 1981), mais aussi (ii) de patients atteints de MCJ ou de kuru et (iii) d'élans atteints de Chronic Wasting Disease (CWD), a permis l'identification d'agrégats fibrillaires d'une vingtaine de nanomètres de diamètre et de 100 à 200 nanomètres de long.

Ces fibrilles sont droites ou plus rarement arrangées en hélices (Liberski, et al., 1989 ; Liberski, et al., 1991). Elles ont été retrouvées dans les tissus des individus atteints d'EST naturelle ou expérimentale et sont absentes des préparations issues de tissus d'animaux sains (Merz, et al., 1984).

Ces agrégats ont été baptisés Scrapie Associated Fibrils par certaines équipes et 'Rods' par d'autres (Prusiner, et al., 1983). L'utilisation d'anticorps dirigés contre les SAF (Diringer, et al., 1984 ; Merz, et al., 1987) a montré que SAF et Rods ne sont qu'une seule et même entité. En outre, les anticorps anti-SAF n'ont pas permis de marquer les structures tubulovésiculeuses (Liberski, et al., 1997).

L'inoculation de préparations de SAF purifiées (par protéolyse ménagée, extraction en détergent et gradients de concentration de sucrose) issues de cerveaux de hamsters atteints par

la souche 263K (Diringer, et al., 1984) ou de souris infectées par la souche ME7 (Prusiner, et al., 1983) a permis de reproduire la maladie.

Le constituant majeur des SAF extraites de cerveaux contaminés est un polypeptide d'un poids moléculaire de 27-30 kDa (Prusiner, et al., 1983). Le séquençage de quelques acides aminés N-terminaux de ce polypeptide a permis de montrer en 1985 qu'il était codé par un gène cellulaire (Oesch, et al., 1985 ; Basler, et al., 1986) et non par un acide nucléique propre. La protéine codée par ce gène est à la fois exprimée chez les individus sains et atteints. Toutefois, chez les individus sains, cette protéine est sensible à la protéinase K alors que chez les individus atteints elle y est partiellement résistante (Oesch, et al., 1985).

Par la suite, une nomenclature particulière destinée à rendre compte des propriétés de cette protéine a fait son apparition (Meyer, et al., 1986) :

- (i) la protéine est dénommée PrP pour '**protease resistant protein**'.
- (ii) le gène codant pour la protéine PrP a été baptisé PRP
- (iii) la protéine retrouvée chez les individus sains est devenue la Protéine Prion Cellulaire (**PrPc**)
- (iv) la protéine retrouvée chez les individus atteints est devenue la Protéine Prion Scrapie ou résistante (**PrPsc** ou **PrPres**).

G. PrPc ET PrPsc : DEUX ISOFORMES D'UNE MEME PROTEINE

1. Le gène PRP

Un gène PRP est connu chez tous les mammifères mais également chez les oiseaux (Harris, et al., 1993). Chez les mammifères, le gène PRP encode pour une protéine d'environ 250 acides aminés contenant plusieurs domaines distincts. La structure de ce gène est variable en fonction des espèces, toutefois le cadre de lecture de tous les gènes PRP des mammifères réside dans un seul exon (Basler, et al., 1986 ; Westaway, et al., 1987 ; Hsiao, et al., 1989 ; Gabriel, et al., 1992).

Les concentrations en ARNm codant pour la protéine PrPc seraient identiques chez les individus sains et atteints par la maladie (Oesch, et al., 1985).

Suite à l'identification du gène PRP, des polymorphismes et des mutations intra-spécifiques ont été identifiés. Certaines de ces mutations ont été rapidement associées chez l'homme à des formes familiales d'EST, telles que le Syndrome de Gertsmann-Straüssler-Scheinker (GSS) (Doh-ura, et al., 1989 ; Hsiao, et al., 1989 ; Speer, et al., 1991) ou à la forme familiale de la

MCI (Goldfarb, et al., 1990 ; Goldfarb, et al., 1991 ; Hsiao, et al., 1991 ; Laplanche, et al., 1991).

2. La PrPc

a. Structure de la PrPc

La protéine native compte 253 acides aminés chez l'homme, 254 chez le hamster, 256 chez la souris et le mouton et 269 chez la vache (Kretzschmar, et al., 1986 ; Goldmann, et al., 1990 ; Lowenstein, et al., 1990 ; Goldmann, et al., 1991).

La majeure partie de la protéine a une structure hautement conservée chez tous les mammifères (Figure 1)

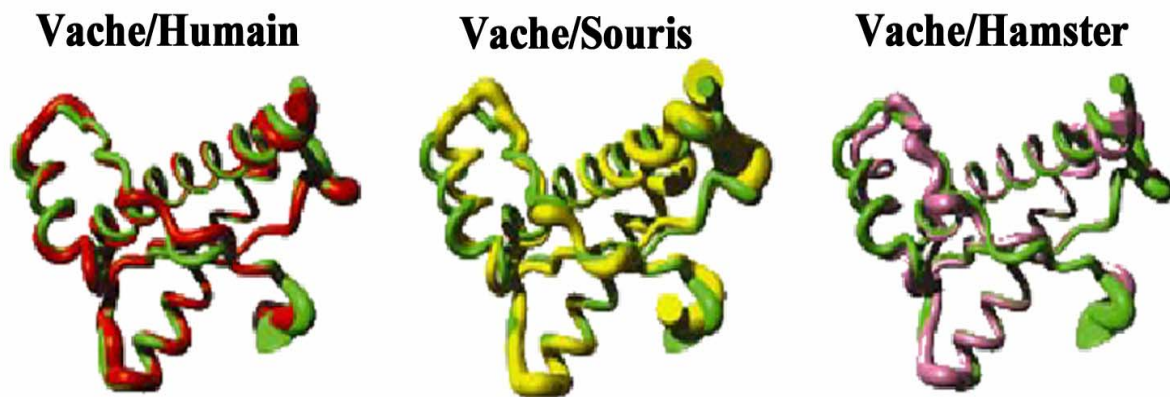


Figure 1 : Comparaisons spatiales 3D entre les PrPc de différentes espèces.

La PrPc bovine est représentée en vert. (Europe, 2002)

Après clivage des extrémités N et C-terminales, l'homologie de la PrP humaine (résidus 23 à 234) est de 91% avec la PrP de souris, 91,5% avec celle de hamster syrien et 93% avec celle de mouton. En revanche, la séquence PrP du poulet diverge fortement (33% seulement d'homologie) (Gabriel, et al., 1992).

Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur la protéine recombinante de souris (Riek, et al., 1996) ont permis d'établir la structure de cette protéine (Figure 2).

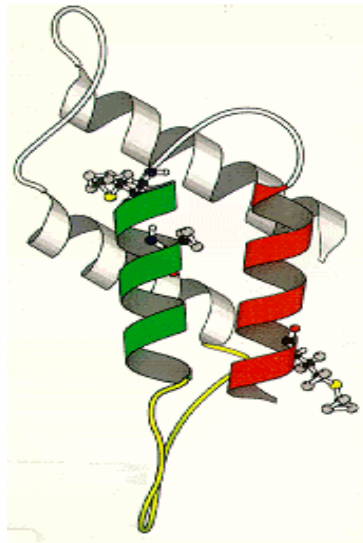


Figure 2 : Structure 3D d'une protéine recombinante de PrPc

Les hélices en couleur correspondent aux hélices α (Leeuwen, 2001).

L'homologie conformationnelle de la protéine prion cellulaire chez les autres espèces semble très forte, comme le suggèrent des études menées sur les protéines recombinantes de hamster (James, et al., 1997) et humaine (Hosszu, et al., 1999).

La PrPc comprend 4 régions :

Région I : Partie N-terminale de 95 acides aminés, comprenant deux séquences hexapeptidiques immédiatement adjacentes à une succession de cinq (ou six chez la vache) séquences octapeptidiques (Bennett, et al., 1992). Cette région contient un site de liaison au cuivre Cu^{2+} (jusqu'à 4 atomes) avec une constante de dissociation (Kd) de 10^{-14} mol. L'extrémité N-terminale (peptide 1-23) permet l'entrée de la protéine dans le réticulum endoplasmique, elle est clivée avant que la protéine ne parvienne à la surface de la cellule.

Région II : Segment 96 à 112, domaine hydrophobe trans-membranaire constitué de 17 acides aminés (Gasset, et al., 1992). Cette partie est hautement conservée chez les mammifères et est supposée contrôler la localisation de la molécule (Stop Transfer Effector).

Région III : Partie 113-230, qui porte 2 sites de N-glycosylation (Asparagine) sur lesquels viennent s'ancrer deux chaînes oligosaccharidiques lors du passage dans l'appareil de Golgi (Harris, 1999). Cette région contient également une des 2 cystéines impliquées dans l'unique pont disulfure de la protéine (Cys179 et Cys214). L'absence totale de glycosylation semble engendrer des perturbations dans le transport intracellulaire de la protéine prion cellulaire.

Région IV : Partie 231 à 254, elle correspond à la partie C-terminale. Elle est constituée d'une séquence signal hydrophobe incluant le site de fixation d'un résidu glycosyl-phosphatidyl-inositol (ancrage GPI) sur une Sérine en position 231. Cette ancre permet la fixation de la protéine PrPc à la face externe de la membrane plasmique (Stahl, et al., 1987). L'action d'une phospholipase spécifique (PIPLC), clivant les ancres GPI, sur des cellules en culture, permet ainsi la solubilisation de la PrPc extracellulaire. La structure de cette ancre GPI est particulière, car elle contient un cœur modifié par l'ajout de résidus d'acide sialique (Harris, 1999).

La PrPc mature comporte une région d'environ 100 aminoacides N-terminaux, sans structure particulière. La région C-terminale (100 aminoacides) est structurée essentiellement en hélices α (43% de la structure) associées à un court feuillet β anti-parallèle (3% de la structure). Les hélices sont au nombre de 3, et sont stabilisées par un unique pont disulfure entre l'hélice 2 et l'hélice 3 (Riek, et al., 1996). La structure tri-dimensionnelle de la molécule (Figure 2), déterminée par cristallographie, semble être symétrique, ce qui participerait à son aptitude à s'organiser en structure amyloïde. De plus, ces analyses révèlent une zone extrêmement flexible qui semble mise en jeu dans le changement conformationnel induit par la PrPsc (Bousset, et al., 2001).

b. Biosynthèse de la PrPc

Comme toute protéine membranaire, la PrPc est synthétisée dans le réticulum endoplasmique puis transite par l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire. Au cours de sa biosynthèse, elle subit le clivage de sa partie N-terminale, l'ajout des deux chaînes oligosaccharidiques, la formation d'un pont disulfure ainsi que l'attachement d'une ancre GPI. D'autres

modifications post-traductionnelles peuvent se produire (Harris, et al., 1993), sous la forme de deux clivages : l'un touchant l'ancre GPI, l'autre le segment hydrophobe hautement conservé. Une fois à la surface de la cellule, la PrPc subit des cycles de déplacements entre la membrane cellulaire et le compartiment endosomal. La molécule est endocytée puis subit un clivage endosomal avant d'être réexportée vers la membrane cellulaire (Shyng, et al., 1993). Cette endocytose serait stimulée par l'action de glycanes sulfatés, et participerait, selon certaines hypothèses, à la capture du cuivre extra-cellulaire (Pauly, et al., 1998). La région N-terminale de la PrPc jouerait un rôle important dans ces phénomènes d'endocytose puisqu'elle permet l'activation de régions membranaires riches en clathrine au niveau desquelles aurait lieu l'endocytose de la PrPc.

c. Une protéine ubiquiste

La PrPc est exprimée dans de nombreux tissus mais à des niveaux variables. Des dosages réalisés chez le mouton indiquent que le système nerveux central est beaucoup plus riche en PrPc que n'importe quel autre organe (au moins 20 fois plus). De la PrPc est ainsi retrouvée dans des tissus aussi divers que le poumon, le muscle squelettique ou les organes lymphoïdes. Le profil de glycosylation de la PrPc semble varier en fonction des organes (Moudjou, et al., 2001).

Dans le système nerveux central, la PrPc est essentiellement retrouvée dans les populations neuronales, mais elle est également exprimée par les cellules gliales (Kretzschmar, et al., 1986; Bendheim, et al., 1992 ; Manson, et al., 1992). On en retrouve également dans le système nerveux périphérique (Shmakov, et al., 2000).

Différentes populations cellulaires impliquées dans le système immunitaire expriment également la PrPc. On en retrouve aussi chez les précurseurs myéloïdes de très nombreuses lignées cellulaires sanguines (CD34 positives) (Dodelet, et al., 1998).

Les lymphocytes B et T matures ainsi que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques matures et immatures et les cellules dendritiques folliculaires (FDC) expriment la PrPc. Néanmoins, les FDC expriment fortement la PrPc (McBride, et al., 1992 ; Brown, et al., 1999 ; Mabbott, et al., 2000) alors que les lymphocytes n'expriment que peu ou pas la molécule (Cashman, et al., 1990 ; Mabbott, et al., 1997 ; Kubosaki, et al., 2001 ; Liu, et al., 2001).

Pour les polynucléaires neutrophiles, la quantité de PrPc semble se réduire au fur et à mesure de leur différenciation (Dodelet, et al., 1998 ; Brown, et al., 1999 ; Burthem, et al., 2001 ; Sugaya, et al., 2002).

d. Des fonctions mal connues

Malgré son caractère ubiquiste chez les vertébrés, la ou les fonctions exactes de la PrPc restent mal connues à ce jour. Différents éléments issus de la transgénèse (souris Knock Out pour le gène PRP) ainsi que d'expériences *in-vitro* sont toutefois disponibles.

* **Souris PrP^{0/0}**

La délétion du gène PRP n'entraîne pas d'altération physiologique majeure chez les individus, dont le développement et le comportement semblent tout à fait normaux (Bueler, et al., 1992 ; Manson, et al., 1994). Des troubles du sommeil, du rythme circadien (Tobler, et al., 1996) et de la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe (Collinge, et al., 1994) ont pourtant été rapportés sur certaines lignées de souris KO, sans que l'on sache exactement s'ils étaient associés à l'absence du gène ou à un effet dérivé de la délétion. Des souris transgéniques avec des délétions partielles du gène ont également été produites. Celles dépourvues des résidus 32 à 106 de la PrP se sont développées de façon normale. La délétion des résidus 32 à 121 semble associée à une ataxie sévère et à une perte neuronale cérébelleuse. L'insertion d'une copie normale du gène PRP chez ces animaux a toutefois permis d'abolir ce phénomène (Shmerling, et al., 1998).

* **Activité Superoxyde Dismutase (SOD-like)**

Des peptides synthétiques, correspondant à la séquence des octapeptides de la PrPc (résidus 51 à 91) contenant chacun une histidine, peuvent fixer *in vitro* le cuivre Cu²⁺ (Hornshaw, et al., 1995 ; Hornshaw, et al., 1995). De tels résultats ont été également obtenus avec le domaine N-terminal complet (résidus 23 à 98) de la PrPc humaine recombinante (Brown, et al., 1997) et avec la PrP complète recombinante de hamster (Stockel, et al., 1998). Les fractions membranaires de cervelet de souris *PRNP*^{0/0} présentent de faibles concentrations de Cu²⁺ par rapport à des souris de type sauvage (Brown, et al., 1997) et possèdent également une activité réduite de l'enzyme Superoxyde Dismutase Cu²⁺-dépendante (Brown, et al., 1997). Chez des souris saines, l'administration orale de cuprizone, chélateur des ions Cu²⁺,

induit une neurodégénérescence spongiforme très similaire à celle observée chez des souris affectées par le prion (Pattison, et al., 1971).

*** Une implication probable dans la régulation du stress oxydatif**

Les cultures *in vitro* de neurones issus de souris *PRP^{0/0}* sont plus sensibles au stress oxydatif que des neurones issus de souris sauvages (Brown, et al., 1997). Une perte de la fonction antioxydante de la PrPc pourrait survenir au cours de la maladie (Milhavet, et al., 2000). Toutefois, aucune neurodégénérescence n'a été observée dans un modèle de souris chez lesquelles l'expression de la PrPc est abolie au stade adulte uniquement. Cette observation réduit donc l'impact de la fonction antioxydante de la PrPc (Mallucci, et al., 2002). Dans ce cas précis et contrairement aux souris *PRNP^{0/0}* constitutives (Bueler, et al., 1993), il est raisonnable de penser qu'aucun mécanisme compensateur de la fonction assumée par la PrPc n'a pu être mis en place.

3. L'isoforme anormal : la PrPsc

L'étude structurale de la PrPsc, l'isoforme anormal de la PrPc, est rendue extrêmement difficile par son insolubilité lors du processus de purification. Cette propriété a, jusqu'à présent, interdit toute étude de la protéine complète en cristallographie. Néanmoins, les mesures de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge de Fourier ont montré une plus forte proportion en feuillet β pour la PrPsc (30% d'hélices α et 45% de feuillets β) que pour la PrPc (43% d'hélices α et très peu de feuillets) (Pan, et al., 1993).

Les deux isoformes de la protéine ont la même séquence primaire (Oesch, et al., 1985 ; Stahl, et al., 1993), ce qui contredit l'axiome selon lequel une séquence primaire engendre uniquement une seule conformation biologiquement active de la protéine. En outre, la PrPsc serait synthétisée à partir de l'isoforme normal PrPc et en dériverait par un processus post-traductionnel (Meyer, et al., 1986 ; Prusiner, et al., 1991).

Les particularités physico-chimiques de la PrPsc ont été attribuées à sa structure tertiaire particulière ; l'enchaînement de feuillets β lui conférant une grande stabilité (Muramoto, 1996).

Les feuillets β de la PrPsc lui permettraient notamment de résister à la protéinase K. Seuls les premiers acides aminés de la PrPsc pourraient être hydrolysés efficacement. Cette structure

pathologique interfèrerait également avec le catabolisme naturel de la protéine et aboutirait à une accumulation progressive de celle-ci (Prusiner, et al., 1991 ; Harris, 1999).

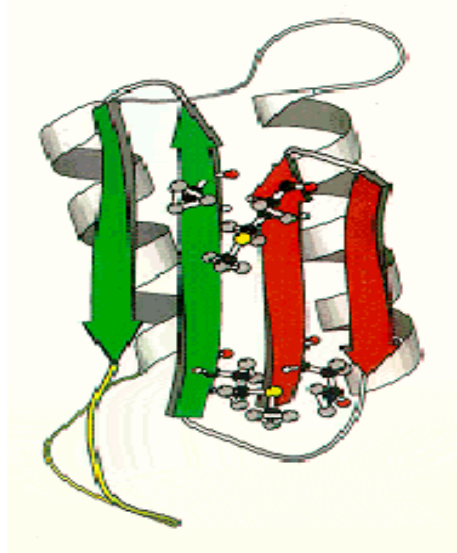


Figure 3 : Représentation 3D de la PrPsc

Les flèches correspondent aux feuillets β , les hélices aux hélices α (Leeuwen, 2001).

H. VERS UN AGENT INFECTIEUX PROTEIQUE

Au fur et à mesure que les données sur l'ATNC s'accumulaient, différentes hypothèses sur la nature de l'agent se sont développées.

1. L'hypothèse virale : la théorie du virino

Une hypothèse virale classique a d'abord été envisagée (Diringer, 1984 ; Dickinson, et al., 1988 ; Diringer, 1991). Le virino serait une particule capable de réplication, entourée de protéo-lipides appartenant à l'hôte et renfermant un acide nucléique. L'origine des protéines, issues de l'hôte, permettrait d'expliquer l'absence de réponse immunitaire. Les SAF, issues d'une protéine codée par le génome de l'hôte, et qui copurifient avec l'infectiosité, pourraient jouer un tel rôle (Bruce, et al., 1987 ; Dickinson, et al., 1988).

L'identification d'acides nucléiques est essentielle à la théorie virale. De nombreux travaux visant à démontrer leur présence ont été entrepris. Des images de SAF, hébergeant une structure monobrin sensible aux nucléases, ont été obtenues (Merz, et al., 1984). Toutefois les SAF ne sont pas observées à partir de préparations non traitées aux détergents, et cet aspect morphologique est probablement plus un artéfact de préparation qu'un caractère propre. Il est toutefois apparu qu'une quantité non négligeable d'acides nucléiques était présente dans les préparations de SAF infectieuses et différentes études ont démontré l'affinité de la PrP 27-30 pour les acides nucléiques (Akowitz, et al., 1994) ou des aptamères (ARN) (Weiss, et al., 1997).

Des expériences de sédimentation en gradients de sucrose, à partir de broyat de tissu contaminé, indiquent que l'infectiosité est associée à une fraction dont la densité (120 S) est compatible avec celle de particules virales (Sklaviadis, et al., 1989 ; Sklaviadis, et al., 1990 ; Manuelidis, et al., 1995 ; Weiss, et al., 1997). A partir de cette fraction il a été montré que l'infectiosité co-purifie avec des complexes protéine-acides nucléiques (Sklaviadis, et al., 1989 ; Sklaviadis, et al., 1990 ; 1993 ; Manuelidis, et al., 1995). Toutefois, les acides nucléiques présents dans la fraction infectieuse semblent pouvoir être digérés (<100bp) sans réelle altération du titre infectieux (Meyer, et al., 1991 ; Kellings, et al., 1993 ; Kellings, et al., 1994).

En dehors de l'existence ou non d'acides nucléiques viraux, il semble qu'un mécanisme caractéristique des infections virales, l'interférence, puisse être mis en évidence dans les EST expérimentales. Sur des souris inoculées avec une souche de MCJ (lente) puis ensuite avec une souche de GSS (rapide), la durée d'incubation est identique à celle observée chez les souris inoculées uniquement avec la souche lente, soit un allongement de plus de 110 jours par rapport aux souris inoculées uniquement avec la souche rapide (Manuelidis, 1998). Outre le critère de période d'incubation, le phénomène d'interférence a été mis en évidence dans l'apparition des signes cliniques, caractéristiques de la souche lente, ainsi que dans le profil lésionnel. En revanche, bien que le niveau de PrPsc accumulée avec la souche rapide soit environ 10 fois supérieur aux niveaux obtenus avec la souche lente, l'infectiosité s'est avérée supérieure de 4 log avec cette souche « rapide » en stade final de la maladie, indiquant que le niveau de PrPsc n'était pas corrélé avec l'infectiosité.

2. La théorie du tout protéique

Les caractères physico-chimiques des ATNC, notamment leur résistance aux traitements qui inactivent ou modifient les acides nucléiques et leur sensibilité à ceux qui dénaturent ou hydrolysent les protéines, ainsi que leur petite taille, ont amené très tôt à considérer que les ATNC se comportaient plus comme des protéines de moins de 100 KDa que comme des virus (Alper, et al., 1966). Très précocement a été formulée l'hypothèse qui ferait des ATNC une protéine infectieuse, dépourvue d'acides nucléiques, et douée de propriétés de réplication (Griffith, 1967). En 1982, suite à la découverte du polypeptide 27-35, Stanley Prusiner a repris et développé cette hypothèse, en baptisant cet agent putatif prion pour « Proteineaceous infectious particle » (Prusiner, 1982). La découverte du gène PRP (Oesch, et al., 1985) et de la dualité PrPc/PrPsc sont venues compléter cette hypothèse.

L'hypothèse « prion » (PrPsc= agent infectieux) implique un transfert d'information de protéine à protéine au niveau conformationnel. Durant l'infection de l'hôte par l'isoforme pathogène, une interaction hautement spécifique entre la PrPc et la PrPsc générerait de nouvelles molécules de PrPsc (Figure 4) (Bolton et al., 1988 ; Cohen et al., 1994).

Il existe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* un mécanisme comparable à celui décrit par l'hypothèse prion. En effet, un mutant de la protéine codée par le gène URE2 est capable d'induire par cytoduction l'apparition du phénotype mutant dans une cellule voisine. La cytoduction nécessite l'accolement de 2 cellules et la fusion de leur membrane pour permettre l'échange de matériel cytoplasmique et l'apparition d'une forme modifiée de la protéine Ure2,

inactive pour sa fonction normale et capable de convertir la forme normale en forme altérée (Wickner, 1994).

Des expériences de transconformation *in vitro* de PrPc par de la PrPsc ont été concluantes. Cependant, dans ces conditions une telle conversion de la PrPc en PrPsc requiert un large excès de PrPsc, ce qui semble contraire à la situation *in vivo* (au moins en début d'infection) (Bossers, et al., 1997).

En fait, il est nécessaire à cette hypothèse que des facteurs cellulaires de l'hôte favorisent, *in vivo*, la faible efficacité de cette réaction stœchiométrique. Ce rôle pourrait être tenu par une protéine -communément dénommée protéine X- appartenant au groupe des protéines chaperonnes (Telling, et al., 1995).

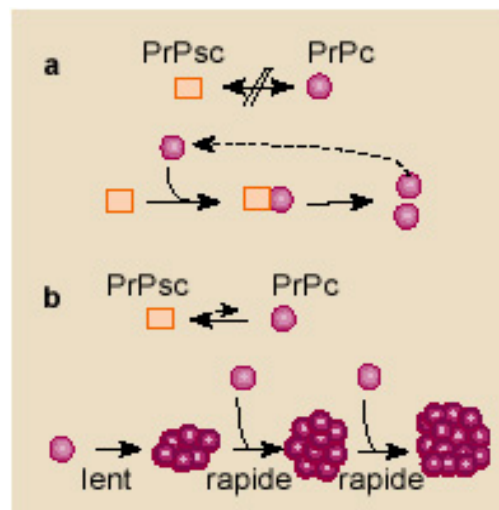


Figure 4 : Représentation schématique des changements conformationnels de la PrPc, induits par la PrPsc

Les protéines chaperonnes ont pour rôle à la fois de faciliter le repliement des protéines lors de leur biosynthèse et leur transport dans les organites cellulaires mais aussi d'éviter leur agrégation lors de stress cellulaire. Ces chaperonnes agiraient en se fixant à leurs substrats, parfois de manière ATP dépendante, prévenant ainsi des repliements inopportuns.

Certains éléments semblent indiquer que des chaperonnes pourraient intervenir dans la formation de la PrPsc. En effet une protéine chaperonne de levure (Hsp104) et une protéine chaperonne bactérienne (GroEL) ont augmenté de façon significative la production cellulaire de PrPsc (DeBurman, et al., 1997).

I. LE PRION, UN CONCEPT COHERENT

1. Une explication à la dualité des EST

Le concept du prion permet d'expliquer assez aisément la dualité des EST, qui dans tous les cas sont transmissibles par inoculation, mais peuvent être d'origine infectieuse ou héréditaire. Chez l'homme certaines formes de MCJ et d'Insomnie fatale Familiale (IFF) ont pu être mises en relation à des mutations ponctuelles du gène PRP (Laplanche, et al., 1993). Ces mutations pourraient expliquer, tout du moins en partie, la survenue de la maladie. Elles favoriseraient une trans-conformation spontanée de la PrPc en PrPsc. Cette dernière jouerait le rôle de nucléateur à l'origine du processus pathologique, sans intervention d'un agent infectieux externe (Cohen, et al., 1994).

L'idée de maladie spontanée sans relation avec un processus infectieux, uniquement liée à un événement aléatoire, lui-même favorisé par des facteurs génétiques, est appuyée par certaines expérimentations, où des mutations obtenues artificiellement sur la PrPc de souris, entraînent une transconformation auto-amplifiée de PrPc (Chiesa, et al., 1998).

2. Expression du gène PRP et sensibilité à la maladie

L'hypothèse prion est cohérente avec le fait que les souris PRP knock-out ($PrP^{0/0}$) ne soient capables, ni de développer la maladie (Bueler, et al., 1994), ni de propager l'agent (Sailer, et al., 1994).

Par ailleurs des lignées de souris exprimant des niveaux variables de transgènes PRP homo ou hétérospécifiques ont permis d'établir que la durée d'incubation de la maladie est inversement proportionnelle au niveau d'expression de la PrPc (Manson, et al., 1994 ;Vilotte, et al., 2001). Toutefois la relation entre le nombre de copies du gène et la réduction de la durée d'incubation n'est pas linéaire, au-delà d'un certain nombre de copies aucune réduction de la durée d'incubation n'est observée et des troubles spontanés apparaissent chez les souris (Westaway, et al., 1994).

3. PrPc et biodiversité des souches

Un problème majeur de l'hypothèse « prion » consiste à expliquer l'existence des souches : comment une molécule autre qu'un acide nucléique, et de surcroît une protéine dont la séquence primaire est unique, peut-elle expliquer une telle diversité ?

Les premiers éléments soutenant l'hypothèse selon laquelle la PrP^{Sc} pourrait servir de support à la définition des souches ont été apportés par l'étude de deux isolats de prion issus du vison et propagés sur hamsters. Les souches 'drowsy' et 'hyper' (Bessen, et al., 1992) entraînent chez le hamster l'accumulation de deux types de PrP^{Sc} biochimiquement différentes par (i) leur solubilité dans le N-laurylsarcosyl, (ii) leur résistance à la PK et (iii) leur profil de migration en polyacrylamide (Bessen, et al., 1994).

Depuis, différents phénotypes cliniques observés lors de MCJ ont été associés à des PrP^{Sc} biochimiquement différenciables par (i) le poids moléculaire des fragments et (ii) le ratio des 3 glycoformes de la PrP^{Sc} après digestion par la PK (Collinge, et al., 1996). Des souris exprimant une PrP chimérique (humaine et murine) et inoculées avec du tissu de patient atteint d'IFF ou de MCJ sporadique ont produit une PrP^{Sc} de 19 kDa et 21 kDa, respectivement (Telling, et al., 1996). En 2nd passage, les résultats obtenus seraient similaires. Cette différence semble due à une différence dans les sites de clivage protéolytique à l'extrémité N-terminale de la PrP^{Sc} humaine, reflétant probablement différentes structures tertiaires (Monari, et al., 1994). Ceci suggère que l'information spécifique de la souche serait contenue dans la structure tertiaire de la PrP^{Sc}.

Il semble cohérent que la PrP^{Sc} serve de matrice pour la conversion de PrP^C en PrP^{Sc}, et soit à l'origine de la création et de la propagation des souches de prion, via une transmission conformationnelle. La transmission de l'ESB et du nv-MCJ à des souris reproduit un profil biochimique stable identique à celui obtenu à partir des isolats primaires (Collinge, et al., 1996 ; Hill, et al., 1997).

Ces éléments démontrent une variabilité biochimique de la PrP^{Sc} et une relation de ces caractères biochimiques avec la définition des souches.

Des expériences de transconformation *in vitro* de PrP^C en PrP^{Sc} par de la PrP^{Sc} issue de hamsters atteints par les souches 'hyper' et 'drowsy' aboutissent à la néosynthèse de PrP^{Sc} ayant les mêmes propriétés biochimiques que les souches d'origine (Bessen, et al., 1995). Par ailleurs, des expériences du même type ont permis de démontrer que la PrP^{Sc} elle-même est capable d'appliquer son propre profil de glycosylation à de la PrP^C trans-conformée *in vitro*. En revanche *in-vivo* ce phénomène « d'impression d'empreinte » reste influencé par la cellule où se produit la trans-conformation (Vorberg, et al., 2002). Toutefois les caractères biochimiques de la PrP^{Sc} tels qu'ils sont actuellement appréhendés semblent insuffisants pour assurer la discrimination de toutes les souches définies par les bio-essais .

4. PrP et barrière d'espèce

La souche de tremblante 263K (hamster) ne peut être transmise à la souris. Chez des souris transgéniques pour le gène PRP de hamster, la souche 263K peut être efficacement propagée, ce qui suggère bien que la PrP puisse servir de support à la barrière d'espèce (Scott, et al., 1989). Dans l'hypothèse prion, les différences de séquence primaire de la PrP entre donneur et receveur seraient le support de la barrière d'espèce (Prusiner, et al., 1990 ; Scott, et al., 1992).

In vitro, une meilleure efficacité de transconformation est obtenue lorsque la PrPc et la PrPsc (nucléateur) sont homologues (Kocisko, et al., 1994). Par ailleurs des interactions entre protéines prion hétérologues (hamster et souris) peuvent interférer et inhiber la conversion en PrPsc de protéines prion homologues (Horiuchi, et al., 2000).

Lors de passage transpécifique en série, les durées d'incubation observées se réduisent avant de se stabiliser. Ce phénomène s'expliquerait par une moindre efficacité de la réaction de conversion due à la différence des séquences primaires de PrPc / PrPsc inoculée (Prusiner, et al., 1990 ; Scott, et al., 1993). Toutefois si cette hypothèse peut expliquer une moins grande efficacité initiale à la transconformation elle ne saurait expliquer la réduction de la durée d'incubation au-delà du premier passage.

L'identité de séquence PrP entre animal inoculé et donneur ne conduirait pas systématiquement à une augmentation de la sensibilité aux EST *in vivo*. Ainsi, certaines souris transgéniques surexprimant la PrP humaine se sont révélées moins sensibles au nv-MCJ que des souris conventionnelles (Hill, et al., 1997), de même que certaines lignées de souris transgéniques bovines avec l'ESB (Scott, et al., 1999). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs que la séquence primaire en acides aminés de la PrP interviennent et que le concept du prion en l'état actuel des connaissances ne permet pas d'expliquer tous les phénomènes observés.

5. Les limites du concept prion

Certaines données expérimentales sont difficilement explicables par la théorie du prion et son axiome principal : la PrPres est le support de l'infectiosité.

Ainsi l'inoculation d'un isolat d'ESB à des souris C57Bl6 (en 1^{er} passage) a entraîné une maladie chez tous les animaux inoculés. Pour 55% de ces animaux aucune accumulation de PrPres n'était détectable dans le SNC. Un homogénat de cerveau préparé à partir de ces

animaux contenait une infectiosité comparable (durée d'incubation, incidence) à celle issue des animaux PrPres positifs (Lasmezas, et al., 1997).

Les travaux de fractionnement moléculaire réalisés par plusieurs équipes indiquent que la plus grande part de l'infectiosité présente dans un homogénat tissulaire n'est pas liée à la PrP (Sklaviadis, et al., 1993 ; Manuelidis, et al., 1995 ; Somerville, et al., 1996 ; Manousis, et al., 2000). L'infectiosité associée à ces fractions purifiées (débarrassées de la plus grande part de la PrP) est sensible à une dénaturation par le SDS (perte de la quasi totalité de l'infectiosité) alors que de telles conditions dénaturantes sont sans effet sur l'infectiosité avant fractionnement (Manuelidis 1995). Par ailleurs, s'il est possible de générer de la PrPsc *de novo* en mélangeant de la PrPc avec un très large excès de PrPsc (Kocisko, et al., 1994), aucune infectiosité associée à de la PrPsc transconformée *in vitro* n'a pu être détectée (Kocisko, et al., 1994 ; Kaneko, et al., 1995 ; Hill, et al., 1999). De la même manière la PrPsc dénaturée en guanidine puis renaturée (Prusiner, et al., 1993 ; Kocisko, et al., 1994) perd son infectiosité.

Sans apporter d'éléments en faveur d'une théorie virale, ces éléments suggèrent un découplage entre infectiosité et PrPres.

IV. PATHOGENESE DES EST

De nombreux éléments du schéma de dissémination de l'agent dans l'organisme sont à présent établis et les acteurs cellulaires identifiés. L'infection naturelle peut être divisée en phases successives :

- (i) une phase de lympho-invasion, qui ne semble pas indispensable à l'infection mais qui la favorise, et au cours de laquelle la PrPsc va progressivement s'accumuler dans toutes les formations lymphoïdes secondaires
- (ii) une phase de neuro-invasion au cours de laquelle de la PrPsc va s'accumuler d'abord dans les neurones du système nerveux autonome puis dans ceux du système nerveux central.

A. CONTAMINATION ET LYMPHO-INVASION

1. Contamination

Lors de tremblante, il semble établi que la voie majeure de contamination est digestive.

La consommation de tissus infectieux semble également être la source des cas d'ESB chez les fauves en captivité (Wilesmith, et al., 1991) et des cas de nv-MCJ chez l'homme (Bruce, et al., 1997 ; Hill, et al., 1997).

Un schéma synthétique de la propagation du prion à travers la barrière digestive et mettant en place les différents acteurs cellulaires est représenté figure 5.

Après exposition à l'agent, une accumulation de PrPsc est rapidement détectable dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif : les plaques de Peyer (Heggebo, et al., 2000). Dans ces structures, certaines cellules épithéliales, appelées cellules M (microfold) sont des sites clefs du micro-échantillonnage antigénique à partir de la lumière digestive (Kraehenbuhl, et al., 2000). Les cellules M sont connues comme porte d'entrée de nombreuses bactéries telles que *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Typhi*, *Shigella flexneri* ou encore *Vibrio cholerae*. Des travaux menés *in vitro* indiquent que la présence de cellules M différenciées au sein d'un épithélium serait suffisante à un transport transépithélial du prion (Heppner, et al., 2001). L'inoculation orale par de la PrPsc de hamster a permis de caractériser la présence de la molécule pathogène dans les cellules M (Beekes, et al., 2000). Ces cellules internalisent donc des particules endo-luminales par micro-pinocytose, puis les transfèrent aux cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (DC), véritables cellules nomades largement présentes dans l'organisme (Banchereau, et al., 1998) expriment la PrPc à un niveau élevé (Burthem, et al., 2001). Elles s'apparentent à des cellules de type monocyte/macrophage, et possèdent une fonction de cellule présentatrice d'antigène (CPA). Elles transportent donc les antigènes aux centres germinatifs folliculaires où ils sont présentés aux lymphocytes B.

2. Cellules présentatrices d'antigènes et dissémination vers les centres germinatifs

Chez les ovins, des cellules de phénotype CD68+ situées dans les micro-poches adjacentes aux cellules M, sont capables d'accumuler très précocement de la PrPsc (Andreoletti, et al., 2000 ; Andreoletti, et al., 2002). Dans l'espèce ovine, CD68 est exprimé à la fois par les macrophages et les cellules dendritiques. Ces deux types cellulaires sont spécialisés dans l'échantillonnage du micro-environnement, la dégradation et la présentation d'antigènes.

Différentes expérimentations, *in vitro* et *ex vivo*, ont récemment mis en évidence le rôle potentiel des phagocytes mononucléés résidents dans la capture et le transport de la PrPsc vers les centres germinatifs locaux et les autres lymphocentres (Aucouturier, et al., 2001 ; Huang, et al., 2002).

Certains travaux ont suggéré que les cellules dendritiques puissent également participer à la dissémination et au transport de la PrPsc directement vers les tissus nerveux et le SNC, en l'absence d'étape de réplication de l'agent dans le système lymphoréticulaire (Aucouturier, et al., 2001). Cependant, ces résultats ont été récemment contestés (Oldstone, et al., 2002).

Une déplétion, même transitoire et partielle, de ces populations cellulaires semble augmenter sensiblement l'efficacité de la contamination lors d'inoculation orale chez la souris (Beringue, et al., 2000). Par ailleurs, le titre infectieux d'un homogénat de cerveau diminue au contact de macrophages péritonéaux de souris (Carp, et al., 1982).

L'ensemble de ces données suggère une dualité des CPA vis à vis du prion, pouvant être à la fois vecteurs de la dissémination de l'agent et capables de le dégrader *in vivo*.

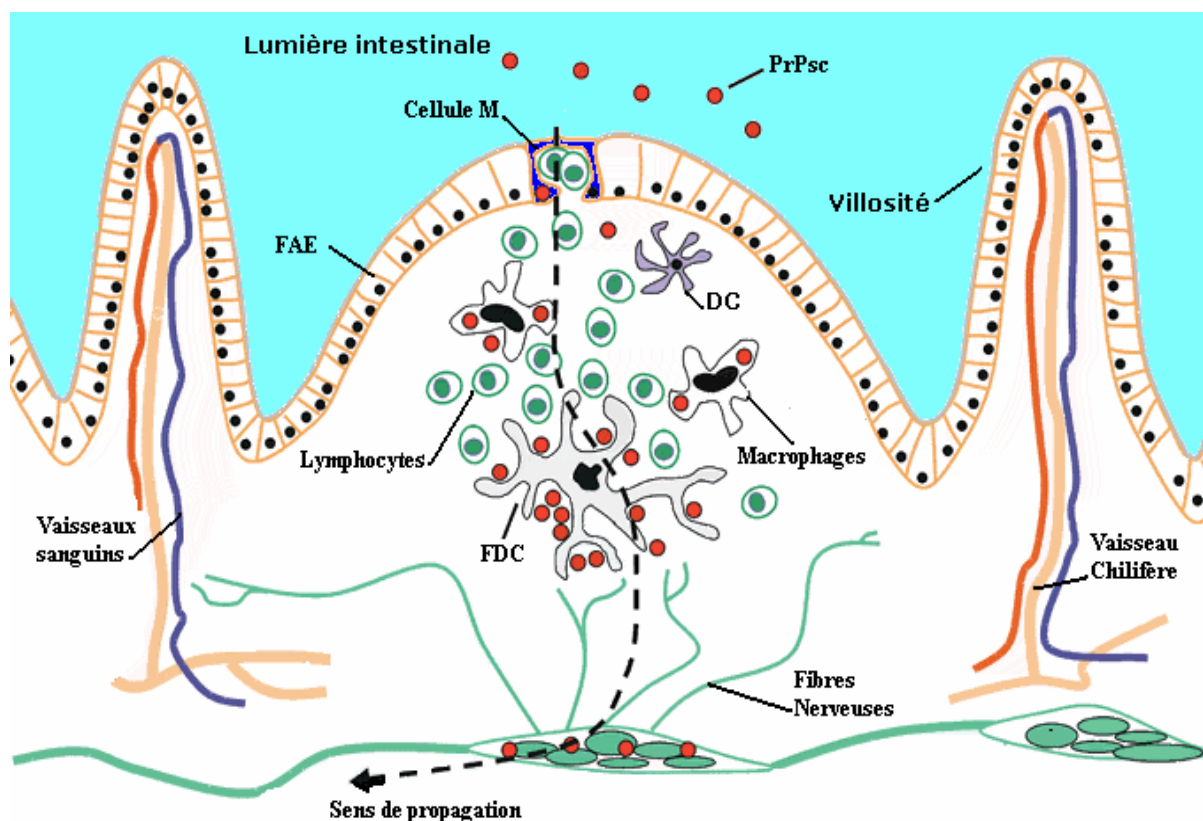


Figure 5 : Représentation schématique du trajet du prion à travers la barrière intestinale jusqu'au SNP et de la localisation des différents acteurs cellulaires (Mabbott, et al., 2001).

(Légende : FAE : Entérocytes associés aux follicules ; FDC : Cellule dendritique folliculaire)

3. Implication des cellules folliculaires dendritiques (FDC).

Les données actuellement disponibles semblent indiquer un rôle essentiel des cellules folliculaires dendritiques dans l'établissement d'une infection pérenne dans les lymphocentres secondaires.

L'origine des FDC demeure incertaine (Kapasi, et al., 1998 ; Tkachuk, et al., 1998 ; Endres, et al., 1999). Les FDC ne subissent pas de mitose, sont résistantes aux rayonnements γ et leur longévité est élevée. Elles sont spécialisées dans la capture et la rétention d'antigènes à leur surface, sous la forme de complexes immuns antigène/anticorps, et/ou du facteur C3 du complément. Les FDC expriment fortement la PrPc, et des quantités importantes de PrPsc semblent s'accumuler dans cette population cellulaire très tôt au cours de la phase de contamination du système immunitaire (McBride, et al., 1992 ; Brown, et al., 1999).

L'importance des FDC dans la pathogenèse des infections à prion a été démontrée par différentes expérimentations. Sur des souris *RAG-1* dépourvues de FDC matures et inoculées par voie périphérique, aucune infectiosité et aucune accumulation de PrPsc n'a été détectée

dans la rate. Par ailleurs, ces souris s'avèrent moins sensibles à la maladie (mortalité faible) lors d'inoculation par voie périphérique, alors que leur mortalité est équivalente à celle observée chez les souris de phénotype sauvage lorsqu'elles sont infectées par voie intracérébrale (Brown, et al., 1999 ; Mabbott, et al., 2000).

Sur le plan cellulaire, il semble que le système du complément intervienne dans la localisation et la rétention du prion à la surface des FDC dans les premiers jours suivant l'infection. D'ailleurs, chez les souris, un déficit permanent (Klein, et al., 2001) ou temporaire (Mabbott, et al., 2001) de la fraction C3 du complément diminue l'accumulation de PrP^{sc} dans la rate et prolonge de façon significative la période d'incubation après inoculation de la tremblante par voie périphérique.

Certains résultats semblent mettre en doute, au moins partiellement, le statut de partenaire obligatoire des FDC matures. En effet, des souris transgéniques, sans FDC matures ni centres germinatifs, inoculées par voie intra-péritonéale avec une souche de tremblante, peuvent développer la maladie avec des titres élevés en prion dans les nœuds lymphatiques (Prinz, et al., 2002).

Au total, le rôle des FDC pourrait varier selon les souches et/ou la dose contaminante initiale. D'autres cellules pourraient alors entrer en jeu (Mabbott, et al., 2002).

4. Rôle des lymphocytes

Aucune preuve directe impliquant les lymphocytes T ou B dans la réplication de l'agent ou dans sa dissémination n'a été apportée à ce jour (Cashman, et al., 1990 ; Mabbott, et al., 1997 ; Brown, et al., 1999 ; Liu, et al., 2001). Toutefois, les FDC sont dépendantes d'autres partenaires cellulaires, afin d'assurer leur maturation et le maintien de leur structure, et le rôle des lymphocytes B dans le maintien de cette différenciation est essentiel (O'Rourke, et al., 1994 ; Fraser, et al., 1996 ; Klein, et al., 1998 ; Frigg, et al., 1999) (figure 6).

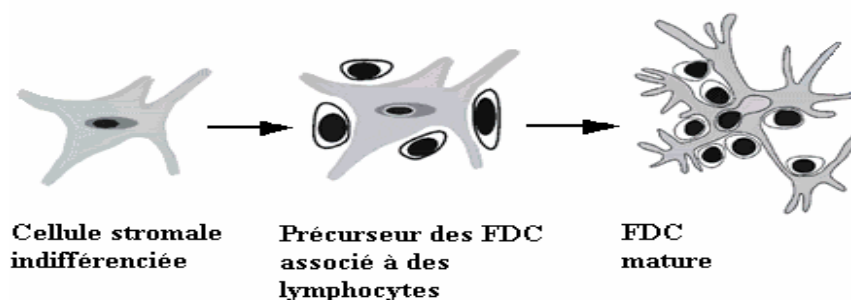


Figure 6 : Schéma de la maturation des FDC sous l'influence des lymphocytes, d'après (Mabbott, et al., 2001).

5. Lympho-invasion et interactions souche/fond génétique de l'hôte

Dans les modèles murins d'inoculation orale, la PrPsc s'accumule dans les lymphocentres, bien avant l'atteinte du SNC (Eklund, et al., 1967). La réplication primaire de l'agent dans les formations lymphoïdes ne semble pourtant pas indispensable à la neuro-invasion après contamination périphérique.

En effet, des souris SCID (dont le système lymphoïde est non fonctionnel) sont réceptives à une souche de tremblante murinisée lors d'inoculation par voie orale (Lasmez, et al., 1996).

Néanmoins, une splénectomie pratiquée avant inoculation orale chez des souris prolonge sensiblement la durée d'incubation (Fraser, et al., 1978), suggérant qu'une réplication lymphoïde primaire favorise la neuro-invasion (figure 7).

Lors d'infection naturelle, la réplication primaire de l'agent dans les organes lymphoïdes semble être très fréquente. Chez les ovins en incubation de tremblante, une accumulation de PrPsc dans les organes lymphoïdes est généralement observée (Eklund, et al., 1967 ; Kimberlin, et al., 1979 ; van Keulen, et al., 1996 ; Androletti, et al., 2000). Ce schéma connaît des exceptions notables. Chez les bovins atteints d'ESB clinique, aucune accumulation importante de PrPsc ou d'infectiosité n'est retrouvée dans les organes lymphoïdes (Somerville, et al., 1997 ; Hill, et al., 1999).

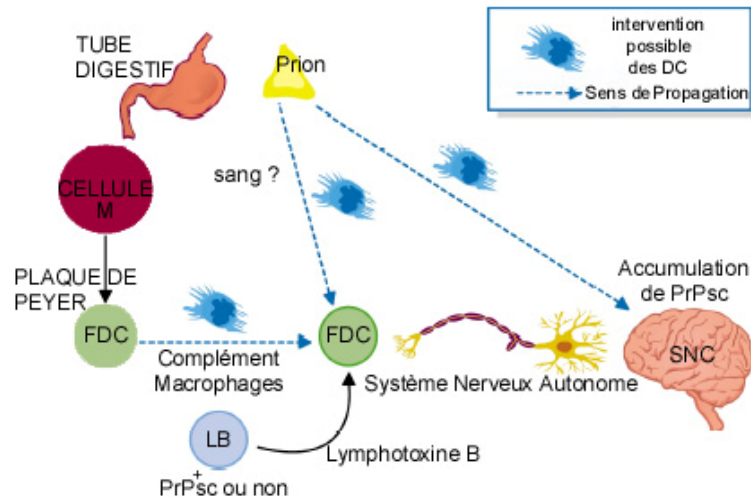


Figure 7 : Quelques aspects cellulaires et moléculaires de la propagation du prion (Aguzzi, 2001).

Chez les ovins, en revanche, lors d'inoculation orale par l'ESB, une accumulation précoce de PrPsc est observée dans les lymphocentres (Jeffrey, et al., 2001).

Dans les troupeaux ovins atteints de tremblante une forte accumulation pré clinique de PrPsc a été observée dans les organes lymphoïdes des animaux homozygotes sensibles alors que chez les animaux hétérozygotes ARR cliniquement atteints, aucune accumulation de PrPsc n'était détectée dans ces organes (van Keulen, et al., 1995).

Il semble donc que l'existence d'une répllication lymphoïde primaire dépende à la fois de la souche de prion mais aussi du fond génétique de l'hôte.

B. NEUROINVASION

Le système nerveux central (SNC) est, dans les maladies à prion, la « cible » de l'agent infectieux. Les relais cellulaires et les voies de dissémination vers cet organe sont à présent mieux connus. Toutefois, si les connaissances actuelles permettent de proposer un schéma de dissémination cohérent, il semble difficile d'affirmer que celui-ci est unique.

1. Atteinte du Système Nerveux Autonome (SNA) digestif

La motilité digestive est assurée par la musculature lisse de la paroi du tube digestif. Ces muscles sont sous le contrôle d'un réseau dense de fibres nerveuses interconnectées et contrôlées par des neurones disséminés dans la paroi du tube digestif. Ces neurones sont

organisés en plexus, eux-mêmes contrôlés par des centres de régulation neuronaux situés dans le SNC : les centres nerveux sympathiques et parasympathiques.

Les organes lymphoïdes sont largement innervés par des fibres de type sympathique (Felten, et al., 1988), et l'hypothèse d'une contamination de ces fibres au contact des organes lymphoïdes infectés a été très tôt proposée (Kimberlin, et al., 1980). En outre, le réseau du SNA digestif comporte de très nombreuses fibres nerveuses amyéliniques dont certaines innervent la zone superficielle des follicules lymphoïdes (Kimberlin, et al., 1983). Dans cette zone, les FDC sont donc très proches des terminaisons axonales (Glatzel, et al., 2000). L'hypothèse est donc celle d'une contamination directe des fibres nerveuses à partir des FDC. Cette hypothèse est soutenue par la présence précoce chez les ovins atteints de tremblante (Andreoletti, et al., 2000 ; Heggebo, et al., 2003) de PrPsc dans les neurones des plexus myentériques, situés immédiatement à proximité des plaques de Peyer.

La contamination du SNA ne semble pas s'opérer par un seul site mais bien par l'ensemble des sites d'interface entre le tissu lymphoïde annexé au tube digestif et le SNA (Andreoletti, et al., 2000).

Par ailleurs, la présence de PrPsc dans les neurones du SNA des différents segments du tube digestif (de l'œsophage au rectum) dans les phases tardives d'incubation de la maladie suggère une redistribution rapide de l'agent entre les différents groupes de neurones digestifs (van Keulen, et al., 1999).

2. Dissémination au Système Nerveux Central

Après son entrée dans le SNA, la protéine pathogène progresse vers le névraxe en suivant simultanément deux voies :

- Les fibres nerveuses sympathiques (nerfs splanchniques) qui innervent les organes digestifs et leurs formations lymphoïdes, comme le suggère l'atteinte précoce de la colonne intermedio-latérale dans la moelle épinière chez les ovins naturellement atteints de tremblante (van Keulen, et al., 2000).
- Les fibres parasympathiques et notamment celles du nerf vague, comme en témoigne la présence précoce de PrPsc dans le noyau dorsal du nerf vague chez les ovins atteints de tremblante (Ryder, et al., 2001) et chez des hamsters inoculés par voie orale (Beekes, et al., 1996 ; Baldauf, et al., 1997 ; Beekes, et al., 1998).

Ce double schéma de dissémination est retrouvé chez différentes espèces animales : la souris (Maignien, et al., 1999), le hamster (Beekes, et al., 1998 ; McBride, et al., 2001), le mouton (Andreoletti, et al., 2000 ; van Keulen, et al., 2000 ; Heggebo, et al., 2002) ou les grands ruminants sauvages (Sigurdson, et al., 2001).

Chez les bovins atteints d'ESB, l'absence de réplication apparente de l'agent dans le tissu lymphoïde soulève des questions sur les voies de dissémination au SNC. Néanmoins, la cinétique de contamination du système nerveux central semble se superposer à celle décrite chez les ovins (Wells, et al., 1998).

3. Translocation de la PrPsc par les fibres nerveuses

De nombreux travaux ont montré que la dissémination dans les fibres nerveuses est dépendante de l'expression de la PrPc par le tissu nerveux (Blattler, et al., 1997 ; Glatzel, et al., 2000 ; Race, et al., 2000). Il semble établi que la PrPc soit véhiculée dans les fibres nerveuses selon un mode rapide axonal (Borchelt, et al., 1994). Le mécanisme de propagation de la PrPsc par les fibres nerveuses reste sujet à controverse.

La première possibilité est un transport axonal. Différents mécanismes assurent le transport axonal :

- Le transport axonal rapide qui peut être de deux types : (i) le transport antérograde -du corps cellulaire vers les extrémités axonales- qui permet des déplacements à une vitesse de l'ordre de 200 à 400 mm par jour et (ii) le transport axonal rapide rétrograde -des extrémités axonales vers le corps cellulaire- qui autorise des déplacements à une vitesse de l'ordre de 100 à 200 mm par jour .
- Le transport axonal lent est mal connu. Il intéresse les protéines du cytosquelette (assemblées sous forme d'oligomères) ainsi que des protéines solubles (enzymatiques par exemple). La vitesse de ces déplacements est de l'ordre de 0,2 à 8 mm par jour.

La vitesse de propagation de la PrPsc par les fibres nerveuses est estimée, dans la plupart des modèles à environ 0,7 mm par jour (Hainfellner, et al., 1999 ; Glatzel, et al., 2000 ; Follet, et al., 2002), et n'est donc compatible qu'avec une migration axonale lente. Toutefois lors d'inoculation intra nerveuse dans le nerf sciatique, la PrPsc serait transportée selon un flux rétro-axonal rapide (Bartz, et al., 2002).

La seconde hypothèse est celle d'un mécanisme non axonal qui mettrait en jeu les cellules de Schwann. La propagation ferait alors appel à un mécanisme de type « chute de dominos », basé sur la trans-conformation de proche en proche des molécules de PrPc présentes en grand nombre à la surface des cellules de Schwann (Follet, et al., 2002).

C. PROCESSUS NEURODEGENERATIF : PERTURBATION DE L'HOMÉOSTASIE TISSULAIRE ET MORT NEURONALE LORS DES MALADIES A PRION

Bien que de nombreuses observations aient été réalisées sur des modèles animaux, les connaissances sur les perturbations tissulaires engendrées par la maladie restent d'interprétation difficile. Les modèles *in-vitro* développés pour essayer d'appréhender l'effet « du prion » sur les différents types cellulaires, soit pris isolément, soit en co-culture, se heurtent à un écueil majeur, la purification de la PrPsc native. C'est pourquoi l'étude des mécanismes d'action de la PrPsc sur l'environnement neuronal et glial a fait appel à des peptides synthétiques.

Le domaine neurotoxique de la PrPsc a été identifié, et correspond aux résidus amino acides 106 à 126 de la PrP humaine (noté HuPrP106-126) (Forloni, et al., 1993). Plus précisément, la toxicité et la capacité à former des fibrilles seraient contenues dans la région palindromique hydrophobe 113-126 du peptide. La suppression de cette région empêche la formation de PrPsc (Chabry, et al., 1998). Le peptide 106-126 partage ainsi un certain nombre des propriétés de la PrPsc. Il possède des propriétés hautement fibrillogéniques, et forme des agrégats dont la structure est riche en feuillets β (Bolton, et al., 1982 ; Tagliavini, et al., 1993 ; De Gioia, et al., 1994).

1. Activation gliale

L'activation des cellules microgliales et astrocytaires est un caractère majeur et précoce (apparition en cours d'incubation) des maladies à prion (DeArmond, et al., 1987 ; Liberski, 1987 ; Diedrich, et al., 1991).

In-vitro l'activation des cellules microgliales par le peptide 106-126 est associée à une augmentation des concentrations de calcium cytosolique, initiée par la voie de canaux voltage dépendants de type L (Florio, et al., 1996 ; Thellung, et al., 2000).

Les astrocytes semblent représenter la 1^{ère} cible de réplication de la PrPsc dans le SNC (Diedrich, et al., 1991) et leur activation serait corrélée à l'accumulation de PrPsc (Jendroska,

et al., 1991 ; DeArmond, et al., 1992 ; Giese, et al., 1998). L'effet de la PrPsc sur la prolifération astrocytaire est controversé. Le peptide Hu-PrP106-126 semble induire une astroglie (Forloni, et al., 1994). Cependant, cet effet sur les astrocytes a été ultérieurement attribué à des cellules microgliales résiduelles dans les cultures d'astrocytes (Brown, et al., 1996 ;1998), qui sont fortement activées par le peptide (Brown, et al., 1996). Par ailleurs, le peptide PrP106-126 n'induit pas de prolifération astrocytaire dans des co-cultures astrocytes-cellules microgliales issues de souris déficientes en PrPc (Brown, et al., 1996). L'ajout de cellules microgliales de type sauvage ne suffit pas à induire la prolifération de ces astrocytes déficients en PrPc (Brown, et al., 1998).

L'activation des cellules gliales *in-vivo* s'accompagne de la production de médiateurs de la réponse pro-inflammatoire (cytokines, chémokines) et de l'expression de molécules de co-stimulation en surface des cellules gliales. Plusieurs études font état de telles modifications avec parfois des discordances majeures (exemple TGF B). Toutefois il semble assez solidement établi que des médiateurs comme IL-1, TNF α ou IL-6 et PGE-2 sont produits *in vivo* (Campbell, et al., 1994 ; Kim, et al., 1999) et que cette production est corrélée spatio-temporellement à l'accumulation de la PrPsc. Le peptide PrP106-126 induit par ailleurs une production microgliale d'IL-1 et d'IL-6 (Peyrin, et al., 1999). Ces deux cytokines sont théoriquement capables de promouvoir la prolifération microgliale et astrocytaire et *in-vitro* des anticorps dirigés contre l'IL-1 et l'IL-6 inhibent la prolifération des astrocytes induite par la microglie en présence de PrP106-126 (Hafiz, et al., 2000).

Dans ce contexte pro-inflammatoire pourtant marqué, l'absence de recrutement de cellules inflammatoires leucocytaires reste toutefois un mystère à élucider.

2. Radicaux libres et stress oxydatif

L'activation des cellules microgliales par le peptide 106-126 *in-vitro* s'accompagne de la production de radicaux libres (Brown, et al., 1996), dont le niveau semble quantitativement modulé par le TNF α (Fabrizi, et al., 2001). *In-vivo*, des marqueurs d'un stress oxydatif comme la nitrotyrosine (Guentchev, et al., 2000) et le 4-hydroxynonéal (Wong, et al., 2001), ou la présence d'hème oxygénase-1 (Choi, et al., 2000), ont été mis en évidence dans des modèles murins de tremblante. La production de radicaux libres par les cellules gliales est

cohérente avec le contexte d'activation microgliale, notamment avec la production d'IL-1 et de TNF α et l'activation des voies NF-k B dépendantes (Kim, et al., 1999).

Les radicaux libres semblent influencer l'état d'activation des cellules gliales. Ainsi l'ajout de superoxyde dismutase (SOD) à une co-culture d'astrocytes et de microglie induite par la PrP106-126, limite la prolifération des astrocytes (Hafiz, et al., 2000).

Le stress oxydatif tissulaire n'est probablement pas la simple conséquence d'une augmentation de la production des radicaux libres. Il semble en effet que le processus neuroinvasif s'accompagne d'une perte d'activité de certaines molécules aux fonctions antioxydantes comme la Mn-SOD (Lee, et al., 1999).

3. Perte neuronale

Lors des maladies à prion, la perte neuronale est précoce (Jeffrey, et al., 1995) et massive (Giese, et al., 1995). Cette perte neuronale semble s'effectuer par apoptose. Les mécanismes menant à l'apoptose restent pour l'instant largement méconnus.

In-vitro, le peptide 106-126 sur des co-cultures microglies/neurones induit une mort neuronale, alors que l'exposition directe des neurones au peptide n'entraîne pas de perte de viabilité cellulaire. La toxicité du peptide semble corrélée au nombre de cellules microgliales : plus les cellules microgliales sont nombreuses plus la toxicité neuronale est forte (Brown, et al., 1996 ; Giese, et al., 1998). Par ailleurs, des antioxydants ajoutés à un tel système inhibent la toxicité neuronale du peptide PrP106-126 (Brown, et al., 1996). Ces éléments suggèrent que l'activation microgliale, *in-vivo*, puisse être directement délétère pour les neurones, notamment par la production de radicaux libres.

Le peptide PrP 106-126 a des effets directs sur les astrocytes. Il inhibe notamment la capture de glutamate par les astrocytes (Brown, et al., 1999), et augmente leur susceptibilité vis-à-vis du stress oxydatif (Brown, et al., 1998). *In-vivo*, le contexte cytokinique local (TNF α et IL-1 notamment) est susceptible d'altérer les fonctions neurotrophiques des astrocytes. Une telle situation ne peut être que délétère pour les neurones.

Dans des modèles de neuroblastome infecté de façon permanente par une souche de tremblante murinisée, des perturbations de l'homéostasie cellulaire calcique ont été notées. Si ces modifications ne semblent pas directement mettre en péril la viabilité cellulaire, elles pourraient diminuer les capacités adaptatives de ces cellules (Kristensson, et al., 1993).

L'importance réelle de tous ces mécanismes dans la physiopathologie de la mort neuronale *in-vivo* reste à démontrer. Ainsi l'inoculation intracérébrale de tremblante à des souris KO pour les gènes codant pour IL-6 ou TNF α permet de reproduire la maladie sans modification notable par rapport aux souris sauvages (Mabbott, et al., 2000). Par ailleurs, l'utilisation du peptide PrP106-126 dans les travaux de neurotoxicité *in-vitro* demeure extrêmement critiquable.

V. DIAGNOSTIC DES EST

Les outils diagnostiques des EST relèvent d'un double objectif : (i) permettre la détection pré-clinique la plus précoce possible des individus atteints, et (ii) confirmer une suspicion clinique.

Une détection pré-clinique est, dans l'espèce humaine, indispensable à la mise en œuvre de thérapeutiques (encore à définir) préventives de l'atteinte neurodégénérative. Pour les espèces animales, la mise en œuvre de tests pré-cliniques, en l'absence d'autres moyens de lutte (comme l'outil génétique chez les ovins), semble nécessaire à une prophylaxie efficace et acceptable socialement et économiquement.

La suspicion clinique d'EST est souvent tardive, les symptômes de la maladie étant peu évocateurs en début d'évolution. La suspicion est par ailleurs difficile à confirmer du vivant de l'individu. La palette des examens complémentaires, même en médecine humaine, reste limitée et d'une fiabilité relative. Le diagnostic est le plus souvent réalisé *post-mortem*.

Les outils diagnostiques utilisés dans les EST humaines et animales reposent sur :

- l'identification des lésions microscopiques pathognomoniques dans l'encéphale
- la mise en évidence des Scrapie Associated Fibrills (SAF)
- la détection immuno-chimique de l'isoforme anormal de la protéine prion (PrP^{sc})
- la mise en évidence d'infectiosité par transmission aux rongeurs de laboratoire.

Du vivant de l'individu, les techniques de détection immuno-chimique de la PrP^{sc} sont effectivement appliquées à des prélèvements biopsiques de tissu lymphoïde ou cérébral. D'autres techniques, moins invasives mais de spécificité réduite sont utilisées dans l'orientation diagnostique. Elles sont basées (i) sur la détection de marqueurs biochimiques ou moléculaires, (ii) sur des modifications fonctionnelles tissulaires associées à la maladie, ou (iii) sur des modifications lésionnelles mises en évidence par des techniques d'imagerie médicale.

Des efforts très soutenus ont été développés pour la mise au point et la validation de tests qui seraient à la fois précoces, spécifiques, sensibles et peu invasifs.

A. EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE

Il s'agit encore aujourd'hui de la technique de référence pour la confirmation *post-mortem* des suspicions cliniques d'EST. L'encéphale est prélevé et fixé dans une solution de formol à 10% (4% de formaldéhyde final) pendant une dizaine de jours, avant d'être recoupé et inclus en paraffine. Les coupes réalisées sont ensuite colorées à l'Hemalun Eosine avant un examen microscopique qui permet l'identification des lésions élémentaires (astrocytose, vacuolisation perikaryonique, spongieuse neuropilaire, perte neuronale, dépôts amyloïdes), dont l'association est typique des EST.

1. Distribution des lésions dans l'encéphale

La distribution des lésions est variable selon la maladie et l'espèce, mais aussi parfois à l'intérieur d'une même entité morbide.

Cette variabilité doit être reliée à l'interaction souche/fond génétique de l'hôte et doit être rapprochée de ce qui est observé lors du typage de souche chez la souris.

a. Cas de l'espèce humaine

Dans l'espèce humaine, la forte variabilité non seulement du tableau clinique mais aussi du tableau lésionnel reflète l'existence d'entités particulières.

*** Distribution des lésions vacuolaires**

Dans les cas de Maladie de Creutzfeldt Jakob sporadique, qui représentent la grande majorité des cas d'EST humaines, la spongieuse est l'élément dominant du tableau lésionnel. Cette spongieuse siège généralement dans le cortex cérébral (plus particulièrement dans les couches 3 et 5), et pour une majorité des cas dans le ganglion basal, le thalamus et le cervelet. Dans le cervelet, la localisation et l'intensité des lésions sont très variables (Masters, et al., 1978), ce qui illustre qu'au sein même du groupe des patients atteints de MCJ sporadique, une diversité assez marquée de la distribution des lésions peut être observée.

Dans les cas d'IFF, des lésions vacuolaires n'ont été qu'occasionnellement décrites dans le cortex cérébral (Manetto, et al., 1992). L'essentiel des lésions nerveuses siège dans les noyaux dorsaux médiaux du thalamus, qui restent le plus souvent épargnés par la spongieuse (Collinge, et al., 1990 ; Gambetti, et al., 1995).

*** Morphologie et distribution des plaques amyloïdes**

Des plaques amyloïdes ne sont retrouvées que dans environ 10% des cas de MCJ sporadiques. Elles sont généralement rondes, uni-centriques et localisées dans le cervelet, mais peuvent aussi être retrouvées dans le thalamus, le ganglion basal ou le cortex cérébral. Les plaques dans les MCJ sporadiques seraient préférentiellement associées aux génotypes M/V et V/V au codon 129 (Pickering-Brown, et al., 1995).

Dans le Kuru, des plaques ont été identifiées dans le cervelet chez plus de 70% des cas. Les plaques amyloïdes retrouvées dans le Kuru ont un aspect radié. Des plaques radiées ou d'allure similaire ont toutefois été identifiées dans quelques cas de MCJ sporadique (Pickering-Brown, et al., 1995) et familial (Tateishi, et al., 1995).

Dans le syndrome de GSS, les plaques amyloïdes représentent un critère diagnostique majeur. Il s'agit de plaques multicentriques, souvent de taille importante, qui sont retrouvées systématiquement dans le cervelet et parfois dans le cortex cérébral ainsi que dans le thalamus et le ganglion basal (Ghetti, et al., 1989).

Dans les cas de nv-MCJ, consécutifs à la contamination par l'ESB, les plaques amyloïdes sont dites plaques florides, car elles sont bordées par une couronne de micro-vacuoles et de cellules microgliales. Ces plaques permettent d'établir sinon un diagnostic du moins une très forte suspicion (Kopp, et al., 1996).

b. Animaux domestiques

Chez les petits ruminants atteints de tremblante, les lésions sont préférentiellement localisées dans le tronc cérébral (Wood, et al., 1997). Chez les bovins atteints par l'ESB, leur localisation peut être très restreinte et se limiter à quelques noyaux gris du tronc cérébral postérieur (Wells, et al., 1995).

Toutefois dans certains cas décrits chez les ovins (Benestad, et al., 2003), les lésions épargnent le tronc cérébral et touchent le cortex cérébral. Cette distribution lésionnelle atypique est associée à une souche particulière qualifiée de NOR98. Chez les ovins l'utilisation du profil lésionnel, comme chez la souris, pour différencier des souches, ne paraît pas adaptée. En effet, le profil lésionnel observé varie pour une même souche de tremblante en fonction de la race et du génotype de l'animal (Begara-McGorum, et al., 2002). Par ailleurs, chez des ovins ARQ/ARQ inoculés avec de l'ESB, le profil lésionnel diffère quelque peu de celui de quelques animaux atteints de tremblante naturelle et du même génotype

(Ligios, et al., 2002). Toutefois, rien ne permet pour le moment d'étendre ces résultats à l'ensemble des souches de tremblante naturelle et aux autres génotypes ovins.

2. Un outil spécifique, mais peu robuste et peu sensible

L'identification des lésions vacuolaires associées à une gliose sur un prélèvement histologique de bonne qualité permet de conclure sans difficulté à une EST. Toutefois, des artéfacts spongiotiques sur des prélèvements de tissu mal ou tardivement fixés ne sont pas rares et rendent le diagnostic par cette technique sinon impossible du moins très difficile. Par ailleurs, les lésions vacuolaires, qui représentent la pierre angulaire du diagnostic, peuvent être absentes ou peu intenses. Chez l'homme, l'IFF est classiquement sans lésion vacuolaire majeure. Chez les bovins, les lésions vacuolaires sont d'intensité trop réduite dans 6-10% des cas pour permettre le diagnostic (Wells, et al., 1994). Chez les ovins, l'identification de lésions vacuolaires peut s'avérer très difficile voire impossible, et conduirait alors à un diagnostic faussement négatif dans environ 5% des cas (Wood, et al., 1997).

Enfin l'histopathologie, comme outil de détection en phase d'incubation (dépistage pré-clinique), s'avère inefficace tant les lésions de spongiose sont d'apparition tardive.

B. IDENTIFICATION DES SAF

Cette méthode repose sur la technique mise au point par Merz (Merz, et al., 1984). La préparation s'effectue à partir de fractions synaptosomales et membranaires synaptiques qui sont extraites en milieu détergent avant digestion par la protéinase K (Hilmert, et al., 1984). Ces préparations sont ensuite observées en microscopie électronique à transmission après coloration négative. Au moins 20 mailles de la grille doivent être observées pendant un minimum de 20 minutes.

Les SAF peuvent être de deux types :

* Le type 1 correspond à l'association de deux fibrilles de 2-4 nm de diamètre formant des filaments de 12-16 nm de long. Ces filaments s'associent entre eux (espace de 2-4 nm entre chaque filament) pour former des agrégats généralement linéaires mais qui peuvent occasionnellement présenter des courbures aiguës. Ils peuvent mesurer de 100 à 500 nm de long.

* Le type 2 correspond à l'association de 4 fibrilles disposées parallèlement et formant des filaments de 27-34 nm de diamètre. Ces filaments peuvent s'associer de façon extrêmement variable (Merz, et al., 1981).

Cette méthode, bien que lourde (mise en œuvre et équipements requis), est considérée comme extrêmement spécifique et permet le diagnostic à partir de tissus autolysés (Scott, et al., 1992 ; Stack, et al., 1993). Toutefois sa sensibilité n'est pas bonne (Wells, et al., 1994) et sa mise en œuvre sur des tissus non nerveux (organes lymphoïdes) conduit à de nombreux faux négatifs qui semblent liés à des problèmes d'extraction de la PrPsc (Stack, et al., 1998).

Si cette technique paraît peu adaptée au diagnostic de première intention ou au criblage à grande échelle, elle n'en demeure pas moins l'un des outils possibles pour la confirmation d'un résultat obtenu par une autre méthode.

C. ANALYSES IMMUNOCHIMIQUES

Les techniques immunochimiques sont basées sur la détection du seul marqueur spécifique actuellement reconnu des EST, la PrPsc, par des anticorps anti-PrP. Elles mettent donc en jeu les techniques classiques de détection de protéines, avec des conditions d'usage particulières liées aux propriétés physico-chimiques de la PrPsc.

1. Détection immunohistochimique(IHC)

La PrPsc est mise en évidence sur des coupes de tissus qui peuvent être fixées par le formol et incluses en paraffine. Ce mode de fixation a l'avantage de préserver la structure tissulaire, mais altère grandement certains antigènes cellulaires, comme les marqueurs de surface des leucocytes. Pour préserver ceux-ci, le tissu devrait plutôt être congelé puis fixé à l'acétone. Bien que la PrP soit une protéine de surface, sa résistance permet d'utiliser indifféremment les deux techniques, en fonction du marquage souhaité.

La forme normale (PrP^c) de la protéine prion peut être révélée sur coupes congelées ou en paraffine, selon des protocoles classiques d'immunohistochimie (Heggebo, et al., 2000). En revanche, la mise en évidence de la forme pathologique (PrP^{sc}) nécessite des pré-traitements possibles uniquement sur coupes en paraffine.

La plupart des anticorps disponibles reconnaissent les deux isoformes PrP^c et PrP^{sc} (Paramithiotis, et al., 2003). De plus, l'accumulation sous forme amyloïde de la PrP^{sc} diminue fortement l'accessibilité des épitopes. Le marquage de la PrP^{sc} suppose donc un prétraitement avec d'une part l'élimination préalable de la PrP^c, et d'autre part un démasquage antigénique de la PrP^{sc}. Ces 2 étapes reposent sur la résistance exceptionnelle de la PrP^{sc} aux différents traitements physico-chimiques. Un prétraitement des coupes par l'acide formique (Kitamoto, et al., 1987) combiné à un autoclavage en milieu humide (Haritani, et al., 1994 ; Van Everbroeck, et al., 1999) sont efficaces pour obtenir un marquage spécifique et sensible de la PrP^{sc}, et ont fait l'objet d'une standardisation en matière de diagnostic des EST (Bell, et al., 1997).

La PrP^{sc} est mise en évidence par des anticorps polyclonaux de lapin ou monoclonaux de souris, obtenus à partir de souris *Prnp*^{0/0}, susceptibles par conséquent de développer une réponse contre la PrP ou le peptide dérivé servant d'immunogène (Williamson, et al., 1996).

Les protocoles d'immunohistochimie sont extrêmement variables et l'interprétation du résultat demeure subjective. Toutefois, le marquage immunohistochimique permet la localisation (distribution) intra tissulaire des dépôts de PrP^{sc} et l'identification des populations cellulaires accumulant du prion (van Keulen, et al., 1996).

2. Western-blot (WB)

La détection de la PrP^{sc} par western-blot est réalisée à partir de SAF purifiées provenant d'un homogénat de tissu. L'homogénat est soumis à une digestion par la PK qui permet de détruire la PrP^c et d'éliminer le domaine N-terminal de la PrP^{sc}. Sur l'électrophorégramme, seul le domaine C-terminal porteur des sites de glycosylation migre avec une diminution de poids moléculaire entre la PrP non digérée et la PrP^{sc} digérée. La migration électrophorétique est effectuée en conditions dénaturantes (Sodium Dodécyl Sulfate) et réductrices (β -mercaptoéthanol). La vitesse de migration est alors fonction du poids moléculaire et de l'état de glycosylation.

Après transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur membrane, la révélation s'effectue à l'aide d'anticorps anti-PrP. Le profil classiquement obtenu comporte 3 bandes qui

correspondent aux formes di-, mono- et non-glycosylée de la PrP. Le pourcentage relatif de l'intensité de ces 3 bandes, associé au poids moléculaire des bandes, sert de support à la différenciation biochimique de certaines souches de prion entre elles (Collinge, et al., 1996).

Cette technique est employée par l'un des tests (Prionics AG, distribué par Roche Diagnostics, Suisse) retenus par la Commission Européenne pour le dépistage systématique de l'ESB depuis 1999.

Le western-blot, par la présence des trois bandes aux poids moléculaires attendus, offre une spécificité jugée supérieure à l'immunohistochimie et à l'ELISA. Par ailleurs, et contrairement à l'histologie, il peut être utilisé sur des échantillons autolysés. Toutefois c'est une technique qui semble moins sensible (en tout cas dans sa version commerciale) que l'IHC ou l'ELISA.

En outre, certains isolats de tremblante des petits ruminants sont difficiles à détecter par cette méthode. Ces isolats semblent en effet extrêmement sensibles à la digestion par la PK et aux conditions classiques de protéolyse utilisées en WB. Il en résulte soit une absence totale de signal (résultat faux négatif), soit, dans des conditions de protéolyse plus ménagée, un signal positif mais sans 'shift' de bande.

3. Détection par ELISA

Cette méthode fait appel à un procédé d'immunocapture de la PrP^{sc} sur phase solide. Après digestion à la PK des homogénats de tissu, une précipitation en solvant organique des SAF est effectuée par centrifugation basse vitesse. Les culots obtenus sont dénaturés et mis à incuber dans des plaques micro puits au fond desquelles est adsorbé un Ac anti-PrP. Un autre Ac anti-PrP (dirigé contre un épitope différent) couplé à une enzyme est alors appliqué. Un chromogène permet de révéler la réaction.

La spécificité de cette technique, lorsqu'elle est appliquée à des prélèvements d'ESB, est aussi élevée que celle du western-blot, mais sa sensibilité analytique est plus élevée (Moynagh, et al., 1999). Un test basé sur ce principe (Platelia™ mis au point par le CEA et distribué par Bio-Rad) a été validé par la Commission Européenne pour le diagnostic de l'ESB.

L'intérêt de l'ELISA est (i) une grande facilité de mise en œuvre, (ii) une grande rapidité d'exécution et (iii) la possibilité de traiter de grandes séries échantillons. Le test commercialisé par la société Biorad et destiné au diagnostic de l'ESB est au moins aussi sensible que l'histologie, l'immunohistochimie, la détection des SAF ou le western blot (Grassi, et al., 2001). Par ailleurs pour l'ESB, ce test est aussi sensible que les tests

d'infectiosité sur souris, qui restent la technique de référence (Deslys et al, 2001 ; Grassi et al., 2001).

4. Electrophorèse capillaire

Cette méthode de détection est basée sur le principe du déplacement d'équilibre par compétition. Une solution contenant un peptide synthétique PrP marqué (fluorescent) et un anticorps dirigé contre ce peptide est préparée ; le peptide est en excès dans le mélange. Lorsque ce mélange est soumis à une migration (champ électrique) dans un capillaire, on obtient une séparation entre la forme libre du peptide et la forme liée à l'anticorps (deux pics de fluorescence). Après digestion par la PK et extraction/purification, l'ajout de molécules de PrPres issues d'un échantillon dans le mélange entraîne un déplacement de l'équilibre peptide lié / peptide libre, en augmentant la fraction libre de peptide.

Cette méthode a été appliquée avec succès à des prélèvements issus de brebis, de hamster et de bovins atteints d'EST (Schmerr, et al., 1997 ; 1998 ; 1999 ; Grassi, et al., 2001). Elle a permis de détecter de la PrPres dans les fractions cellulaires mononucléées sanguines de jeunes agneaux en incubation de tremblante (Schmerr, et al., 1999). Si la méthode est élégante et extrêmement sensible (niveau de sensibilité de l'ordre de l'atomole), de nombreux écueils techniques, essentiellement liés à l'extraction et la purification de la PrPres sous une forme compatible avec la technique, rendent son exploitation délicate. Son niveau de sensibilité extrême pose par ailleurs des problèmes liés (i) à la spécificité des signaux obtenus, et (ii) à la signification biologique des résultats.

D. TEST D'INFECTIOSITE SUR RONGEURS DE LABORATOIRE

Cette méthode a le grand avantage de révéler la présence d'infectiosité, indépendamment de la présence de PrPsc, mais reste lourde et coûteuse. Du simple fait des durées d'incubation, le bio-essai ne peut servir de méthode de première intention pour le diagnostic. Par ailleurs, la barrière d'espèce peut, avec certaines souches, empêcher la transmission primaire.

Toutefois la méthode garde tout son intérêt pour le typage de souches et permet notamment de différencier les souches de tremblante de l'ESB (Bruce, et al., 1997).

Des souris transgéniques, surexprimant le gène PrP de différentes espèces (Murine, Ovine, Bovine, Humaine), ont récemment été développées, dans le but de faciliter l'utilisation des tests d'infectiosité. En effet, ces modèles doivent théoriquement permettre d'améliorer les

problèmes liés au franchissement des barrières d'espèce (homologie des séquences PrP de l'hôte et de la PrPsc infectieuse) et aux durées d'incubation (réduction de la durée par augmentation des niveaux d'expression de la PrPc). Certaines lignées transgéniques ont effectivement permis de réduire significativement les durées d'incubation, comme la lignée Tga20 (transgénique 10x pour le gène PrP murin) avec les souches murinisées (Buschmann, et al., 2000) ou comme les souris Tg338 transgéniques pour l'allèle VRQ du gène PrP ovin avec les souches de tremblante (Vilotte, et al., 2001). Dans d'autres cas, les améliorations attendues n'ont pas été observées, comme pour certaines souris transgéniques pour le gène PrP bov, chez qui les durées d'incubation de l'ESB sont identiques voire supérieures à celles observées chez les souris RIII (Scott, et al., 1999 ; Buschmann, et al., 2000).

E. VERS UN DIAGNOSTIC PRECLINIQUE

Le dépistage préclinique et/ou une aide au diagnostic dans les phases cliniques précoces est un objectif majeur en santé animale et humaine.

1. Recherche de prion dans les fluides biologiques

Dans l'urine, une forme de PrP protéase-résistante (UPrPsc) a été mise en évidence chez des hamsters, des bovins et des hommes atteints d'EST. La nature exacte de cette U-PrPsc reste à déterminer et aucune preuve de son infectiosité n'est à ce jour disponible. Chez le hamster cette UPrPsc semble apparaître très précocement (dès le premier quart de la période d'incubation) (Shaked, et al., 2001). A l'heure actuelle aucune donnée sur la précocité d'apparition de cette protéine dans les urines n'est disponible chez les ruminants ou chez l'homme.

Dans le sang, la présence d'infectiosité a été démontrée sur des modèles murins (Manuelidis, et al., 1978 ; Diringer, 1984 ; Brown, et al., 1998) et plus récemment chez des brebis cliniquement atteintes et en incubation de tremblante naturelle et d'ESB (Houston, et al., 2000 ; Hunter, et al., 2002) et sur un modèle simien inoculé avec de l'ESB (Bons, et al., 2002).

Chez les ovins, une transmission effective de la maladie est possible par l'utilisation de sang complet prélevé sur des donneurs à mi-incubation. Même si les volumes transfusés sont élevés, les durées d'incubation chez les animaux récepteurs sont proches de celles obtenues

par une injection intraveineuse d'une grande quantité (0,2 g de cerveau issu de bovin ESB) d'infectiosité, ce qui suggère une infectiosité circulante importante (Hunter, et al., 2002).

Dans les modèles rongeurs (Brown, et al., 1998 ; Brown, et al., 1999) la plus grande part de l'infectiosité du sang semble associée à la fraction cellulaire mononucléée. Les résultats obtenus sur modèle simien sont compatibles avec une présence d'infectiosité dans le buffy-coat même si les fractions acellulaires et les hématies n'ont pas été testées (Bons, et al., 2002). Dans le modèle ovin, l'infectiosité est retrouvée dans le buffy-coat, mais les niveaux observés (sur la base des durées d'incubation chez les ovins transfusés) semblent sensiblement moins élevés que pour le sang total (Hunter, et al., 2002).

Différentes compagnies privées et équipes de recherche travaillent actuellement à l'élaboration de tests sanguins diagnostiques applicables aux maladies à prion. Toutefois, les résultats actuels, même si certaines approches semblent prometteuses, ne permettent pas d'envisager à court terme l'élaboration d'un outil diagnostique préclinique robuste.

2. Recherche de PrPsc sur biopsie tissulaire

Cette technique repose sur la détection de PrPsc dans les organes lymphoïdes secondaires d'un accès relativement aisé. Le prélèvement est ensuite soumis à une détection immunohistochimique de la PrPsc. La méthode a été initialement développée chez les ovins infectés par la tremblante. Il est possible de détecter de la PrPsc dans les amygdales d'ovin en incubation de la maladie plus d'un an avant les signes cliniques (Schreuder, et al., 1996 ; van Keulen, et al., 1996 ; Schreuder, et al., 1998). Cependant l'apparition de PrPsc dans les amygdales varie notamment en fonction du génotype de l'animal (Schreuder, et al., 1998) ; pour certains génotypes, une biopsie d'amygdale négative n'implique pas forcément que l'animal soit indemne (Schreuder, et al., 1996 ; van Keulen, et al., 1996 ; Schreuder, et al., 1998).

Plus récemment une alternative à la biopsie d'amygdale a été proposée chez les ovins et les ruminants sauvages, par prélèvement du tissu lymphoïde de la membrane nictitante (« 3^e paupière ») (O'Rourke, et al., 2000). Une seule publication fait état de tests comparatifs entre les amygdales, la 3^e paupière et l'encéphale, avec la même technique d'immunodétection de la PrPsc. Sur 16 brebis positives en PrPsc dans le cerveau et l'amygdale, la troisième paupière était négative sur 3 d'entre elles (O'Rourke, et al., 2000). Lors de biopsie de la 3^e paupière, le nombre de follicules prélevés dépend de la zone, mais s'avère souvent réduit

(systématiquement < 6 et souvent < 3) (Thuring, et al., 2000). Sur les animaux âgés la densité folliculaire semble diminuer. Un faible nombre de follicules lymphoïdes rend l'interprétation délicate. Ainsi, seuls 80 % des échantillons (sur environ 700 ovins issus de 22 troupeaux) étaient exploitables en immuno-histochimie (O'Rourke, et al., 2002). Chez l'homme, une biopsie d'amygdale ou le prélèvement de l'appendice permet de conforter une suspicion de nv-MCJ (Hill, et al., 1997 ; Hilton, et al., 1998).

Toutefois les biopsies tissulaires ne peuvent être utilisées dans tous les cas. En effet chez les bovins atteints d'ESB ou chez les individus atteints de MCJ sporadique l'accumulation de PrP^{sc} dans les organes lymphoïdes secondaires n'est pas ou exceptionnellement détectable (Wells, et al., 1998).

VI. SUSCEPTIBILITE GENETIQUE DES PETITS RUMINANTS AUX EST

A. EXEMPLE DE LA TREMBLANTE OVINE

1. Données historiques

Les travaux de transmission expérimentale de la tremblante, initiés en 1938 sur les ovins au Royaume-Uni, ont apporté une contribution essentielle aux connaissances des facteurs génétiques (Dickinson, 1976).

Des lignées de moutons ont été sélectionnées sur la base de leur réponse à la contamination par un inoculum standardisé de tremblante, « SSBP/1 » (Sheep Scrapie Brain Pool n°1) constitué d'un mélange d'encéphales d'animaux atteints de tremblante. Ces expériences furent organisées dans trois races, Cheviot, Herdwick et Swaledale (Hunter, et al., 1991). Les observations (NPU d'Edimbourg) en race Cheviot ont permis de caractériser des lignées positives (sensibles) et négatives (résistantes). La réponse très forte à la sélection contre la sensibilité observée dans la lignée négative (Dickinson, 1976) fut attribuée après croisements des deux lignées, à l'effet d'un gène à effet majeur : le gène Sip (pour Scrapie incubation period). Ce gène porte deux allèles en ségrégation, l'un nommé sA (short incubation) et l'autre pA (prolonged incubation) (Dickinson, et al., 1968). La ségrégation de ce locus fut également démontrée dans la race Herdwick (Nussbaum, et al., 1975) ainsi que dans la race Swaledale (Hoare, et al., 1977). Les premières analyses ont suggéré un effet dominant de l'allèle sA, mais une dominance partielle fut démontrée par la suite, la durée d'incubation de la tremblante étant plus longue chez les animaux hétérozygotes que chez les homozygotes sAsA (Foster, et al., 1991).

2. Implication du gène PRP et de son polymorphisme

Vingt ans après la découverte de l'implication de ces allèles, un polymorphisme génétique de longueur des fragments de restriction (RFLP) (vraisemblablement en déséquilibre de liaison avec les mutations causales responsables des phénotypes observés), et lié au locus Sip fut découvert en utilisant des sondes du gène PRP et les enzymes de restriction EcoR1 et HindIII (Hunter, et al., 1989). Il est à présent établi que Sip et PRP sont un seul et même gène. Des

travaux ultérieurs faisant appel à d'autres techniques ont permis d'identifier des polymorphismes dans la région codante.

Quatorze allèles ont été décrits pour le gène PRP ovin (tableau 1) (Laplanche, et al., 1993 ; Belt, et al., 1995 ; Clouscard, et al., 1995 ; Bossers, et al., 1996 ; Hunter, et al., 1996 ; Thorgeirsdottir, et al., 1999), en fonction des codons considérés.

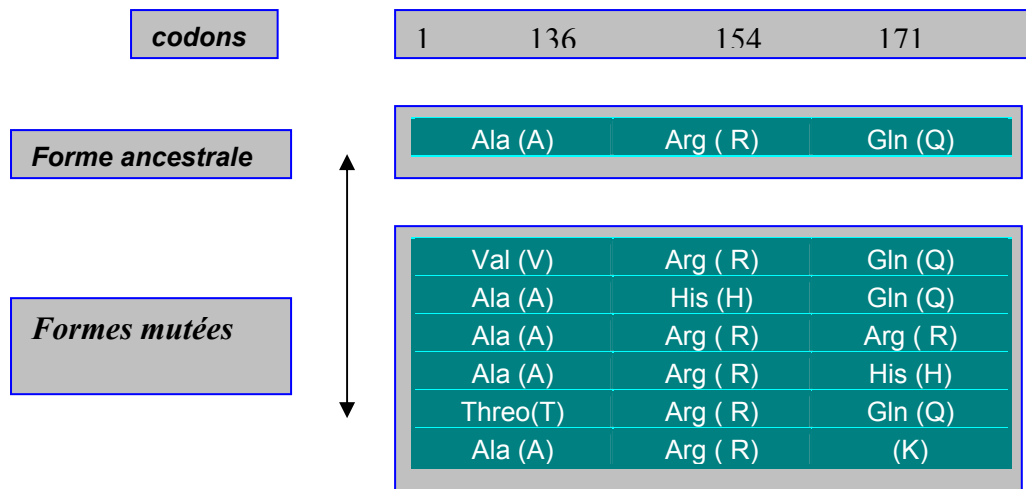
Toutefois, les différentes études ont montré qu'il existait des codons principaux (136, 154 et 171), dont la nature influence directement la susceptibilité à la tremblante, et des codons secondaires, dont les mutations sont dites muettes et n'ont pas d'influence sur la maladie (Elsen, et al., 1999).

Tableau 1 : Les allèles connus du gène PRP ovin

Allèle	Codons									
	112	136	137	138	141	151	154	171	176	211
ARQ (ancêtre)	M	A	M	S	L	R	R	Q	N	R
T112ARQ	T	A	M	S	L	R	R	Q	N	R
VRQ	M	V	M	S	L	R	R	Q	N	R
TRQ	M	T	M	S	L	R	R	Q	N	R
AT137RQ	M	A	T	S	L	R	R	Q	N	R
AN138RQ	M	A	M	N	L	R	R	Q	N	R
AF141RQ	M	A	M	S	F	R	R	Q	N	R
AC151RQ	M	A	M	S	L	C	R	Q	N	R
AHQ	M	A	M	S	L	R	H	Q	N	R
ARH	M	A	M	S	L	R	R	H	N	R
ARR	M	A	M	S	L	R	R	R	N	R
ARK	M	A	M	S	L	R	R	K	N	R
ARQK176	M	A	M	S	L	R	R	Q	K	R
ARQQ211	M	A	M	S	L	R	R	Q	N	Q

Tableau 2 : Polymorphisme de PRP chez les ovins.

Les données ont été recueillies dans les races Romanov, Ile-de-France (Laplanche, et al., 1993) et Cheviot (Hunter, et al., 1996).



Des 12 (2x2x3) combinaisons possibles sur les codons 136 (T/A/V), 154 (R/H) et 171 (Q/R/H/K) seulement six combinaisons ont été observées (tableau 2).

Les données cumulées de génotypage et de microséquençage du gène PRP dans différentes races de moutons ont permis de conclure que l'allèle ancestral était probablement ARQ (notation simplifiée pour A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁). A partir de cet allèle ancestral, 6 allèles répertoriés peuvent dériver par mutation ponctuelle (TRQ, VRQ, AHQ, ARH, ARR, ARK). Les fréquences respectives des différents allèles varient en fonction des races ovines.

3. Modulation de la sensibilité par le génotype PRP

La mise en évidence de la corrélation entre la sensibilité à la tremblante et le polymorphisme aux codons 136, 154 et 171 du gène PRP a conduit à distinguer (Elsen, et al., 1999) :

- (i) des animaux résistants qui, placés dans un milieu fortement contaminant ou inoculés, ne déclenchent pas la maladie.
- (ii) des animaux intermédiaires qui développeront la maladie avec une incidence variable mais faible et avec une période d'incubation longue.
- (iii) des animaux très sensibles qui, placés en milieu contaminant, développent la maladie sous une incidence très élevée et avec une durée d'incubation courte.

a. Ovins de génotype ARR/ARR

Les animaux homozygotes ARR/ARR sont considérés comme très résistants à la tremblante classique. Toutefois un cas d'infection naturelle d'un mouton ARR/ARR a été rapporté, celui d'un Suffolk japonais (Ikeda, et al., 1995).

Une première étude épidémiologique de type cas/témoin (Contrat Européen CT 97-4305), menée à l'échelle européenne, n'avait pas permis de détecter de cas de tremblante classique chez les individus ARR/ARR. Ce génotype représentait pourtant 15,5 % des 9141 témoins de l'étude. Par ailleurs dans un élevage à forte incidence de tremblante (jusqu'à 30% de mortalité par an), aucun cas clinique n'a été identifié chez les animaux homozygotes ARR (Figure 8).

Toutefois la notion de résistance absolue associée aux ARR/ARR a récemment été remise en question. En effet des ovins de ce génotype, inoculés par voie intra cérébrale avec de l'ESB, ont déclaré une EST clinique (3 animaux sur 19) (Houston, et al., 2003). De précédentes infections expérimentales avec cette même souche (Goldmann, et al., 1994 ; Foster, et al., 1996 ; Foster, et al., 2001) avait amené les expérimentateurs à conclure à une résistance des animaux ARR/ARR .

Par ailleurs, les programmes de surveillance développés dans l'Union Européenne ont permis d'identifier des ovins ARR/ARR atteints de tremblante (Buschmann, et al., 2004). Les souches impliquées sont qualifiées d'atypiques, et proches sinon identiques de la souche Nor98 (Le Dur, et al., 2005).

Depuis longtemps était connu le fait que, lors d'inoculations expérimentales, des ovins d'un génotype particulier peuvent s'avérer cliniquement sensibles à une souche et résistants à une autre (CH1641 et ESB) (Foster, et al., 1988 ; Goldmann, et al., 1994).

Il n'est pas exclu que les animaux dits résistants se révèlent être des "porteurs sains". Cette question du portage silencieux de l'agent infectieux par les animaux résistants a été abordée par la recherche de « PrPres » dans les tissus issus d'ovins ARR/ARR exposés soit naturellement soit expérimentalement à différents isolats d'EST. Les résultats actuellement disponibles suggèrent que les ARR/ARR ne sont pas porteurs de PrPsc (Dickinson, et al., 1968 ; Schreuder, et al., 1996 ; 1998 ; Jeffrey, et al., 2001 ; Heggebo, et al., 2002). Néanmoins, nous avons vu précédemment le possible découplage entre agent infectieux responsable de l'EST et protéine PrPres, ce qui tempère ces affirmations.

Les bio-essais réalisés sur des moutons ARR/ARR inoculés *per os* avec l'agent de l'ESB confirment que ces animaux ne seraient pas des porteurs sains de cet agent. Toutefois le

nombre d'animaux inclus dans ces expérimentations était très réduit (Foster, et al., 2001 ; Jeffrey, et al., 2001).

b. Ovins de génotype ARR/X ou AHQ/X

Dans les conditions naturelles d'exposition à des souches de tremblante classique, les animaux hétérozygotes ARR (et homozygotes ou hétérozygotes AHQ) ne sont atteints qu'avec une très faible incidence par la tremblante classique. Sur des ovins de race Romanov l'incidence est inférieure à 5% (Figure 8). Par ailleurs, l'âge à la mort est sensiblement plus tardif que chez les ovins sensibles (4 à 7 ans) (Elsen, et al., 1999). Ces données sont confirmées par de nombreuses autres études réalisées en Grande Bretagne (Baylis, 2002), en Irlande (O'Doherty, et al., 2000), en Norvège (Tranulis, 2002) ou encore en Allemagne (Drogemuller, et al., 2001). Toutefois, et à l'inverse des résultats obtenus avec les souches de tremblante classique, les ovins porteurs d'allèles ARR ou AHQ peuvent être atteints voire être plus sensibles (AHQ) à des souches qualifiées d'atypiques (Saunders, et al., 2006).

c. Ovins porteurs de l'allèle VRQ ou ARQ

Sur un millier de moutons de race Romanov, issus d'un troupeau français (troupeau de Langlade) naturellement infecté par une souche de tremblante classique, les animaux homozygotes VRQ semblent les plus sensibles à la tremblante (76% d'animaux atteints). Cette sensibilité est élevée mais moindre pour les animaux hétérozygotes VRQ/ARQ (52% de cas) et homozygotes ARQ (42%) (figure 8) (Elsen, et al., 1999). La durée moyenne d'incubation chez les ARQ/ARQ (27 mois) semble plus longue que celle des VRQ/VRQ (18 mois) (Elsen, et al., 1999). D'autres travaux réalisés à partir d'un élevage Cheviot indiquaient que les animaux de génotype ARQ/VRQ avaient une durée d'incubation plus longue que les individus VRQ/VRQ (Hunter et al 1996) (Tableau 3).

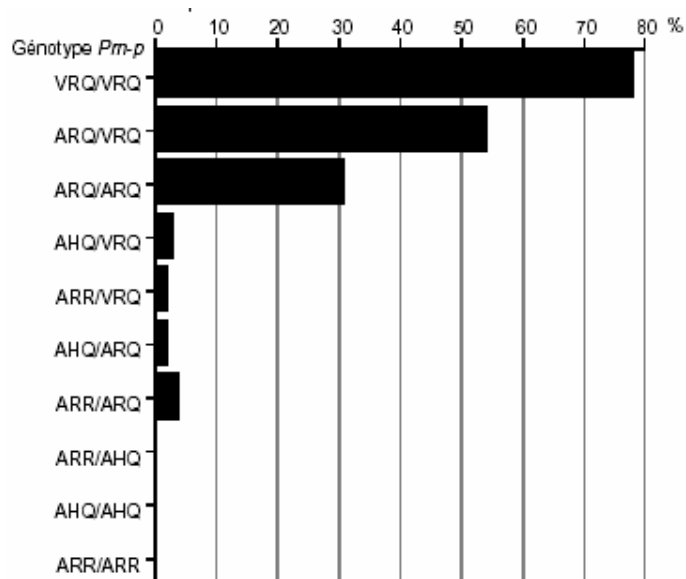


Figure 8. : Fréquence d'animaux morts de tremblante naturelle selon leur génotype au locus PRP (codons 136, 154 et 171), dans un troupeau d'ovins de race Romanov (Elsen, 1999).

Tableau 3 : Génotypes de 35 animaux atteints de tremblante (décédés entre 1986 et 1995)(Hunter, et al., 1996).

Génotype PrP	Nombre d'animaux	% d'animaux	Age moyen	Ecart type	SD
VRQ/VRQ	27	77	907	497-1631	265
ARQ/VRQ	8	23	1462	1107-2250	426

Dans l'étude cas/témoin menée à l'échelle européenne, précédemment citée, les animaux VRQ/VRQ représentaient 13,7 % des ovins atteints de tremblante et 0,6% des témoins, ce qui semble confirmer l'extrême sensibilité des animaux de ce génotype.

Toutefois, la sensibilité relative des animaux d'un génotype peut varier en fonction de l'environnement et de la souche de tremblante (Foster, et al., 1988 ; Foster, et al., 1993 ; Goldmann, et al., 1994). En effet si dans un troupeau particulier (race Suffolk) le génotype ARQ/ARQ a pu être associé à la majorité des cas de tremblante (Hunter, et al., 1997), dans un autre troupeau de structure génétique PRP comparable, mais en race Texel, ils ne correspondent qu'à une minorité de cas (Dawson, et al., 1998).

Une forte interaction entre la souche et le génotype a été également démontrée. Lors d'inoculation par voie intracérébrale d'animaux ARQ/ARQ avec la souche CH1641 tous les animaux vont déclarer la maladie alors que les ovins du même génotype mais inoculés avec la souche SSBP1 ne seront pas atteints cliniquement (Goldmann, et al., 1994). De plus si lors de tremblante la durée d'incubation chez les ovins VRQ/VRQ est généralement plus courte que les ovins ARQ/ARQ, lors d'inoculation avec un isolat d'ESB bovine, il semble que cela soit le contraire (Goldmann, et al., 1994 ; Jeffrey, et al., 2001).

Le phénomène de tropisme allélique d'une souche est par ailleurs illustré par la souche NOR98 isolée de façon répétée en Norvège. Aucun cas de NOR98 n'a été décrit chez des individus porteurs de l'allèle VRQ, pourtant présent dans les troupeaux atteints. La majorité des isolats sont issus de porteurs de l'allèle AHQ (Benestad, et al., 2003).

Récemment, un second polymorphisme au codon 141 (L→F) associé à l'allèle ARQ a été associé à une sensibilité accrue vis-à-vis de souches atypiques des porteurs d'AFRQ par rapport aux ALRQ (Moum, et al., 2005 ; Saunders et al., 2006).

Les différences de durée d'incubation en fonction du génotype ou le tropisme allélique particulier de certaines souches, restent difficiles à expliquer. Quelques éléments issus d'expériences de conversion *in vitro* permettent toutefois de formuler des hypothèses. La gamme de sensibilité allélique observée *in vivo* correspond *in vitro* à une plus ou moins grande efficacité de conversion en PrPres. Ainsi la transconformation de la PrPc ARR était quasi inefficace alors que cette transconformation était beaucoup plus efficace pour les PrPc VRQ et ARQ (Bossers, et al., 1997). Dans ce modèle, la séquence primaire de la PrPc semble un facteur majeur pour l'efficacité de conversion. La séquence primaire de la PrPsc nucléatrice interviendrait également dans ce processus. En effet, la PrPsc^{VQ/VQ} a converti avec une efficacité décroissante la PrPc^{VQ/VQ}, la PrPc^{AQ/AQ} et la PrPc^{AR/AR}, alors que la PrPsc^{AQ/AQ} a converti avec la même efficacité la PrPc^{AQ/AQ} et la PrPc^{VQ/VQ} (Bossers, et al., 2000).

Ces variations d'efficacité de transconformation pourraient, dans l'hypothèse du prion, expliquer les associations d'allèle de sensibilité avec des souches particulières d'agents d'EST.

4. Utilisation de l'outil génétique dans la lutte contre les EST chez les ovins

Les programmes de lutte contre la tremblante ont été longtemps fondés sur une stratégie d'abattage total des cheptels atteints, avec comme résultat une fréquente ré-infection des animaux nouvellement introduits. Cette situation est probablement liée à la forte rémanence de l'agent infectieux dans le milieu d'élevage et à sa résistance aux procédés de décontamination.

Aux USA, les campagnes d'éradication menées dès 1952 n'ont pas été, d'un point de vue global, couronnées de succès. Seule l'Islande semble en voie de réussir par l'application d'une telle stratégie. La politique islandaise en la matière apparaît toutefois extrêmement contraignante et coûteuse. Elle repose notamment sur la division du pays en zones saines/atteintes, l'abattage total des troupeaux atteints avec destruction du matériel d'élevage, élimination de la terre autour des locaux d'élevage, et interdiction de reprendre l'élevage pendant au moins cinq ans. Les animaux utilisés pour le repeuplement proviennent évidemment de secteurs indemnes (Detwiler, 1992).

Compte tenu des connaissances actuelles, l'utilisation de l'allèle ARR comme moyen de lutte contre la maladie semble une approche intéressante. Même si certaines questions fondamentales restent en suspens (existence d'un portage sain, universalité de la résistance des ARR, liaison avec d'autres caractères de production, de résistance aux maladies), des programmes de lutte basés en grande partie sur la sélection d'animaux résistants ont d'abord débuté en Grande-Bretagne, en France et aux Pays-Bas, avant d'être étendus à l'ensemble des pays membres de l'Union Européenne en 2001.

B. POLYMORPHISMES DU GENE PRP ET SENSIBILITE A LA TREMBLANTE DANS L'ESPECE CAPRINE

L'intérêt porté à l'espèce caprine en matière de risques sanitaires liés aux EST n'est qu'assez récent. La faiblesse des effectifs du cheptel caprin dans les pays les plus 'concernés' par les problèmes d'EST, ainsi que le faible nombre de cas rapportés dans cette espèce, expliquent certainement ce phénomène.

1. Variabilité du gène PRP caprin

Les données relatives aux polymorphismes génétiques du gène PRP caprin ne sont que récentes. Le caractère très régionalisé des races de caprins et le faible effectif des animaux impliqués dans ces études ne permettent pas d'écarter l'existence de polymorphismes autres que ceux décrits. L'ensemble des mutations codantes (n=18) observées dans les différentes études est présenté dans la tableau 4 (Manuelidis, 1994 ; Obermaier, et al., 1995 ; Goldmann, et al., 1996 ; Goldmann, et al., 1998 ; Wopfner, et al., 1999 ; Foster, et al., 2001 ; Billinis, et al., 2002 ; Goldmann, et al., 2004 ; Zhang, et al., 2004 ; Kurosaki, et al., 2005 ; Papisavva-Stylianou, et al., 2005 ; Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006).

Outre les mutations codantes observées sur le gène caprin, différentes mutations silencieuses ont été rapportées (codons 42-138-202-219-232) (Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006). Une délétion dans la zone des octa-peptides répétés est à signaler (région N terminale de la protéine). Contrairement aux ovins (5 répétitions) ou aux bovins (6 répétitions), le gène caprin n'en compte que 3.

Compte tenu des différences notables entre les résultats issus de ces études (certaines rapportant l'existence de mutations alors que d'autres à la même position non), il semble que la fréquence de la plupart des mutations soit relativement faible. Toutefois, les études menées ne font pas preuve d'une puissance suffisante en terme d'échantillonnage et il paraît difficile, dans ce contexte, d'estimer la fréquence des polymorphismes du gène PRP dans la population caprine générale.

Tableau 4 : Polymorphisme du gène PrP chez les caprins

Codons	Mutation(s) observée(s)
21	V→A
23	L→P
37	G→V
49	G→S
102	W→G
110	T→N ou T→P
127	G→S
142	I→M
143	H→R
146	N→S ou N→D
151	R→H
154	R→H
168	P→Q
211	R→Q
218	I→L
220	Q→H
222	Q→K
240	S→P

2. Gène PrP caprin et sensibilité aux EST

Dans ce domaine encore, et malgré les intérêts que recouvre la possibilité d'une politique de gestion sanitaire basée sur la sélection génétique calquée sur celle des ovins, les données demeurent très parcellaires.

La majeure partie des études portant sur la question ont fait appel à des dispositifs cas témoin mis en place dans des troupeaux atteints. Le faible nombre des cas impliqués ainsi que le peu de certitudes quant au statut sanitaire des individus (notamment les témoins où la seule indication est souvent l'absence de signes cliniques compatibles avec la maladie) soulèvent certains doutes quant à la fiabilité des conclusions rendues. Malgré ces réserves des polymorphismes ont été identifiés comme ayant potentiellement une influence sur la sensibilité à l'infection par la tremblante. Il s'agit des codons 37 (Agrimi, et al., 2003), 143

(Billinis, et al., 2002 ; Agrimi, et al., 2003), 146 (Papasavva-Stylianou, et al., 2005), 154 (Billinis, et al., 2002 ; Vaccari, et al., 2006), 222 (Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006) , 240 (Agrimi, et al., 2003), ainsi que la variation du nombre de répétitions d'octapeptides (Goldmann, et al., 1998). Lors d'inoculations expérimentales, la mutation M142 semble associée à un prolongation des durées d'incubation (Goldmann, et al., 1996 ; 1998).

Toutefois tous ces résultats présentent des discordances selon les études.

Différents facteurs peuvent être évoqués pour expliquer l'inconsistance des résultats actuellement disponibles : la faible fréquence des mutations sur le gène, le nombre réduit d'études sur le sujet, et la relativement faible prévalence de la maladie dans les troupeaux atteints étudiés (Baylis, et al., 2004).

C. LUTTE CONTRE LA TREMBLANTE CAPRINE EN L'ABSENCE D'OUTIL GENETIQUE

Les mesures sanitaires légales (police sanitaire) applicables aux troupeaux caprins déclarés suspects et officiellement atteints de tremblante sont fixées par l'arrêté du 27 janvier 2003.

Lors de suspicion sur un caprin, l'exploitation est placée sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance. Ces mesures visent essentiellement à suspendre tout échange d'animaux vers d'autres élevages. Les mouvements des individus issus de ce troupeau sont limités à leur seule élimination (abattage pour consommation ou destruction).

En cas de confirmation, tous les animaux présentant des signes cliniques de tremblante sont euthanasiés et détruits. Les individus issus du troupeau sont marqués et euthanasiés dans un délai de 6 mois. L'élevage subit ensuite des mesures de désinfection et nettoyage par une entreprise agréée par la préfecture avant de pouvoir accueillir de nouveaux caprins

Les mesures d'indemnisation prévues par la loi font appel à une évaluation de la valeur commerciale intégrant principalement des critères de production économique du troupeau. Malgré le montant des indemnisations, le coût social et la valeur du 'travail' de l'éleveur (sélection génétique sur plusieurs années voire dizaines d'années) ne peuvent être totalement pris en compte. Face à une telle situation, les organisations professionnelles d'éleveurs caprins sont évidemment demandeuses de mesures alternatives à l'abattage total.

Conclusion et objectifs du travail expérimental

On ne dispose que de peu de connaissances de la pathogénèse et de la susceptibilité génétique des caprins aux EST.

La mise en place depuis 2001 d'un dispositif de surveillance active de la maladie, renforcé en 2005 et 2006 suite au cas d'ESB découvert chez une chèvre, a permis de mieux appréhender la prévalence de la maladie dans le cheptel français. Toutefois cette surveillance repose sur l'utilisation de tests rapides réalisés sur des prélèvements d'obex. Or en transposant les connaissances physiopathologiques acquises dans l'espèce ovine, l'obex ne constitue vraisemblablement pas le prélèvement de choix pour un diagnostic précoce de la maladie et ne peut évidemment pas permettre de diagnostic du vivant de l'animal.

Il apparaît par ailleurs que les données disponibles en matière de modulation de la sensibilité à la maladie par les polymorphismes du gène PRP demeurent très incomplètes.

Dans ce contexte, à l'initiative de diverses associations professionnelles d'éleveurs caprins, un projet a été mis en place dès 2002. Ce projet fédère les efforts de l'UMR INRA ENVIT 1225 (INRA), du laboratoire d'étude et de recherche caprine de l'AFSSA et de la station d'amélioration génétique des animaux (INRA).

Les objectifs de ce projet étaient :

- De décrire la prévalence de la maladie (épidémiologie descriptive) dans différents troupeaux naturellement infectés.
- D'étudier l'intérêt potentiel de tests utilisant des tissus lymphoïdes pour un diagnostic précoce de la maladie.
- D'apporter des éléments sur une possible utilisation de tests ELISA de détection de la PrPres (tests rapides) sur les tissus périphériques.
- D'étudier les performances de la détection de la PrPsc sur biopsie d'amygdale pour un diagnostic individuel réalisé du vivant de l'animal.
- D'identifier l'existence d'éventuels effets de certains polymorphismes du gène PRP sur la sensibilité à la tremblante.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

A. ANIMAUX

Un total de 1661 caprins issus de 6 élevages atteints de tremblante (désignés chacun par une lettre : de A à F) a été inclus dans cette étude. Les effectifs au sein des troupeaux choisis variaient de 162 à 375 individus (tableau 5). Ces troupeaux étaient constitués majoritairement, et en proportions variables, d'animaux issus des deux races dominantes dans le cheptel Français (Saanen et Alpine). Tous les troupeaux étudiés étaient de type 'laitier' (filrière production laitière comme principal débouché) et provenaient de 5 départements différents (17, 18, 47, 79, 86).

Les données individuelles concernant chacun des animaux (année de naissance, race, sexe...) ont été recueillies :

- (i) via le contrôle laitier officiel (CLO) pour 1331 individus soit 80 %.
- (ii) sur l'élevage lui même (moindre niveau de certitude quant à l'exactitude des données).

Tableau 5 : Répartition des animaux de l'étude par race et par élevage

Elevage	Race				Total
	Saanen	Alpine	Croisée	Nubien	
<i>A</i>	27	324	24	0	375
<i>B</i>	185	63	58	0	306
<i>C</i>	268	14	0	8	290
<i>D</i>	285	0	0	0	285
<i>E</i>	185	17	41	0	243
<i>F</i>	16	146	0	0	162
Total	966	564	123	8	1661

B. PRELEVEMENTS EFFECTUES SUR LES ANIMAUX DANS L'ELEVAGE

Dans chaque élevage, une biopsie d'amygdale et un prélèvement de sang sur tube EDTA (en vue d'un isolement d'ADN) ont été réalisés sur tous les individus âgés de plus de 12 mois (1493 au total).

1. Biopsie d'amygdale

La biopsie d'amygdale a été réalisée sur animaux anesthésiés, après injection intraveineuse d'un mélange à base de 2 mg de diazépam (Valium®) et de 30 mg de kétamine (Imalgene®) en moyenne (adaptation de la dose en fonction du gabarit de l'animal). L'animal était ensuite placé en décubitus et la gueule était maintenue ouverte manuellement par un opérateur. A l'aide d'un laryngoscope à lame, un autre opérateur plaquait la langue vers le bas de la cavité buccale et effectuait le prélèvement d'amygdale (en passant par le recessus amygdalien) à l'aide d'une pince à biopsie adaptée (élaborée à partir des modèles de pinces à biopsie rectale humaine). L'ensemble de l'opération ne nécessitait que quelques minutes (2-3 minutes en conditions optimales). Plusieurs fragments étaient généralement prélevés sur chaque individu.

Il est très difficile de juger de la qualité d'une biopsie par examen macroscopique. Ce n'est que lors de l'examen histologique que cela peut être fait avec certitude. La biopsie a été considérée réussie quand elle comptabilisait au moins 3 follicules lymphoïdes complets. La moyenne du nombre de follicules examinés se situait aux alentours de 7-8 en fonction des opérateurs et des conditions de prélèvements (les amygdales étant plus difficiles à prélever chez les animaux âgés).

2. Prélèvement sanguin et génotypage aux codons 142-154-211-222 et 240 du gène PRP

Une prise de sang sur un tube EDTA de 5 ml a été réalisée conjointement aux biopsies d'amygdales. Les échantillons, d'abord congelés (sang complet) ont été adressés à LABOGENA (Jouy en Josas, France) pour y être traités.

La mise à disposition de données obtenues préalablement (toujours dans le cadre du projet AFSSA-INRA) ont permis de limiter nos investigations aux seuls polymorphismes aux codons 142-154-211-222 et 240 (étude cas témoins menée dans un troupeau fortement atteint - 98 cas - et séquençage de l'ORF complet du gène PRP)

Le génotypage a été réalisé par 'SNaP shot PCR'. Il s'agit d'une technique de 'micro-séquençage' de l'ADN permettant un ciblage spécifique des codons, par le choix d'amorces adjacentes aux codons d'intérêt. L'intégration de bases marquées, ne pouvant permettre l'élongation du produit de PCR (dye terminator), aboutit à l'amplification de miniséquences (amorce plus dye terminator) ensuite analysées sur séquenceur à flux capillaire. La lecture de ces mini-séquences permet d'identifier rapidement et à moindre coup les polymorphismes aux codons d'intérêt.

C. PRELEVEMENTS SUR LES ANIMAUX A L'EQUARRISSAGE

Suite aux biopsies, et conformément à l'application des mesures de police sanitaire en vigueur pour les élevages caprins atteints de tremblante, l'ensemble des troupeaux étudiés a été abattu et envoyé à l'équarrissage. Le délai entre cet abattage et les prélèvements biopsiques variait de quelques jours à plusieurs mois. A l'équarrissage, comme prévu par la réglementation, un prélèvement d'obex a été effectué par les services vétérinaires en vue de la réalisation d'un test rapide ayant une valeur officielle.

Dans le même temps nous avons réalisés de façon systématique des prélèvements :

- d'iléon (contenant si possible des plaques de Peyer)
- de nœud lymphatique mésentérique iléal
- d'amygdale
- de tronc cérébral postérieur

Les échantillons prélevés ont été pour moitié fixés dans une solution de formol tamponné à 4% et pour moitié congelés.

D. DETECTION DE PrP^{sc}

Différentes techniques permettant la détection de la PrP anormale ont été appliquées aux échantillons (biopsiques ou réalisés à l'équarrissage) collectés.

1. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) permet la détection in situ de la PrP^{sc} sur coupe de tissu inclus en paraffine. Après fixation au formol, et inclusion dans la paraffine, des coupes de tissus (3µm d'épaisseur) ont été étalées sur des lames de verre, puis séchées durant une nuit à 56°C avant d'être déparaffinées et réhydratées. Les lames ont tout d'abord été incubées dans de l'acide formique à 98% (No 1.00264, Merck) pendant 30 minutes à température ambiante puis ont été autoclavées à 121°C pendant 20 minutes dans une solution de citrate à 10 mmol, tamponnée à pH=6,1. Ce traitement vise à détruire l'immunogénicité de la PrP^c tout en augmentant celle de la PrP^{sc}.

L'immuno-marquage de la PrP est ensuite réalisé au moyen d'un anticorps monoclonal de souris (mAb) 8G8 (IgG2a produite contre la protéine PrP humaine et reconnaissant spécifiquement la séquence 95-108 d'acides aminés, gracieusement fournie par J.Grassi du CEA de Saclay, France), utilisé à une dilution de 1:2000 (Krasemann, et al., 1996).

Les sites de fixation non spécifiques ont été au préalable bloqués par incubation des sections de tissus avec un sérum normal de chèvre à 20% dans une solution tampon de Tris (TBS) à 0,1 mol pendant 20 minutes. L'anticorps primaire (8G8) a ensuite été appliqué pendant 60 minutes à température ambiante. Une incubation de 30 minutes avec un anticorps secondaire de chèvre biotiné (dilution 1:100), spécifique des immunoglobulines (Ig) de souris, a été réalisée avant d'appliquer un complexe streptavidin-péroxydase (dilution 1:100) pendant 30 minutes. La révélation des sites de fixation des anticorps a été effectuée par l'utilisation d'un substrat enzymatique, le Diamino-Benzidine (DAB, Brown end product, K 0598, DAKO).

La reproductibilité de l'immuno-marquage a été caractérisée par l'inclusion de sections contrôles (positif et négatif) dans chaque lot d'immuno-marquage.

2. ELISA

Une technique de détection de la PrPSc par ELISA a été appliquée à l'ensemble des prélèvements congelés réalisés à l'équarrissage.

Le test utilisé ('TeSe sheep and goat' produit par BIO-RAD) est validé par la commission européenne pour le diagnostic post mortem de la tremblante des petits ruminants sur prélèvement d'obex. Ce test a été utilisé conformément aux recommandations éditées par le fabricant sur les différents échantillons disponibles (tissu lymphoïde, iléon, SNC).

La conduite du test repose sur plusieurs étapes successives.

a. Homogénéisation

Pour chaque échantillon congelé, 340±40 mg de tissu ont été prélevés. Ces échantillons ont été placés dans 1,5ml de solution de glucose à 5% contenant des billes de céramique (de 1 mm de diamètre), pour subir une série de cycles d'homogénéisation de 45 secondes chacun, à vitesse maximale dans un Ribolyser (TM-COGER).

Les tissus prélevés permettaient le plus souvent d'obtenir un échantillon de masse suffisante, néanmoins pour certains organes (notamment les plaques de Peyer) la masse collectée était insuffisante du fait de leur petite taille. Dans ce cas là, les tests directs n'ont pu être réalisés qu'en employant un complément de masse connue de cerveau d'un animal négatif, afin que la masse finale obtenue soit comprise dans l'intervalle fixé pour l'analyse.

Une dilacération manuelle préalable des tissus, au moyen d'une lame de scalpel, améliorerait de façon significative l'homogénéisation ultérieure du prélèvement et diminuait par là le nombre de cycles qu'il avait à subir.

En moyenne 2 à 3 cycles d'homogénéisation ont été suffisants pour obtenir de bons homogénats des nœuds lymphatiques, cependant les tissus intestinaux ou les amygdales ont subi jusqu'à 10 cycles afin d'obtenir une qualité équivalente.

b. Extraction et mesure de la PrPsc

500 microlitres de l'homogénat obtenu ont été prélevés et filtrés grâce à une aiguille sans biseau de calibre 25 G, puis mis en incubation pendant 10 minutes à 37°C avec 500 microlitres du tampon A contenant la protéinase K. La PrPsc se retrouvait ensuite au niveau du culot après addition de 500 microlitres du tampon B et centrifugation à 20 000 g durant 5 minutes à température ambiante.

Le surnageant a été éliminé et les tubes séchés. Le culot a été chauffé dans du tampon C1, pendant 5 minutes à 100°C puis dilué au 1:6 dans le réactif R6. 100µL de la préparation ont ensuite été déposés sur les plaques immunosensibilisées. La plaque a été placée 1,5 heures à 37°C puis lavée 5 fois en solution détergente. Un anticorps anti PrP traceur directement couplé à la peroxydase a ensuite été déposé dans chaque puit et mis à incuber à 4°C pendant 1 heure. La plaque a ensuite été lavée 3 fois avant révélation par une solution chromogène (30 minutes à température ambiante dans le noir). La réaction enzymatique était ensuite arrêtée à l'aide d'une solution d'acide sulfurique 1N.

La lecture des densités optiques a été effectuée à 450nm avec une mesure à 620 nm pour extraire le bruit de fond. Le résultat était considéré comme positif pour des absorbances supérieures à 0.150 OD.

3. Tests rapides

Parallèlement à nos investigations les tests officiels sur obex ont été effectués par les laboratoires locaux agréés.

Il s'agissait variablement du test Biorad Platelia (initialement destiné à la détection de l'ESB chez les bovins mais validé par la suite pour les petits ruminants par la commission européenne), du test Biorad « sheep and goat » ou du test Prionics (Western-blot rapide). Les résultats de ces tests, validés par la DGAL, ont été utilisés pour notre analyse comparative des techniques.

II. RESULTATS

Pour chaque tissu prélevé à l'équarrissage, un résultat positif ou négatif a été obtenu par chacune des deux techniques IHC et ELISA.

Pour chaque animal, un statut infectieux correspondant à chaque technique (STATUT IHC et STATUT ELISA) a été déduit par combinaison de ces résultats (infecté si l'un des tissus au moins était positif ; sain si l'ensemble des échantillons était négatif pour la recherche de PrPsc).

De même, en combinant les résultats ELISA et IHC pour chaque prélèvement, un statut positif ou négatif a été déterminé pour ce prélèvement (un prélèvement étant considéré comme positif si l'une des deux méthodes au moins permettait de détecter de la PrP anormale).

Enfin, la spécificité de chaque test étant arbitrairement fixée à 1, le statut infectieux (STATUT GLOBAL) de chaque animal a été défini comme positif chaque fois qu'au moins un des prélèvements examinés était positif par au moins une des techniques employées.

Il est important de préciser dès à présent que 18 animaux positifs en post-mortem sur l'amygdale ont été considérés comme 'non infectés'.

Pour ces animaux :

- (i) le seul prélèvement positif était l'une des deux amygdales prélevées à l'équarrissage.
- (ii) la biopsie d'amygdale était systématiquement négative, ainsi que tous les autres organes en post-mortem.
- (iii) les délais séparant le prélèvement biopsique et l'abattage des animaux étaient supérieurs à un mois.

Nous en avons conclu que pour ces animaux la contamination était vraisemblablement liée à la réalisation de la biopsie avec une pince souillée. En effet, pour des raisons pratiques et compte tenu de la destination finale des animaux (destruction), nous n'avons pas dans ces élevages décontaminé de façon systématique les pinces à biopsie (2 heures dans la soude bimolaire puis 1h30 d'autoclavage à 134°C en chaleur humide).

A. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE DE LA TREMBLANTE DANS LES 6 TROUPEAUX ETUDIES

1. Prévalence globale et prévalence par troupeaux

La prévalence moyenne de la tremblante dans les troupeaux étudiés était de 7,28 % (n=121/1661 - tableau I présenté en annexe).

De grandes disparités ont été observées entre les troupeaux (tableau 6) et les élevages peuvent être classés en deux catégories :

* Les élevages pour lesquels aucun nouveau cas n'a été détecté à l'équarrissage en dehors du cas index (élevages A et B) ou pour lesquels quelques cas seulement ont pu être détectés (élevage D). Pour ces trois élevages, on peut qualifier la tremblante de sporadique.

* Les élevages avec de fortes prévalences, qualifiés d'enzootiques (élevages C, E et F).

Tableau 6 : Prévalence observée dans les 6 élevages

Eleveage	Nombre d'animaux positifs / Nombre d'animaux testés*	Prévalence*
<i>A</i>	0/375*	0.00 %*
<i>B</i>	0/306*	0.00 %*
<i>C</i>	38 / 290	13.10 %
<i>D</i>	3 / 285	1.05 %
<i>E</i>	41 / 243	16.87 %
<i>F</i>	39 / 162	24.07 %
Total	121 / 1661	7.28 %

*Hors cas index

2. Prévalence par race

Les prévalences semblaient varier entre les races Saanen (8,70 %), Alpine (6,21 %), et les Croisées (1,63 %) ou les Nubiennes (0%). Toutefois ces apparentes différences n'ont permis de tirer aucune conclusion. En effet :

- (i) les effectifs raciaux étaient sensiblement déséquilibrés dans notre échantillon,
- (ii) la distribution raciale était particulièrement variable d'un élevage à l'autre (par exemple deux des élevages à forte incidence (C et E) comptaient une majorité de Saanen).

3. Prévalence par classe d'âge

La distribution des animaux par classe d'âge est présentée figure 9 pour les 3 élevages qualifiés d'enzootiques (C, E et F).

Compte tenu de la répartition très hétérogène des âges, un regroupement en 3 classes d'âge a été effectué : moins de 2 ans (2 ans exclus) ; entre 2 ans (2 ans inclus) et 4 ans (4 ans exclus) ; supérieur ou égal à 4 ans. Les prévalences par classes d'âge ont ensuite été comparées par le test du chi-2. Par ce test, la prévalence chez les animaux de moins de 2 ans semble significativement plus faible que chez les animaux plus âgés ($p < 0,05$).

Il faut cependant tenir compte de l'imprécision relative des données concernant les dates de naissance (valeur forfaitaire au 1^{er} février dans un des troupeaux) qui pourrait être à l'origine d'un biais de classification. Lorsque la première classe d'âge englobait les animaux de 2 ans, les prévalences observées n'étaient plus significativement différentes ($p = 0,23$).

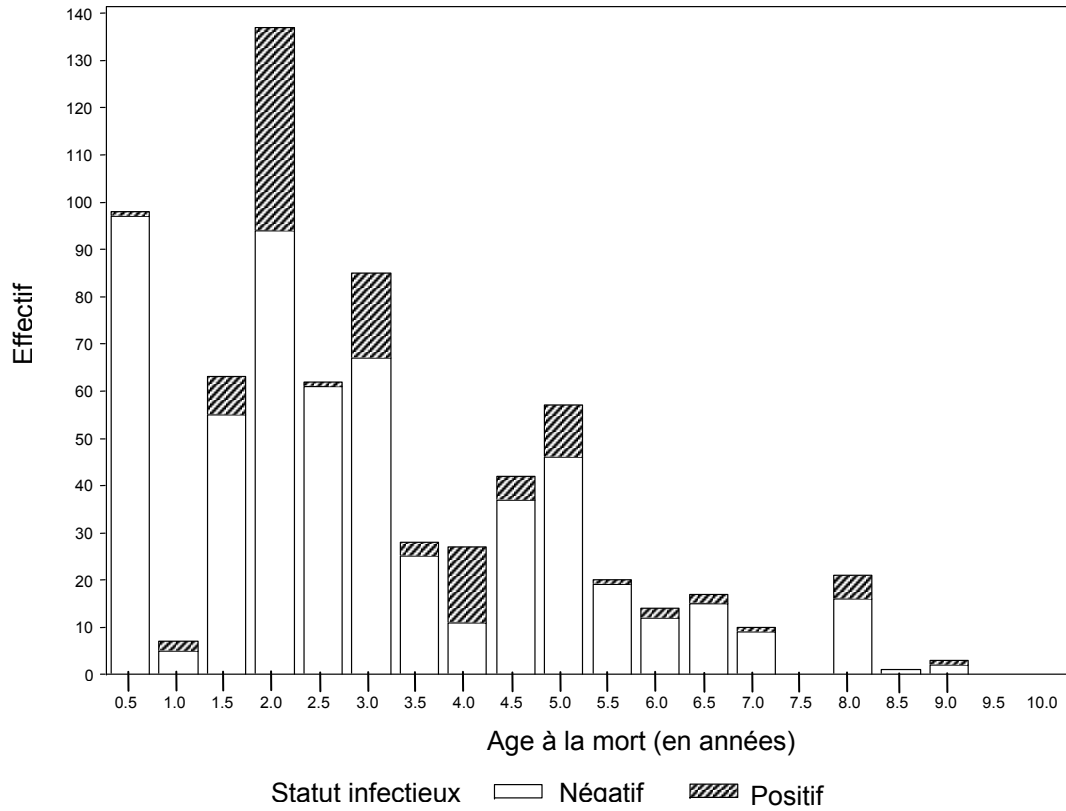


Figure 9 : Diagramme de répartition des cas pour chaque classe d'âge

Tableau 7 : Prévalence de la tremblante en fonction de l'âge

Classe d'âge	< 2 ans	[2 ans- 4 ans[≥ 4 ans	P
Positif/total	24/217	51/266	42/209	0,02
Prévalence (%)	11,06	19,17	20,10	

B. PERFORMANCES COMPAREES DES OUTILS DIAGNOSTIQUES

1. Concordance IHC/ELISA et sensibilité comparée des deux techniques

L'immunohistochimie (IHC) est l'une des techniques de référence (reconnue par l'OIE) pour le diagnostic de la tremblante. Le manuel de l'OIE reconnaît la validité de la détection de la PrPsc sur tissu périphérique (hors Obex) de cette méthode.

En revanche, la technique ELISA de détection de la PrPsc sur tissu lymphoïde n'est pas officiellement reconnue. Dans cette étude une détection de la PrPsc par ELISA et par IHC a été pratiquée sur la totalité des échantillons, ce qui a permis une comparaison des deux techniques.

La prise en compte des élevages sporadiques dans cette comparaison ne présentait pas d'intérêt particulier (tous les animaux testés sont négatifs par les deux méthodes). L'analyse a donc intégré les seuls élevages enzootiques (C-E-F).

Pour chaque organe, le Kappa de concordance (et son intervalle de confiance à 95 %) entre les deux techniques a été calculé. Le test non paramétrique Kappa de Cohen permet de chiffrer la concordance/divergence de deux techniques lorsque les variables analysées sont qualitatives (ici positif ou négatif). Il est utilisé dans des études de reproductibilité qui nécessitent une estimation de l'agrément entre 2 ou plusieurs cotations qualifiant une variable discontinue.

Le coefficient Kappa est un nombre réel, sans dimension, compris entre -1 et 1. La concordance est d'autant plus forte que la valeur de Kappa est proche de 1. On considère généralement qu'un coefficient Kappa supérieur à 0,8 atteste d'une bonne concordance.

Pour chacun des 4 prélèvements considérés (amygdale, NLM, iléon, obex), la concordance entre les résultats obtenus par les deux techniques (tableaux 8-9-10-11) est apparue comme bonne à excellente. La meilleure concordance (0,96) a été obtenue sur l'obex (4 résultats discordants sur 565 analyses) et la moins bonne (0,93) sur le nœud lymphatique mésentérique (12 résultats discordants sur 559 analyses). Cependant aucune différence significative ne semble liée au tissu considéré (chevauchement des intervalles de confiance à 95 %).

Tableau 8 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour l'amygdale

Amygdale		IHC			Total
		Négatif	Positif	ND*	
ELISA	Négatif	454	<u>2</u>	23	479
	Positif	<u>6</u>	100	5	111
	ND*	2	0	103	105
Total		462	102	131	695

Kappa de concordance : 0.95 IC 95 % = 0.92-0.98

* ND = non déterminé

Tableau 9 : Comparaison des résultats IHC/ELISA pour le nœud lymphatique mésentérique

Nœud lymphatique mésentérique		IHC			Total
		Négatif	Positif	ND*	
ELISA	Négatif	452	<u>5</u>	122	579
	Positif	<u>7</u>	95	7	109
	ND*	6	0	1	7
Total		465	100	130	695

Kappa de concordance : 0.93 IC 95 % = 0.89-0.97

* ND = non déterminé

Tableau 10 : Comparaison des résultats de IHC/ELISA pour l'iléon

Iléon		IHC			Total
		Négatif	Positif	ND*	
ELISA	Négatif	460	<u>2</u>	7	469
	Positif	<u>6</u>	88	1	95
	ND*	0	0	131	131
Total		466	90	139	695

Kappa de concordance : 0.95 IC 95 % = 0.91-0.98

* ND = non déterminé

Tableau 11 : Comparaison des résultats de IHC/ELISA pour l'obex

Obex		IHC			Total
		Négatif	Positif	ND*	
ELISA	Négatif	498	<u>2</u>	0	500
	Positif	<u>2</u>	63	0	65
	ND*	2	0	128	130
Total		502	65	128	695

Kappa de concordance : 0.96 IC 95 % = 0.93-1.00

* ND = non déterminé

Si l'on considère le statut global des individus (tous organes confondus) établi par chacune des deux techniques, le kappa de concordance est excellent (0,94). Notons toutefois que 8 animaux ont été détectés positifs uniquement par l'ELISA et 2 uniquement par l'IHC.

Tableau 12 : Comparaison des résultats par IHC et par ELISA tous organes confondus

		IHC GLOBAL			Total
		Négatif	Positif	ND*	
ELISA	Négatif	455	<u>2</u>	122	579
	Positif	<u>8</u>	102	6	116
	ND*	---	---	---	---
Total		463	102	128	695

Kappa de concordance : 0.94 IC 95% = 0.90 – 0.98

* ND = non déterminé

Il paraît par ailleurs intéressant de souligner que pour chacun des quatre échantillons considérés, la distribution des 'discordants' n'est pas en faveur d'une technique par rapport à une autre, ce qui pourrait suggérer que ces discordances sont davantage liées à une distribution hétérogène de la PrPsc dans les tissus analysés qu'à un problème de sensibilité d'une des deux techniques sur une matrice particulière.

En effet, rappelons que les échantillons testés, même s'ils provenaient du même tissu, étaient physiquement distincts.

Afin d'objectiver cette interprétation, la sensibilité des deux techniques a été comparée.

Rappelons que (i) la sensibilité d'une technique diagnostique correspond au rapport du nombre d'animaux détectés par cette technique sur le nombre total d'animaux réellement positifs, et que (ii) la spécificité est le rapport du nombre d'individus considérés comme négatifs d'après la technique évaluée, sur le nombre total d'animaux réellement négatifs. En l'absence de test de référence permettant de définir de façon certaine les animaux réellement positifs, nous avons utilisé le statut global (défini plus haut) comme statut de référence.

Cette comparaison de sensibilité a été effectuée à partir du sous-ensemble des animaux dont le statut infectieux était défini comme positif et qui a été soumis à l'ensemble des analyses sur les 4 prélèvements.

Dans ces conditions, la sensibilité de l'ELISA paraît meilleure que celle de l'IHC, toutefois cette différence n'est pas significative ($p=0,11$) (tableau 13).

Tableau 13 : Sensibilité comparée ELISA/IHC

Sensibilité	Sensibilité IHC 4	Effectif	p
ELISA 4 organes	organes		
98,23 %	92,92 %	113	0,11

2. Performances comparées du diagnostic réalisé sur tissu lymphoïde et système nerveux central

Là encore, la sensibilité de chaque technique appliquée à chacun des organes prélevés a été calculée en utilisant le sous-ensemble des animaux dont le statut infectieux était défini comme positif.

L'intérêt de chaque organe pour la détection des animaux infectés a été évalué en considérant le résultat composite de l'IHC et de l'ELISA (un tissu est considéré comme positif si de la PrPsc est détectée par au moins l'une des deux méthodes diagnostiques) (tableau 14). Les intervalles de confiance des sensibilités ont été calculés en utilisant la loi binomiale.

Afin de déterminer les performances de chacune des deux techniques (ELISA et IHC) à détecter la présence de PrPsc dans les différents types de prélèvements (obex - amygdale - iléon et nœud lymphatique), un test de chi² de Mc Nemar pour données appariées a été appliqué. Le test de Mc Nemar suit asymptotiquement une loi de chi² à un degré de liberté.

L'absence de quelques prélèvements (problème d'identification à l'équarrissage) explique que les effectifs puissent varier d'une classe de prélèvement à une autre (tableau 14).

Tableau 14 : Sensibilité associée aux différents organes pour le diagnostic post-mortem

Prélèvement	Technique	Effectif	Sensibilité (%)	Sensibilité composite
			[IC 95 %]*	de l'organe (%) [IC 95 %]*
Amygdales	IHC	113	91,15 [84,33 -95,67]	96,61 [91,55-99,07]
	ELISA	118	94,92 [89,26 – 98,11]	
NLM	IHC	111	90,09 [82,96 – 94,95]	97,46 [92,75-99,47]
	ELISA	118	93,22 [87,08 – 97,03]	
Iléon	IHC	111	81,08 [72,55 – 87,89]	86,61 [78,87 – 92,31]
	ELISA	112	84,82 [76,81 – 90,90]	
Obex	IHC	113	57,52 [47,87 – 66,77]	60,00 [50,45 – 69,02]
	ELISA	114	58,77 [49,17 – 67,91]	

*IC 95 % = Intervalle de confiance à 95 % calculé d'après la loi binomiale

Lorsque l'on considère chaque type de tissu individuellement, la sensibilité de l'ELISA semble supérieure à celle de l'IHC, mais les différences observées ne sont statistiquement pas significatives.

La meilleure sensibilité semble obtenue lorsque le diagnostic est réalisé par ELISA sur l'amygdale (Se=94,92 %). La sensibilité du diagnostic est significativement inférieure lorsque l'iléon est utilisé plutôt que l'amygdale ou le nœud lymphatique mésentérique.

Les tests actuels de détection utilisés dans le cadre du réseau d'épidémiologie des EST des petits ruminants sont pratiqués sur système nerveux central.

Dans notre population, la sensibilité du diagnostic réalisée à partir de l'obex est très inférieure à celle obtenue avec les trois autres tissus, (l'obex ne permettant de détecter que 60 % des animaux considérés comme infectés). Cette observation est en accord avec le schéma de dissémination de la PrPsc dans l'organisme des individus infectés (atteinte plus précoce des organes lymphoïdes) et amène à s'interroger sur l'efficacité des mesures de détection actuellement appliquées.

Tableau 15 : Comparaison des sensibilités associées à chaque organe pour diagnostic post-mortem

Comparaison technique 1 / technique 2	Effectif	Sensibilité (%) technique 1	Sensibilité (%) technique 2	Exact P-value test de McNemar
Amygdale / NLM	117	96,58	97,44	1,00000
Amygdale / iléon	112	96,43	86,61	0,00342
Amygdale / obex	113	96,46	59,29	<10 ⁻⁵
NLM / iléon	111	97,30	86,49	0,00418
NLM / obex	112	97,32	58,93	<10 ⁻⁵
Ileon / obex	112	86,61	59,82	<10 ⁻⁵

3. Evaluation des performances du diagnostic basé sur la biopsie d'amygdale

Sur le total de 1493 animaux biopsiés, 1426 échantillons se sont avérés exploitables avec un total de 100 cas positifs. En considérant l'ensemble des échantillons analysés (prélèvements en équarrissage) sur ces 1426 animaux biopsiés, un total de 111 cas positifs a été comptabilisé (tableau 16).

La sensibilité de la biopsie d'amygdale apparaît donc de 90,09 % (IC=82,96-94,95).

Tableau 16 : Visualisation des performances de la biopsie d'amygdale

		Biopsie			Total
		Négatif	Positif	ND	
Statut tremblante	Négatif	1315	---	225	1540
	Positif	<u>11</u>	100	10	121
	ND	---	---	---	---
Total		1326	100	235	1661

Si l'on compare maintenant la sensibilité de la biopsie à la sensibilité composite (obtenue en combinant les résultats d'IHC et d'ELISA) de chaque tissu par le test de Chi2 de Mc Nemar (tableau 17), celle ci apparaît comme :

- significativement inférieure à celle du diagnostic par prélèvement d 'amygdale à l' équarrissage (p=0,008)
- significativement inférieure à celle du diagnostic par prélèvement de nœud lymphatique mésentérique à l' équarrissage (p=0,02)
- supérieure (non significatif) à celle obtenue à partir de l' iléon (p=0,42)
- significativement supérieure à celle obtenue sur l' obex (p<10⁻⁵).

Tableau 17 : Comparaison biopsie/prélèvements post-mortem

Comparaison technique 1 /technique 2	Effectif	Sensibilité (%) Technique 1	Sensibilité (%) technique 2	Exact P-value test de McNemar'
Biopsie / amygdale	111	90,09	97,30	0,00781
Biopsie / NLM	110	90,00	97,27	0,02148
Biopsie / iléon	110	90,00	86,36	0,42395
Biopsie / obex	111	90,09	60,36	<10 ⁻⁵

Si l'on examine les onze cas pour lesquels la biopsie est demeurée négative alors que les individus étaient effectivement positifs (sur un des autres tissus prélevé en équarrissage), il apparaît qu'aucun des individus n'avait accumulé de PrPsc au niveau de l'obex, ce qui indique clairement qu'ils étaient en phase 'précoce' d'incubation de la maladie (moins de la première moitié de la durée d'incubation).

Il apparaît également que trois des individus n'étaient positifs qu'au niveau du noeud lymphatique mésentérique, résultats là encore compatibles avec un stade d'infection précoce. Pour les 8 autres individus, l'amygdale était positive soit en IHC, soit en ELISA, alors que le prélèvement biopsique n'a pas révélé de PrPsc.

Les hypothèses : (i) d'un prélèvement raté , ou (ii) d'une 'positivation' de l'amygdale pendant le délai ayant séparé la biopsie et l'abattage, ne peuvent être écartées. Les durées parfois longues séparant les deux prélèvements dans les 3 élevages dans lesquels le phénomène a été constaté plaident en faveur de la seconde hypothèse (tableau 18).

Tableau 18 : Visualisation des délais biopsie-équarrissage pour les animaux ayant une biopsie négative et un résultat sur amygdale positif en post-mortem

Nombre d'animaux	Date de biopsie	Date d'abattage	Délai
2	25/09/03	03/11/03	39 j
4	08/12/03	02/02/04	56 j
2	04/03/04	01/07/04	119 j

C. POLYMORPHISMES AUX CODONS 142-154-211-222 ET 240 DU GENE PRP CAPRIN ET SENSIBILITE A LA TREMBLANTE

1. Structure génotypique des populations dans les élevages étudiés

Les données relatives aux polymorphismes du gène PRP ont été obtenues pour 1475 des 1661 caprins initialement inclus dans l'étude (moyenne 80,8 % - Elevage A : 89,33 % - B : 95,75 % - C : 98,28 % - D : 72,28 % - E : 93,83 % - F : 79,01 %). L'essentiel de la perte d'information était liée à des problèmes d'identification des caprins et des prélèvements (doublons –

plusieurs numéros attribués au même animal – problème de traçabilité des résultats des analyses effectuées sur les tissus à l'équarrissage).

Il ressort de l'examen des fréquences des polymorphismes aux 5 codons réalisé sur notre échantillon (tableau 19) que :

- (i) Les codons 154 et 222 sont très peu polymorphes : près de 95 % des caprins génotypés sont homozygotes RR au codon 154 et plus de 90 % sont homozygotes QQ au codon 222.
- (ii) Les codons 142 et 211 présentent un polymorphisme plus important mais l'homozygotie concernait encore respectivement 86,58 % (II au codon 142) et 73,15 % (RR au codon 211) des caprins génotypés
- (iii) La présence d'une mutation sur les deux allèles du gène est très peu répandue : seulement 9 des caprins (0,61 %) sont homozygotes MM au codon 142, 6 (0,41 %) sont homozygotes HH au codon 154, 31 (2,10 %) sont homozygotes QQ au codon 211 et seulement 4 caprins (0,27 %) sont homozygotes KK au codon 222.
- (iv) De fortes disparités de la fréquence des polymorphismes entre les élevages : la fréquence du polymorphisme au codon 142 est très faible (< 7 %) dans les élevages E et F, alors qu'elle est très élevée (environ 30 %) dans l'élevage C ; la fréquence de la mutation H154 est très faible (entre 0 et 6 %) dans l'ensemble des élevages, sauf dans l'élevage F (33,25 %). Ces fortes disparités rendent difficile la réalisation d'analyses corrélatives statistiques (fort effet élevage).

Tableau 19 : Polymorphisme génétique aux 5 codons (142, 154, 211, 222 et 240) du gène PrP au sein des 6 élevages

Elevage	Effectif	Codon 142			Codon 154			Codon 211			Codon 222			Codon 240		
		II	MI	MM	HH	HR	RR	QQ	QR	RR	KK	KQ	QQ	PP	PS	SS
A	335	288	47	0	0	20	315	7	84	244	2	43	290	97	166	72
		85,97	14,03				5,97	94,03	2,09	25,07	72,84	0,60	12,84	86,57	28,96	49,55
B	293	264	29	0	1	13	279	5	44	244	0	25	268	91	147	55
		90,10	9,90		0,34	4,44	95,22	1,71	15,02	83,28		8,53	91,47	31,06	50,17	18,77
C	285	202	74	9	0	4	281	3	67	215	0	7	278	81	134	70
		70,88	25,96	3,16			1,40	98,60	1,05	23,51	75,44		2,46	97,54	28,42	47,02
D	206	186	20	0	0	0	206	1	44	161	0	27	179	53	118	35
		90,29	9,71					10	0,49	21,36	78,16		13,11	86,89	25,73	57,28
E	228	214	14	0	0	5	223	15	91	122	2	22	204	44	103	81
		93,86	6,14				2,19	97,81	6,58	39,91	53,51	0,88	9,65	89,47	19,30	45,18
F	128	123	5	0	5	35	88	0	35	93	0	7	121	19	64	45
		96,09	3,91		3,91	27,34	68,75		27,34	72,66		5,47	94,53	14,84	5	35,16
Total	1475	1277	189	9	6	77	1392	31	365	1079	4	131	1340	385	732	358
		86,58	12,81	0,61	0,41	5,22	94,37	2,10	24,75	73,15	0,27	8,88	90,85	26,10	49,63	24,27

Considérant les mutations décrites sur les 5 codons étudiés, 6 allèles (combinaisons de mutations) ont été observés (après clonage et séquençage des porteurs de mutations, résultats non présentés ici). Ces 6 allèles conduisent à l'existence 21 génotypes.

L'étude des fréquences a permis de considérer que l'allèle IRRQS était l'allèle sauvage (ancestral).

A partir de cet allèle sauvage sont observées des mutations sur un seul codon. Dans notre échantillon, un très fort déséquilibre de fréquences alléliques a été observé, avec par ordre de fréquences décroissantes les allèles IRRQP (43,90 %), IRQQS (14,47 %), IRRKS (4,71 %) et IHRQS (3,02 %). Une double mutation a également été mise en évidence aux codons 142 (I→M) et 240 (S→P) chez 7,02 % des individus.

Tableau 20 : Répartition allélique dans les 6 élevages

Effectif (% par élevage)	Elevages						Total
	B	A	C	E	D	F	
IRRQP	46,72	51,19	35,79	38,82	49,51	37,89	43,90
IRRQS	21,64	27,82	33,33	24,78	27,91	26,17	26,88
IRQQS	14,63	9,22	12,81	26,54	11,17	13,67	14,47
MRRQP	7,01	4,95	16,14	3,07	4,85	1,95	7,02
IRRKS	7,01	4,27	1,23	5,70	6,55	2,73	4,71
IHRQS	2,99	2,56	0,70	1,10	0,00	17,58	3,02

Tableau 21 : Fréquences génotypiques dans chaque élevage

	Codon(s) muté(s)	Effectif (% par élevage)	A	B	C	D	E	F	Total
Génotype sauvage		IRRQS/IRRQS	20 5,97	26 8,87	37 12,98	13 6,31	16 7,02	7 5,47	119
1 mutation sur 1 allèle	154	IHRQS/IRRQS	7 2,09	2 0,68	0 0,00	0 0,00	1 0,44	10 7,81	20
	211	IRQQS/IRRQS	13 3,88	11 3,75	24 8,42	9 4,37	31 13,60	12 9,38	100
	222	IRRKS/IRRQS	6 1,79	5 1,71	3 1,05	9 4,37	9 3,95	3 2,34	35
	240	IRRQP/IRRQS	74 22,09	84 28,67	58 20,35	64 31,07	35 15,35	27 21,09	342
1 mutation sur chaque allèle	154 / 154	IHRQS/IHRQS	0 0,00	1 0,34	0 0,00	0 0,00	0 0,00	5 3,91	6
	154 / 211	IHRQS/IRQQS	5 1,49	1 0,34	0 0,00	0 0,00	2 0,88	7 5,47	15
	154 / 222	IHRQS/IRRKS	0 0,00	3 1,02	0 0,00	0 0,00	1 0,44	1 0,78	5
	154 / 240	IHRQS/IRRQP	8 2,39	7 2,39	3 1,05	0 0,00	1 0,44	16 12,50	35
	211 / 211	IRQQS/IRQQS	7 2,09	5 1,71	3 1,05	1 0,49	15 6,58	0 0,00	31
	211 / 222	IRQQS/IRRKS	12 3,58	1 0,34	3 1,05	3 1,46	4 1,75	0 0,00	23
	211 / 240	IRQQS/IRRQP	47 14,03	30 10,24	29 10,18	29 14,08	52 22,81	16 12,50	203
	222 / 222	IRRKS/IRRKS	2 0,60	0 0,00	0 0,00	0 0,00	2 0,88	0 0,00	4
	222 / 240	IRRKS/IRRQP	15 4,48	14 4,78	1 0,35	14 6,80	8 3,51	3 2,34	55
240 / 240	IRRQP/IRRQP	72 21,49	74 25,26	41 14,39	44 21,36	37 16,23	16 12,50	284	
2 mutations sur 1 allèle	142 – 240	MRRQP/IRRQS	5 1,49	9 3,07	31 10,88	7 3,40	5 2,19	1 0,78	58
2 mutations sur 1 allèle et 1 mutation sur l'autre	142 – 240 / 154	MRRQP/IHRQS	0 0,00	0 0,00	1 0,35	0 0,00	0 0,00	1 0,78	2
	142 – 240 / 211	MRRQP/IRQQS	7 2,09	1 0,34	11 3,86	3 1,46	2 0,88	0 0,00	24
	142 – 240 / 222	MRRQP/IRRKS	10 2,99	2 0,68	0 0,00	1 0,49	0 0,00	0 0,00	13
	142 – 240 / 240	MRRQP/IRRQP	25 7,46	17 5,80	31 10,88	9 4,37	7 3,07	3 2,34	92
2 mutations sur chaque allèle	142 – 240 / 142 – 240	MRRQP/MRRQP	0 0,00	0 0,00	9 3,16	0 0,00	0 0,00	0 0,00	9
Total			335	293	285	206	228	128	1475

2. Polymorphismes du gène PRP et infection par la tremblante

Cette analyse a été réalisée à partir des 3 élevages atteints de tremblante enzootique (C, E et F). Pour les élevages A, B et D, la faible prévalence de la maladie ne permettait pas de conduire des analyses d'une puissance suffisante. Dans ces analyses la variable réponse est le statut infectieux des individus, établi à partir de l'ensemble des analyses disponibles (ELISA et IHC) sur les 4 tissus prélevés.

a. Analyse univariée par codon

Cette analyse a été réalisée pour chacun des 5 codons. Pour chaque polymorphisme, le nombre d'animaux infectés/non infectés a été comparé par le test du chi-deux ou le test de Fisher quand les effectifs le nécessitaient.

Le tableau 22 présente les effectifs et pourcentages d'animaux positifs pour chacun des polymorphismes observés sur les 5 codons étudiés.

Compte tenu de la très faible fréquence d'individus homozygotes MM au codon 142, un regroupement avec les animaux IM a été effectué. De même, les caprins HH au codon 154, QQ au codon 211 et KK au codon 222 ont respectivement été regroupés avec les animaux HR, RQ et KQ.

Le nombre de caprins infectés parmi les porteurs d'une mutation (IM) ou de 2 mutations (MM) n'était pas significativement différent de celui des caprins homozygotes II ($p=0,38$).

Par contre les caprins homozygotes HH154 ou hétérozygotes HR154 étaient significativement moins sensibles que les caprins homozygotes RR154 (respectivement 2,04 % versus 16,72 % d'animaux infectés, $p=0,0065$).

De même, les caprins hétérozygotes QR ou homozygotes QQ étaient significativement moins sensibles que les caprins homozygotes RR (respectivement 1,42 % versus 22,56 % de caprins infectés, $p<10^{-3}$).

Par ailleurs, parmi les 38 caprins hétérozygotes KQ222 ($n=36$) ou homozygotes KK222 ($n=2$) aucun n'était positif. A l'inverse, 16,58 % (100/603) des homozygotes QQ222 étaient positifs. La différence est statistiquement significative ($p=0,0063$).

En ce qui concerne le codon 240, les caprins homozygotes SS étaient significativement moins infectés que les caprins homozygotes PP (11,22 % versus 22,22 %, $p=0,0061$). En revanche il n'y avait pas de différence significative entre les animaux hétérozygotes PS et les

homozygotes SS ($p=0,1983$). Les hétérozygotes PS tendaient à être moins souvent positifs que les homozygotes PP, mais la différence n'était pas significative au seuil d'erreur de première espèce de 5% ($p=0,0716$).

Il semble donc au travers de cette première analyse que les mutations R→H (codon 154), R→Q (codon 211) et Q→K (codon 222) seraient fortement protectrices contre la tremblante et que la mutation I→M au codon 142 n'aurait pas d'effet sur la fréquence de l'infection.

Cependant compte tenu de l'existence de 21 génotypes différents, cette analyse simple ne permet pas d'étudier l'effet spécifique de chaque mutation. En effet, de nombreux animaux sont porteurs de plusieurs mutations, sur l'un ou les deux allèles, comme l'indique le tableau 21, conduisant à des facteurs de confusion importants. Une analyse de l'association entre le génotype global aux 5 codons du gène PrP et le statut infectieux était donc nécessaire.

Tableau 22 : Répartition des caprins génotypés des 3 élevages enzootiques (n=641) selon leur statut infectieux et leur typage aux codons 142, 154, 211, 222 et 240

Statut	Codon 142			Codon 154			Codon 211			Codon 222			Codon 240		
	II	MI	MM	RR	HR	HH	RR	QR	QQ	QQ	KQ	KK	PP	PS	SS
Négatif	452	80	9	493	43	5	333	190	18	503	36	2	112	255	174
	83,86	86,02	100,00	83,28	97,73	100,00	77,44	98,45	100,00	83,42	100,00	100,00	77,78	84,72	88,78
Positif	87	13	0	99	1	0	97	3	0	100	0	0	32	46	22
	16,14	13,98	0,00	16,72	2,27	0,00	22,56	1,55	0,00	16,58	0,00	0,00	22,22	15,28	11,22
Total	539	93	9	592	44	5	430	193	18	603	36	2	144	301	196

b. Analyse multivariée

*Principe de l'analyse et segmentation des populations :

Cette analyse plus complexe basée sur les génotypes a été réalisée afin de confirmer/infirmer les résultats obtenus au travers de l'analyse univariée. Cette analyse a fait appel à un modèle de régression logistique multivariée. La variable réponse était le statut (infecté ou non) de l'animal. La variable explicative principale était le génotype au gène PrP (ou le groupe de génotypes pour les regroupements présentés en annexe tableau III).

Compte tenu de l'absence (ou du très faible nombre) de cas positifs pour certains génotypes, des regroupements ont été fait sur la base du nombre et de la nature des mutations observées par rapport au génotype sauvage (tableau 23).

Tableau 23 : Regroupements effectués pour l'analyse multivariée

Génotype aux codons 142, 154, 211, 222, 240	Effectif	Groupe pour l'analyse multivariée
IHRQS / IHRQS	5	
IHRQS / IRRQP	20	IHRQS
IHRQS / IRRQS	11	
IRRKS / IRRKS	2	
IRRKS / IRRQP	12	IRRKS
IRRKS / IRRQS	15	

Un certain nombre de génotypes n'ont pas été pris en compte dans cette analyse. Il s'agit des génotypes IHRQS/IRQQS (n=9), IHRQS/IRRKS (n=2), IRQQS/IRRKS (n=7), MRRQP/IHRQS (n=2), MRRQP/IRQQS (n=13). Ces génotypes ne permettaient pas l'analyse spécifique de l'association entre chaque mutation et le statut infectieux, puisqu'ils étaient porteurs de deux mutations différentes sur chacun des allèles.

*Comparaison des pourcentages d'animaux infectés :

En première approche, une analyse de comparaison des effectifs de caprins infectés regroupés par génotypes (n= 608) a été effectuée par le test du chi-deux ou le test exact de Fisher quand les effectifs le nécessitaient (tableau 24).

Cette analyse a indiqué que l'allèle IRQQ à l'état homozygote ou hétérozygote était fortement protecteur vis à vis de la tremblante (3 cas sur 182 individus porteurs de cet allèle).

De même, les allèles porteurs des mutations R→H au codon 154 et Q→K au codon 222 semblaient protecteurs par comparaison au génotype sauvage de référence IRRQS/IRRQS (2, 78 % des animaux porteurs de l'H en 154 étaient positifs, aucun animal porteur de K en 222 n'était positif alors que 33,33 % des animaux porteurs du génotype sauvage étaient positifs).

Par ailleurs dans notre échantillon, les caprins de génotype MRRQP/MRRQP et MRRQP/IRRQP semblaient moins à risque que ceux porteurs du génotype de référence (p=0,05 et p=0,01). Cependant, les caprins hétérozygotes MRRQP/IRRQS ne semblaient pas bénéficier de cette moindre sensibilité, ce qui suggère un rôle protecteur de la mutation M142 à la condition d'une association avec la mutation P au codon 240.

Tableau 24: Comparaison des pourcentages d'animaux infectés selon le génotype par rapport au groupe de référence IRRQS/IRRQS et rapport de cotes associé

Génotype	Cas positif / Effectif total	Pourcentage de cas positifs	Odd's ratio [IC 95 %]*	p**
IRRQS/IRRQS	20/60	33,33	-	-
IRRQP/IRRQS	36/120	30,00	0,86 [0,421 – 1,772]	0,73307
IRRQP/IRRQP	27/94	28,72	0,81 [0,380 – 1,729]	0,59242
MRRQP/IRRQS	8/37	21,62	0,55 [0,185 – 1,544]	0,25459
MRRQP/IRRQP	5/41	12,20	0,28 [0,075 – 0,878]	0,01900
MRRQP/MRRQP	0/9	0	ND***	0,05057
IRQQS/IRRQS	1/67	1,49	0,03 [0,001 – 0,208]	0,00000
IRQQS/IRRQP	2/97	2,06	0,04 [0,005 – 0,190]	0,00000
IRQQS/IRQQS	0/18	0	ND***	0,00405
IHRQS ⁽¹⁾	1/36	2,78	0,06 [0,001 – 0,403]	0,00026
IRRKS ⁽²⁾	0/29	0	ND***	0,00022

(1) le groupe IHRQS comprend les animaux de génotype IHRQS/IHRSQ (n=5), IHRQS/IRRQP (n=20) et IHRQS/IRRQS (n=11).

(2) Le groupe IRRKS comprend les animaux de génotype IRRKS/IRRKS (n=2), IRRKS/IRRQP (n=12) et IRRKS/IRRQS (n=15)

* Odd's ratio [IC 95 %] : rapport de cotes par rapport au groupe de référence IRRQS/IRRQS et son intervalle de confiance exact à 95 %.

** p : degré de significativité de la différence entre les pourcentages d'animaux positifs, par rapport au groupe de référence IRRQS/IRRQS, calculé par le test exact de Fisher

*** ND = Non déterminé. Pour les génotypes pour lesquels aucun cas positif n'est observé, le rapport de cote ne peut être calculé.

*Analyse multivariée :

Dans l'analyse précédente, nous avons effectué une comparaison des effectifs (pourcentages) d'animaux infectés/non infectés selon le seul génotype. Cette analyse considérait que seul le génotype au gène PrP pouvait influencer la capacité des animaux à l'infection. Cependant, il est évident que (i) l'âge des animaux au moment du diagnostic et (ii) l'élevage d'origine peuvent aussi influencer.

Afin d'intégrer ces paramètres, une analyse a été réalisée par un modèle de régression logistique multivariée : (i) la variable réponse est le statut infectieux, (ii) la variable explicative principale est le génotype au gène PRP, (iii) le modèle a été ajusté sur l'âge et un effet aléatoire élevage a été introduit pour tenir compte d'une potentielle corrélation intra-troupeau.

La variable « âge au diagnostic » a été catégorisée, l'information par classe d'âge étant plus pertinente qu'une échelle continue. Le choix du ou des seuils pour définir les groupes s'est fait selon le critère du maximum de vraisemblance. Nous avons posé comme contrainte la présence d'au moins 10 animaux par classe d'âge dans chaque troupeau. Trois groupes ont ainsi été définis, [minimum-2],]2 – 4], et]4 – maximum].

Dans cette analyse, les génotypes ou groupes de génotypes pour lesquels aucun cas positif n'a été observé n'ont pas pu être analysés (IRRKS n=29, IRQQS/IRQQS n=18, MRRQP/MRRQP n=9), et les caprins pour lesquels l'âge n'avait pas pu être estimé (n=3) ont été éliminés, conduisant à un effectif de 550 caprins.

Tableau 25 : Résultats de l'analyse multivariée

Variable	Odd's ratio	IC 95 %		p
Génotype				
IRRQS / IRRQS	1	-	-	-
IRRQP / IRRQS	0.791	0.559	1.120	0.5008
IRRQP / IRRQP	0.729	0.504	1.053	0.3908
MRRQP / IRRQS	0.586	0.359	0.958	0.2778
MRRQS / IRRQP	0.282	0.162	0.490	0.0223
IRQQS / IRRQS	0.023	0.008	0.066	0.0003
IRQQS / IRRQP	0.031	0.015	0.067	<.0001
IHRQS	0.030	0.011	0.088	0.0010
Classe d'âge				
2 à 4 ans	0.928	0.666	1.294	0.8227
> 4 ans	2.316	1.746	3.070	0.0031

L'effet de l'âge (tableau 25) a été appréhendé : les animaux de plus de 4 ans sont globalement plus à risque d'être infectés ($p=0.003$) que les animaux de moins de 2 ans. Il n'y a pas de différence significative entre les animaux jeunes (moins de 2 ans) et ceux d'âge intermédiaire (2 à 4 ans). La faible précision des dates de naissance (parfois unique pour tous les animaux nés la même année dans un élevage), rend cependant l'interprétation de ces résultats délicate. En tout cas, cet effet, ainsi que l'effet élevage, ne semblent pas avoir biaisé l'analyse univariée puisque les estimateurs des rapports de cotes (Odd's ratio) pour les différents génotypes (tableau 25) sont semblables à ceux obtenus dans l'analyse univariée, traduisant la prédominance du rôle du gène PrP dans la susceptibilité à la tremblante. Les allèles porteurs des mutations R->Q au codon 211 et R->H au codon 154 apparaissent fortement protecteurs vis-à-vis de l'infection par la tremblante.

Aucun animal muté au codon 222 n'est apparu infecté. Cette absence de cas et le faible effectif d'individus porteurs de cette mutation (29 caprins) ne permettent pas d'évaluer avec une grande puissance le degré de protection que confère cette mutation.

Dans notre population d'étude la mutation I -> M au codon 142 ne semble être protectrice qu'en cas d'homozygotie PP au codon 240 (caprins MRRQP/MRRQP ou MRRQP/IRRQP).

III. DISCUSSION

Echantillon d'étude et imperfections de l'approche

Cette étude, réalisée sur une période de plus de trois ans, a permis de recueillir dans des troupeaux de caprins naturellement infectés un nombre considérable de données dont l'exploitation dépasse largement le cadre de cette thèse.

En effet les effectifs, mais aussi l'exhaustivité relative des analyses réalisées ici, sont sans commune mesure avec ceux actuellement disponibles dans le domaine de la tremblante caprine.

Toutefois il ressort clairement de l'analyse des résultats que l'identification des animaux et des échantillons prélevés est imparfaite, ce qui a sans aucun doute affecté la précision des analyses. La réalisation des diverses opérations (prélèvement sanguin, biopsie d'amygdale – puis prélèvement en équarrissage), couplée à l'absence de numéro individuel d'identification des petits ruminants, sont certainement à l'origine de beaucoup de ces erreurs.

Par ailleurs, même si le nombre d'animaux finalement inclus dans l'échantillon analysé paraît satisfaisant, la transposition directe des données obtenues à l'ensemble de la population caprine ne peut se faire sans certaines précautions. En effet, au sein même du groupe des troupeaux étudiés, de fortes disparités de la structure génétique ont été constatées et les effets de ces disparités, à l'échelle de la population caprine globale, ne sauraient être appréciés en l'absence de données plus précises (structure génotypique par race et aire géographique).

Une seconde limite à notre approche est le mode de détermination du statut infectieux des individus. Nous avons en effet fait le choix de considérer un individu comme sain (vis à vis de la tremblante) lorsqu'aucune des techniques utilisées ne permettait de détecter de PrP anormale dans aucun des tissus prélevés.

Cette approche combinatoire a permis d'éviter certains faux négatifs, mais n'est pas absolue. En effet la présence d'agent infectieux est possible dans certains tissus en l'absence de PrP détectable (Lasmez, et al., 1997). En toute rigueur seule l'utilisation de bio-essais adéquats permettrait de définir avec un degré de certitude maximal le statut infectieux d'un individu. Toutefois pour des raisons évidentes de coût et de faisabilité une telle méthode n'était pas applicable au cadre de notre travail.

A l'inverse, nous avons fait l'hypothèse que l'ensemble des techniques utilisées présentait une spécificité de 100%. Cette approche est inhabituelle dans le cadre de l'évaluation des

performances d'un test diagnostique. Différentes approches statistiques auraient pu être envisagées afin d'évaluer la sensibilité des différents tests en ne faisant pas l'hypothèse d'une spécificité parfaite, mais elles requièrent pour la plupart l'hypothèse d'indépendance conditionnelle des techniques et des analyses (Enoe, et al., 2000). Cette hypothèse n'étant clairement pas vérifiée dans notre étude (par exemple, un résultat positif sur l'obex, implique systématiquement un résultat positif sur le nœud lymphatique mésentérique, l'inverse n'étant pas vrai), ces méthodes n'étaient donc pas applicables. D'autres méthodes plus élaborées permettent de tenir compte de la non indépendance des techniques (Qu, 1998), mais elles sont encore du domaine de la recherche statistique et ne sont pas encore développées pour prendre en compte le grand nombre d'analyses effectuées (9 par individus).

Nous avons dès lors préféré faire l'hypothèse d'une spécificité parfaite, qui rendait les calculs envisageables. En l'absence de test de référence parfait, cette hypothèse est envisageable dès lors qu'elle s'accompagne d'une vérification scrupuleuse des résultats douteux ou contradictoires. Dans notre étude un certain nombre de cas contradictoires ont fait l'objet d'analyses supplémentaires (contranalyse par IHC ou ELISA ou analyse en Western-Blot) afin de confirmer ou d'infirmer les résultats antérieurs. Néanmoins, dans le cadre de cette hypothèse se pose l'éventualité de quelques faux positifs.

Efficacité du dépistage sur tissus prélevés post mortem

Dans notre étude, les tests de détection de la PrP anormale pratiqués sur obex sont d'une sensibilité très décevante (environ 50%). Ces mauvais résultats ne semblent pas liés à la nature de la technique utilisée. Même si les tests 'officiels' pratiqués sous l'égide des autorités sanitaires officielles se sont avérés moins sensibles que ceux pratiqués dans notre laboratoire, les différentes techniques utilisées (tests rapides par ELISA /IHC) ont abouti à des résultats équivalents. Dans ces conditions un défaut de la sensibilité 'analytique' de ces tests ne semble également pas pouvoir expliquer les résultats obtenus. La principale explication tient sans doute au schéma de dissémination de la PrP anormale dans l'organisme des animaux atteints. Chez les ovins, lors d'infection naturelle par les EST, il semble établi que la contamination s'effectue par voie digestive. Après exposition à l'agent, une accumulation de PrP^{sc} est rapidement détectable dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif (Andreoletti, et al., 2000 ; Heggebo, et al., 2000). En l'absence d'éléments spécifiques à l'espèce caprine quant au schéma de dissémination de la PrP anormale dans l'organisme (publiés et

accessibles), nos données semblent compatibles avec la situation rapportée chez les ovins où une phase de lympho-invasion périphérique précède la phase de neuro-invasion.

Dans notre étude, l'efficacité d'un test rapide déjà utilisé sur le terrain (ELISA) et sa comparaison avec une méthode référence (l'immunohistochimie) font la preuve des excellentes performances d'un dépistage des EST chez les caprins par test rapide sur tissu lymphoïde.

La seule limite à l'usage exclusif des tissus lymphoïdes pour la réalisation du dépistage des EST est la situation décrite chez certains ovins. En effet, chez les individus hétérozygotes ARR l'infection semble associée à une faible accumulation de PrP^{sc} dans les structures lymphoïdes secondaires (van Keulen, et al., 1995 ; Androletti, et al., 2000). Notons cependant que de tels cas n'ont pas été observés dans notre échantillon : l'ensemble des animaux qui se sont avérés positifs sur l'obex l'étaient aussi sur le tissu lymphoïde (amygdale ou nœud lymphatique mésentérique). Afin de limiter les risques potentiels de faux négatifs liés à l'absence éventuelle d'accumulation de PrP anormale dans le tissu lymphoïde de certains individus (effet potentiel de polymorphismes du gène PrP caprin non identifiés dans cette étude, ou effet de la souche d'agent EST en cause) l'utilisation conjointe d'un prélèvement de SNC et de tissu lymphoïde pourrait être envisagée.

Efficacité diagnostique de la biopsie d'amygdale

Dans notre échantillon le diagnostic basé sur les biopsies d'amygdale a montré une sensibilité de 90,09 % (IC95%=82,96-94,95). Cette performance est bien supérieure à celle des tests réalisés sur obex.

Différents biais pourraient, par ailleurs, être à l'origine d'une sous-évaluation de la sensibilité de la méthode. Il s'agit notamment du délai entre la réalisation des biopsies et la réalisation des prélèvements post mortem à l'équarrissage, qui peut pour certains élevages excéder 2 mois. Dans ces conditions il paraît légitime d'envisager une possible contamination ultérieure des individus.

Toutefois le défaut de sensibilité de la biopsie d'amygdale ne peut être attribué à ce seul facteur. En effet, dans notre échantillon certains individus n'avaient pas accumulé de PrP anormale dans l'amygdale (pas de détection ni sur biopsie ni sur test à l'équarrissage) alors que celle-ci était détectable dans l'iléon et/ou le nœud lymphatique mésentérique. Cette situation s'explique sans doute par la dynamique du schéma de dissémination de la PrP^{sc} dans

les tissus des individus atteints. Si cette dynamique est identique à celle observée chez les ovins, la contamination s'effectue par les plaques de Peyer iléales, les premiers tissus touchés ensuite sont les nœuds lymphatiques mésentériques drainants cette zone, l'amygdale n'étant atteinte qu'ultérieurement (Andreoletti, et al., 2000).

Dans ce contexte, malgré sa bonne sensibilité, la détection sur biopsie d'amygdale ne saurait permettre, sur un seul prélèvement, de déterminer avec une absolue certitude le statut infectieux d'un individu isolé. Toutefois la réalisation de deux tests, séparés par une période de temps suffisante, devrait permettre de lever cette réserve.

Malgré les difficultés de mise en œuvre (réalisation d'une anesthésie, recours à un équipement spécifique), le nombre de prélèvements réalisés, la faiblesse du nombre de biopsies ratées ainsi que le nombre limité de personnes mobilisées pour prélever les quelques 1500 individus inclus dans cette étude, témoignent de la possibilité de mettre en œuvre, dans un nombre limité de troupeaux, cette technique.

Au vu de l'ensemble de ces éléments, l'utilisation de cet outil pour évaluer de façon fiable, sur animaux vivants, la prévalence de l'infection dans des troupeaux atteints nous paraît donc envisageable.

Modulation de la sensibilité à la tremblante et polymorphismes du gène PRP

L'espoir de découvrir sur le gène PRP caprin des polymorphismes associés à une moindre sensibilité aux EST motive beaucoup les études menées dans le domaine de la tremblante caprine. De tels polymorphismes permettraient, à l'instar de la politique menée chez les ovins, d'envisager des moyens de lutte contre ces maladies ne faisant appel qu'à un abattage sélectif dans les troupeaux atteints.

Les premiers travaux (non présentés ici) menés :

- (i) sur un échantillon représentatif de la population caprine française (boucs d'insémination artificielle),
- (ii) dans un troupeau très fortement atteint (incidence de la maladie de 35%) où le gène PRP de l'ensemble des individus a été séquencé

nous ont amené dans notre étude à nous focaliser sur les codons 142-154-211-222 et 240, en ignorant certains autres polymorphismes pourtant décrits dans la littérature.

Cette démarche, bien que critiquable sur un plan scientifique a été menée avec le souci (i) de rendre notre étude réalisable sur un plan financier (ii) d'accroître l'efficacité du travail mis en oeuvre. Par ailleurs, compte tenu de la variabilité génétique du gène PRP dans la population française caprine, l'étude de l'ensemble des polymorphismes décrits sur le gène PRP caprin se serait révélé peu efficace (faiblesse des effectifs associés à certains polymorphismes).

Parmi les 5 codons sélectionnés, 4 correspondent à des positions déjà décrites comme ayant un effet potentiel sur la sensibilité ou les durées d'incubation des EST caprines (142-154-211-222) (Goldmann, et al., 1996 ; Goldmann, et al., 1998 ; Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006). Toutefois certains polymorphismes comme la mutation H/R143 ou la présence de 3 répétitions d'octapeptides associées à la glycine en 102, décrits comme potentiellement intéressants (Goldmann, et al., 1996 ; Goldmann, et al., 1998 ; Billinis, et al., 2002 ; Agrimi, et al., 2003), n'ont pu être étudiés.

Parmi les résultats que nous avons obtenus il ressort que le polymorphisme en position 142 (I/M) ne semble conférer de résistance partielle à l'infection que lorsqu'il est associé à la mutation P240. Ce résultat est en accord avec les travaux de Goldmann (Goldmann, et al., 1996 ; 1998). En effet, dans ces études, la méthionine en 142 semblait conférer une augmentation de résistance dans le cadre d'infections expérimentales par les souches CH 1641, ME 7 et d'ESB. Cependant, dans d'autres études, cet effet ne semblait pas exister (Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006). Si une association allélique M142-P240 est nécessaire à l'expression de la résistance, la faiblesse des effectifs et la non prise en compte de l'influence de cette liaison peuvent expliquer les discordances observées entre ces études.

Dans notre échantillon les polymorphismes Q211 et K222 semblaient associés à une plus forte résistance à la maladie.

La description d'un fort effet protecteur du Q211 est originale. En effet si ce polymorphisme a déjà été décrit (Acutis, et al., 2006) aucun effet ne semblait lui être attribué. Ce point

s'explique certainement par la faible fréquence de cette mutation dans les populations ayant fait l'objet des études antérieures ainsi que par le nombre limité d'animaux inclus dans ces études. L'effet protecteur de la lysine en position 222 a récemment été rapporté par deux autres études (Acutis, et al., 2006 ; Vaccari, et al., 2006). De façon intéressante, chez l'homme la présence de lysine en cette position (codon 219 du gène PRP humain correspondant à la position 222 du gène PrP caprin), semble associée à une plus forte résistance à la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (Shibuya, et al., 1998).

Bien qu'un niveau de protection élevé semble associé aux codons Q211 et K222 il demeure important de souligner que cette résistance, tout du moins à l'état hétérozygote, ne peut en aucun cas être considérée comme absolue.

Concernant le dernier codon (154) apparu comme protecteur dans notre étude, différents travaux ont déjà rapporté que l'histidine en 154 conférait une augmentation de résistance à la tremblante naturelle chez les caprins (Billinis, et al., 2002 ; Vaccari, et al., 2006). Nos résultats semblent confirmer ces données. Toutefois, des travaux menés récemment indiquent que ce polymorphisme est, chez les ovins, associé à une plus grande sensibilité à certains agents des EST (tremblante atypique ou de type Nor98) et des cas de tremblante atypique ont été décrits chez les caprins (Moum et al, 2005).

Ces éléments amènent à s'interroger sur le caractère universel de la 'résistance' que pourrait conférer certains polymorphismes du gène PRP. En effet en fonction de l'agent d'EST en cause (souche), le comportement associé à certains génotypes pourrait être modulé. Au delà du cas de la tremblante atypique décrit plus haut, la question de la variation des effets des polymorphismes du gène PRP en fonction de la souche doit être envisagée. L'allèle VRQ chez les ovins semble associé dans la plupart des cas de tremblante naturelle à une forte sensibilité à la maladie par comparaison à l'allèle ARQ. Toutefois, lors d'infection expérimentale par l'ESB, les porteurs de l'allèle ARQ apparaissent plus sensibles à la maladie que les porteurs d'allèle VRQ (Foster, et al., 1988 ; Foster, et al., 1993 ; Goldmann, et al., 1996 ; Foster, et al., 2001).

Ces éléments nous incitent à considérer que les résultats que nous avons ici obtenus, même si ils sont largement corroborés par des études antérieures, doivent être considérés avec précaution. Avant de pouvoir affirmer que certains polymorphismes sont associés à une plus forte résistance à la maladie, d'autres travaux devront être entrepris. Des infections expérimentales par différents agents des EST permettront d'éviter les biais liés à des différences d'exposition et d'objectiver les effets de chacun des polymorphismes identifiés. Par ailleurs, compte tenu des enjeux sanitaires, l'utilisation pour ces infections expérimentales de l'agent de l'ESB paraît essentielle.

Vers des méthodes alternatives à l'abattage total

Réglementairement, seul l'abattage total est considéré comme une mesure d'assainissement des élevages atteints. En cela la législation française est conforme à la réglementation européenne en matière d'EST. Ces mesures ont un coût financier mais aussi social extrêmement élevé.

Au delà des 6 troupeaux dont les résultats ont été présentés ici, un total de 12 troupeaux a fait l'objet de prélèvements à l'équarrissage (6 élevages sans biopsie d'amygdale ni typage du gène PRP- résultats non présentés). Les résultats obtenus dans l'ensemble de ces troupeaux indiquent clairement que (i) pour la moitié d'entre eux aucun autre cas que le cas index n'était décelable, (ii) pour l'autre moitié des troupeaux une prévalence élevée était observée. Face à cette dichotomie se pose la question du bien fondé de l'abattage total systématisé.

Différentes alternatives pourraient, à la lumière des résultats actuellement disponibles, être proposées.

Il s'agit tout d'abord d'un recours à l'outil génétique, avec l'utilisation dans les troupeaux atteints de reproducteurs porteurs d'allèles de moindre sensibilité. Cette approche quoique séduisante semble actuellement difficile à appliquer à divers titres. Au delà des incertitudes relatives à l'universalité (différents types d'agents des EST) de la résistance observée qui reste à objectiver, la structure génétique des populations caprines est un frein majeur à cette approche. En effet les mutations les plus intéressantes (Q211 et K 222) semblent très peu fréquentes. Des efforts à l'échelle de la population générale seraient nécessaires pour augmenter la fréquence de ces allèles. Une telle démarche requiert de forts investissements financiers et une action coordonnée des différents acteurs de la filière caprine, qui ne peuvent être envisagés sans un soutien des pouvoirs publics (vision à long terme).

Pourtant même en l'état actuel des mesures d'éradication des EST caprines (abattage et repeuplement), les mesures de sélection de résistance semblent nécessaires. En effet, un écueil majeur de la politique actuellement appliquée demeure qu'elle ne propose après abattage et nettoyage des installations qu'un repeuplement de l'élevage à partir d'animaux 'tout-venant'. Compte tenu de la forte résistance dans l'environnement de l'agent infectieux, la récurrence de la maladie semble possible, comme cela a été observé en tremblante ovine (Detwiler, 1992). Dans ce contexte l'introduction d'animaux de moindre sensibilité dans les élevages atteints semble la seule solution rationnelle à ce problème.

L'autre alternative à l'abattage total systématique pourrait être la mise en place d'une politique différentielle, distinguant les troupeaux en fonction de leur niveau d'incidence. Dans cette perspective après détection du cas index, l'ensemble des individus du troupeau pourrait être testé (biopsie d'amygdale). Les troupeaux dans lesquels d'autres cas seraient ainsi identifiés n'auraient d'autre solution que l'abattage total alors que les troupeaux où aucun autre cas ne serait détecté feraient l'objet d'une mise sous surveillance sans abattage total. Au bout de quelques années de surveillance (tests systématiques de tous les individus éliminés de l'élevage) et en l'absence de détection d'autre cas, les mesures de surveillance et de restriction de circulation des animaux seraient levées. Cette alternative est actuellement testée dans un nombre restreint d'élevages atteints (programme dérogatoire- durée de la surveillance : 3 ans). Ce programme a pour objectif de faire la preuve de l'efficacité de ces mesures de surveillance.

Afin d'accroître l'efficacité de cette approche alternative, la combinaison de l'approche génétique et sanitaire différentielle pourrait également être envisagée. Le couplage de l'introduction de génotype de moindre sensibilité aux mesures de surveillance du programme dérogatoire dans les troupeaux atteints devrait permettre :

- (i) de sécuriser davantage les troupeaux atteints mis sous surveillance (aucun autre cas que le cas index détecté par biopsie d'amygdale)
- (ii) d'étendre ce programme dérogatoire à des troupeaux à très faible incidence (quelque cas positifs détectés par biopsie d'amygdale). Dans ces troupeaux les individus positifs seraient alors éliminés et l'utilisation de reproducteurs porteurs d'allèles de résistance serait mise en place pour limiter la circulation potentielle de l'agent transmissible.

Toutefois là encore de telles mesures demandent des efforts coordonnés et soutenus de l'ensemble des acteurs de la filière caprine et des autorités sanitaires.

CONCLUSION

Les résultats présentés ici indiquent sans ambiguïté qu'une part importante des efforts réalisés en matière de détection des troupeaux atteints (tests en abattoir et équarrissage sur obex) sont inefficaces. Malgré les difficultés pratiques que pourraient représenter l'inclusion des tissus lymphoïdes comme matrice dans le cadre des programmes de dépistage (identification, réalisation d'un prélèvement correct), leur non utilisation chez les petits ruminants n'est scientifiquement pas justifiable.

Nos travaux ouvrent par ailleurs différentes pistes permettant d'envisager des alternatives à la l'abattage total dans la lutte contre les EST caprines. Ces pistes, qu'elles reposent sur une approche génétique ou la réalisation d'un suivi individuel des caprins dans les troupeaux atteints, requièrent davantage de travaux pour permettre d'en confirmer l'intérêt et d'en établir les limites. Toutefois, au delà de ces difficultés, elles offrent de nouveaux espoirs aux éleveurs dont les troupeaux sont atteints par cette maladie et qui, percevant mal les enjeux en terme de santé animale et humaine que recouvrent les EST, n'acceptent que difficilement les mesures de lutte qui leur sont imposées.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle DAMAY Christine, Germaine, Geneviève
a été admis(e) sur concours en : 2000
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 16/06/2005-
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

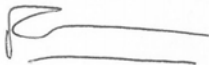
AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, F. SCHELCHER, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

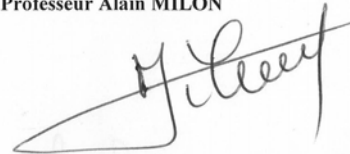
Mlle DAMAY Christine, Germaine, Geneviève
intitulée :

Tremblante caprine évaluation des performances des outils diagnostiques et caractérisation de l'influence des polymorphismes du gène PRP sur la sensibilisation à la maladie

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur François SCHELCHER



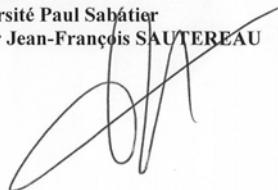
Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jacques IZOPET



Vu le : 14 NOV. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU



BIBLIOGRAPHIE

ACUTIS, P. L., BOSSERS, A., PRIEM, J., et al.

Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks.
J Gen Virol, 2006, **87**, 1029-33.

AGRIMI, U., CONTE, M., MORELLI, L., et al.

Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics.
Vet Res Commun, 2003, **27 Suppl 1**, 31-8.

AGUZZI, A.

Peripheral prion pursuit.
J Clin Invest, 2001, **108**, 661-2.

AKOWITZ, A., SKLAVIADIS, T. and MANUELIDIS, L.

Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease.
Nucleic Acids Res, 1994, **22**, 1101-7.

ALPER, T., HAIG, D. A. and CLARKE, M. C.

The exceptionally small size of the scrapie agent.
Biochem Biophys Res Commun, 1966, **22**, 278-84.

ALPER, T. and HAIG, D. A.

Protection by anoxia of the scrapie agent and some DNA and RNA viruses irradiated as dry preparations.
J Gen Virol, 1968, **3**, 157-66.

ANDREOLETTI, O., BERTHON, P., MARC, D., et al.

Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie.
J Gen Virol, 2000, **81**, 3115-26.

ANDREOLETTI, O., BERTHON, P., LEVAVASSEUR, E., et al.

Phenotyping of Protein-Prion (PrPsc)-accumulating Cells in Lymphoid and Neural Tissues of Naturally Scrapie-affected Sheep by Double-labeling Immunohistochemistry.
J. Histochem. Cytochem., 2002, **50**, 1357-1370.

AUCOUTURIER, P., GEISSMANN, F., DAMOTTE, D., et al.

Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie.
J Clin Invest, 2001, **108**, 703-708.

BALDAUF, E., BEEKES, M. and DIRINGER, H.

Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord.
J Gen Virol, 1997, **78**, 1187-97.

- BANCHEREAU, J. and STEINMAN, R. M.
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature, 1998, **392**, 245-52.
- BARINGER, J. R. and PRUSINER, S. B.
Experimental scrapie in mice: ultrastructural observations.
Ann Neurol, 1978, **4**, 205-11.
- BARTZ, J. C., KINCAID, A. E. and BESSEN, R. A.
Retrograde Transport of Transmissible Mink Encephalopathy within Descending Motor Tracts.
J Virol, 2002, **76**, 5759-68.
- BASLER, K., OESCH, B., SCOTT, M., et al.
Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene.
Cell, 1986, **46**, 417-28.
- BAYLIS, M.
The BSE-susceptible proportion of UK sheep.
Vet Rec, 2002, **151**, 481-2.
- BAYLIS, M. and GOLDMANN, W.
The genetics of scrapie in sheep and goats.
Curr Mol Med, 2004, **4**, 385-96.
- BEEKES, M., BALDAUF, E. and DIRINGER, H.
Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie.
J Gen Virol, 1996, **77**, 1925-34.
- BEEKES, M., MCBRIDE, P. A. and BALDAUF, E.
Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie.
J Gen Virol, 1998, **79**, 601-7.
- BEEKES, M. and MCBRIDE, P. A.
Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie.
Neurosci Lett, 2000, **278**, 181-4.
- BEGARA-MCGORUM, I., GONZALEZ, L., SIMMONS, M., et al.
Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation.
J Comp Pathol, 2002, **127**, 59-68.
- BELL, J. E., GENTLEMAN, S. M., IRONSIDE, J. W., et al.
Prion protein immunocytochemistry--UK five centre consensus report.
Neuropathol Appl Neurobiol, 1997, **23**, 26-35.

- BELT, P. B., MUILEMAN, I. H., SCHREUDER, B. E., et al.
Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie.
J Gen Virol, 1995, **76**, 509-17.
- BENDHEIM, P. E., BROWN, H. R., RUDELLI, R. D., et al.
Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein.
Neurology, 1992, **42**, 149-56.
- BENESTAD, S. L., SARRADIN, P., THU, B., et al.
Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98.
Vet Rec, 2003, **153**, 202-8.
- BENNETT, A. D., BIRKETT, C. R. and BOSTOCK, C. J.
Molecular biology of scrapie-like agents.
Rev Sci Tech, 1992, **11**, 569-603.
- BERINGUE, V., DEMOY, M., LASMEZAS, C. I., et al.
Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis.
J Pathol, 2000, **190**, 495-502.
- BESSEN, R. A. and MARSH, R. F.
Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent.
J Virol, 1992, **66**, 2096-101.
- BESSEN, R. A. and MARSH, R. F.
Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy.
J Virol, 1994, **68**, 7859-68.
- BESSEN, R. A., KOCISKO, D. A., RAYMOND, G. J., et al.
Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein.
Nature, 1995, **375**, 698-700.
- BILLINIS, C., PANAGIOTIDIS, C. H., PSYCHAS, V., et al.
Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie.
J Gen Virol, 2002, **83**, 713-21.
- BLATTLER, T., BRANDNER, S., RAEBER, A. J., et al.
PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain.
Nature, 1997, **389**, 69-73.
- BOLTON, D. C., MCKINLEY, M. P. and PRUSINER, S. B.
Identification of a protein that purifies with the scrapie prion.
Science, 1982, **218**, 1309-11.

- BOLTON, D.C., BENDHEIM, P.E.
A modified host protein model of scrapie.
Ciba Found Symp, 1988, **135**, 164-81.
- BONS, N., LEHMANN, S., MESTRE-FRANCES, N., et al.
Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*.
Transfusion, 2002, **42**, 513-6.
- BORCHELT, D. R., KOLIATSOS, V. E., GUARNIERI, M., et al.
Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems.
J Biol Chem, 1994, **269**, 14711-4.
- BOSSERS, A., SCHREUDER, B. E., MUILEMAN, I. H., et al.
PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie.
J Gen Virol, 1996, **77**, 2669-73.
- BOSSERS, A., BELT, P., RAYMOND, G. J., et al.
Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, 4931-6.
- BOSSERS, A., DE VRIES, R. and SMITS, M. A.
Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP.
J Virol, 2000, **74**, 1407-14.
- BOUSSET, L., BELRHALI, H., JANIN, J., et al.
Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Structure (Camb), 2001, **9**, 39-46.
- BROWN, D. R., SCHMIDT, B. and KRETZSCHMAR, H. A.
Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment.
Nature, 1996, **380**, 345-7.
- BROWN, D. R., SCHULZ-SCHAEFFER, W. J., SCHMIDT, B., et al.
Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity.
Exp Neurol, 1997, **146**, 104-12.
- BROWN, K. L., STEWART, K., RITCHIE, D. L., et al.
Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein- expressing follicular dendritic cells.
Nat Med, 1999, **5**, 1308-12.

- BROWN, P., ROHWER, R. G. and GAJDUSEK, D. C.
Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue.
J Infect Dis, 1986, **153**, 1145-8.
- BROWN, P., LIBERSKI, P. P., WOLFF, A., et al.
Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications.
J Infect Dis, 1990, **161**, 467-72.
- BROWN, P., ROHWER, R. G., DUNSTAN, B. C., et al.
The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy.
Transfusion, 1998, **38**, 810-6.
- BROWN, P., CERVENAKOVA, L., MCSHANE, L. M., et al.
Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans.
Transfusion, 1999, **39**, 1169-78.
- BROWN, P., RAU, E. H., JOHNSON, B. K., et al.
New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**, 3418-21.
- BRUCE.
Biological stability of different classes of scrapie agent.
In: PRUDSINER SJ, H. W.
Slow transmissible diseases of the nervous system.
New York: Academic, 1979, 71-86.
- BRUCE, M. E. and DICKINSON, A. G.
Biological evidence that scrapie agent has an independent genome.
J Gen Virol, 1987, **68**, 79-89.
- BRUCE, M. E. and FRASER, H.
Scrapie strain variation and its implications.
Curr Top Microbiol Immunol, 1991, **172**, 125-38.
- BRUCE, M. E., WILL, R. G., IRONSIDE, J. W., et al.
Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments].
Nature, 1997, **389**, 498-501.
- BRUCE, M. E., BOYLE, A., COUSENS, S., et al.
Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE.
J Gen Virol, 2002, **83**, 695-704.

- BUELER, H., FISCHER, M., LANG, Y., et al.
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein.
Nature, 1992, **356**, 577-82.
- BUELER, H., AGUZZI, A., SAILER, A., et al.
Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.
Cell, 1993, **73**, 1339-47.
- BUELER, H., RAEBER, A., SAILER, A., et al.
High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene.
Mol Med, 1994, **1**, 19-30.
- BURTHEM, J., URBAN, B., PAIN, A., et al.
The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells.
Blood, 2001, **98**, 3733-8.
- BUSCHMANN, A., PFAFF, E., REIFENBERG, K., et al.
Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP(C).
Arch Virol Suppl, 2000, 75-86.
- BUSCHMANN, A., LUHKEN, G., SCHULTZ, J., et al.
Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrP ARR/ARR).
J Gen Virol, 2004, **85**, 2727-33.
- CAMPBELL, I. L., EDDLESTON, M., KEMPER, P., et al.
Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie.
J Virol, 1994, **68**, 2383-7.
- CARP, R. I. and CALLAHAN, S. M.
Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation.
Intervirology, 1982, **17**, 201-7.
- CARP, R. I., CALLAHAN, S. M., SERSEN, E. A., et al.
Preclinical changes in weight of scrapie-infected mice as a function of scrapie agent-mouse strain combination.
Intervirology, 1984, **21**, 61-9.
- CASHMAN, N. R., LOERTSCHER, R., NALBANTOGLU, J., et al.
Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation.
Cell, 1990, **61**, 185-92.
- CHABRY, J., CAUGHEY, B. and CHESEBRO, B.
Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides.
J Biol Chem, 1998, **273**, 13203-7.

- CHANDLER, R.
Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material.
Lancet, 1961, **1**, 1378-9.
- CHELLE, P. L.
Un cas de tremblante chez la chèvre.
Bull. Acad. Vet. Fr., 1942, **15**, 294-295.
- CHIESA, R., PICCARDO, P., GHETTI, B., et al.
Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation.
Neuron, 1998, **21**, 1339-51.
- CHOI, Y. G., KIM, J. I., LEE, H. P., et al.
Induction of heme oxygenase-1 in the brains of scrapie-infected mice.
Neurosci Lett, 2000, **289**, 173-6.
- CLOUSCARD, C., BEAUDRY, P., ELSEN, J. M., et al.
Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie.
J Gen Virol, 1995, **76**, 2097-101.
- COHEN, F. E., PAN, K. M., HUANG, Z., et al.
Structural clues to prion replication.
Science, 1994, **264**, 530-1.
- COLLINGE, J., OWEN, F., POULTER, M., et al.
Prion dementia without characteristic pathology.
Lancet, 1990, **336**, 7-9.
- COLLINGE, J., WHITTINGTON, M. A., SIDLE, K. C., et al.
Prion protein is necessary for normal synaptic function.
Nature, 1994, **370**, 295-7.
- COLLINGE, J., SIDLE, K. C., MEADS, J., et al.
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD.
Nature, 1996, **383**, 685-90.
- CUILLÉ, J. and CHELLE, P. L.
La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?
C. R. Acad. Sci. Paris., 1936, **203**, 1552-54.
- DAWSON, M., HOINVILLE, L. J., HOSIE, B. D., et al.
Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group.
Vet Rec, 1998, **142**, 623-5.

- DE GIOIA, L., SELVAGGINI, C., GHIBAUDI, E., et al.
Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein.
J Biol Chem, 1994, **269**, 7859-62.
- DEARMOND, S. J., MOBLEY, W. C., DEMOTT, D. L., et al.
Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection.
Neurology, 1987, **37**, 1271-80.
- DEARMOND, S. J., KRISTENSSON, K. and BOWLER, R. P.
PrPSc causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox.
Prog Brain Res, 1992, **94**, 437-46.
- DEBBURMAN, S. K., RAYMOND, G. J., CAUGHEY, B., et al.
Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, 13938-43.
- DESLYS, J. P., COMOY, E., HAWKINS, S., et al.
Screening slaughtered cattle for BSE.
Nature, 2001, **409**, 476-8.
- DETWILER, L.A.
Scrapie
Rev Sci Tech, 1992, **11**, 491-537.
- DICKINSON, A. G., MEIKLE, V. M. and FRASER, H.
Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice.
J Comp Pathol, 1968, **78**, 293-9.
- DICKINSON, A. G. and FRASER, H.
Scrapie: effect of Dh gene on incubation period of extraneurally injected agent.
Heredity, 1972, **29**, 91-3.
- DICKINSON, A. G.
Scrapie in sheep and goats.
Front Biol, 1976, **44**, 209-41.
- DICKINSON, A. G. and TAYLOR, D. M.
Resistance of scrapie agent to decontamination.
N Engl J Med, 1978, **299**, 1413-4.
- DICKINSON, A. G. and OUTRAM, G. W.
Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis.
Ciba Found Symp, 1988, **135**, 63-83.

- DICKINSON, A. G., OUTRAM GW.
Operational limitations in the characterization of the infective units of Scrapie.
In: CURT LA, C. F.
Virus non conventionnels et affection du système nerveux central.
Paris: Masson, 1983, 3-16.
- DIEDRICH, J. F., BENDHEIM, P. E., KIM, Y. S., et al.
Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, **88**, 375-9.
- DIRINGER, H.
Sustained viremia in experimental hamster scrapie. Brief report.
Arch Virol, 1984, **82**, 105-9.
- DIRINGER, H., RAHN, H. C. and BODE, L.
Antibodies to protein of scrapie-associated fibrils.
Lancet, 1984, **2**, 345.
- DIRINGER, H.
Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) virus-induced amyloidoses of the central nervous system (CNS).
Eur J Epidemiol, 1991, **7**, 562-6.
- DODELET, V. C. and CASHMAN, N. R.
Prion protein expression in human leukocyte differentiation.
Blood, 1998, **91**, 1556-61.
- DOH-URA, K., TATEISHI, J., SASAKI, H., et al.
Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome.
Biochem Biophys Res Commun, 1989, **163**, 974-9.
- DORANDEU, A., WINGERTSMANN, L., CHRETIEN, F., et al.
Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia.
Brain Pathol, 1998, **8**, 531-7.
- DROGEMULLER, C., LEEB, T. and DISTL, O.
PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie.
Vet Rec, 2001, **149**, 349-52.
- EKLUND, C. M., KENNEDY, R. C. and HADLOW, W. J.
Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse.
J Infect Dis, 1967, **117**, 15-22.
- ELOIT, M., ADJOU, K., COULPIER, M., et al.
BSE agent signatures in a goat.
Vet Rec, 2005, **156**, 523-4.

- ELSEN, J. M., AMIGUES, Y., SCHELCHER, F., et al.
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov.
Arch Virol, 1999, **144**, 431-45.
- ENDRES, R., ALIMZHANOV, M. B., PLITZ, T., et al.
Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells.
J Exp Med, 1999, **189**, 159-68.
- ENOE, C., GEORGIADIS, M. P. and JOHNSON, W. O.
Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown.
Prev Vet Med, 2000, **45**, 61-81.
- EUROPE, S. http://www.spectroscopyeurope.com/news12_5.html. 2003, 2002.
- FABRIZI, C., SILEI, V., MENEGAZZI, M., et al.
The stimulation of inducible nitric-oxide synthase by the prion protein fragment 106--126 in human microglia is tumor necrosis factor-alpha-dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase.
J Biol Chem, 2001, **276**, 25692-6.
- FELTEN, D. L. and FELTEN, S. Y.
Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs.
Brain Behav Immun, 1988, **2**, 293-300.
- FLORIO, T., GRIMALDI, M., SCORZIELLO, A., et al.
Intracellular calcium rise through L-type calcium channels, as molecular mechanism for prion protein fragment 106-126-induced astroglial proliferation.
Biochem Biophys Res Commun, 1996, **228**, 397-405.
- FOLLET, J., LEMAIRE-VIEILLE, C., BLANQUET-GROSSARD, F., et al.
PrP Expression and Replication by Schwann Cells: Implications in Prion Spreading.
J Virol, 2002, **76**, 2434-2439.
- FORLONI, G., ANGERETTI, N., CHIESA, R., et al.
Neurotoxicity of a prion protein fragment.
Nature, 1993, **362**, 543-6.
- FORLONI, G., DEL BO, R., ANGERETTI, N., et al.
A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy.
Eur J Neurosci, 1994, **6**, 1415-22.
- FOSTER, J., GOLDMANN, W., PARNHAM, D., et al.
Partial dissociation of PrP(Sc) deposition and vacuolation in the brains of scrapie and BSE experimentally affected goats.
J Gen Virol, 2001, **82**, 267-73.

- FOSTER, J. D. and DICKINSON, A. G.
The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie.
Vet Rec, 1988, **123**, 5-8.
- FOSTER, J. D. and HUNTER, N.
Partial dominance of the sA allele of the Sip gene for controlling experimental scrapie.
Vet Rec, 1991, **128**, 548-9.
- FOSTER, J. D., HOPE, J. and FRASER, H.
Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats.
Vet Rec, 1993, **133**, 339-41.
- FOSTER, J. D., HUNTER, N., WILLIAMS, A., et al.
Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer.
Vet Rec, 1996, **138**, 559-62.
- FRASER, H. and DICKINSON, A. G.
Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation.
J Comp Pathol, 1973, **83**, 29-40.
- FRASER, H.
The pathology of a natural and experimental scrapie.
Front Biol, 1976, **44**, 267-305.
- FRASER, H. and DICKINSON, A. G.
Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: the role of spleen and thymus.
J Comp Pathol, 1978, **88**, 563-73.
- FRASER, H., BRUCE, M. E., CHREE, A., et al.
Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice.
J Gen Virol, 1992, **73**, 1891-7.
- FRASER, H., BROWN, K. L., STEWART, K., et al.
Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow.
J Gen Virol, 1996, **77**, 1935-40.
- FRIGG, R., KLEIN, M. A., HEGYI, I., et al.
Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice.
J Virol, 1999, **73**, 9584-8.
- GABRIEL, J. M., OESCH, B., KRETZSCHMAR, H., et al.
Molecular cloning of a candidate chicken prion protein.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, **89**, 9097-101.

- GAMBETTI, P., PARCHI, P., PETERSEN, R. B., et al.
Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features.
Brain Pathol, 1995, **5**, 43-51.
- GASSET, M., BALDWIN, M. A., LLOYD, D. H., et al.
Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, **89**, 10940-4.
- GHETTI, B., TAGLIAVINI, F., MASTERS, C. L., et al.
Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family.
Neurology, 1989, **39**, 1453-61.
- GIBBS, C. J., JR., GAJDUSEK, D. C. and LATARJET, R.
Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1978, **75**, 6268-70.
- GIBBS, C. J., JR., AMYX, H. L., BACOTE, A., et al.
Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates.
J Infect Dis, 1980, **142**, 205-8.
- GIESE, A., GROSCHUP, M. H., HESS, B., et al.
Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis.
Brain Pathol, 1995, **5**, 213-21.
- GIESE, A., BROWN, D. R., GROSCHUP, M. H., et al.
Role of microglia in neuronal cell death in prion disease.
Brain Pathol, 1998, **8**, 449-57.
- GLATZEL, M. and AGUZZI, A.
Peripheral pathogenesis of prion diseases.
Microbes Infect, 2000, **2**, 613-9.
- GOLDFARB, L. G., MITROVA, E., BROWN, P., et al.
Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia.
Lancet, 1990, **336**, 514-5.
- GOLDFARB, L. G., BROWN, P., MITROVA, E., et al.
Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families.
Eur J Epidemiol, 1991, **7**, 477-86.
- GOLDMANN, W., HUNTER, N., FOSTER, J. D., et al.
Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, **87**, 2476-80.

- GOLDMANN, W., HUNTER, N., MARTIN, T., et al.
Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon.
J Gen Virol, 1991, **72**, 201-4.
- GOLDMANN, W., HUNTER, N., SMITH, G., et al.
PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie.
J Gen Virol, 1994, **75**, 989-95.
- GOLDMANN, W., MARTIN, T., FOSTER, J., et al.
Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period.
J Gen Virol, 1996, **77**, 2885-91.
- GOLDMANN, W., CHONG, A., FOSTER, J., et al.
The shortest known prion protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic.
J Gen Virol, 1998, **79**, 3173-6.
- GOLDMANN, W., PERUCCHINI, M., SMITH, A., et al.
Genetic variability of the PrP gene in a goat herd in the UK.
Vet Rec, 2004, **155**, 177-8.
- GRASSI, J., COMOY, E., SIMON, S., et al.
Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue.
Vet Rec, 2001, **149**, 577-82.
- GRIFFITH, J. S.
Self-replication and scrapie.
Nature, 1967, **215**, 1043-4.
- GUENTCHEV, M., VOIGTLANDER, T., HABERLER, C., et al.
Evidence for oxidative stress in experimental prion disease.
Neurobiol Dis, 2000, **7**, 270-3.
- HAFIZ, F. B. and BROWN, D. R.
A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease.
Mol Cell Neurosci, 2000, **16**, 221-32.
- HAINFELLNER, J. A. and BUDKA, H.
Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies.
Acta Neuropathol (Berl), 1999, **98**, 458-60.
- HARITANI, M., SPENCER, Y. I. and WELLS, G. A.
Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy- affected brain.
Acta Neuropathol, 1994, **87**, 86-90.

- HARRIS, D. A., HUBER, M. T., VAN DIJKEN, P., et al.
Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C- terminal cleavage sites.
Biochemistry, 1993, **32**, 1009-16.
- HARRIS, D. A.
Cellular biology of prion diseases.
Clin Microbiol Rev, 1999, **12**, 429-44.
- HEGGEDO, R., PRESS, C. M., GUNNES, G., et al.
Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie- free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent.
J Gen Virol, 2000, **81**, 2327-37.
- HEGGEDO, R., PRESS, C. M., GUNNES, G., et al.
Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep.
J Gen Virol, 2002, **83**, 479-89.
- HEGGEDO, R., GONZALEZ, L., PRESS, C. M., et al.
Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie- affected Suffolk sheep.
J Gen Virol, 2003, **84**, 1327-38.
- HEPPNER, F. L., CHRIST, A. D., KLEIN, M. A., et al.
Transepithelial prion transport by M cells.
Nat Med, 2001, **7**, 976-7.
- HILL, A. F., ZEIDLER, M., IRONSIDE, J., et al.
Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy.
Lancet, 1997, **349**, 99-100.
- HILL, A. F., ANTONIOU, M. and COLLINGE, J.
Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity.
J Gen Virol, 1999, **80**, 11-4.
- HILMERT, H. and DIRINGER, H.
A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters.
Biosci Rep, 1984, **4**, 165-70.
- HILTON, D. A., FATHERS, E., EDWARDS, P., et al.
Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease.
Lancet, 1998, **352**, 703-4.
- HOARE, M., DAVIES, D. C. and PATTISON, I. H.
Experimental production of scrapie-resistant Swaledale sheep.
Vet Rec, 1977, **101**, 482-4.
- HORIUCHI, M., PRIOLA, S. A., CHABRY, J., et al.
Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**, 5836-41.

- HORNSHAW, M. P., MCDERMOTT, J. R., CANDY, J. M., et al.
Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides.
Biochem Biophys Res Commun, 1995, **214**, 993-9.
- HOSSZU, L. L., BAXTER, N. J., JACKSON, G. S., et al.
Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange.
Nat Struct Biol, 1999, **6**, 740-3.
- HOUSTON, F., FOSTER, J. D., CHONG, A., et al.
Transmission of BSE by blood transfusion in sheep.
Lancet, 2000, **356**, 999-1000.
- HOUSTON, F., GOLDMANN, W., CHONG, A., et al.
Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection.
Nature, 2003, **423**, 498.
- HSIAO, K., BAKER, H. F., CROW, T. J., et al.
Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome.
Nature, 1989, **338**, 342-5.
- HSIAO, K. K., CASS, C., SCHELLENBERG, G. D., et al.
A prion protein variant in a family with the telencephalic form of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome.
Neurology, 1991, **41**, 681-4.
- HUANG, F. P., FARQUHAR, C. F., MABBOTT, N. A., et al.
Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut.
J Gen Virol, 2002, **83**, 267-71.
- HUNTER, N., FOSTER, J. D., DICKINSON, A. G., et al.
Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep.
Vet Rec, 1989, **124**, 364-6.
- HUNTER, N., FOSTER, J. D., BENSON, G., et al.
Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep.
J Gen Virol, 1991, **72**, 1287-92.
- HUNTER, N., FOSTER, J. D., GOLDMANN, W., et al.
Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes.
Arch Virol, 1996, **141**, 809-24.
- HUNTER, N., MOORE, L., HOSIE, B. D., et al.
Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland.
Vet Rec, 1997, **140**, 59-63.

- HUNTER, N., FOSTER, J., CHONG, A., et al.
Transmission of prion diseases by blood transfusion.
J Gen Virol, 2002, **83**, 2897-905.
- IKEDA, T., HORIUCHI, M., ISHIGURO, N., et al.
Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan.
J Gen Virol, 1995, **76**, 2577-81.
- JAMES, T. L., LIU, H., ULYANOV, N. B., et al.
Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, 10086-91.
- JEFFREY, M., FRASER, J. R., HALLIDAY, W. G., et al.
Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunocytochemistry.
Neuropathol Appl Neurobiol, 1995, **21**, 41-9.
- JEFFREY, M., GOODSIR, C. M., FOWLER, N., et al.
Ultrastructural immuno-localization of synthetic prion protein peptide antibodies in 87V murine scrapie.
Neurodegeneration, 1996, **5**, 101-9.
- JEFFREY, M., MARTIN, S., GONZALEZ, L., et al.
Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep.
J Comp Pathol, 2001, **125**, 271-84.
- JEFFREY, M., RYDER, S., MARTIN, S., et al.
Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera.
J Comp Pathol, 2001, **124**, 280-9.
- JENDROSKA, K., HEINZEL, F. P., TORCHIA, M., et al.
Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain correlates with regional pathology and scrapie infectivity.
Neurology, 1991, **41**, 1482-90.
- KANEKO, K., PERETZ, D., PAN, K. M., et al.
Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, **92**, 11160-4.
- KAPASI, Z. F., QIN, D., KERR, W. G., et al.
Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues.
J Immunol, 1998, **160**, 1078-84.

- KASCSAK, R. J., RUBENSTEIN, R., MERZ, P. A., et al.
Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins.
J Virol, 1987, **61**, 3688-93.
- KELLINGS, K., MEYER, N., MIRENDA, C., et al.
Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations.
Arch Virol Suppl, 1993, **7**, 215-25.
- KELLINGS, K., PRUSINER, S. B. and RIESNER, D.
Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component?
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1994, **343**, 425-30.
- KIM, J., JU, W., CHOI, J., et al.
Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice.
Brain Res Mol Brain Res, 1999, **73**, 17-27.
- KIMBERLIN, R. H. and WALKER, C. A.
Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture.
J Gen Virol, 1978, **39**, 487-96.
- KIMBERLIN, R. H. and WALKER, C. A.
Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes.
J Comp Pathol, 1979, **89**, 551-62.
- KIMBERLIN, R. H. and WALKER, C. A.
Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS.
J Gen Virol, 1980, **51**, 183-7.
- KIMBERLIN, R. H., WALKER, C. A., MILLSON, G. C., et al.
Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents.
J Neurol Sci, 1983, **59**, 355-69.
- KIMBERLIN, R. H., COLE, S. and WALKER, C. A.
Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters.
J Gen Virol, 1987, **68**, 1875-81.
- KIMBERLIN, R. H., WALKER, C. A. and FRASER, H.
The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice.
J Gen Virol, 1989, **70**, 2017-25.
- KITAMOTO, T., OGOMORI, K., TATEISHI, J., et al.
Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids.
Lab Invest, 1987, **57**, 230-6.

- KLEIN, M. A., FRIGG, R., RAEBER, A. J., et al.
PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion [see comments].
Nat Med, 1998, **4**, 1429-33.
- KLEIN, M. A., KAESER, P. S., SCHWARZ, P., et al.
Complement facilitates early prion pathogenesis.
Nat Med, 2001, **7**, 488-92.
- KOCISKO, D. A., COME, J. H., PRIOLA, S. A., et al.
Cell-free formation of protease-resistant prion protein.
Nature, 1994, **370**, 471-4.
- KOPP, N., STREICHENBERGER, N., DESLYS, J. P., et al.
Creutzfeldt-Jakob disease in a 52-year-old woman with florid plaques.
Lancet, 1996, **348**, 1239-40.
- KRAEHENBUHL, J. P. and NEUTRA, M. R.
Epithelial M cells: differentiation and function.
Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, **16**, 301-32.
- KRASEMANN, S., GROSCHUP, M. H., HARMEYER, S., et al.
Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice.
Mol Med, 1996, **2**, 725-34.
- KRETZSCHMAR, H. A., PRUSINER, S. B., STOWRING, L. E., et al.
Scrapie prion proteins are synthesized in neurons.
Am J Pathol, 1986, **122**, 1-5.
- KRISTENSSON, K., FEUERSTEIN, B., TARABOULOS, A., et al.
Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells.
Neurology, 1993, **43**, 2335-41.
- KUBOSAKI, A., YUSA, S., NASU, Y., et al.
Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice.
Biochem Biophys Res Commun, 2001, **282**, 103-7.
- KUROSAKI, Y., ISHIGURO, N., HORIUCHI, M., et al.
Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan.
J Vet Med Sci, 2005, **67**, 321-3.
- LAPLANCHE, J. L., CHATELAIN, J., THOMAS, S., et al.
Analysis of the PrP gene in a Tunisian family with Creutzfeldt-Jakob disease.
Rev Neurol, 1991, **147**, 825-7.
- LAPLANCHE, J. L., CHATELAIN, J., WESTAWAY, D., et al.
PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis.
Genomics, 1993, **15**, 30-7.

- LASMEZAS, C. I., CESBRON, J. Y., DESLYS, J. P., et al.
Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent.
J Virol, 1996, **70**, 1292-5.
- LASMEZAS, C. I., DESLYS, J. P., ROBAIN, O., et al.
Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein.
Science, 1997, **275**, 402-5.
- LATARJET, R., MUEL, B., HAIG, D. A., et al.
Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light.
Nature, 1970, **227**, 1341-3.
- LE DUR, A., BERINGUE, V., ANDREOLETTI, O., et al.
A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes.
Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**, 16031-6.
- LEE, D. W., SOHN, H. O., LIM, H. B., et al.
Alteration of free radical metabolism in the brain of mice infected with scrapie agent.
Free Radic Res, 1999, **30**, 499-507.
- LEEUWEN, I. M. M. V. <http://www.bio.vu.nl/thb/users/ingeborg/p1.gif>, 2003, 2001.
- LIBERSKI, P. P.
Astrocytic reaction in experimental scrapie in hamsters.
J Comp Pathol, 1987, **97**, 73-8.
- LIBERSKI, P. P., PLUCIENNICZAK, A., HRABEC, E., et al.
Isolation and purification of scrapie-associated fibrils and prion protein from scrapie-infected hamster brain.
J Comp Pathol, 1989, **100**, 177-85.
- LIBERSKI, P. P., BROWN, P., XIAO, S. Y., et al.
The ultrastructural diversity of scrapie-associated fibrils isolated from experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease.
J Comp Pathol, 1991, **105**, 377-86.
- LIBERSKI, P. P., JEFFREY, M. and GOODSIR, C.
Tubulovesicular structures are not labeled using antibodies to prion protein (PrP) with the immunogold electron microscopy techniques.
Acta Neuropathol (Berl), 1997, **93**, 260-4.
- LIBERSKI, P. P. and JEFFREY, M.
Tubulovesicular structures: what are they really?
Microsc Res Tech, 2000, **50**, 46-57.
- LIGIOS, C., JEFFREY, M., RYDER, S. J., et al.
Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling.
J Comp Pathol, 2002, **127**, 45-57.

- LIU, T., LI, R., WONG, B. S., et al.
Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells.
J Immunol, 2001, **166**, 3733-42.
- LOWENSTEIN, D. H., BUTLER, D. A., WESTAWAY, D., et al.
Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins.
Mol Cell Biol, 1990, **10**, 1153-63.
- LUCASSEN, P. J., WILLIAMS, A., CHUNG, W. C., et al.
Detection of apoptosis in murine scrapie.
Neurosci Lett, 1995, **198**, 185-8.
- MABBOTT, N. A., BROWN, K. L., MANSON, J., et al.
T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein.
Immunology, 1997, **92**, 161-5.
- MABBOTT, N. A., MACKAY, F., MINNS, F., et al.
Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie.
Nat Med, 2000, **6**, 719-20.
- MABBOTT, N. A., WILLIAMS, A., FARQUHAR, C. F., et al.
Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie.
J Virol, 2000, **74**, 3338-44.
- MABBOTT, N. A. and BRUCE, M. E.
The immunobiology of TSE diseases.
J Gen Virol, 2001, **82**, 2307-18.
- MABBOTT, N. A., MCGOVERN, G., JEFFREY, M., et al.
Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain.
J Virol, 2002, **76**, 5131-9.
- MAIGNIEN, T., LASMEZAS, C. I., BERINGUE, V., et al.
Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents.
J Gen Virol, 1999, **80**, 3035-42.
- MALLUCCI, G. R., RATTE, S., ASANTE, E. A., et al.
Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration.
Embo J, 2002, **21**, 202-210.
- MANETTO, V., MEDORI, R., CORTELLI, P., et al.
Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases.
Neurology, 1992, **42**, 312-9.

MANOUSIS, T., VERGHESE-NIKOLAKAKI, S., KEYES, P., et al.
Characterization of the murine BSE infectious agent.
J Gen Virol, 2000, **81**, 1615-20.

MANSON, J., WEST, J. D., THOMSON, V., et al.
The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?
Development, 1992, **115**, 117-22.

MANSON, J. C., CLARKE, A. R., HOOPER, M. L., et al.
129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal.
Mol Neurobiol, 1994, **8**, 121-7.

MANSON, J. C., CLARKE, A. R., MCBRIDE, P. A., et al.
PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology.
Neurodegeneration, 1994, **3**, 331-40.

MANUELIDIS, E., GORGACS, E. and MANUELIDIS, L.
Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease.
Science, 1978, **200**, 1069-71.

MANUELIDIS, L.
The dimensions of Creutzfeldt-Jakob disease.
Transfusion, 1994, **34**, 915-28.

MANUELIDIS, L.
Dementias, neurodegeneration, and viral mechanisms of disease from the perspective of human transmissible encephalopathies.
Ann N Y Acad Sci, 1994, **724**, 259-81.

MANUELIDIS, L., SKLAVIADIS, T., AKOWITZ, A., et al.
Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, **92**, 5124-8.

MANUELIDIS, L.
Vaccination with an attenuated Creutzfeldt-Jakob disease strain prevents expression of a virulent agent.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, **95**, 2520-5.

MASTERS, C. and RICHARDSON, E. J.
Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change.
1978, Brain, **101**, 333-44.

MCBRIDE, P. A., EIKELENBOOM, P., KRAAL, G., et al.
PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice.
J Pathol, 1992, **168**, 413-8.

- MCBRIDE, P. A., SCHULZ-SCHAEFFER, W. J., DONALDSON, M., et al.
Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves.
J Virol, 2001, **75**, 9320-7.
- MCGOWAN, J. P.
Scrapie in sheep.
Scott. J. Agric., 1922, **5**, 365-75.
- MERZ, P. A., SOMERVILLE, R. A., WISNIEWSKI, H. M., et al.
Abnormal fibrils from scrapie-infected brain.
Acta Neuropathol, 1981, **54**, 63-74.
- MERZ, P. A., ROHWER, R. G., KASCSAK, R., et al.
Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases.
Science, 1984, **225**, 437-40.
- MERZ, P. A., KASCSAK, R. J., RUBENSTEIN, R., et al.
Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils.
J Virol, 1987, **61**, 42-9.
- MEYER, N., ROSENBAUM, V., SCHMIDT, B., et al.
Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids.
J Gen Virol, 1991, **72**, 37-49.
- MEYER, R. K., MCKINLEY, M. P., BOWMAN, K. A., et al.
Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, **83**, 2310-4.
- MILHAVET, O., MCMAHON, H. E., RACHIDI, W., et al.
Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, **97**, 13937-42.
- MILLSON, G. C., HUNTER, G. D. and KIMBERLIN, R. H.
The physico-chemical nature of the scrapie agent.
Front Biol, 1976, **44**, 243-66.
- MONARI, L., CHEN, S. G., BROWN, P., et al.
Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, **91**, 2839-42.
- MOUDJOU, M., FROBERT, Y., GRASSI, J., et al.
Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures.
J Gen Virol, 2001, **82**, 2017-24.

- MOUM, T., OLSAKER, I., HOPP, P., et al.
Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor 98 cases.
J Gen Virol., 2005, **86**, 231-5.
- MOYNAGH, J. and SCHIMMEL, H.
Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy.
Nature, 1999, **400**, 105.
- MURAMOTO, T., M. SCOTT, F. E. COHEN, AND S. B. PRUSINER.
Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, **93**, 15457-15462.
- NARANG, H. K.
Virus-like particles in natural scrapie of the sheep.
Res Vet Sci, 1973, **14**, 108-10.
- NARANG, H. K., ASHER, D. M., POMEROY, K. L., et al.
Abnormal tubulovesicular particles in brains of hamsters with scrapie.
Proc Soc Exp Biol Med, 1987, **184**, 504-9.
- NUSSBAUM, R. E., HENDERSON, W. M., PATTISON, I. H., et al.
The establishment of sheep flocks of predictable susceptibility to experimental scrapie.
Res Vet Sci, 1975, **18**, 49-58.
- OBERMAIER, G., KRETZSCHMAR, H. A., HAFNER, A., et al.
Spongiform central nervous system myelinopathy in African dwarf goats.
J Comp Pathol, 1995, **113**, 357-72.
- O'DOHERTY, E., AHERNE, M., ENNIS, S., et al.
Detection of polymorphisms in the prion protein gene in a population of Irish Suffolk sheep.
Vet Rec, 2000, **146**, 335-8.
- OESCH, B., WESTAWAY, D., WALCHLI, M., et al.
A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.
Cell, 1985, **40**, 735-46.
- OLDSTONE, M. B., RACE, R., THOMAS, D., et al.
Lymphotoxin-alpha- and Lymphotoxin-beta-Deficient Mice Differ in Susceptibility to Scrapie: Evidence against Dendritic Cell Involvement in Neuroinvasion.
J Virol, 2002, **76**, 4357-4363.
- O'ROURKE, K., DUNCAN, J., LOGAN, J., et al.
Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming.
Clin Diagn Lab Immunol, 2002, **9**, 966-71.
- O'ROURKE, K. I., HUFF, T. P., LEATHERS, C. W., et al.
SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication.
J Gen Virol, 1994, **75**, 1511-4.

O'ROURKE, K. I., BASZLER, T. V., BESSER, T. E., et al.
Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue.
J Clin Microbiol, 2000, **38**, 3254-9.

OUTRAM, G. W.
The pathogenesis of scrapie in mice.
Front Biol, 1976, **44**, 325-57.

PAN, K. M., BALDWIN, M., NGUYEN, J., et al.
Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, **90**, 10962-6.

PAPASAVVA-STYLIANOU, P., KLEANTHOS, M., TOUMAZOS, P., et al.
Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie.
Vet J, 2005.

PARAMITHIOTIS, E., PINARD, M., LAWTON, T., et al.
A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation.
Nat Med, 2003, **9**, 893-9.

PATTISON, I. H.
Transmission of scrapie to the goat.
Lancet, 1957, **272**, 104-5.

PATTISON, I. H.
Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats.
Vet Rec, 1965, **77**, 1388-90.

PATTISON, I. H. and JEBBETT, J. N.
Histopathological similarities between scrapie and cuprizone toxicity in mice.
Nature, 1971, **230**, 115-7.

PAULY, P. C. and HARRIS, D. A.
Copper stimulates endocytosis of the prion protein.
J Biol Chem, 1998, **273**, 33107-10.

PEYRIN, J. M., LASMEZAS, C. I., HAIK, S., et al.
Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines.
Neuroreport, 1999, **10**, 723-9.

PICKERING-BROWN, S. M., MANN, D. M., OWEN, F., et al.
Allelic variations in apolipoprotein E and prion protein genotype related to plaque formation and age of onset in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.
Neurosci Lett, 1995, **187**, 127-9.

POCCHIARI, M.

Prions and related neurological diseases.

Mol Aspects Med, 1994, **15**, 195-291.

PORTER, D. D., PORTER, H. G. and COX, N. A.

Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice.

J Immunol, 1973, **111**, 1407-10.

PRINZ, M., MONTRASIO, F., KLEIN, M. A., et al.

Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, **15**, 15.

PRUSINER, S. B., GROTH, D. F., COCHRAN, S. P., et al.

Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent.

Biochemistry, 1980, **19**, 4883-91.

PRUSINER, S. B., MCKINLEY, M. P., GROTH, D. F., et al.

Scrapie agent contains a hydrophobic protein.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1981, **78**, 6675-9.

PRUSINER, S. B.

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.

Science, 1982, **216**, 136-44.

PRUSINER, S. B., MCKINLEY, M. P., BOWMAN, K. A., et al.

Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods.

Cell, 1983, **35**, 349-58.

PRUSINER, S. B., GROTH, D. F., BOLTON, D. C., et al.

Purification and structural studies of a major scrapie prion protein.

Cell, 1984, **38**, 127-34.

PRUSINER, S. B., SCOTT, M., FOSTER, D., et al.

Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication.

Cell, 1990, **63**, 673-86.

PRUSINER, S. B. and DEARMOND, S. J.

Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans.

Brain Pathol, 1991, **1**, 297-310.

PRUSINER, S. B., GROTH, D., SERBAN, A., et al.

Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, **90**, 2793-7.

QU, Y., ET HADGU, A.

A model for evaluating sensitivity and specificity for correlated diagnostic tests in efficacy studies with a imperfect reference test.

Journal of the American Statistical Association, 1998, **93**, 920-928.

- RACE, R., OLDSTONE, M. and CHESEBRO, B.
Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen.
J Virol, 2000, **74**, 828-33.
- RIEK, R., HORNEMANN, S., WIDER, G., et al.
NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321).
Nature, 1996, **382**, 180-2.
- RYDER, S. J., SPENCER, Y. I., BELLERBY, P. J., et al.
Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep.
Vet Rec, 2001, **148**, 7-13.
- SAILER, A., BUELER, H., FISCHER, M., et al.
No propagation of prions in mice devoid of PrP.
Cell, 1994, **77**, 967-968.
- SAUNDERS, G.C., CAWTHRAW, S., MOUNTJOY, S.J., et al.
PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain.
J Gen Virol, 2006, **87**, 3141-9.
- SCHMERR, M. J., JENNY, A. and CUTLIP, R. C.
Use of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis to detect the prion protein extracted from scrapie-infected sheep.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, **697**, 223-9.
- SCHMERR, M. J. and JENNY, A.
A diagnostic test for scrapie-infected sheep using a capillary electrophoresis immunoassay with fluorescent-labeled peptides.
Electrophoresis, 1998, **19**, 409-14.
- SCHMERR, M. J., JENNY, A. L., BULGIN, M. S., et al.
Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy.
J Chromatogr A, 1999, **853**, 207-14.
- SCHREUDER, B. E., VAN KEULEN, L. J., VROMANS, M. E., et al.
Preclinical test for prion diseases.
Nature, 1996, **381**, 563.
- SCHREUDER, B. E., VAN KEULEN, L. J., VROMANS, M. E., et al.
Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie.
Vet Rec, 1998, **142**, 564-8.
- SCOTT, J. R. and FRASER, H.
Degenerative hippocampal pathology in mice infected with scrapie.
Acta Neuropathol, 1984, **65**, 62-8.

- SCOTT, M., FOSTER, D., MIRENDA, C., et al.
Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species- specific scrapie infectivity and amyloid plaques.
Cell, 1989, **59**, 847-57.
- SCOTT, M., GROTH, D., FOSTER, D., et al.
Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes.
Cell, 1993, **73**, 979-88.
- SCOTT, M., WILL, R., IRONSIDE, J., et al.
Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, **96**, 15137-42.
- SCOTT, M. R., KOHLER, R., FOSTER, D., et al.
Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice.
Protein Sci, 1992, **1**, 986-97.
- SHAKED, G. M., SHAKED, Y., KARIV-INBAL, Z., et al.
A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases.
J Biol Chem, 2001, **276**, 31479-82.
- SHIBUYA, S., HIGUCHI, J., SHIN, R. W., et al.
Codon 219 Lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.
Ann Neurol, 1998, **43**, 826-8.
- SHMAKOV, A. N., MCLENNAN, N. F., MCBRIDE, P., et al.
Cellular prion protein is expressed in the human enteric nervous system.
Nat Med, 2000, **6**, 840-1.
- SHMERLING, D., HEGYI, I., FISCHER, M., et al.
Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions.
Cell, 1998, **93**, 203-14.
- SHYNG, S. L., HUBER, M. T. and HARRIS, D. A.
A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells.
J Biol Chem, 1993, **268**, 15922-8.
- SIGURDSON, C. J., SPRAKER, T. R., MILLER, M. W., et al.
PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease.
J Gen Virol, 2001, **82**, 2327-34.

- SKLAVIADIS, T., AKOWITZ, A., MANUELIDIS, E. E., et al.
Nuclease treatment results in high specific purification of Creutzfeldt- Jakob disease infectivity with a density characteristic of nucleic acid- protein complexes.
Arch Virol, 1990, **112**, 215-28.
- SKLAVIADIS, T., AKOWITZ, A., MANUELIDIS, E. E., et al.
Nucleic acid binding proteins in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparations.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, **90**, 5713-7.
- SKLAVIADIS, T. K., MANUELIDIS, L. and MANUELIDIS, E. E.
Physical properties of the Creutzfeldt-Jakob disease agent.
J Virol, 1989, **63**, 1212-22.
- SOMERVILLE, R. A. and DUNN, A. J.
The association between PrP and infectivity in scrapie and BSE infected mouse brain.
Arch Virol, 1996, **141**, 275-89.
- SOMERVILLE, R. A., BIRKETT, C. R., FARQUHAR, C. F., et al.
Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows.
J Gen Virol, 1997, **78**, 2389-96.
- SPEER, M. C., GOLDGABER, D., GOLDFARB, L. G., et al.
Support of linkage of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome to the prion protein gene on chromosome 20p12-pter.
Genomics, 1991, **9**, 366-8.
- STACK, M. J., SCOTT, A. C., DONE, S. H., et al.
Scrapie associated fibril detection on decomposed and fixed ovine brain material.
Res Vet Sci, 1993, **55**, 173-8.
- STACK, M. J., CHAPLIN, M. J., ALDRICH, A. M., et al.
The distribution of scrapie-associated fibrils in neural and non-neural tissues of advanced clinical cases of natural scrapie in sheep.
Res Vet Sci, 1998, **64**, 141-6.
- STAHL, N., BORCHELT, D. R., HSIAO, K., et al.
Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid.
Cell, 1987, **51**, 229-40.
- STAHL, N., BALDWIN, M. A., TEFLOW, D. B., et al.
Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing.
Biochemistry, 1993, **32**, 1991-2002.
- STOCKEL, J., SAFAR, J., WALLACE, A. C., et al.
Prion protein selectively binds copper(II) ions.
Biochemistry, 1998, **37**, 7185-93.

- SUGAYA, M., NAKAMURA, K., WATANABE, T., et al.
Expression of cellular prion-related protein by murine Langerhans cells and keratinocytes.
J Dermatol Sci, 2002, **28**, 126-34.
- TAGLIAVINI, F., PRELLI, F., VERGA, L., et al.
Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, **90**, 9678-82.
- TATEISHI, J., TASHIMA, T. and KITAMOTO, T.
Practical methods for chemical inactivation of Creutzfeldt-Jakob disease pathogen.
Microbiol Immunol, 1991, **35**, 163-6.
- TATEISHI, J. and KITAMOTO, T.
Inherited prion diseases and transmission to rodents.
Brain Pathol, 1995, **5**, 53-9.
- TAYLOR, D.
Inactivation of the causal agents of Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases.
Brain Pathol, 1996, **6**, 197-8.
- TAYLOR, D. M. and MCCONNELL, I.
Autoclaving does not decontaminate formol-fixed scrapie tissues.
Lancet, 1988, **1**, 1463-4.
- TAYLOR, D. M.
Inactivation of BSE agent.
Dev Biol Stand, 1991, **75**, 97-102.
- TAYLOR, D. M., FRASER, H., MCCONNELL, I., et al.
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie.
Arch Virol, 1994, **139**, 313-26.
- TAYLOR, D. M.
Survival of mouse-passaged bovine spongiform encephalopathy agent after exposure to paraformaldehyde-lysine-periodate and formic acid.
Vet Microbiol, 1995, **44**, 111-2.
- TAYLOR, D. M., FERNIE, K., MCCONNELL, I., et al.
Solvent extraction as an adjunct to rendering: the effect on BSE and scrapie agents of hot solvents followed by dry heat and steam.
Vet Rec, 1998, **143**, 6-9.
- TAYLOR, D. M., FERNIE, K., MCCONNELL, I., et al.
Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat.
Vet Microbiol, 1999, **67**, 13-6.
- TAYLOR, D. M.
Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review.
Vet J, 2000, **159**, 10-7.

- TAYLOR, D. M., MCCONNELL, I. and FERGUSON, C. E.
Closely similar values obtained when the ME7 strain of scrapie agent was titrated in parallel by two individuals in separate laboratories using two sublines of C57BL mice.
J Virol Methods, 2000, **86**, 35-40.
- TELLING, G. C., SCOTT, M., MASTRIANNI, J., et al.
Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein.
Cell, 1995, **83**, 79-90.
- TELLING, G. C., PARCHI, P., DEARMOND, S. J., et al.
Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity.
Science, 1996, **274**, 2079-2082.
- THELLUNG, S., FLORIO, T., VILLA, V., et al.
Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126.
Neurobiol Dis, 2000, **7**, 299-309.
- THORGEIRSDOTTIR, S., SIGURDARSON, S., THORISSON, H. M., et al.
PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep.
J Gen Virol, 1999, **80**, 2527-34.
- THURING, C., MCELROY, M., SWEENEY, T., et al.
Suitability of protuberances on the third eyelids of sheep as a biopsy site for lymphoid follicles.
Vet Rec, 2000, **147**, 631-2.
- TKACHUK, M., BOLLIGER, S., RYFFEL, B., et al.
Crucial role of tumor necrosis factor receptor 1 expression on nonhematopoietic cells for B cell localization within the splenic white pulp.
J Exp Med, 1998, **187**, 469-77.
- TOBLER, I., GAUS, S. E., DEBOER, T., et al.
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.
Nature, 1996, **380**, 639-42.
- TRANULIS, M. A.
Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep.
Apmis, 2002, **110**, 33-43.
- VACCARI, G., DI BARI, M. A., MORELLI, L., et al.
Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie.
J Gen Virol, 2006, **87**, 1395-402.
- VAN DUIJN, C. M., DELASNERIE-LAUPRETRE, N., MASULLO, C., et al.
Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD).
Lancet, 1998, **351**, 1081-5.

- VAN EVERBROECK, B., PALS, P., MARTIN, J. J., et al.
Antigen retrieval in prion protein immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem, 1999, **47**, 1465-70.
- VAN KEULEN, L. J., SCHREUDER, B. E., MELOEN, R. H., et al.
Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie.
Vet Pathol, 1995, **32**, 299-308.
- VAN KEULEN, L. J., SCHREUDER, B. E., MELOEN, R. H., et al.
Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie.
J Clin Microbiol, 1996, **34**, 1228-31.
- VAN KEULEN, L. J., SCHREUDER, B. E., VROMANS, M. E., et al.
Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie.
J Comp Pathol, 1999, **121**, 55-63.
- VAN KEULEN, L. J., SCHREUDER, B. E., VROMANS, M. E., et al.
Pathogenesis of natural scrapie in sheep.
Arch Virol Suppl, 2000, **16**, 57-71.
- VILOTTE, J. L., SOULIER, S., ESSALMANI, R., et al.
Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp.
J Virol, 2001, **75**, 5977-84.
- VORBERG, I. and PRIOLA, S. A.
Molecular basis of scrapie strain glycoform variation.
J Biol Chem, 2002, **23**, 23.
- WEISS, S., PROSKE, D., NEUMANN, M., et al.
RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP.
J Virol, 1997, **71**, 8790-7.
- WELLS, G. A., SCOTT, A. C., WILESMITH, J. W., et al.
Correlation between the results of a histopathological examination and the detection of abnormal brain fibrils in the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy.
Res Vet Sci, 1994, **56**, 346-51.
- WELLS, G. A. and WILESMITH, J. W.
The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy.
Brain Pathol, 1995, **5**, 91-103.
- WELLS, G. A., HAWKINS, S. A., GREEN, R. B., et al.
Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update.
Vet Rec, 1998, **142**, 103-6.

- WESTAWAY, D., GOODMAN, P. A., MIRENDA, C. A., et al.
Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice.
Cell, 1987, **51**, 651-62.
- WESTAWAY, D., DEARMOND, S. J., CAYETANO-CANLAS, J., et al.
Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins.
Cell, 1994, **76**, 117-29.
- WICKNER, R. B.
[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*.
Science, 1994, **264**, 566-9.
- WILESMITH, J. W., RYAN, J. B. and ATKINSON, M. J.
Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.
Vet Rec, 1991, **128**, 199-203.
- WILLIAMSON, R. A., PERETZ, D., SMORODINSKY, N., et al.
Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, **93**, 7279-82.
- WONG, B. S., BROWN, D. R., PAN, T., et al.
Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities.
J Neurochem, 2001, **79**, 689-98.
- WOOD, J. L. and DONE, S. H.
Natural scrapie in goats: neuropathology.
Vet Rec, 1992, **131**, 93-6.
- WOOD, J. L., MCGILL, I. S., DONE, S. H., et al.
Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991.
Vet Rec, 1997, **140**, 167-74.
- WOPFNER, F., WEIDENHOFER, G., SCHNEIDER, R., et al.
Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein.
J Mol Biol, 1999, **289**, 1163-78.
- ZHANG, L., LI, N., FAN, B., et al.
PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds.
Anim Genet, 2004, **35**, 457-61.

Toulouse, 2006

NOM : DAMAY

PRENOM : Christine

TITRE : Tremblante caprine : évaluation des performances des outils diagnostiques et caractérisation de l'influence des polymorphisme du gène PRP sur la sensibilité à la maladie.

RESUME :

La tremblante sévit actuellement dans le cheptel caprin français. Contrairement aux ovins, peu de données sont disponibles dans cette espèce en matière de (i) sensibilité et spécificité des outils diagnostiques et (ii) résistance génétique aux EST.

Dans cette étude 1661 caprins issus de 6 troupeaux atteints de tremblante ont été suivis. Il apparaît clairement que les tissus lymphoïdes permettent un diagnostic plus précoce que le système nerveux central. Parmi les tests appliqués, la biopsie d'amygdale, réalisée du vivant des animaux présente d'excellentes performances. Par ailleurs une approche cas/témoin nous a permis d'établir, dans notre population, l'existence d'une moindre sensibilité chez les individus porteurs des polymorphismes aux codons 154 (H/R), 211 (Q/R) et 222 (K/Q) du gène PRP. La résistance associée à ces polymorphismes, même si elle n'est que partielle, ouvre de nouvelles perspectives pour la maîtrise et l'éradication de la tremblante dans les troupeaux atteints.

MOTS-CLES : Tremblante, Caprin, Diagnostic, Polymorphisme génétique.

ENGLISH TITLE : Scrapie in goats : evaluation of diagnosis methods and characterization of the PRP gene polymorphism effect on disease susceptibility.

ABSTRACT :

Scrapie is currently present in French goat herds. While in sheep numerous data are available, in goats we are lacking information about (i) sensitivity and specificity of diagnosis tests and (ii) genetic susceptibility towards TSE.

Here we studied 1661 goats, from 6 different scrapie affected flocks. Data clearly indicated that lymphoid tissues allowed a earlier and more reliable diagnosis than Central Nervous tissues. Moreover tonsil biopsies, realized in living animals, appeared to be a reliable tool for individual diagnosis. Case control study we conducted in our population established a lower susceptibility to scrapie in goat harbouring polymorphism at codon 154 (H/R), 211 (Q/R) et 222 (K/Q) of PRP gene. This genetic resistance, even if only partial, open new horizons to eradication and management of scrapie in affected flocks.

KEY WORDS : Scrapie, Goat, Diagnosis, Genetic polymorphism.