

**MISE EN EVIDENCE D'UN SYNDROME D'HYPERCORTICISME MAJEUR  
CHEZ LA BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE.**

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Carole TOURON**

Soutenance : 22/06/01

*A notre jury,*

**Monsieur le Professeur PARINAUD**  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
*Biologie du développement et de la reproduction*

*Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse  
Hommages respectueux*

**Madame le Docteur GAYRARD**  
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Physiologie de la reproduction – Endocrinologie*

*Qui nous a guidé tout au long de la réalisation de nos travaux  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance*

**Madame le Docteur HAGEN – PICARD**  
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologie de la reproduction*

*Qui nous a également aidé et a aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse  
Sincères remerciements*

*Nous tenons tout particulièrement à remercier Véronique GAYRARD et Nicole HAGEN pour leur soutien scientifique et moral. Leur compétence et leur bonne humeur auront accompagné à chaque instant la réalisation de ce travail.  
Qu'elles soient assurées de notre profonde gratitude.*

*Nous tenons aussi à exprimer nos plus sincères remerciements à tout le personnel de du Laboratoire de Physiologie et Toxicologie Expérimentales pour leur accueil et leur aide précieuse à la réalisation de ce travail.*

*A mes parents,*

*A ma famille,*

*A mes amis,*

*A Jean-François,*

*Pour leur soutien et leurs encouragements de tous les instants.*

## **TABLE DES MATIERES**

<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>3</b>
<b><u>I. INTRODUCTION</u> .....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Présentation générale .....</b>	<b>5</b>
I.1.1. Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles .....	5
I.1.2. La tremblante ovine .....	6
I.1.3. Cadre de notre étude sur la tremblante .....	8
I.1.4. Objectifs de l'étude .....	9
<b>I.2. Données générales sur la pharmacocinétique du cortisol .....</b>	<b>10</b>
I.2.1. Cortisol et axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien .....	10
I.2.2. Rôles physiologiques du cortisol .....	12
I.2.3. Métabolisme du cortisol .....	12
I.2.4. Fixation du cortisol aux protéines plasmatiques .....	12
I.2.5. Disposition du cortisol .....	15
<b><u>II. MATERIELS ET METHODES</u> .....</b>	<b>18</b>
<b>II.1. Animaux et hébergement .....</b>	<b>18</b>
<b>II.2. Protocole expérimental .....</b>	<b>18</b>
II.2.1. Expérience 1 .....	19
II.2.2. Expérience 2 .....	19
<b>II.3. Procédure expérimentale .....</b>	<b>19</b>
II.3.1. Prélèvements de sang .....	19
II.3.2. Administrations .....	20
II.3.3. Traitement des échantillons .....	20
<b>II.4. Méthodes analytiques .....</b>	<b>20</b>
II.4.1. Expérience 1 .....	20
II.4.2. Expérience 2 .....	22
<b>II.5. Analyse pharmacocinétique .....</b>	<b>23</b>
II.5.1. Evaluation de la clairance du cortisol libre par modélisation des paramètres de fixation du cortisol à la CBG (expérience 2) .....	23
II.5.2. Evaluation des paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques par la technique in vitro de dialyse à l'équilibre (expérience 1) .....	27
<b>II.6. Analyse statistique .....</b>	<b>28</b>
II.6.1. Expérience 1 .....	28
II.6.2. Expérience 2 .....	29
II.6.3. Comparaison des paramètres de liaison obtenus dans les 2 expériences .....	30
<b>II.7. Histologie .....</b>	<b>30</b>

<b><u>III. RESULTATS</u></b> .....	<b>31</b>
<b>III.1. Expérience 1</b> .....	<b>31</b>
III.1.1. Concentrations plasmatiques des corticoïdes .....	31
III.1.2. Etude de la liaison du cortisol aux protéines plasmatiques .....	31
<b>III.2. Expérience 2</b> .....	<b>33</b>
III.2.1. Période 1 .....	33
III.2.2. Période 2 .....	33
<b>III.3. Comparaison des paramètres de liaison à la CBG obtenus <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i></b> .....	<b>34</b>
<b><u>IV. DISCUSSION</u></b> .....	<b>43</b>
<b><u>V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>49</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>53</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>55</b>

## **GLOSSAIRE**

- ◆ ACTH : Adrenocorticotropie Hormone (Hormone corticotrope)
- ◆ AUC : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en cortisol en fonction du temps
- ◆ AVP : Arginine vasopressine
- ◆  $AUC_{free(0-24h)}$  : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en cortisol libre sur 24 heures
- ◆ B : Concentration plasmatique en cortisol lié aux protéines plasmatiques (CBG et albumine)
- ◆  $B_{alb}$  : Concentration plasmatique en cortisol lié à l'albumine
- ◆  $B_{CBG}$  : Concentration plasmatique en cortisol lié à la CBG
- ◆  $B_{max}$  : Capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG (nmol)
- ◆ CBG : Corticosteroid-Binding-Globulin (Transcortine)
- ◆  $CBG_{free}$  : Concentration plasmatique en cortisol libre (non lié à la CBG)
- ◆ Cl : Clairance plasmatique du cortisol (l/kg/min)
- ◆  $Cl_F$  : Clairance plasmatique du cortisol libre (non lié à la CBG) (l/kg/min)
- ◆ CRF : Corticotropin Releasing Factor ou  
CRH : Corticotropin Releasing Hormon (Corticolibérine)
- ◆ ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- ◆ ESST : Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles
- ◆ F : Concentration plasmatique en cortisol non lié aux protéines plasmatiques (véritablement libre)
- ◆  $k_{10}$  : Constante d'élimination du cortisol libre à partir du compartiment central ( $\text{min}^{-1}$ )
- ◆  $k_{12}$  : Constante de transfert de premier ordre du cortisol du compartiment central vers le compartiment périphérique ( $\text{min}^{-1}$ )

- ◆  $k_{21}$  : Constante de transfert de premier ordre du cortisol depuis le compartiment périphérique vers le compartiment central ( $\text{min}^{-1}$ )
- ◆  $K_d$  : Constante de dissociation à l'équilibre du cortisol à la CBG (nmol)
- ◆ LCR : Liquide céphalorachidien
- ◆ NS : Constante de liaison non spécifique du cortisol à l'albumine
- ◆ PR : Taux de production du cortisol
- ◆  $PR_{(0-24h)}$  : Taux de production du cortisol sur 24 heures
- ◆  $Q_2$  : Quantité de cortisol total présent dans le compartiment périphérique
- ◆  $Q_{1f}$  : Quantité de cortisol libre présent dans le compartiment central
- ◆ SNC : Système nerveux central
- ◆  $T_{1/2}$  : Temps de demi-vie plasmatique du cortisol libre (temps nécessaire pour diviser par deux les concentrations plasmatiques)
- ◆ TOT : Concentration plasmatique en cortisol total
- ◆  $V_C$  : Volume du compartiment central du cortisol libre (l/kg)
- ◆  $V_{SS}$  : Volume de distribution à l'équilibre du cortisol libre

## **I. INTRODUCTION**



## **I.1. Présentation générale**

### ***I.1.1. Les Encéphalopathies Spongiformes Subaigües Transmissibles***

La tremblante est une maladie affectant les ovins et les caprins et appartenant au groupe des ESST (Encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles) au même titre que l'ESB (Encéphalopathie spongiforme bovine) chez les bovins et la maladie de Creutzfeldt-Jacob chez l'Homme. Ces maladies dégénératives du système nerveux central seraient dues à un Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC) ou prion. La transmission des ESST serait liée à une protéine PrP (Prion Protein) qui posséderait une structure tertiaire différente selon que l'animal est sain (PrP<sub>c</sub> pour PrPcellulaire) ou atteint (PrP<sub>sc</sub> pour PrPscrapie) : augmentation de la quantité de feuillets  $\beta$  par rapport aux hélices  $\alpha$  pour la forme pathologique (PrP<sub>sc</sub>). Cette protéine prion est codée par un gène normalement présent et exprimé chez les Mammifères. Au cours du processus infectieux, la protéine prion s'accumule sous une forme anormale et présente alors des propriétés biochimiques différentes de la protéine d'un sujet sain : insolubilité en présence de détergents et résistance importante à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques (protéinase K). Cette protéine biochimiquement anormale serait capable de s'autorépliquer en convertissant la protéine normale en protéine anormale (5,27). Cependant de nombreuses interrogations subsistent sur la nature et les propriétés de cet agent infectieux peu commun.

La tremblante du mouton sert de modèle pour définir les principaux critères communs aux ESST animales ou humaines. Les points communs sont avant tout d'ordre clinique et anatomo-pathologique (en plus du fait que l'agent de transmission est le même). Toutefois, il faut se garder de faire des amalgames trop hâtifs. En effet, la tremblante se distingue sur différents points des autres ESST animales et en particulier de l'ESB : diverses souches de tremblante ont été isolées alors que les isolats de l'ESB paraissent à la fois homogènes et différents des souches de tremblante connues. Une autre différence majeure concerne le mode de transmission supposé de la tremblante (à partir d'ovins infectés) par rapport à l'ESB (hypothèse des farines de viandes et d'os contaminés).

### ***I.1.2. La tremblante ovine***

La tremblante du mouton est une maladie naturelle décrite depuis le milieu du 18<sup>ème</sup> siècle. Une susceptibilité génétique a été identifiée depuis longtemps et a servi depuis le début des années 60 à la création de lignées divergentes (sensible et résistante) en race cheviot. Depuis le décret du 14 juin 1996, la tremblante des petits ruminants est devenue une maladie à déclaration obligatoire (cf. annexe).

La maladie apparaît classiquement chez des animaux âgés de 2 à 5 ans (incubation longue).

Les signes cliniques cardinaux sont :

- un prurit souvent en région dorso-lombaire
- une ataxie avec une démarche hésitante et des chutes au sol
- une modification du comportement (crainte ou agressivité excessive)
- des tremblements surtout céphaliques.

A ces troubles, s'ajoutent souvent une cécité et une émaciation progressive. L'évolution est toujours irréversible et conduit à la mort en 2 à 6 mois (33).

Actuellement le diagnostic de certitude repose sur l'analyse histologique de l'encéphale (tronc cérébral surtout (pont, bulbe) et cervelet) après fixation des coupes tissulaires au formol et coloration à l'hémalun-éosine. C'est par ailleurs la seule technique validée dans le cadre de la police sanitaire. En microscopie, on recherche des lésions caractéristiques de vacuolisation du périkarion et moins fréquemment de spongiose du neuropile (espaces interneuronaux) ; des colorations spéciales permettent de mettre en évidence une astroglie et beaucoup plus rarement des plaques amyloïdes. Ce diagnostic est par conséquent *post-mortem* et cette technique est pratiquement inutilisable en phase préclinique sachant que les lésions de l'encéphale sont tardives et précèdent de peu les signes cliniques (33). De plus, cet examen n'est réalisable que sur un prélèvement cérébral ayant subi une fixation par le formol dans un délai relativement court après la mort de l'animal (inférieur à 8 heures), afin d'assurer une parfaite conservation des structures anatomiques au sein du tissu.

D'autres techniques de diagnostic ont été développées (22) (figure 1) :

- le Western Blot : cette technique vise à détecter la présence de la PrP<sup>sc</sup> dans l'encéphale des animaux malades. Après homogénéisation du prélèvement et addition de la protéinase K, la PrP<sup>c</sup> est détruite et la PrP<sup>sc</sup> éventuellement présente est concentrée puis détectée immunologiquement au moyen d'anticorps appropriés. Cette technique ne nécessite ni conservation des structures anatomiques tissulaires ni traitement préalable de fixation.

- l'immunohistochimie : cette méthode consiste en la détection immunologique de la PrPsc sur coupes tissulaires obtenues à partir de prélèvements fixés au formol et observées en microscopie photonique.

De nouveaux tests sont en cours d'évaluation afin de répondre à des contraintes récemment apparues : réduction du délai d'obtention des résultats et utilisation sur des effectifs beaucoup plus importants (22). Trois tests semblent répondre à ces attentes :

- une technique de Western Blot « rapide » (test Prionics, Suisse), réalisée sur homogénat cérébral mais sans étape de concentration de la protéine pathologique ; en revanche, la détection immunologique de la PrPsc est comparable à la technique « classique » de Western Blot.
- les 2 autres tests sont des tests dits ELISA, l'un a été développé par la société irlandaise ENFER Technology, l'autre conjointement par 2 laboratoires du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique)(France). Après broyage et traitement des prélèvements cérébraux par la protéinase K, la PrPsc est dosée en microplaques de titration après avoir été capturée par des anticorps spécifiques, et en couplage avec une enzyme permettant une détection lumineuse (test ENFER) ou colorimétrique (test CEA) de la protéine pathologique.

Ces 3 derniers tests semblent avoir une très bonne sensibilité et spécificité.

Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de diagnostic précoce, non invasif et spécifique des ESST. Etant donné le risque de transmission de ces maladies de l'animal à l'homme (27), le développement d'un test de diagnostic rapide, spécifique et sensible est un enjeu à la fois épidémiologique et physiopathologique.

### ***1.1.3. Cadre de notre étude sur la tremblante***

Les études réalisées en laboratoire se sont orientées vers la recherche de tests indirects, en essayant en particulier de trouver une altération de sécrétions endocrines contrôlées par le système nerveux central. Dans cette optique, différents axes endocriniens ont été examinés : sécrétion de mélatonine, prolactine, hormone de croissance... Sachant qu'une augmentation du poids des surrénales avait été observée chez des brebis atteintes de tremblante (6) et chez des souris et des hamsters infectés expérimentalement par une souche de tremblante (7,20), une attention plus particulière s'est portée sur la fonction surrénalienne. Récemment, une étude réalisée en laboratoire a montré (34) que les concentrations plasmatiques et urinaires de corticoïdes étaient plus élevées chez les brebis atteintes de tremblante que chez les brebis

saines. Le 20 $\beta$ -dihydrocortisol, le principal métabolite du cortisol chez le mouton, semble être le marqueur plasmatique le plus intéressant, sachant qu'il n'est pas soumis, comme sa molécule-mère, à de brusques variations de concentrations dues au caractère pulsatile de la sécrétion de cortisol (cf. discussion). Une hypertrophie des glandes surrénales a aussi été notée (34).

#### ***1.1.4. Objectifs de l'étude***

La mise en évidence d'un syndrome d'hypercortisolémie chez les brebis atteintes de tremblante soulève la question fondamentale de l'origine de ce syndrome. **Cet hypercorticisme pourrait résulter d'une augmentation du taux de production du cortisol et/ou d'un défaut d'élimination de cette hormone entraînant une baisse de la clairance du cortisol.**

Afin d'analyser les mécanismes responsables de ce syndrome, nous avons évalué la disposition du cortisol chez des brebis saines et chez des brebis atteintes de tremblante. Dans une première expérience, nous avons déterminé *in vitro* les paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques dans les 2 groupes (brebis saines / malades) à l'aide de la méthode de référence de dialyse à l'équilibre ; dans une deuxième expérience, nous avons évalué la clairance et le taux de production du cortisol chez des brebis saines et atteintes de tremblante.

La partie expérimentale de notre étude est divisée en 3 : matériels et méthodes utilisés, résultats de nos expériences et discussion des ces résultats ; avant de la présenter, nous avons donné quelques éléments introductifs sur le cortisol et les notions de pharmacocinétique utilisées tout au long de l'étude.

## I.2. Données générales sur la pharmacocinétique du cortisol

### *I.2.1. Cortisol et axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (fig. 2) (28)*

Chez de nombreuses espèces dont la brebis, le **cortisol** ou hydrocortisone est la principale hormone glucocorticoïde sécrétée par la zone fasciculée des glandes corticosurrénales. Chez la brebis, les concentrations plasmatiques physiologiques de cortisol varient de 0.01 à 0.05  $\mu\text{M}$  (11) soit 5 à 18 ng/ml.

La sécrétion du cortisol est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire : en réponse à des stimuli variés d'origine exogène (lumière, stress, exercice physique, température, ...) ou endogène (cortisolémie, glycémie,...) et par l'intermédiaire de neuromédiateurs (acétylcholine, sérotonine, noradrénaline) ou de cytokines ( $\text{IL}_1$ ,  $\text{IL}_2$ ,  $\text{IL}_6$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ), la corticolibérine (CRF : Corticotropin Releasing Factor) et l'arginine vasopressine (AVP) sont libérées par les neurones de la division parvocellulaire dorsomédiale du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et atteignent les cellules corticotropes de la *pars distalis* de l'antéhypophyse *via* les vaisseaux sanguins portes hypothalamo-hypophysaires de la tige pituitaire (19,39). L'AVP est également synthétisée dans les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires qui se projettent dans la neurohypophyse. Le CRF et l'AVP stimulent de façon synergique la libération de l'hormone corticotrope (ACTH) qui, à son tour induit la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes par la corticosurrénale.

Le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre sécrétion. Ce rétrocontrôle, dû à la fraction libre du cortisol dans le plasma, s'opère :

- au niveau hypophysaire, sur les cellules corticotropes
- au niveau hypothalamique, sur les neurones à CRF (ce feed-back ne s'applique pas à l'AVP)
- au niveau extra-hypothalamique, sur les neurones qui ont des afférences hypothalamiques.

Les corticoïdes de synthèse, tels que la dexaméthasone, administrés à doses pharmacologiques, à des fins thérapeutiques ou diagnostiques (test de freination), exercent une action inhibitrice sur l'axe corticotrope, tout comme le cortisol, mais cette fois uniquement sur l'antéhypophyse.

Après avoir franchi la barrière hémato-méningée, les glucocorticoides peuvent se fixer à 2 types de récepteurs :

- un récepteur de type I dit récepteur à minéralocorticoides car il se lie à l'aldostérone et aux glucocorticoides avec une forte affinité
- un récepteur de type II dit récepteur à glucocorticoides qui ne possède qu'une faible affinité pour les minéralocorticoides.

Les récepteurs de type I sont saturés aux concentrations de base des glucocorticoides alors que les récepteurs de type II approchent la saturation lors des pics de concentrations de glucocorticoides pendant les variations du rythme circadien ou pendant un stress (28).

### ***1.2.2. Rôles physiologiques du cortisol (39)***

Le cortisol est une hormone qui joue de nombreux rôles dans l'organisme.

Le cortisol agit essentiellement sur le métabolisme glucidique ; il possède une activité **hyperglycémiant**e se traduisant par l'augmentation du catabolisme des protéines musculaires et des acides aminés, par la stimulation de la néoglucogenèse hépatique associée à une diminution de l'utilisation périphérique du glucose (peau, tissu adipeux), et par l'augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux.

Le cortisol possède également une action **anti-inflammatoire** due à l'inhibition des phases précoces et tardives de l'inflammation.

Les glucocorticoides exercent également un effet **immunomodulateur** important : ils inhibent la réponse immunitaire en réduisant le nombre de lymphocytes et en inhibant les réactions d'hypersensibilité immédiate et retardée.

### ***1.2.3. Métabolisme du cortisol***

Le cortisol est rapidement et efficacement éliminé de la circulation sanguine, principalement par inactivation hépatique, à la suite de conversions enzymatiques puis de conjugaisons qui le rendent plus hydrosoluble. Le rein constitue le deuxième site majeur de métabolisme du cortisol. Les métabolites, conjugués ou libres, sont excrétés dans la bile et les urines.

### ***1.2.4. Fixation du cortisol aux protéines plasmatiques (fig.3)***

Chez les ovins, plus de 80 % du cortisol circulant est fixé à la CBG (Corticosteroid-Binding-Globulin) appelée encore transcortine (12). Cette glycoprotéine, synthétisée essentiellement

dans les hépatocytes, se lie de façon spécifique au cortisol, avec une forte affinité mais une faible capacité. Elle est par conséquent saturable ; chez la plupart des espèces animales, la capacité maximale de liaison à la CBG est du même ordre de grandeur que les cortisolémies physiologiques moyennes (12). La transcortine lie la corticostérone et la progestérone avec des affinités comparables au cortisol (8). Le rôle classiquement décrit de la transcortine est celui de transporteur spécifique des glucocorticoïdes, ce qui fait d'elle un rôle de réservoir.

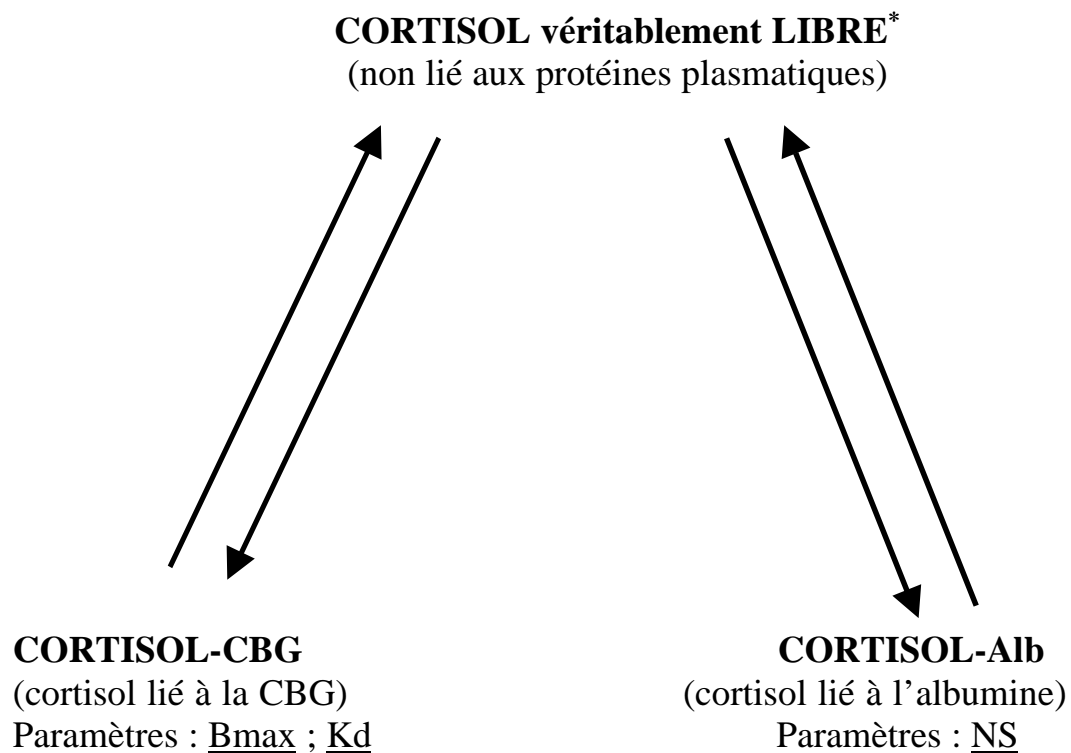
Le cortisol se fixe aussi de façon non spécifique et non saturable à l'albumine mais avec une affinité beaucoup plus faible (38).

La liaison du cortisol à la CBG est caractérisée par la capacité maximale de liaison du cortisol sur la transcortine,  $B_{max}$ , et la constante de dissociation à l'équilibre,  $K_d$ , c'est-à-dire la concentration en cortisol non lié à la transcortine pour laquelle la moitié de celle-ci est saturée ; la liaison du cortisol à l'albumine est caractérisée par une constante de proportionnalité NS (proportionnalité entre la concentration plasmatique en cortisol libre et la concentration en cortisol lié à la protéine).

L'activité biologique du cortisol est déterminée par la fraction libre circulante, seule capable de franchir les membranes cellulaires (29,30). Or, en pratique, la mesure des concentrations plasmatiques de cortisol total est généralement utilisée pour évaluer l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. De plus, différentes études suggèrent que les concentrations plasmatiques de CBG ou les capacités de fixation ne sont pas constantes et peuvent être altérées par différents facteurs tels que le stress, l'inflammation, les œstrogènes ou un traitement aux glucocorticoïdes (40,43). Il a été également démontré que des variations mineures de concentrations en CBG pouvaient entraîner des modifications majeures sur les concentrations de cortisol libre (8). Par exemple, dans certaines situations telles que le stress, des modifications des taux de cortisol libre ont été mises en évidence sans qu'aucune variation des concentrations de cortisol total n'ait été notée (2).

L'étude de la fonction corticosurrénalienne passe donc non seulement par la mesure des concentrations plasmatiques de cortisol total mais aussi par l'évaluation des différentes fractions de cortisol (libre, lié à la CBG, lié à l'albumine).

Figure 3 : Les trois formes de cortisol dans la circulation sanguine.



Bmax : Capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG

Kd : Constante de dissociation à l'équilibre du cortisol à la CBG

NS : Constante de liaison non spécifique du cortisol à l'albumine



### *1.2.5. Disposition du cortisol*

La détermination de la disposition d'une molécule permet de caractériser le sort de cette molécule au moyen de paramètres qui rendent compte de sa distribution et de son élimination. On définit la **disposition** d'une molécule comme l'ensemble des processus qui entrent en jeu depuis le moment où la molécule atteint la circulation jusqu'au moment où celle-ci ou un ou plusieurs métabolites quittent l'organisme. On définit la **distribution** d'une molécule comme les processus de répartition de la molécule dans l'ensemble des tissus et des organes.

Cette analyse de la disposition du cortisol implique l'évaluation de différents paramètres pharmacocinétiques dont le taux de production, le volume de distribution et la clairance de cette hormone.

On définit le **volume de distribution** comme le volume théorique qu'occuperait la fraction absorbée de la molécule à l'état d'équilibre si elle était uniformément répartie dans l'organisme.

On définit la **clairance sanguine (plasmatique) totale** comme la quantité de sang (respectivement de plasma) complètement et irréversiblement épuré d'un analyte par unité de temps, rapportée à la concentration (sanguine ou plasmatique) en analyte à l'origine de ce processus épurateur.

Classiquement, la détermination du **taux de production PR** d'une hormone est basée sur l'évaluation de sa clairance plasmatique Cl, obtenue après administration par voie intraveineuse d'une quantité donnée de l'hormone, et de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques physiologiques de l'hormone AUC (voir page suivante), selon l'équation 1 :

$$PR = Cl \times AUC$$

Equation 1

L'application de cette relation implique que soient respectées 2 conditions :

la linéarité et la stationnarité de la clairance, c'est-à-dire que la clairance doit être indépendante de la concentration en cortisol et qu'elle doit être stable au cours du temps. Ceci n'est pas le cas du cortisol compte tenu de sa liaison saturable avec la CBG. En effet, le rythme ultradien de sécrétion du cortisol est à l'origine de variations permanentes de la fraction de cortisol non lié la CBG. Or cette fraction, constituée de la fraction véritablement

libre et de la fraction liée à l'albumine est la fraction métabolisable du cortisol. Par conséquent, la clairance du cortisol total (c'est-à-dire la capacité de l'organisme à éliminer le cortisol total) subit en permanence des variations ultradiennes et nycthémérales. A ce titre, la disposition du cortisol est à la fois non linéaire, puisque la clairance plasmatique du cortisol augmente lorsque le taux de production est accru, et non-stationnaire, puisque le cortisol est sécrété de façon pulsatile et selon un rythme circadien.

Lorsque la cinétique d'une hormone n'est pas linéaire, l'approche traditionnelle pour évaluer le taux de production consiste à administrer l'hormone sous forme radiomarquée à dose traçante (cortisol tritié) ce qui met en jeu une technique analytique lourde.

Récemment, une étude réalisée en laboratoire a permis de valider une méthode de mesure du taux de production du cortisol qui s'affranchit de l'utilisation de radioisotopes (39), basée sur l'évaluation de la clairance du cortisol non lié à la CBG (Clairance libre,  $Cl_F$ ) et sur la détermination de l'aire sous la courbe des concentrations physiologiques en cortisol non lié à la CBG ( $AUC_{free(0-24h)}$ ). Le taux de production sur 24 heures est alors donné par l'équation suivante :

$$PR_{(0-24h)} = Cl_F \times AUC_{free(0-24h)} \quad \text{Equation 2}$$

La clairance du cortisol libre est indépendante des fluctuations des sécrétions hormonales et est par conséquent un véritable **paramètre** (et non plus une variable comme l'était la clairance du cortisol total) qui permet d'évaluer de façon correcte la capacité de l'organisme à éliminer le cortisol.

Cette méthode a donc été retenue pour évaluer le taux de production du cortisol chez les brebis atteintes de tremblante.

On définit l'**aire sous la courbe (AUC)** comme la surface délimitée par les axes et la courbe de concentrations sanguines ou plasmatiques de la molécule en fonction du temps. L'aire de la courbe est soit limitée à une durée déterminée, soit extrapolée jusqu'à l'infini.

Le calcul des AUC a fait appel à la **méthode des trapèzes** : elle consiste à tracer un trapèze entre 2 points de prélèvement. Ce trapèze est délimité par la droite joignant les 2 temps de prélèvement (entre  $t_1$  et  $t_2$  sur l'axe des abscisses), celle reliant les 2 concentrations correspondantes ( $C_1$  et  $C_2$ ) et celles parallèles à l'axe des ordonnées par liaison du point

obtenu pour le temps considéré. On détermine l'aire de chaque trapèze ainsi tracé selon l'équation 3 :

$$Aire_{trapèze} = \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1)$$

Equation 3

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **II.1. Animaux et hébergement**

Dans la première expérience, 9 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante, de race Manech tête rousse et toutes âgées entre 1 et 4 ans, ont été utilisées. La deuxième expérience a été réalisée avec 6 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante ayant participé à la première expérience.

Le diagnostic de tremblante a été basé sur les signes cliniques classiquement décrits : prurit, changements de comportement, tremblements et ataxie ; ce diagnostic a été établi au moins 10 jours avant le début des expériences. Les brebis saines ont été sélectionnées sur la base de l'absence de ces critères et aucun des signes cliniques de tremblante n'est apparu pendant les 6 mois qui ont suivi les expériences.

Durant la phase animale de l'expérimentation, les brebis étaient placées dans des cages à métabolisme dans lesquelles elles recevaient une ration journalière de concentrés, du foin et de l'eau à volonté. Les animaux étaient soumis à un éclairage artificiel qui mimait les conditions naturelles (12h d'obscurité, 12h de lumière).

Les brebis atteintes de tremblante ont été sacrifiées lorsqu'elles ont manifesté les signes cliniques ultimes de la maladie, c'est-à-dire un décubitus irréversible.

### **I.2. Protocole expérimental**

L'objectif de ces 2 expériences était d'étudier la disposition et les paramètres pharmacocinétiques du cortisol chez les brebis atteintes de tremblante comparativement à ceux des brebis saines.

### ***II.2.1. Expérience 1***

Deux prélèvements de sang ont été effectués sur chaque brebis à 1 mois d'intervalle durant la phase clinique de tremblante dans le but d'évaluer *in vitro* les paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques.

Des prélèvements de sang ont également été réalisés pendant la même période pour évaluer les taux plasmatiques des métabolites du cortisol dans le but de confirmer le syndrome d'hypercortisolémie mis en évidence chez les brebis atteintes de tremblante et pour déterminer l'importance relative des différentes fractions de cortisol (libre, lié à la CBG et lié à l'albumine) à partir de l'analyse individuelle des paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques (CBG et albumine).

### ***II.2.2. Expérience 2***

L'objectif de cette expérience était de comparer la disposition du cortisol (clairance, volume de distribution, temps de demi-vie, taux de production) et les paramètres de liaison du cortisol (obtenus *in vivo*) des brebis atteintes de tremblante à ceux des brebis saines.

Cette deuxième expérience s'est déroulée entre les 2 sessions de la première expérience et a compris 2 périodes :

- durant la première période, des prélèvements de sang ont été effectués toutes les heures pendant 24 heures, le premier prélèvement ayant eu lieu à 8 heures du matin, de façon à obtenir un profil spontané des concentrations plasmatiques de cortisol sur 24 heures
- pendant la deuxième période, qui a eu lieu une semaine plus tard, le cortisol a été administré par voie intraveineuse à 10 heures. Préalablement, les brebis avaient reçu une administration intraveineuse de dexaméthasone à 7 heures de façon à inhiber les sécrétions endogènes de cortisol. Les prélèvements de sang ont débuté 3 heures avant l'administration de cortisol et ont été effectués toutes les heures pendant 3 heures, puis aux temps 1,2,4,8,15,30,45,60 minutes après l'injection et enfin toutes les heures jusqu'à 12 heures après l'injection.

## **II.3. Procédure expérimentale**

### ***II.3.1. Prélèvements de sang***

Dans l'expérience 1, les prélèvements de sang (30 à 50 ml) ont été réalisés par ponction directe de la veine jugulaire gauche à l'aide de seringues à usage unique.

Dans l'expérience 2, les prélèvements de sang (10 à 20 ml) ont été effectués à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire gauche la veille des mesures. Les cathéters utilisés (hémocath 30, Vygon, Paris) étaient stériles et héparinés (Héparine Roche diluée dans du sérum physiologique à 10 U/ml) afin d'éviter toute obstruction par coagulation puis bouchés jusqu'au début des prélèvements. Les prélèvements de sang ont été effectués à l'aide du cathéter gauche avec des seringues deux corps à usage unique. Après chaque prélèvement, le cathéter a été rincé avec du sérum physiologique hépariné.

### ***II.3.2. Administrations***

Les administrations (cortisol et dexaméthasone) ont été réalisées au niveau d'un cathéter placé dans la veine jugulaire droite. Le cortisol (Hydrocortisone, Sigma<sup>R</sup> ; l'Isle d'Abeau Chesnes, La Verpillière, France) a été administré à la dose de 1 mg/kg et la dexaméthasone (Cortamethasone<sup>R</sup>, Vétoquinol, Lure, France) à la dose de 0.1 mg/kg.

Le cortisol à administrer a été préalablement dissous dans une solution de diméthyl sulfoxyde et éthanol 50/50 (v/v) de façon à obtenir une concentration de 50 mg/ml. La solution a été préparée au cours des 2 heures précédant les administrations et conservée dans de la glace pilée.

### ***II.3.3. Traitement des échantillons***

Pour tous les prélèvements, le sang a été recueilli dans des tubes héparinés et immédiatement mélangé par retournement. Les prélèvements ont ensuite été centrifugés à 1400 g et à 4°C pendant 10 minutes. Les plasmas ont été récupérés dans des tubes en cristal identifiés et conservés à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

## II.4. Méthodes analytiques

### *II.4.1. Expérience 1*

Les dosages de cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone ont été réalisés par la technique d'**HPLC** (High Performance Liquid Chromatography) (3). L'extraction des corticoïdes a été réalisée avec du chlorure de méthylène : 1 ml de plasma, 1 ml de 0.1 N NaOH et 10 ml de chlorure de méthylène ont été mélangés pendant 10 minutes et centrifugés à 8400g pendant 10 minutes à 4°C ; la couche de chlorure de méthylène a ensuite été aspirée et évaporée à 40°C. Le résidu a été dissous dans 100  $\mu$ l de solvant puis injecté dans la colonne. La phase mobile était constituée d'un mélange de chlorure de méthylène, méthanol et acide acétique avec des proportions de 96 / 4 / 0.4 (v / v / v). L'appareil à chromatographie était composé d'une colonne (10 X 0.8 cm) en gel de microparticules de silice, équipée d'un système de compression radiale et d'un détecteur à UV de longueur d'onde unique à 254nm.

Avec cette technique, les coefficients de variation inter et intra dosage ont été inférieurs à 15%. L'exactitude a varié entre 89 et 105 %, le taux d'extraction entre 75 et 85 %. La limite de quantification a été de 1.25 ng/ml pour tous les analytes.

Pour l'évaluation des paramètres de liaison du cortisol à la CBG, les stéroïdes endogènes ont été préalablement éliminés du plasma par adsorption sur du charbon (4) ; la quantité de charbon était de 500 mg pour 10 ml de plasma. Après agitation pendant 1 heure à température ambiante, le charbon a été éliminé par des centrifugations successives. Les plasmas ainsi traités ont été conservés à -4°C jusqu'au moment de la réalisation de l'étude de liaison *in vitro* qui a eu lieu dans les 24 heures suivant les prélèvements. Un échantillon de plasma déstéroïdé a été conservé à -20°C afin de s'assurer de l'absence de corticoïdes dans les plasmas traités.

Les paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques ont été déterminés à l'aide de la technique de **dialyse à l'équilibre**. Cette technique a utilisé un système Dianorm<sup>R</sup> (CH8135, Langenau, Zurich, Switzerland) (12). La dialyse a eu lieu dans des demi-cellules en Téflon séparées par une membrane semi-perméable en cellulose qui exclut les substances de poids moléculaire supérieur à 10 000 (Diachema<sup>R</sup> 16-10, Braun Scientetec, ZA Courtabœuf, Les Ulis, France). L'un des compartiments contenait le cortisol (Hydrocortisone, Sigma<sup>R</sup>) en solution dans du tampon phosphate à 0.1 mM (pH : 7.4 ; 0.9 ml). Le deuxième contenait le

plasma déstéroïdé (0.9 ml). La fixation du cortisol a été étudiée dans une gamme de concentrations qui s'étendait de 0.0055 à 2.762  $\mu\text{M}$ . Vingt microlitres d'une solution de cortisol tritié utilisé comme traceur ( $_{1,2,6,7-}^3\text{[H]}$  cortisol, 80 Ci/mme, Amersham International<sup>R</sup>, Buckinghamshire, England) à 1.5 nM dans du toluène : éthanol (9 / 1, v/v) ont été ajoutés à un volume de 1 ml de chacune des solutions de cortisol (10 000 dpm par cellule). La pureté radiochimique de la solution de  $^3\text{[H]}$ cortisol conservée à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  a été contrôlée par HPLC (supérieure à 98%).

Les cellules, soumises à une rotation constante (20 rpm) ont été placées dans un bain-marie, dont la température a été contrôlée, pendant 1 heure. Les mesures de fixation protéique ont été réalisées à  $37^\circ\text{C}$  avec les plasmas issus des prélèvements de l'expérience 1.

Après la dialyse, respectivement 400 et 200  $\mu\text{l}$  de plasma et de solution tampon prélevés dans des demi-cellules ont été comptés à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (Tri-Carb<sup>R</sup> 1500, Packard Instrument, Rungis, France) après addition de liquide scintillant (4.5 ml, Ready Safe<sup>R</sup>, Beckma Instruments, Gagny, France). Les coups par minute (cpm) ont été convertis en désintégrations par minute (dpm) en utilisant la correction de « quenching » par standard externe.

#### ***II.4.2. Expérience 2***

Pour les échantillons de l'expérience 2, les dosages de cortisol ont été réalisés par radioimmunologie. Le cortisol a été dosé en duplicate en utilisant des aliquots de plasmas de 50  $\mu\text{l}$  par une méthode **RIA** (Radio Immuno Assay) adaptée à partir de celle utilisée par Gomez Brunet et Lopez Sebastian (14).

La limite de quantification a été de 4 ng/ml. Le coefficient de variation intra dosage a été de 13% (pour 3 niveaux de dosages à 4, 16, 32 ng/ml et 4 dosages) et le coefficient de variation inter dosage a été de 14 %.

Le dosage du cortisol a donc fait appel à 2 techniques différentes : HPLC dans la première expérience et RIA dans la seconde.



## II.5. Analyse pharmacocinétique

### *II.5.1. Evaluation de la clairance du cortisol libre par modélisation des paramètres de fixation du cortisol à la CBG (expérience 2)*

Les valeurs de cortisol plasmatique (cortisol total) ont été analysées en utilisant une approche compartimentale. On définit le **compartiment** comme un espace virtuel de distribution dans lequel la molécule est instantanément répartie de manière homogène, puis s'élimine ou s'échange avec d'autres compartiments, suivant une cinétique identique en tous les points du compartiment.

Des modèles monocompartimentaux et bicompartimentaux ont été construits à partir du postulat selon lequel le cortisol non lié de façon spécifique à la CBG (c'est-à-dire le cortisol libre et le cortisol lié de façon non spécifique à l'albumine) était la seule forme de cortisol éliminée à partir du compartiment central, de volume  $V_C$  (l/kg), avec une constante de transfert  $k_{10}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) (fig.4). Dans le compartiment central, le cortisol est lié de façon spécifique à la CBG, caractérisée par une capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG ( $B_{\text{max}}$  (nmol)) et une constante de dissociation du cortisol à la CBG ( $K_d$  (nmol)) qui correspond à la concentration de cortisol libre pour laquelle la moitié de la CBG est saturée.  $B_{\text{max}}$  et  $K_d$  ont été estimés par modélisation en termes de quantités mais ont été exprimés sous forme de concentration en divisant la quantité estimée par le volume de distribution de la fraction libre, soit  $V_C$ . Il faut souligner que dans notre modèle, le cortisol fixé de façon non spécifique n'a pas été pris en compte et que ce que l'on appelle le cortisol libre correspond en réalité au cortisol véritablement libre plus le cortisol qui est fixé de façon non spécifique à l'albumine.

Le modèle a été résolu numériquement en utilisant une méthode de Runge-Kutta au 5<sup>ème</sup> ordre. Les paramètres ont été obtenus à l'aide de REVOL, un algorithme de type Monte Carlo (21) et ont été ajustés en utilisant la méthode des moindres carrés pondérés ( $1/i^2$  avec  $i$  l'ième concentration ajustée). Un test F a été utilisé pour choisir le nombre de compartiments approprié (1 ou 2) et un modèle bicompartimental a été retenu. On définit ainsi un **compartiment central**, compartiment modélisant le plasma et les compartiments extravasculaires où l'équilibre des concentrations de la molécule considérée avec le plasma est

rapide, et un **compartiment périphérique**, compartiment modélisant les tissus où l'équilibre des concentrations de la molécule considérée avec le plasma s'effectue plus lentement.

Les paramètres estimés ont été  $k_{10}$  ( $\text{min}^{-1}$ ),  $k_{12}$  ( $\text{min}^{-1}$ , constante de transfert de premier ordre du cortisol du compartiment central vers le compartiment périphérique),  $k_{21}$  ( $\text{min}^{-1}$ , constante de transfert de premier ordre du cortisol depuis le compartiment périphérique vers le compartiment central),  $V_C$  (l/kg),  $B_{\text{max}}$  (nmol) et  $K_d$  (nmol) (fig.4).

La clairance plasmatique du cortisol libre (non lié à la CBG), appelée  $Cl_F$  et exprimée en l/kg.min, a été calculée en utilisant l'équation 4 :

$$Cl_F = k_{10} \times V_C \quad \text{Equation 4}$$

Le temps de  $\frac{1}{2}$  vie pour la phase terminale a été calculé à l'aide de l'équation 5 :

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{10}} \quad \text{Equation 5}$$

Le volume de distribution à l'équilibre du cortisol libre a été obtenu à partir de l'équation 6 :

$$V_{ss} = V_C \left( 1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right) \quad \text{Equation 6}$$

Le taux de production sur 24 heures a été calculé à partir de l'équation 7 :

$$PR_{(0-24h)} = AUC_{\text{free}(0-24h)} \times Cl_F \quad \text{Equation 7}$$

où  $AUC_{\text{free}(0-24h)}$  est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques du cortisol libre sur 24 heures, calculée en utilisant la méthode des trapèzes linéaires, à partir des valeurs obtenues dans la première période de l'expérience 2.

Les concentrations de cortisol libre ont été calculées grâce à l'équation 8 :

$$CBG_{\text{free}} = \frac{(TOT - B_{\text{max}} - Kd) + \sqrt{(Kd - TOT + B_{\text{max}})^2 + 4 \times TOT \times Kd}}{2} \quad \text{Equation 8}$$

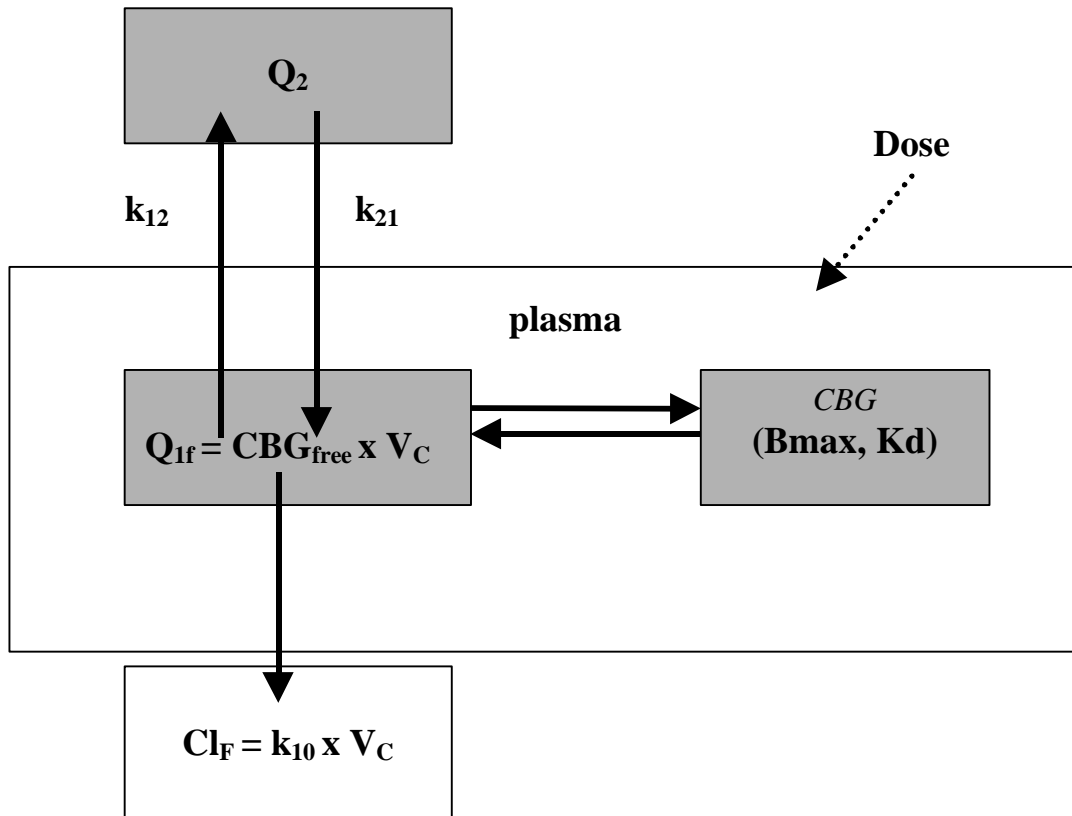
avec TOT, la concentration plasmatique de cortisol total mesurée, B<sub>max</sub> et Kd, les paramètres de liaison du cortisol à la CBG estimés.

Le Kd estimé est en fait le produit de la constante de dissociation et de (NS+1), NS étant la constante de liaison non spécifique du cortisol à l'albumine (constante de proportionnalité sans unité) :

$$Kd_{\text{in vivo}} = Kd_{\text{in vitro}} \times (NS + 1) \quad \text{Equation 9}$$

Grâce à cette équation 9, le Kd<sub>in vivo</sub>, estimé par modélisation comme décrit précédemment et le Kd<sub>in vitro</sub>, mesuré par la technique de dialyse à l'équilibre, considérée comme technique de référence, ont pu être comparés.

Figure 4 : Le modèle bicompartimental



Représentation du modèle bicompartimental où  $Q_2$  est la quantité de cortisol total présente dans le compartiment périphérique,  $Q_{1f}$  est la quantité de cortisol libre présente dans le compartiment central,  $k_{10}$  est la constante d'élimination du cortisol libre à partir du compartiment central,  $k_{12}$  est la constante de transfert du cortisol libre depuis le compartiment central vers le compartiment périphérique,  $k_{21}$  est la constante de transfert du cortisol libre depuis le compartiment périphérique vers le compartiment central,  $V_C$  est le volume de distribution du cortisol libre dans le compartiment central,  $CBG_{free}$  est la concentration de cortisol libre (non lié à la CBG),  $B_{max}$  est la capacité maximale de liaison du cortisol à la CBG,  $K_d$  est la constante de dissociation à l'équilibre du cortisol à la CBG,  $Cl_F$  est la clairance plasmatique du cortisol libre (non lié à la CBG).

### ***II.5.2. Evaluation des paramètres de liaison du cortisol aux protéines plasmatiques par la technique in vitro de dialyse à l'équilibre (expérience 1)***

La détermination du nombre de dpm (désintégrations par minutes) à l'équilibre dans chacun des compartiments a permis de calculer les concentrations à l'équilibre des formes libres et liées du cortisol (12). La concentration à l'équilibre en cortisol total ( $P_E$ ) dans le plasma a été calculée à partir de la concentration initiale en cortisol de la solution de tampon phosphate ( $P_T$ ) et de la quantité de radioactivité contenue dans chacun des compartiments, suivant l'équation 10 :

$$P_E = P_T \times \frac{(\text{dpm plasma})}{(\text{dpm tampon}) + (\text{dpm plasma})} \quad \text{Equation 10}$$

Les équations 11 et 12 ont été utilisées pour déterminer les concentrations molaires à l'équilibre de F (cortisol libre) et B (cortisol lié à la CBG et à l'albumine):

$$F = P_E \times \frac{(\text{dpm tampon})}{(\text{dpm plasma})} \quad \text{Equation 11}$$

$$B = P_E - F \quad \text{Equation 12}$$

La dialyse à l'équilibre nous a permis de déterminer *in vitro* des couples de valeurs B et F où B est la concentration molaire en cortisol lié aux protéines plasmatiques c'est-à-dire la somme des concentrations en cortisol lié à la CBG ( $B_{CBG}$ ) et à l'albumine ( $B_{alb}$ ) et où F est la concentration molaire en cortisol libre. Les données ont été ajustées selon le modèle de fixation sur des sites saturables (liaison spécifique à la CBG) et des sites non saturables (liaison non spécifique à l'albumine), d'après l'équation 13 :

$$B = \frac{B_{max} \times F}{Kd_{in\ vitro} + F} + NS \times F \quad \text{Equation 13}$$

Les paramètres de liaison du cortisol à la CBG ( $B_{max}$ ,  $Kd_{in\ vitro}$ ) et à l'albumine (NS) ont été obtenus par régression non linéaire (45).

Pour les différentes concentrations de cortisol total, la concentration de cortisol libre a été évaluée à partir de l'équation 14 :

$$F = \frac{(\text{TOT} - \text{Bmax} - \text{Kd}(\text{NS} + 1)) + \sqrt{(\text{Kd}(\text{NS} + 1) - \text{TOT} + \text{Bmax})^2 + 4 \times \text{TOT} \times \text{Kd}(\text{NS} + 1)}}{2}$$

Equation 14

La concentration du cortisol lié à l'albumine a été calculée à partir de l'équation 15:

$$B_{\text{alb}} = \text{NS} \times F$$

Equation 15

La concentration du cortisol lié à la CBG ( $B_{\text{CBG}}$ ) a été déterminée par différence selon l'équation 16 :

$$B_{\text{CBG}} = \text{TOT} - F - B_{\text{alb}}$$

Equation 16

## **II.6. Analyse statistique**

Les résultats ont été exprimés sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type (SD : standard deviation) ou sous la forme médiane et valeurs extrêmes (range). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics<sup>R</sup> (version 5, STCS Inc., 1991, Rockville, MD, USA). La valeur critique a été fixée à 0.05 (seuil significatif).

### ***II.6.1. Expérience 1***

Les concentrations plasmatiques de corticoides situées en dessous du seuil de détection pour la technique HPLC ont été fixées arbitrairement à 0.6 ng/ml. L'influence de la tremblante sur les concentrations plasmatiques de corticoides a été évaluée à l'aide d'un test t de Student.

Etant donné la variabilité des paramètres entre animaux et le nombre relativement restreint de sujets, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour analyser l'effet de la tremblante sur les concentrations des différents corticoides quand les variances étaient différentes.

Les paramètres de fixation à la CBG ont été analysés à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) et du modèle statistique suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + L_k + (A_i * L_k) + \varepsilon_{ijk}$$

où  $Y_{ijk}$  est le paramètre de fixation à la CBG (c'est-à-dire  $B_{max}$  ou  $K_d$ ),  $\mu$  la moyenne générale,  $A_i$  l'effet de groupe (brebis saines vs tremblantes),  $B_{ij}$  l'effet de la brebis  $j$  au sein du groupe  $i$ ,  $L_k$  l'effet de la période  $k$  ( $k=1$  ou  $2$ ),  $(A_i * L_k)$  l'interaction entre l'effet de groupe  $i$  et la période  $k$  de prélèvement,  $\varepsilon_{ijk}$  la valeur résiduelle.

Les proportions des différentes formes de cortisol (libre, lié à la CBG et lié à l'albumine), calculées à partir des paramètres individuels de fixation à la CBG et à l'albumine, ont été analysées par une analyse de covariance (ANCOVA) avec le cortisol mesuré comme covariable, en utilisant le modèle suivant :

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (A_i * B_j) + \varepsilon_{ij}$$

où  $Y_{ij}$  est la proportion d'une forme donnée de cortisol,  $\mu$  la moyenne générale,  $A_i$  l'effet de groupe (brebis saines vs tremblantes),  $B_j$  l'effet de la concentration plasmatique de cortisol,  $(A_i * B_j)$  l'interaction entre le groupe  $i$  et la concentration de cortisol  $j$ ,  $\varepsilon_{ij}$  la valeur résiduelle.

### ***II.6.2. Expérience 2***

Les concentrations de cortisol situées en dessous du seuil de détection du dosage ont été fixées arbitrairement à 2 ng/ml.

L'effet de la tremblante sur les paramètres pharmacocinétiques du cortisol et les paramètres de liaison à la CBG a été évalué par une analyse de variance (ANOVA) à 1 facteur. Etant donné l'hétérogénéité des variances, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour analyser l'effet de la tremblante sur les concentrations plasmatiques de cortisol total et de cortisol non lié à la CBG.

### ***II.6.3. Comparaison des paramètres de liaison obtenus dans les 2 expériences***

Les valeurs de Bmax et Kd estimées par modélisation dans l'expérience 2 ont été comparées à celles obtenues dans l'expérience 1 par la méthode de dialyse à l'équilibre à l'aide d'un test t de Student apparié. Les valeurs de  $Kd_{in vivo}$  (expérience 1) ont été comparées au produit des valeurs de  $Kd_{in vitro}$  (expérience 1) par (NS + 1), selon l'équation 8.

## **II.7. Histologie**

Les brebis tremblantes ou mourantes ont été euthanasiées in extremis et autopsiées. L'euthanasie a été pratiquée à l'aide d'une injection intraveineuse de pentobarbital puis les brebis ont été saignées. L'encéphale et les glandes surrénales ont été récupérés et fixés dans une solution de formol tamponné à 10% pendant 3 semaines.

Les prélèvements (surrénales, obex et pons) ont été déshydratés, enrobés dans la paraffine, coupés en section de 2  $\mu m$  et colorés par la méthode classique à l'hémalun-éosine. Le diagnostic de tremblante a été confirmé par l'identification de lésions caractéristiques : vacuolisation du périkarion et/ou spongieuse du neuropile dans au moins 3 noyaux de la substance grise (34).



## **III. RESULTATS**

Aucun signe évident de stress n'a été décelé pendant les différents prélèvements et les brebis atteintes de tremblante se sont comportées et ont mangé normalement jusqu'à ce qu'elles soient exclues du protocole, quand les signes cliniques dus à la maladie devenaient trop sévères.

### **III.1. Expérience 1**

#### ***III.1.1. Concentrations plasmatiques des corticä des***

Le tableau 1 montre les concentrations plasmatiques de cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone (médianes et valeurs extrêmes) chez les brebis saines et atteintes de tremblante. La médiane des concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol est 2 fois plus élevée chez les brebis malades (8.1 nM, 3.2–48.3 nM) que celle obtenue chez les brebis saines (4.8 nM, 1.6–8.3 nM). Une analyse de Kruskal-Wallis a mis en évidence un effet significatif de la tremblante sur les concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol et de cortisone (respectivement  $p < 0.02$  et  $p < 0.05$ ). Par contre, la médiane des concentrations plasmatiques de cortisol chez les brebis tremblantes n'est pas significativement différente de celle des brebis saines (57 nM, 24–360 nM vs 51 nM, 26–236 nM).

#### ***III.1.2. Etude de la liaison du cortisol aux protéines plasmatiques***

La figure 5 montre que le pourcentage de cortisol lié aux protéines plasmatiques (par rapport aux concentrations plasmatiques de cortisol total) est plus élevé chez les brebis saines que celles atteintes de tremblante. Chez les brebis saines comme chez les brebis malades, les profils de liaison aux protéines plasmatiques sont biphasiques. Chez les brebis saines, la fraction de cortisol lié diminue de 88% à 64% pendant que les concentrations de cortisol varient de 5.5 à 552 nM ; pour les brebis atteintes de tremblante, la fraction de cortisol lié diminue de 76% à 64% pendant que les concentrations de cortisol passent de 5.5 à 138 nM. La liaison du cortisol demeure ensuite à peu près constante pour des concentrations supérieures. La première phase des courbes met en évidence les sites de fixation de haute

affinité de la CBG, la seconde phase est le résultat de la fixation non saturable du cortisol à l'albumine.

La moyenne  $\pm$  écart-type des paramètres de liaison du cortisol aux protéines obtenus durant les 2 séries de prélèvements sont présentés dans le tableau 2. L'analyse de la variance a montré un effet significatif de la tremblante sur Bmax (ANOVA,  $p < 0.01$ ) mais pas d'effet de la maladie sur Kd ni sur NS ( $p > 0.05$ ). L'analyse de la variance a révélé un effet significatif des sessions de prélèvements de sang sur Kd ( $p < 0.05$ ) et NS ( $p < 0.005$ ). Il n'y a pas eu d'effet similaire de période sur Bmax. La moyenne générale de Bmax chez les brebis atteintes de tremblante ( $37 \pm 32$  nM) est 2 fois plus basse que chez les brebis saines ( $73 \pm 29$  nM). La moyenne générale de Kd est de  $8.8 \pm 3.7$  nM pour les brebis tremblantes et de  $9.8 \pm 3.0$  nM chez les saines. Enfin, la moyenne générale de NS est de  $1.13 \pm 0.18$  pour les brebis malades et de  $1.14 \pm 0.23$  nM pour les saines.

Les fractions de cortisol libre, de cortisol lié à la CBG et de cortisol lié à l'albumine ont été calculées à partir de l'analyse individuelle des paramètres de fixation à la CBG obtenus pendant la période 1 et à partir des taux de cortisol plasmatiques mesurés. Ces données sont rassemblées dans le tableau 3.

Les concentrations de cortisol libre chez les brebis atteintes de tremblante (médiane et valeurs extrêmes : 22.7 nM, 4.6–150 nM) ont tendance à être plus élevées que celles des brebis saines (8.8 nM, 2.4–69 nM) mais la différence n'est pas significative (Kruskal-Wallis,  $p = 0.15$ ). Cependant, l'ANCOVA montre que les concentrations de cortisol libre, pour une concentration donnée (mesurée) de cortisol total, sont significativement plus élevées chez les brebis atteintes de tremblante que chez les brebis saines ( $p < 0.01$ ).

De même, les concentrations de cortisol lié à l'albumine ont tendance à être plus élevées chez les brebis tremblantes (27.3 nM, 4.3-207 nM) que chez les brebis saines (11.2 nM, 2.8–92 nM) mais la différence n'est pas significative (Kruskal-Wallis,  $p = 0.19$ ). Cependant, l'ANCOVA montre que, pour une concentration de cortisol total donné, l'effet de la tremblante sur les concentrations de cortisol lié à l'albumine est à la limite de la signification ( $p = 0.07$ ).

Les concentrations de cortisol lié à la CBG des brebis atteintes de tremblante (12 nM, 2.0–80 nM) sont significativement inférieures à celles des brebis saines (29 nM, 16–75 nM) (Kruskal-Wallis,  $p < 0.02$ ). Quand on applique l'ANCOVA aux concentrations mesurées de

cortisol total, la différence entre les brebis saines et les brebis atteintes de tremblante est presque significative (ANCOVA,  $p=0.06$ ).

La figure 6 représente les concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) de cortisol libre, lié à l'albumine, lié à la CBG et de cortisol non lié à la CBG pour différentes concentrations de cortisol total qui s'étendent de 5.5 à 276 nM, chez les brebis saines et atteintes de tremblante. Chez les brebis saines, pour des concentrations moyennes de cortisol total variant de 14 à 28 nM (34), les concentrations moyennes de cortisol libre variaient de 1.5 à 3.9 nM, tandis que chez les brebis atteintes de tremblante, pour des concentrations moyennes de cortisol total variant de 28 à 165 nM (34), les concentrations de cortisol libre variaient de 7.9 à 64 nM.

## **III.2. Expérience 2**

### ***III.2.1. Période 1***

La figure 7 représente les variations nyctémérales individuelles et moyennes des concentrations de cortisol total et de cortisol non lié à la CBG (calculées à partir des paramètres de fixation à la CBG (équation 7)) chez les brebis saines et atteintes de tremblante. La moyenne générale des concentrations plasmatiques de cortisol total chez les brebis atteintes de tremblante est 2 fois plus élevée que celle des brebis saines ( $23.5 \pm 17.2$  vs  $13.9 \pm 8.5$  ng/ml, Kruskal-Wallis,  $p<0.01$ ). Les concentrations correspondantes de cortisol non lié à la CBG sont 5 fois plus élevées chez les brebis atteintes de tremblante que chez les brebis saines ( $12.4 \pm 14.8$  vs  $2.6 \pm 2.8$  ng/ml, Kruskal-Wallis,  $p<0.01$ ).

### ***III.2.2. Période 2***

La disposition moyenne du cortisol libre (non lié à la CBG), obtenue après administration de cortisol par voie intra veineuse à la dose de 1 mg/kg et les paramètres de fixation du cortisol à la CBG sont présentés dans le tableau 4. La clairance moyenne du cortisol libre (non lié à la CBG) chez les brebis atteintes de tremblante n'est pas significativement différente de celle des brebis saines ( $29.7 \pm 10.5$  vs  $26.4 \pm 4.2$  ml/kg.min, ANOVA,  $p>0.05$ ). De même, les autres paramètres pharmacocinétiques ne sont pas affectés par la maladie, sauf le volume du compartiment central,  $V_C$ , qui est significativement plus élevé chez les brebis atteintes de tremblante (ANOVA,  $P<0.05$ ). Le  $B_{max}$  moyen est 2 fois plus bas chez les brebis tremblantes

par rapport aux brebis saines ( $14.8 \pm 6.1$  ng/ml vs  $34.3 \pm 15.3$  ng/ml, ANOVA,  $p < 0.05$ ). La valeur moyenne du Kd est de  $3.9 \pm 2.6$  ng/ml chez les brebis tremblantes et de  $2.6 \pm 1.6$  ng/ml chez les brebis saines ; la différence n'est pas statistiquement différente (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

La détermination individuelle des paramètres de fixation à la CBG a permis de calculer les concentrations de cortisol libre (non lié à la CBG). Ces valeurs ont montré que le taux de production du cortisol sur 24 heures chez les brebis atteintes de tremblante était 5 fois plus élevé que chez les brebis saines ( $514 \pm 418$  vs  $84 \pm 30$  µg/kg sur 24 heures, ANOVA,  $p < 0.01$ ).

### **III.3. Comparaison des paramètres de liaison à la CBG obtenus *in vitro* et *in vivo***

Le tableau 5 indique les moyennes  $\pm$  écart-types des Bmax et Kd obtenus dans l'expérience 1 par dialyse à l'équilibre ( $B_{\max_{in vitro}}$ ,  $Kd_{in vitro}$  (NS+1)) et estimés dans l'expérience 2 par modélisation ( $B_{\max_{in vivo}}$ ,  $Kd_{in vivo}$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de Bmax déterminées par modélisation des cortisolémies totales et les valeurs de référence obtenues par dialyse à l'équilibre (respectivement  $23.1 \pm 14.5$  vs  $20.3 \pm 12.3$  ng/ml,  $p > 0.05$ ). En revanche, les valeurs de  $Kd_{in vivo}$  sont statistiquement différentes des valeurs de référence (respectivement  $3.2 \pm 2.1$  vs  $6.4 \pm 1.8$  ng/ml,  $p < 0.01$ ).

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques de cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone chez 8 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante

<b>Concentrations des corticoïdes plasmatiques</b>	<b><i>Brebis saines</i></b>	<b>Brebis atteintes de tremblante</b>
Cortisol (nM)	51 (26 – 236)	57 (24 – 360)
20 $\beta$ -dihydrocortisol (nM)	4.8 (1.6 – 8.3)	8.1 (3.2 – 48.3)**
Cortisone (nM)	8.3 (5.2 – 19.9)	25 (1.7 – 71.1)*

Les valeurs sont exprimées sous la forme médiane et valeurs extrêmes.

Les concentrations des différents corticoïdes plasmatiques ont été déterminées par la technique HPLC.

L'effet de la tremblante sur les concentrations des corticoïdes a été déterminé par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ .

Tableau 2 : Paramètres de fixation du cortisol aux protéines plasmatiques chez 9 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante lors de la première session de prélèvements (période 1) et chez 6 brebis saines et 6 brebis atteintes de tremblante lors de la seconde session (période 2).

Paramètres de liaison aux protéines	Brebis saines		Brebis atteintes de tremblante	
	Période 1 n = 9	Période 2 n = 6	Période 1 n = 13	Période 2 n = 6
Bmax (nM)	66 ± 25	82 ± 30	31 ± 34	48 ± 24
Kd (nM)	8.5 ± 1.2	11.8 ± 3.9	8.0 ± 4.0	10.5 ± 2.2
NS	1.24 ± 0.15	0.99 ± 0.25	1.19 ± 0.16	1.01 ± 0.19

Bmax et Kd sont respectivement la capacité maximale de fixation de la CBG et sa constante de dissociation. Bmax correspond au produit du nombre de sites de fixation par la concentration molaire de la protéine. NS est la constante de liaison non spécifique du cortisol à l'albumine.

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type.

Pour les valeurs de Bmax, il n'y a pas eu d'effet de période et la tremblante a eu un effet significatif ( $p < 0.01$ , ANOVA) pour les 2 périodes. Pour Kd et NS, il y a eu un effet significatif de période (respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.005$ , ANOVA) mais la tremblante n'a pas eu d'effet significatif ( $p > 0.05$ , ANOVA).

Tableau 3 : Concentrations plasmatiques de cortisol libre (non lié aux protéines plasmatiques), lié à l'albumine et lié à la CBG chez 9 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante lors de la première session de prélèvements.

Fractions de cortisol	Brebis saines	Brebis atteintes de tremblante
	Période 1 n = 9	Période 1 n = 13
Cortisol libre (nM)	8.8 (2.4-69)	22.7 (4.6-150)
Cortisol lié à l'albumine (nM)	11.2 (2.8-92)	27.3 (4.3-207)
Cortisol lié à la CBG (nM)	29 (16-75)*	12 (2.0-80)*

Les concentrations des différentes fractions du cortisol (libre, lié à l'albumine et lié à la CBG) ont été calculées à partir des paramètres individuels de fixation aux protéines plasmatiques obtenus dans la période 1, et à partir des concentrations plasmatiques de cortisol.

Les valeurs sont exprimées sous la forme médiane et valeurs extrêmes.

L'effet de la tremblante sur les différentes fractions de cortisol a été déterminé par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, \*  $p < 0.02$ .

Pour une concentration donnée de cortisol total, l'ANCOVA a montré un effet significatif de la tremblante sur les concentrations de cortisol libre ( $p < 0.01$ ) et un effet presque significatif pour les fractions de cortisol lié à l'albumine et lié à la CBG (respectivement  $p = 0.07$  et  $p = 0.06$ ).

Tableau 4 : Paramètres de liaison à la CBG et paramètres pharmacocinétiques décrivant la disposition du cortisol après une administration intraveineuse de cortisol à la dose de 1 mg/kg chez 6 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante.

Paramètres	Brebis saines	Brebis atteintes de tremblante
T1/2 (min)	5.6 ± 1.5	7.2 ± 1.8
V <sub>C</sub> (ml/kg)	211.7 ± 64.0	297.7 ± 76.6*
V <sub>SS</sub> (ml/kg)	631.9 ± 114.8	683.0 ± 127.4
Cl (ml/(kg.min))	26.4 ± 4.2	29.7 ± 10.5
Bmax (ng/ml)	34.3 ± 15.3	14.8 ± 6.1*
Kd (ng/ml)	2.6 ± 1.6	3.9 ± 2.6

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type.

T1/2 : Temps de demi-vie plasmatique pour la phase terminale

V<sub>C</sub> : Volume du compartiment central du cortisol libre (non lié à la CBG)

V<sub>SS</sub> : Volume de distribution à l'équilibre du cortisol libre

Cl : Clairance plasmatique du cortisol libre

Bmax : Capacité maximale de fixation à la CBG

Kd : Constante de dissociation ; le Kd *in vivo* estimé est en fait le produit de la constante de dissociation obtenue *in vitro* par (NS + 1) où NS est la constante de liaison non spécifique du cortisol à l'albumine.

\* p < 0.05, ANOVA.



Tableau 5 : Paramètres de liaison du cortisol à la CBG déterminés dans l'expérience 1 par la technique *in vitro* de dialyse à l'équilibre et dans l'expérience 2 par modélisation des concentrations plasmatiques de cortisol.

<b>Paramètres</b>	<b>Exp.1 (<i>in vitro</i>)</b>	<b>Exp. 2 (<i>in vivo</i>)</b>
Bmax (ng/ml)	20.3±12.3	23.1±14.5
Kd (ng/ml)	6.4±1.8	3.2±2.1*

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type.

Les valeurs de Kd sont ( $Kd_{in\ vitro}$  (NS+1)) pour l'expérience 1 et  $Kd_{in\ vivo}$  pour l'expérience 2.

Les valeurs de Bmax et Kd sont respectivement comparées entre les 2 expériences.

\*  $p < 0.01$

## **IV. DISCUSSION**

Les principaux résultats de nos expériences sont que le taux de production du cortisol chez les brebis atteintes de tremblante est augmenté d'un facteur 5 sans diminution de la clairance plasmatique du cortisol, alors que les concentrations plasmatiques de cortisol sont « seulement » augmentées d'un facteur 2 ; cette discordance entre l'augmentation du taux de production et des concentrations plasmatiques de cortisol est liée à la diminution significative (d'un facteur 2) de la capacité maximale de liaison du cortisol à la CBG qui est responsable de l'augmentation de la concentration de cortisol non lié à la CBG.

Dans la première expérience, nous avons montré que les concentrations plasmatiques de cortisol total n'étaient pas différentes entre les brebis saines et les brebis atteintes de tremblante ; par contre, les concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol et de cortisone ont été plus élevées chez les brebis atteintes de tremblante.

Les concentrations plasmatiques de cortisol sont soumises à des fluctuations d'origine endogène (pulsatilité de sécrétion) et exogène (en réponse à un stimulus tel que le stress lié aux prélèvements sanguins). Par conséquent, il est difficile, à partir d'un seul dosage de cortisol total, de distinguer une brebis atteinte de tremblante d'une brebis saine. Ces fluctuations n'existent pas pour les métabolites plasmatiques et urinaires du cortisol car les variations à court terme de la sécrétion de cortisol sont tamponnées par les processus métaboliques (34). L'augmentation des concentrations plasmatiques des métabolites du cortisol (20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone) des brebis malades reflète la stimulation de la fonction surrénalienne précédemment mise en évidence chez des brebis atteintes de tremblante (34), et est en accord avec l'épaississement du cortex surrénalien observé chez des brebis atteintes de tremblante (6), chez des souris infectées expérimentalement par la tremblante (20), et chez des hamsters infectés par la souche 139H de tremblante (7).

Cet état d'hypercortisolémie des brebis atteintes de tremblante a été confirmé dans la deuxième expérience où la moyenne des concentrations plasmatiques de cortisol total a été 2 fois plus élevée chez les brebis atteintes de tremblante ; ce phénomène a été encore plus marqué pour le cortisol non lié à la CBG (augmentation d'un facteur 5).

Nous avons également observé que de nombreuses valeurs de concentrations plasmatiques de cortisol chez les brebis saines étaient élevées en comparaison avec des concentrations physiologiques (34) ; cette augmentation pourrait être liée au stress engendré par les prélèvements de sang (11).

Les paramètres de fixation du cortisol à la CBG des brebis saines, obtenus par 2 méthodes différentes (*in vitro* : dialyse à l'équilibre / *in vivo* : modélisation des concentrations plasmatiques de cortisol), ont été du même ordre de grandeur que les valeurs physiologiques obtenues dans une expérience précédente à l'aide de la technique de référence de dialyse à l'équilibre (12).

Les valeurs de la capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG,  $B_{max}$  (brebis saines et tremblantes), obtenues par modélisation n'ont pas été significativement différentes des valeurs de  $B_{max}$  obtenues par la méthode de référence. Par contre les valeurs de  $K_d$  obtenues *in vivo* ont été statistiquement différentes des valeurs de référence. Cette différence de faible amplitude (facteur 2) ne semble pas avoir de signification physiologique. De plus, la dose de cortisol administrée semble avoir une influence. En effet, une étude récemment réalisée en laboratoire a montré des variations équivalentes de valeurs de  $K_d$  déterminées par modélisation des concentrations plasmatiques en cortisol après administration de cortisol aux doses de 0.2 et 1 mg/kg, alors qu'avec une dose de 0.05 mg/kg les valeurs de  $K_d$  ne différaient pas des valeurs de référence (méthode radioisotopique) (39).

Nous avons montré que le  $B_{max}$  était diminué d'un facteur 2 chez les brebis atteintes de tremblante par rapport aux brebis saines ; en revanche, les 2 autres paramètres,  $K_d$  et  $NS$ , n'ont pas été modifiés, ce qui suggère que l'affinité de la CBG resterait inchangée lors de la maladie. La diminution de la capacité de fixation de la CBG pourrait être en relation avec un effet dépresseur de l'hypercorticisme sur la synthèse de la CBG, ce qui a déjà été décrit chez le rat, chez les humains traités avec des corticoides ou dans la maladie de Cushing (10,35). En effet, une augmentation prolongée des concentrations plasmatiques de glucocorticoides pourrait entraîner une baisse des synthèses protéiques et en particulier de la CBG, comme cela a été montré chez le rat (9,40). Nous ne pouvons cependant pas exclure l'hypothèse selon laquelle un autre mécanisme pathogène lié à la tremblante pourrait provoquer une baisse de la capacité maximale de fixation du cortisol à la CBG.

Les études de la disposition du cortisol chez la brebis ont fait appel à différentes approches méthodologiques (17,25,41). Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser une méthode basée sur l'évaluation de la clairance plasmatique du cortisol non lié à la CBG (cf. introduction, 39), qui s'affranchit de l'utilisation de radio-isotopes. Si nous comparons nos résultats à ceux de la littérature, la clairance plasmatique du cortisol total peut être estimée approximativement à 0.5 l/kg.h en multipliant la valeur moyenne de la clairance plasmatique du cortisol non lié à la CBG de notre expérience, soit 1.6 l/kg.h par une estimation du pourcentage de cortisol non lié à la CBG correspondant aux valeurs physiologiques, soit 30%, pour une concentration plasmatique moyenne de cortisol de 15 ng/ml, avec une valeur de Bmax de 28.2 ng/ml et de Kd de 3.3 ng/ml (12). Dans la bibliographie, les valeurs de clairance plasmatique de cortisol total généralement rapportées varient de 1 à 2 l/kg.h (17,25,41,42). Le rang élevé des valeurs de clairance plasmatique du cortisol total peut s'expliquer par le fait qu'il s'agit d'une variable, directement liée à la fraction de cortisol pouvant être éliminée, c'est-à-dire la fraction de cortisol non lié à la CBG, qui est soumise à des variations instantanées chaque fois que le taux de cortisol plasmatique dépasse les capacités de liaison de la CBG. Au contraire, la clairance plasmatique du cortisol non lié à la CBG, appelée « libre » dans notre étude, est indépendante des fluctuations de sécrétion du cortisol et est le reflet de la véritable capacité d'élimination. Nous avons mis en évidence que cette clairance « libre » n'était pas modifiée lors de tremblante. Le taux de production moyen du cortisol des brebis saines, basé sur les valeurs individuelles de cette clairance libre a été évalué à 3.5 µg/kg.h.

Le taux de production du cortisol a été augmenté d'un facteur 5 chez les brebis atteintes de tremblante alors que les concentrations plasmatiques de cortisol ont été seulement doublées. Nous avons montré que la capacité de liaison de la CBG était diminuée chez les brebis atteintes de tremblante. Ainsi, la discordance entre l'augmentation du taux de production et celle des taux plasmatiques du cortisol chez les brebis atteintes de tremblante s'explique par la non-linéarité de la fixation du cortisol plasmatique à la CBG et par la diminution de la capacité maximale de liaison de la CBG. Il en résulte une augmentation de la fraction de cortisol non lié à la CBG et une amplification du phénomène de stimulation de la fonction surrénalienne. En effet, les concentrations plasmatiques de cortisol total des brebis atteintes de tremblante dépassent souvent le seuil (déjà) diminué de la capacité maximale de fixation de la CBG, et il en résulte une augmentation plus que proportionnelle des

concentrations de cortisol non lié à la CBG, fraction du cortisol pouvant franchir les membranes cellulaires.

Nous avons également mis en évidence une baisse significative de la fraction de cortisol lié à la CBG chez les brebis atteintes de tremblante ; l'implication physiologique de cette diminution n'est pas claire. Plusieurs rapports suggèrent que la CBG liée au cortisol pourrait avoir un autre rôle biologique que le simple transport plasmatique du cortisol, rôle qui n'a pas encore été élucidé (18,30).

Nous avons pu montrer que l'hypercorticisme observé chez les brebis atteintes de tremblante était dû à une altération de la fonction surrénalienne. En effet, le taux de production du cortisol est augmenté d'un facteur 5 chez les brebis atteintes de tremblante sans altération de la clairance du cortisol. D'un point de vue mécanistique, la stimulation de l'activité surrénalienne peut être liée soit, à des altérations spécifiques des systèmes neuronaux impliqués dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, soit à une hyperactivité autonome des glandes surrénales. Une autre étude, réalisée sur les mêmes brebis, a montré que l'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante était associé à une augmentation de la sécrétion d'ACTH (d'un facteur 1.5) et à une diminution de la réponse au test de freinage faible à la dexaméthasone chez certaines brebis (13). Ces résultats sont plus en faveur de la première hypothèse c'est-à-dire d'une atteinte centrale plutôt que surrénalienne. Un état réfractaire total ou partiel au rétrocontrôle du cortisol a été évoqué et 2 mécanismes ont été proposés : 1) une augmentation de sécrétion de l'arginine vasopressine par les neurones magnocellulaires des noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus, ce qui permettrait à l'ACTH d'échapper au rétrocontrôle du cortisol ; et/ou 2) une augmentation des sécrétions de CRF et/ou d'arginine vasopressine par les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire (13).

Le syndrome d'hypercorticisme des brebis atteintes de tremblante soulève la question de la signification et des conséquences physiopathologiques d'une surexposition chronique du système nerveux central au cortisol libre.

Il est généralement admis que seule la fraction de cortisol non lié à la CBG peut traverser la barrière hémato-méningée (16,29). Les concentrations de cortisol non lié à la CBG dans le

plasma sont du même ordre de grandeur que les valeurs de cortisol dans le liquide céphalorachidien (LCR) (23,37) dans les conditions physiologiques. Il a été mis en évidence chez le singe qu'une administration prolongée de cortisol ou d'ACTH dans le sang entraînait une augmentation plus importante des valeurs de cortisol dans le LCR que dans la circulation sanguine, probablement par accumulation du cortisol dans le LCR (23).

Dans la maladie d'Alzheimer, un effet protecteur des glucocorticoïdes a été mis en évidence : par leur action anti-inflammatoire, ils pourraient ralentir l'évolution de la maladie ; en effet, l'activation de mécanismes inflammatoires spécifiques contribuerait à la dégénérescence neuronale (1). Des études récentes, sur un modèle murin de tremblante, ont montré que l'accumulation de PrPsc était liée à la production de cytokines gliales, cytokines qui sembleraient jouer un rôle dans la pathogénie des lésions nerveuses (44). Le caractère inflammatoire des lésions cérébrales pourrait expliquer l'augmentation du temps d'incubation et du temps de survie observée chez des souris infectées expérimentalement par une souche de tremblante et traitées en début d'infection par de fortes doses de corticoïdes (24).

On pourrait émettre alors l'hypothèse selon laquelle l'hypercorticisme mis en évidence chez les brebis atteintes de tremblante aurait pour but de contrecarrer un processus inflammatoire se situant au niveau du SNC. En effet, les glucocorticoïdes seraient des inhibiteurs potentiels de la famille du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, facteur qui serait impliqué dans la réponse du SNC à des stimuli pathogènes aboutissant à la mort neuronale (15).

Le maintien des taux de cortisol plasmatique au-dessus des valeurs usuelles pourraient également exacerber le lent processus dégénératif observé lors de tremblante. En effet, il a été démontré qu'une surexposition chronique aux glucocorticoïdes pouvait avoir des effets délétères sur le cerveau, en particulier des pertes neuronales ont été observées chez le rat au niveau de l'hippocampe où se trouvent de nombreux récepteurs aux glucocorticoïdes (32) et une atrophie de l'hippocampe chez des patients atteints de maladie de Cushing (31). En outre, l'effet plus général d'inhibition du système immunitaire des corticoïdes pourrait expliquer l'absence de réponse immunitaire détectable chez les animaux atteints de tremblante (36).

## **V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Notre étude a confirmé l'hypercortisolémie mise en évidence chez des brebis atteintes de tremblante lors d'une étude précédente. Nous avons montré que cette hypercortisolémie était due à une augmentation du taux de production du cortisol sans altération de la clairance plasmatique. Nous avons également mis en évidence une diminution de la capacité maximale de liaison de la transcortine et une augmentation de la fraction de cortisol non lié à la CBG chez les brebis atteintes de tremblante.

L'exploration de l'altération de la fonction surrénalienne chez les brebis atteintes de tremblante pourrait être poursuivie en évaluant l'intégrité des systèmes neurohormonaux impliqués dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (CRF, AVP ...). Le rôle des corticoides dans le processus physiopathologique de cette maladie pourrait également être analysé : cause ou conséquence ? rôle bénéfique ou délétère ? Dans ce cadre, il serait intéressant de mesurer les concentrations de cortisol dans le liquide céphalorachidien des brebis atteintes de tremblante ; de plus, les conséquences physiopathologiques d'un blocage de la sécrétion de cortisol ou d'une administration prolongée de cortisol sur l'évolution de la maladie pourrait être évaluée.

Développer un test diagnostique ante mortem sensible et spécifique de la tremblante n'est pas une tâche facile. Toutefois, l'exploration des différents systèmes neuroendocriniens perturbés dans les maladies à prions pourrait permettre de « présélectionner » une population d'animaux à risque sur lesquels des tests plus spécifiques (immunohistochimie sur le SNC ou les amygdales par exemple) pourraient être réalisés . Il s'agit d'un enjeu non seulement scientifique mais aussi et surtout de santé publique.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Aisen P.S. & Pasinetti G.M.** Glucocorticoids in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* – 1998 ; **12**, 1-6.
2. **Alexander S.L. & Irvine C.H.G.** The effect of social stress on adrenal axis activity in horses : the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *Journal of Endocrinology* – 1998 ; **157**, 425-432.
3. **Alvinerie M. & Toutain P.L.** Simultaneous determination of corticosterone, hydrocortisone, dexamethasone in dog plasma using high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 1982 ; **71**, 816-818.
4. **Alvinerie M., Houin G. & Toutain P.L.** Prednisolone binding to plasma proteins in domestic species. *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 1988 ; **77**, 937-938.
5. **Baron Th. & Madec J.Y.** L'agent infectieux des encéphalopathies spongiformes et sa transmissibilité. *Le Point Vétérinaire* – 1996 ; **28** (179), 637-644.
6. **Beck E., Daniel P.M. & Parry H.B.** Degeneration of the cerebellar and hypothalamo-neurohypophysial systems in sheep with scrapie and its relationship to human system degenerations. *Brain* – 1964 ; **87**, 153-176.
7. **Carp R.I., Kim Y.S. & Callahan S.M.** Pancreatic lesions and hypoglycemia-hyperinsulinemia in scrapie-infected hamsters. *Journal of Infectious Diseases* – 1990 ; **161**, 462-466.
8. **Dunn J.F., Nisula B.C. & Rodbard D.** Transport of steroid hormones : binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* – 1981 ; **53**, 58-68.



9. **Feldman D., Mondon C.E., Horner J.A. & Weiser J.N.** Glucocorticoid and estrogen regulation of corticosteroid-binding globulin production by rat liver. *American Journal of Physiology* – 1979 ; **237**, E493-E499.
10. **Fleshner M., Deak T., Spencer R.L., Laudenslager M.L., Watkins L.R. & Maier S.F.** A long term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* – 1995 ; **136**, 5336-5342.
11. **Fulkerson W.J. & Jamieson P.A.** Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic ACTH or imposition of various stressor agents. *Australian Journal of Biological Sciences* – 1982 ; **35**, 215-222.
12. **Gayrard V., Alvinerie M. & Toutain P.L.** Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domestic Animal Endocrinology* – 1996 ; **13**, 35-45.
13. **Gayrard V., Picard-Hagen N., Grino M., Sauze N., Grandjean C., Galea J., Andreoletti O., Schelcher F. & Toutain P.L.** Major hypercorticism is an endocrine feature of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology* – 2000 ; **141**, 988-994.
14. **Gomez Brunet A. & Lopez Sebastian A.** Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant , non-pregnant and lactating ewes. *Animal Reproduction Science* – 1991 ; **26**, 251-268.
15. **Grilli M. & Memo M.** Nuclear factor- $\kappa$ B/Rel proteins a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochemical Pharmacology* – 1999 ; **57**, 1-7.
16. **Hammond G.L.** Molecular properties of corticosteroid-binding globulin and sex-steroid binding proteins. *Endocrine Reviews* – 1990 ; **11**, 65-79.
17. **Hennessy D.P., Coghlan J.P., Hardy K.J., Scoggins B.A. & Wintour E.M.** The origin of cortisol in the blood of fetal sheep. *Journal of Endocrinology* – 1982 ; **95**, 71-79.

18. **Hryb D.J., Kahn M.S., Romas N.A. & Rosner W.** Specific binding of human corticosteroid-binding globulin to cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* – 1986 ; **83**, 3253-3256.
19. **Jenny M. & Vallotton M.** Le cortex surrénalien in Meyer P., *Physiologie humaine*, Paris, Flammarion Médecine-sciences – 1977 ; 330-342.
20. **Kim Y.S., Carp R.I., Callahan S.M. & Wisniewski H.M.** Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* – 1988 ; **189**, 21-27.
21. **Koeppe P. & Hamann C.** A program for non-linear regression analysis to be used on desk-top computers. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* – 1980 ; **12**, 121-128.
22. **Madec J.Y. & Baron T.** De nouveaux tests pour détecter les prions. *Bulletin des GTV* – 2000 ; **6**, 15-18.
23. **Martensz N.D., Herbert J. & Stacey P.M.** Factors regulating levels of cortisol in cerebrospinal fluid of monkeys during acute and chronic hypercortisolemia. *Neuroendocrinology* – 1983 ; **36**, 39-48.
24. **Outram G.W., Dickinson A.G. & Fraser H.** Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration. *Nature* – 1974 ; **249**, 855-856.
25. **Paterson J.Y.F. & Harrison F.A.** The specific activity of plasma cortisol in sheep during continuous infusion of [1,2-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>] cortisol, and its relation to the rate of cortisol secretion. *Journal of Endocrinology* – 1967 ; **37**, 269-277.
26. **Picard-Hagen N., Gayrard V., Alvinerie M., Laroute V., Touron C., Andréoletti O. & Toutain P.L.** Naturally occurring scrapie is associated with a lower CBG binding capacity in ewes. *Journal of Endocrinology* – 2000 ; **165**, 527-532.

27. **Prusiner S.B.** Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* – 1998 ; **95**, 13363-13383.
28. **Reichlin S.** Neuroendocrinology in Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M. & Larsen P.R., Williams textbook of Endocrinology 9<sup>ième</sup> édition, Philadelphia, Saunders – 1998 ; 206-208.
29. **Rosner W.** The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin : recent advances. *Endocrine Reviews* – 1990 ; **11**, 80-91.
30. **Rosner W.** Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* – 1991 ; **20**, 697-720.
31. **Sapolski R.M.** Why stress is bad for your brain. *Science* – 1996 ; **273**, 749-750.
32. **Sapolsky R.M., Krey L.C. & McEwen B.S.** Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number : implications for aging. *Journal of Neuroscience* – 1985 ; **5**, 1221-1227.
33. **Schelcher F., Andréoletti O. & Cabanié P.** La tremblante des ovins. *Le Point Vétérinaire* – 1996 ; **28** (179), 661-666.
34. **Schelcher F., Picard-Hagen N., Laroute V., Gayrard V., Popot M.A., Andréoletti O. & Toutain P.L.** Corticoid concentrations are increased in the plasma and urine of naturally occurring scrapie in ewe. *Endocrinology* – 1999 ; **140**, 2422-2425.
35. **Schlechte J.A. & Hamilton D.** The effect of glucocorticoids on corticosteroid binding globulin. *Clinical Endocrinology* – 1987 ; **27**, 197-203.
36. **Schreuder B.E.C.** Animal spongiform encephalopathies – an update part I. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies. *The Veterinary Quarterly* – 1994 ; **16**, 174-181.

37. **Schwarz S. & Pohl P.** Steroid hormones and steroid hormone binding globulins in cerebrospinal fluid studied in individuals with intact and with disturbed blood-cerebrospinal fluid barrier. *Neuroendocrinology* – 1992 ; **55**, 174-182.
38. **Siiteri P.K., Murai J.T., Hammond G.L., Nisker J.A., Raymoure W.J. & Kuhn R.W.** The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research* – 1982 ; **38**, 457-510.
39. **Smeyers H.** Développement et validation d'une méthode de mesure du taux de production du cortisol par évaluation de la clairance libre du cortisol, chez la brebis. Thèse Pharm. Toulouse – 1999 ; 99/TOU3/2075.
40. **Smith C.L. & Hammond G.L.** Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology* – 1992 ; **130**, 2245-2251.
41. **Soding P., Coghlan J.P., Denton D.A., Graham W.F., Humphery T.J. & Scoggins B.A.** The effect of ACTH on the blood clearance rate of aldosterone, cortisol, 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the sheep. *Journal of Steroid Biochemistry* – 1983 ; **18**, 173-177.
42. **Thompson K., Coleman E.S., Hudmon A., Kempainen R.J., Soyoola E.O. & Sartin J.L.** Effects of short-term cortisol infusion on growth hormone-releasing hormone stimulation of growth hormone release in sheep. *American Journal of Veterinary Research* – 1995 ; **56**, 1228-1231.
43. **Westphal U.** Corticosteroid-binding globulin (CBG) of man and other species in Gross F., Labhart A., Mann T., Samuels L.T. & Zander J., Steroid-Protein Interactions, New York, Springer-Verlag – 1971, 164-355.
44. **Williams A., Van Dam A.M., Ritchie D., Eikelenboom P. & Fraser H.** Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Research* – 1997 ; **754**, 171-180.

45. **Yamaoka K., Tanigawara K., Nakagawa T. & Uno T.** A pharmacokinetic analysis program (Multi) for microcomputer. *Journal of Pharmacobiodynamics* – 1981 ; **4**, 879-889.

46. **Ye X. & Carp R.I.** Histopathological changes in the pituitary glands of female hamsters infected with the 139H strain of scrapie. *Journal of Comparative Pathology* – 1996 ; **114**, 291-304.

# **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

## **Figures**

- Figure 1 : Les différentes techniques utilisables pour le diagnostic de l'ESB p7
- Figure 2 : Schéma de la fonction hypothalamo-hypophyso-surrénalienne et ses relations avec le système immunitaire p11
- Figure 3 : Les trois formes de cortisol dans la circulation sanguine p14
- Figure 4 : Le modèle bicompartimental p26
- Figure 5 : Pourcentage de cortisol lié aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations de cortisol total p40
- Figure 6 : Concentrations de cortisol libre, lié à l'albumine, lié à la CBG et non lié à la CBG p41
- Figure 7 : Variations nyctémérales des concentrations plasmatiques individuelles et moyennes de cortisol total et de cortisol non lié à la CBG p42

## **Tableaux**

- Tableau 1 : Concentrations plasmatiques de cortisol,  $20\beta$ -dihydrocortisol et cortisone chez 8 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante p35
- Tableau 2 : Paramètres de fixation du cortisol aux protéines plasmatiques chez 9 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante (période 1) et chez 6 brebis saines et 6 brebis atteintes de tremblante (période 2) p36

Tableau 3 : Concentrations plasmatiques de cortisol libre, lié à l'albumine et lié à la CBG chez 9 brebis saines et 13 brebis atteintes de tremblante lors de la première session de prélèvements p37

Tableau 4 : Paramètres de liaison à la CBG et paramètres pharmacocinétiques décrivant la disposition du cortisol après une administration intraveineuse de cortisol chez 6 brebis saines et 8 brebis atteintes de tremblante p38

Tableau 5 : Paramètres de liaison du cortisol à la CBG (expérience 1 et 2) p39

Toulouse, 2001

NOM : **TOURON**

PRENOM : **Carole**

TITRE : **Mise en évidence d'un syndrome d'hypercorticisme majeur chez la brebis atteinte de tremblante**

RESUME :

Une étude récente réalisée en laboratoire a mis en évidence un syndrome d'hypercortisolémie chez les brebis atteintes de tremblante.

L'objectif de notre travail était d'analyser les mécanismes responsables de l'augmentation des concentrations plasmatiques de cortisol : augmentation du taux de production et/ou diminution de la clairance plasmatique du cortisol. Dans ce cadre, nous avons comparé la disposition du cortisol et ses paramètres pharmacocinétiques chez 9 brebis saines et 13 brebis atteintes tremblante.

Il a été mis en évidence une augmentation d'un facteur 5 du taux de production du cortisol chez les brebis atteintes de tremblante sans modification de la clairance plasmatique, et une diminution d'un facteur 2 de la capacité maximale de liaison de la transcortine au cortisol.

Ce syndrome d'hypercorticisme pourrait avoir des conséquences physiopathologiques, les corticoides étant impliqués dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

MOTS-CLES : TREMBLANTE – BREBIS – CORTISOL – TRANSCORTINE – TAUX DE PRODUCTION – CLAIRANCE PLASMATIQUE

---

ENGLISH TITLE : Major hypercorticism in ewe with naturally occurring scrapie

ABSTRACT :

In a recent study, it was demonstrated that naturally scrapie-affected ewes presented a syndrome of hypercortisolism.

The goal of our study was to investigate the mechanisms by which scrapie-affected ewes maintained high plasma cortisol levels : increase in hormone production rate and/or decrease in cortisol plasma clearance. Thus, we compared the disposition of cortisol and its pharmacokinetic parameters in 9 healthy and 13 scrapie affected ewes.

We demonstrated that cortisol production rate was increased by a factor of 5 while cortisol plasma clearance remained unmodified, and transcortin binding maximal capacity was 2 times lower in scrapie affected ewes than in healthy ones.

This syndrome of hypercorticism could have physiopathological consequences because corticoids are involved in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease.

KEY WORDS : SCRAPIE – EWE – CORTISOL – TRANSCORTIN – PRODUCTION RATE – PLASMA CLEARANCE