

---

# HYPERCORTISOLEMIE MAJEURE CHEZ LA BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE : APPLICATION A LA RECHERCHE DE MARQUEURS DE LA 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*

**Christophe, Jean-Philippe GRANDJEAN**  
Né, le 25 avril 1973 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

---

**Directeur de thèse : Mme le Docteur Nicole HAGEN-PICARD**

---

**JURY**

PRESIDENT :  
**M. Jean-PARINAUD**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**Mme Nicole HAGEN-PICARD**  
**Mlle Véronique GAYRARD**

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



MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... : M. **P. BENARD**  
Directeurs honoraires..... : MM. **R. FLORIO**  
**R. LAUTIE**  
**J. FERNEY**  
**G. VAN HAVERBEKE**  
Professeurs honoraires..... : MM. **A. BRIZARD**  
**L. FALIU**  
**C. LABIE**  
**C. PAVAU**  
**F. LESCURE**  
**A. RICO**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

Mme **BURGAT-SACAZE Viviane**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** *Pathologie chirurgicale*  
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BENARD Patrick**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*  
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **GRIESS Daniel**, *Alimentation*  
M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootchnie*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

## **A NOTRE PRESIDENT DE THESE :**

### **Monsieur le Professeur PARINAUD**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Biologie du Développement et de la Reproduction

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
qu'il soit assuré de notre reconnaissance.

## **A NOTRE JURY DE THESE :**

### **Madame le Docteur HAGEN-PICARD**

Maître de Conférences à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction

Qui nous a proposé ce sujet de thèse, et nous a fait confiance dès le début,  
Qui nous a initié aux rudes nuits de prélèvements,  
Qu'elle trouve ici l'expression notre reconnaissance et notre fidèle dévouement.

### **Madame le Docteur GAYRARD-TROY,**

Maître de conférences à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Qui nous a accordé sa confiance, et nous a fait vivre la nuit grâce à la mélatonine,  
Qui nous impressionne par son courage et sa gentillesse,  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude et de notre admiration.



## **A NOS MAITRES**

**Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN,**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

Qui nous a initié à la recherche en nous accueillant dans son laboratoire,

et nous a honoré de sa confiance,

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude,

**Monsieur le Professeur François SCHELCHER**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour

Qui nous a communiqué sa passion pour les ruminants,

Et appris l'art du diagnostic,

Qu'il soit assuré de notre sincère reconnaissance.



A ma tendre femme, Jessie,

A mes parents, Bernard et Hélène,  
Qui m'ont toujours montré l'exemple,  
Qui m'ont appris les valeurs travail et honnêteté,  
Qui vont un jour arrêter de fumer.

A Sophie et Frédéric.

A mes grand-mères Mamie Minou et Mamie Titin,  
Qui me manquent profondément.

A ma famille et à Jolie Maman.

A mes deux petits noirs, Drakkard et Nebraska.

Merci Maman, pour ta patience, ta disponibilité, tes compétences informatiques et linguistiques.



## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
<b>I - MATERIELS ET METHODES COMMUNS AUX DIFFERENTES EXPERIENCES</b>	<b>29</b>
<b>I – 1. PRELEVEMENTS D’URINE.....</b>	<b>31</b>
<b>I – 2. DOSAGE DES CORTICOÏDES PLASMATIQUES ET URINAIRES.....</b>	<b>31</b>
<b>I – 3. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHIMIE.....</b>	<b>32</b>
<b>II - REALISATIONS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>35</b>
<b>II – 1. HYPERCORTISOLEMIE MAJEURE CHEZ LES BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE .....</b>	<b>37</b>
<b>II – 1 – 1. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
a) Animaux.....	37
b) Protocole expérimental.....	38
c) Prélèvements sanguins.....	38
d) Analyse des résultats.....	39
<b>II – 1 – 2. RESULTATS .....</b>	<b>39</b>
a) Concentrations plasmatiques en corticoïdes.....	39
b) Concentrations urinaires en corticoïdes (figure 6).....	42
c) Histologie.....	44
<b>II – 1 – 3. DISCUSSION.....</b>	<b>45</b>
<b>II – 2. MISE AU POINT ET EVALUATION D’UN TEST DIAGNOSTIQUE BASE SUR LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUE ET URINAIRE DU 20 β-DIHYDROCORTISOL .....</b>	<b>50</b>
<b>II – 2 – 1. VALEUR DISCRIMINANTE DES CORTICOÏDES URINAIRES ET PLASMATIQUES : ETUDE DE POPULATION.....</b>	<b>50</b>
a) Matériels et méthodes.....	53
b) Analyses statistiques .....	60
c) Résultats .....	60
d) Discussion .....	65

II – 2 – 2. EXPLORATION DE LA FONCTION CORTICOTROPE DE LA BREBIS A GENOTYPE SENSIBLE A LA TREMBLANTE PENDANT LES PHASES PRECLINIQUE ET CLINIQUE DE LA MALADIE .....	68
a) Matériels et méthodes .....	68
b) Résultats .....	70
c) Conclusion.....	74
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>79</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>89</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**11 $\beta$ -HSD** : *11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase*, enzyme catalysant la conversion du cortisol en cortisone et vice-versa.

**20 $\beta$ -DIHYDROCORTISOL** : 20 $\beta$ -DHF en nomenclature, 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ , 21-tétrahydroxy-4-prègnène-3-one.

**ACTH** : *Adrenocorticotropic Hormone* ou hormone corticotrope, libérée par l'antéhypophyse.

**ARQ, ARR, ARH, AHQ, VRQ** : allèles identifiés comme intervenant dans la sensibilité génétique de la tremblante.

**ATNC** : *Agent Transmissible Non Conventionnel*.

**AVP** : *Arginine VasoPressine*.

**CBG** : *Corticosteroid Binding Globulin* ou transcortine, transporteur spécifique du cortisol dans le sang.

**CORTISOL** : F en nomenclature, 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-trihydroxy-4-prègnène-3, 20-dione.

**CORTISONE** : E en nomenclature, 17 $\alpha$ , 21-dihydroxy-4-prègnène-3, 11,20-trione.

**CRF** : *Corticotropin Releasing Factor* ou corticolibérine, libéré par l'hypothalamus, facteur stimulant la libération d'hormone corticotrope.

**ESST** : *Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles*.

**HPLC** : *Hight Performance Liquid Chromatography*, chromatographie haute performance en phase liquide.

**IHC** : *ImmunoHistoChimie*.

**Prn-p** : gène qui code la protéine prion cellulaire.

**PrPc** : protéine prion cellulaire (normale).

**PrPres ou PrPsc** : protéine prion résistante à la protéinase K.

**SAF** : *Scrapie Associated Fibrils*, agrégat de PrPsc mis en évidence par microscopie électronique .



## LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 :** Schéma métabolique du cortisol avec ses trois dérivés 20-dihydrogénés d'après GAILLY (p 26).
- Figure 2 :** Principales étapes de l'analyse histologique conventionnelle (p 32).
- Figure 3 :** Principales étapes de l'immunohistochimie (p 34).
- Figure 4 :** Variations nyctémérales des concentrations plasmatiques en corticoïdes (moyenne  $\pm$  écart-type, ng/mL) chez les brebis tremblantes (n=6) et les brebis témoins (n=5) (p 40).
- Figure 5 :** Concentrations moyennes globales plasmatiques en corticoïdes (moyenne  $\pm$  écart-type) observées sur 24 heures sur des brebis en phase clinique de tremblante (aire noire) et sur des brebis témoins (aire blanche) (p 41).
- Figure 6 :** Concentrations urinaires (moyenne  $\pm$  écart-type) en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone) chez les brebis saines (n = 7) et atteintes de tremblante (n = 7). Chaque histogramme représente la valeur obtenue pour une brebis (p 43).
- Figure 7 :** Répartition des ovins selon l'année de prélèvement (p 53).
- Figure 8 :** Répartition des ovins selon leur race (p 53).
- Figure 9 :** Répartition des ovins selon leur sexe et leur stade physiologique (p 55).
- Figure 10 :** Répartition des ovins selon leur âge (p 55).
- Figure 11 :** Répartition des ovins selon leur génotype (p 56).
- Figure 12 :** Répartition des ovins selon l'intensité du stress au cours du prélèvement sanguin (p 56).
- Figure 13 :** Répartition des ovins selon les mois de prélèvement (p 56).
- Figure 14 :** Répartition des ovins selon l'heure de prélèvement (p 57).
- Figure 15 :** Répartition des ovins selon la durée de leur période d'habituation (p 57).
- Figure 16 :** Répartition des ovins selon la durée du délai prélèvement-mort (p 58).
- Figure 17 :** Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques (moyenne  $\pm$  SD) en 20 $\beta$ -dihydrocortisol des brebis à génotype résistant à la tremblante (brebis témoins) au cours de la première année de l'étude expérimentale (p 73).
- Figure 18 :** Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques individuelles de 20 $\beta$ -dihydrocortisol chez les brebis sensibles à la tremblante et ayant développé la maladie au cours de la période fév-97 - fév-99. Les courbes interrompues correspondent à des animaux morts en cours de suivi. La courbe grise plus épaisse représente la moyenne des concentrations en 20 $\beta$ -dihydrocortisol de 8 brebis à génotype résistants (voir figure 17) (p 73).
- Photo 1 :** Brebis Romanov en phase clinique de tremblante ; à noter les traces de dépilations, signes du prurit intense, et la cachexie (p 22).
- Photo 2 :** Brebis Manech Tête Rousse en phase clinique de tremblante (p22).
- Photo 3 :** Matériel de prélèvement urinaire comprenant la sonde de Foley, la seringue de 50 mL et les pots à congélation (p 31).
- Photo 4 :** Vue microscopique (grossissement 400 fois) de la vacuolisation des neurones (flèches) (p 44).
- Photo 5 :** Vue microscopique (grossissement 1000 fois) du dépôt de PrPres en immunohistochimie (flèche) (p 44).

**Photo 6 :** Vue microscopique (grossissement 40 fois) de l'hypertrophie de la zone fasciculée de la cortico-surrénale (délimitée par les 2 flèches) (p 45).

**Photo 7 :** Vue macroscopique (a) et coupe sagittale (b) de 2 glandes surrénales : à droite, glande surrénale pesant 1,84 g d'une brebis saine (41 kg) et à gauche, glande surrénale pesant 2,92 g d'une brebis atteinte de tremblante (27,5 kg) (p 47).

**Photo 8 :** Matériel nécessaire à la ponction veineuse comprenant porte-tube, aiguille et tubes héparinés (p 59).

**Tableau 1 :** Description des brebis incluses dans le protocole expérimental (p 37).

**Tableau 2 :** Paramètres d'évaluation de la valeur d'un test diagnostique (p 51).

**Tableau 3 :** Description de la population étudiée (p 54).

**Tableau 4 :** Age et poids des ovins selon leur statut physiologique (moyenne  $\pm$  écart-type) (p 61).

**Tableau 5 :** Concentrations plasmatiques en corticostéroïdes (ng/mL) des moutons selon leur statut pathologique (moyenne  $\pm$  écart-type et rang) (p 61).

**Tableau 6 :** Concentrations urinaires en corticostéroïdes, créatinine (ng/mL) et densité urinaire chez les ovins selon leur statut pathologique (moyenne  $\pm$  écart-type et rang) (p 62).

**Tableau 7 :** Classification des moutons sains et des moutons atteints de tremblante selon plusieurs combinaisons de variables prédictives (p 63).

**Tableau 8 :** Classification des ovins prélevés 30 jours avant leur mort selon plusieurs combinaisons de variables prédictives (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone plasmatiques, créatinine urinaire, et intensité de stress) (p64).

**Tableau 9 :** Répartition des brebis du troupeau expérimental en fonction du polymorphisme aux codons 136, 154 et 171 du gène Prn-p et des caractères correspondants de sensibilité/résistance à la tremblante (p 69).

**Tableau 10 :** Répartition des brebis du troupeau expérimental en fonction de leur génotype et de leur année de naissance (p 69).

**Tableau 11 :** Répartition des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie parmi les brebis mortes au cours de l'étude en fonction de leur génotype et de leur année de naissance (p 70).

**Tableau 12 :** Répartition des brebis mortes au cours de l'étude en fonction de l'établissement ou non du diagnostic positif ou négatif de tremblante selon leur génotype (p 71).

**Tableau 13 :** Répartition des brebis mortes au cours de l'étude en fonction de la nature des troubles cliniques et de l'établissement ou non du diagnostic positif ou négatif de tremblante (p 72).

**Tableau 14 :** Classification et nomenclature des acides aminés (p 91).

**Tableau 15 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes (p 92).

**Tableau 16 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de cortisol (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes (p 93).

**Tableau 17 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de cortisone (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes (**p 94**).

**Tableau 18 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de 20 $\beta$ -dihydrocortisol (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes (**p 95**).

**Tableau 19 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de cortisol (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes (**p 96**).

**Tableau 20 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de cortisone (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines aux mêmes périodes (**p 97**).



## **INTRODUCTION**



Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles(ESST) sont des maladies neuro-dégénératives caractérisées par une longue période d'incubation, et qui aboutissent fatalement à la mort [PRUSINER, S., 1998]. Les plus connues sont le Kuru, la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheiker et l'insomnie fatale familiale chez l'homme, l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins et la tremblante chez les petits ruminants [DORMONT, D., 1994]. Ces pathologies constituent un enjeu scientifique et économique important. En effet, l'émergence de contaminations humaines, d'origine très probablement animale, pose un réel problème de santé publique. Il faut, en effet, arriver à soustraire de la consommation humaine les animaux atteints d'ESST. De plus, la mise en cause des tissus animaux (viande) entraîne une restructuration profonde des filières de productions animales [BARALON, P., *et al.*, 1996 ; BARALON, P., *et al.*, 2000].

Le Laboratoire de Physiologie et Toxicologie expérimentales de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse a entrepris dès 1996 des investigations sur les sécrétions neuroendocriniennes des brebis atteintes de tremblante, avec pour objectif la recherche d'un marqueur en vue du diagnostic des maladies à prions.

C'est dans ce cadre que j'ai réalisé ma thèse expérimentale sur l'hypercortisolémie chez la brebis atteinte de tremblante et son application à la recherche de marqueurs de cette maladie.

Dans une première partie introductive, je présenterai la tremblante du mouton et les troubles endocriniens dans les maladies à prions, avant de présenter la partie expérimentale.

Ces maladies neurodégénératives rares seraient dues à un agent transmissible non conventionnel (ATNC), constitué d'une glycoprotéine normalement produite par l'hôte, la PrPc. Sous sa forme infectieuse, la protéine devient résistante à la protéinase K, présente une conformation anormale et est capable d'induire des changements conformationnels de la protéine normale, la rendant pathologique [PRUSINER, S., *et al.*, 1998].

La tremblante est une maladie neurodégénérative transmissible qui affecte le système nerveux central des ovins et des caprins. C'est une maladie décrite et connue chez le mouton depuis plus de 200 ans [PATTISON, I., 1988]. La transmissibilité a été démontrée par Cuillé et Chelle, en 1936, lors d'injections intraoculaires de broyats de cerveaux de moutons atteints de

tremblante à des moutons sains [CUILLE, J., *et al.*, 1936]. La contamination des ovins se fait par voie orale [HOURRIGAN, J., *et al.*, 1979 ; HADLOW, W., *et al.*, 1982], la porte d'entrée du prion se situerait au niveau des plaques de Peyer [HEGGEBO, R., *et al.*, 2000].

Comme toutes les ESST, la tremblante est caractérisée par une longue période d'incubation (plusieurs mois à plusieurs années) suivie d'une phase clinique brève (2 à 6 mois) dont l'issue est toujours fatale. Les animaux atteints ont classiquement entre 2 et 5 ans ; cliniquement, les symptômes observés sont du prurit, des modifications de comportement, des tremblements et de l'ataxie [DETWILER, L., 1992 ; SCHELCHER, F., *et al.*, 1996].



**Photo 1:** Brebis Romanov en phase clinique de tremblante ; à noter les traces de dépilations, signes du prurit intense, et la cachexie.



**Photo 2:** Brebis Manech Tête Rousse en phase clinique de tremblante.

Le prurit, présent au début, est localisé le plus souvent en région dorso-lombaire et moins fréquemment sur la tête et sur les membres (photo 1). Les modifications du comportement sont des prodromes fréquents: la brebis devient le plus souvent craintive mais peut aussi adopter un comportement d'hyperagressivité. Les tremblements surtout céphaliques, sont visibles après quelques semaines d'évolution. Enfin, l'ataxie qui apparaît plus tardivement, se caractérise d'abord par une démarche hésitante, puis trébuchante (photo 2). En fin d'évolution, la cachexie est marquée, le relevé est difficile, le décubitus est fréquent puis constant.

Parallèlement à ces troubles fréquents, existent des tableaux cliniques plus rarement observés mais qui posent de réelles difficultés pour le diagnostic différentiel. Il s'agit en particulier d'une parésie postérieure isolée, c'est à dire sans prurit, suivie d'une paraplégie d'évolution relativement rapide (10 à 15 jours).

La sensibilité d'un ovin à la tremblante a un support génétique [ELSEN, J., *et al.*, 1996], elle apparaît très fortement contrôlée par le gène Prn-p qui code pour la protéine PrPc (glycoprotéine membranaire neuronale codée par l'hôte). Chez les ovins, une dizaine de polymorphismes de Prn-p sont connus, avec des informations plus détaillées sur trois codons. De l'ensemble des combinaisons possibles pour les trois codons (2x2x3), seules cinq sont observées. Il est vraisemblable que l'allèle ARQ (A = Alanine en 136, R = Arginine en 154, Q = Glutamine en 171) soit l'allèle ancestral dont sont dérivés, chacun par une seule mutation, les allèles ARR, ARH, AHQ, et VRQ. Les différents codons correspondants aux acides aminés et la nomenclature des acides aminés sont répertoriés en annexe (tableau 14 page 91). Les trois codons qui ont une action sur la sensibilité de l'animal à la tremblante sont :

- le codon 136 où deux allèles sont possibles : Alanine (A) ou Valine (V). L'allèle Valine est associé à la sensibilité à la tremblante dans de nombreuses races où il a été étudié, notamment les races Cheviot, Romanov et Ile-de-France. Les deux allèles semblent agir de façon additive avec une position intermédiaire des hétérozygotes A/V dans la sensibilité à la tremblante. La présence de l'allèle Valine n'est pas nécessaire pour le déclenchement de la maladie.
- le codon 154 où deux allèles Arginine (R) et Histidine (H) coexistent. Il a été démontré en race Romanov que l'allèle H avait un pouvoir protecteur.
- le codon 171 où trois allèles sont possibles Arginine (R), Glutamine (Q) ou Histidine (H). Les deux derniers allèles jouent un rôle déterminant dans la sensibilité à la tremblante, avec

une forte sensibilité des individus homozygotes QQ ou HH ainsi que des hétérozygotes HQ. La résistance conférée par l'allèle Arginine a été observée dans plusieurs races : Lacaune, Texel et Romanov.

En résumé, ce sont les individus homozygotes aux codons 154 et 171 porteurs de l'allèle RQ qui sont très sensibles à la tremblante, les hétérozygotes porteurs sont peu sensibles et les non porteurs semblent protégés.

Comme pour l'ensemble des ESST, il n'existe aucun moyen non-invasif permettant de réaliser un diagnostic précoce, c'est à dire en phase préclinique, de la tremblante. Les approches classiques en matière de diagnostic d'un processus infectieux (mise en évidence de l'agent, réaction immunitaire) sont rendues très difficiles par la mauvaise connaissance des ATNC et par l'absence apparente de réaction immunitaire qui caractérise les pathologies à prions [SCHREUDER, B., 1994 ; SCHREUDER, B., 1994]. Différentes techniques expérimentales comme l'électroencéphalogramme [STRAIN, G., *et al.*, 1986], les mesures voltampérométriques sur l'urine [BANISSI-SABOURDY, C., *et al.*, 1992] ou l'électrophorèse capillaire sur le sang [SCHMERR, M., *et al.*, 1998 ; SCHMERR, M., *et al.*, 1999] ont été proposées, mais elles présentent toutes des limites (mise en œuvre lourde, résultats encore incertains) ou sont encore au stade expérimental. Le diagnostic formel des sujets infectés est obtenu post-mortem après l'apparition des symptômes et par des moyens invasifs :

- mise en évidence de l'accumulation de PrPres (forme résistante au traitement à la protéinase K de la protéine infectieuse appelée prion, ou PrPsc) dans le système nerveux (immunohistochimie [KIM, H., *et al.*, 2001], Elisa [GRASSI, J., *et al.*, 2000], Western Blotting [MADEC, J.Y., *et al.*, 2000], détection d'agrégats de PrPsc (SAF) en microscopie électronique [STACK, M., *et al.*, 1995 ; CHAPLIN, M., *et al.*, 1998]) ;
- mise en évidence de marqueurs lésionnels comme l'astrocytose ou la vacuolisation neuronale en histologie conventionnelle ;
- démonstration expérimentale de la transmissibilité par inoculation à la souris de broyats de cerveau.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques a permis de discriminer spécifiquement les deux isoformes de PrP, PrPc et PrPres, pour l'encéphalopathie spongiforme bovine et la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme [KORTH, C., *et al.*, 1997] ; cependant, ces anticorps ne sont pas encore utilisés en routine et, lors de marquage anticorps, une étape de prétraitement des tissus est toujours nécessaire pour dénaturer la PrPc afin de ne mettre en

évidence que la PrPsc. Ces anticorps monoclonaux spécifiques ne sont pas encore disponibles pour la mise en évidence de la PrPsc de la tremblante du mouton.

Dans ce contexte, la recherche d'éléments diagnostiques pendant la phase asymptomatique de la maladie est un véritable enjeu à la fois épidémiologique et physiopathologique.

Notre projet de développement d'un test diagnostique de la tremblante a été orienté vers la recherche d'un marqueur fonctionnel précoce de l'infection.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle des altérations précoces du système nerveux central pourraient s'exprimer au travers de perturbations d'une fonction neuroendocrine. Notre approche diagnostique a été basée sur l'identification d'un marqueur plasmatique ou urinaire de la fonction neuroendocrine perturbée. Dans cette optique, nous avons exploré deux grands systèmes neuroendocriniens, les voies photoneuroendocriniennes qui contrôlent la sécrétion de mélatonine et l'axe corticotrope.

Le rythme nyctéméral de sécrétion de mélatonine est contrôlé par un circuit nerveux qui va de la rétine à la glande pinéale via les relais hypothalamiques des noyaux paraventriculaire et supra-chiasmatique et un relai sympathique : le ganglion cervical supérieur [REITER, R., 1980 ; TESSONEAUD, A., *et al.*, 1994]. Différents arguments expérimentaux étaient en faveur d'une altération des sécrétions de mélatonine chez la brebis atteinte de tremblante : (i) la mise en évidence de lésions rétinienne chez des brebis atteintes de tremblante [BARNETT, K., *et al.*, 1971], (ii) l'observation de troubles des rythmes circadiens chez les malades atteints d'une ESST, l'insomnie fatale familiale humaine [PORTALUPPI, F., *et al.*, 1994], ainsi que chez la souris transgénique n'exprimant pas la protéine PrP [TOBLER, I., *et al.*, 1996].

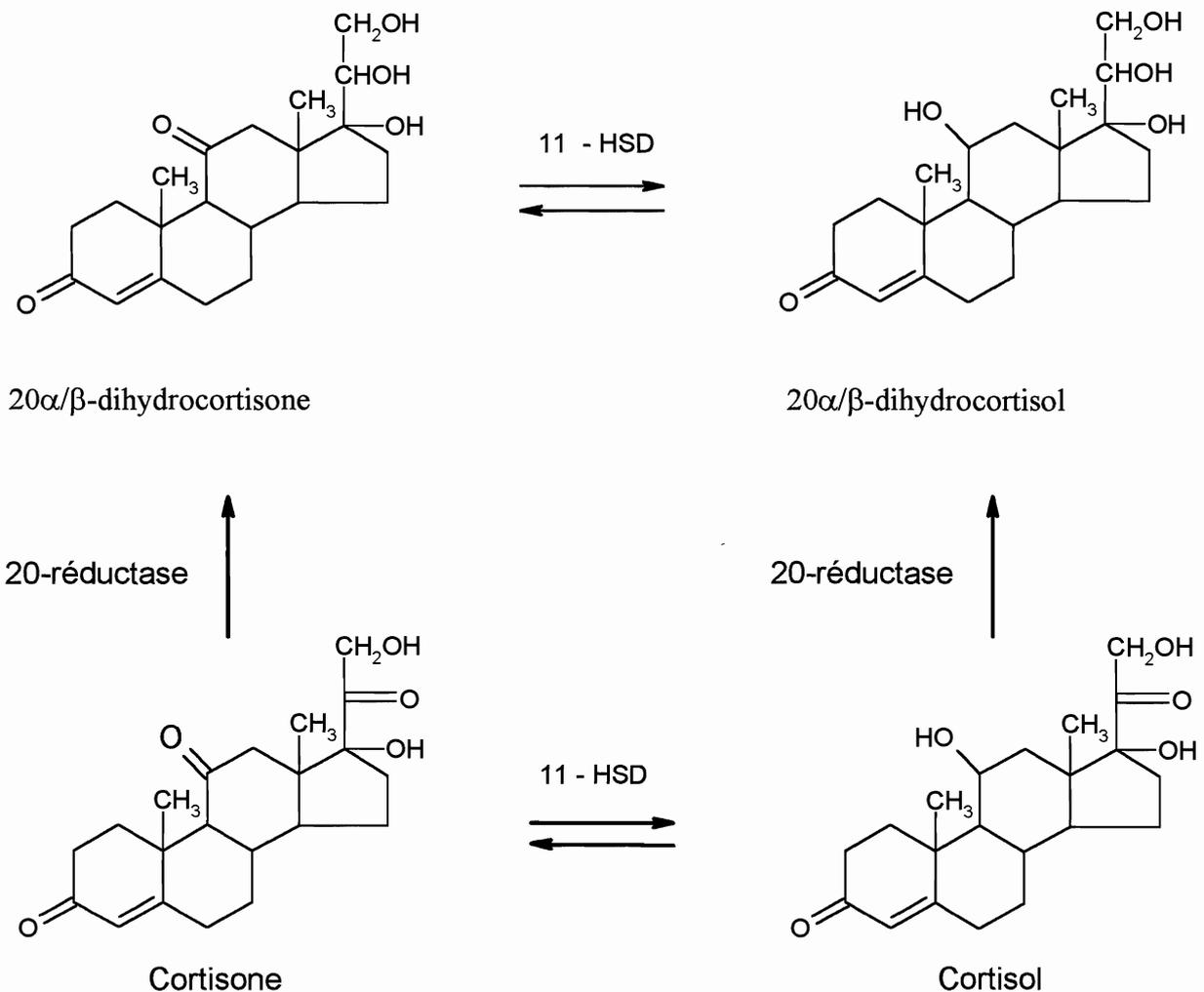
Nous n'avons cependant pas mis en évidence de modification de la sécrétion de mélatonine (rythme nyctéméral ou réponse à un flash lumineux) chez les brebis tremblantes, bien que celles-ci présentent des lésions histologiques prononcées de la glande pinéale [PICARD-HAGEN, N., *et al.*, 1998].

Le deuxième système neuroendocrinien que nous avons exploré chez la brebis atteinte de tremblante est l'axe corticotrope.

La sécrétion de corticoïdes est contrôlée par la libération d'une hormone hypophysaire, l'ACTH (Adrenocorticotropique Hormone). La production d'ACTH est, elle-même, régulée par 2 principaux facteurs hypothalamiques, le CRF (corticotropin-releasing factor) ou corticolibérine, produit par les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire, et l'AVP ou arginine vasopressine qui peut provenir soit des neurones parvocellulaires du noyau

paraventriculaire, comme le CRF, soit des neurones magnocellulaires des noyaux supra-optique et paraventriculaire [WHITHALL, M.H., *et al.*, 1987].

La dégradation du cortisol a principalement lieu dans le foie ; le catabolisme rénal est également très actif chez les ovins [SCHNEIDER, J., *et al.*, 1952]. La dégradation du cortisol est complexe ; 3 principales voies ont été identifiées : (i) une voie majeure, la conversion du cortisol en cortisone, (ii) la saturation du cycle A suivie d'hydrogénations successives, (iii) la réduction des fonctions C6 et/ou C20 [GAILLY, G., 1998]. Cette dernière voie conduit à la formation du 20 $\beta$ -dihydrocortisol par réduction de la fonction cétone portée par le C20, en alcool secondaire (figure 1).



**Figure 1 :** Schéma métabolique du cortisol avec ses trois métabolites : 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone d'après GAILLY (32)

Plusieurs arguments expérimentaux sont en faveur d'une atteinte du système corticotrope chez les brebis atteintes de tremblante naturelle et chez les animaux expérimentalement infectés. Ainsi, chez la brebis atteinte de tremblante [BECK, E., *et al.*, 1964], des modifications histologiques importantes (vacuolisation et mort des cellules nerveuses, gliose et démyélinisation) ont été mises en évidence au niveau du cervelet et du système hypothalamo-hypophysaire, associées à une augmentation de poids des surrénales des brebis. Une deuxième étude, réalisée chez le hamster expérimentalement infecté avec les souches de tremblante 139H et 22CH, a également montré une augmentation du poids corporel en phase pré-clinique de tremblante associée à une hypertrophie des surrénales [CARP, R., *et al.*, 1990]. Plus récemment, une étude immunohistochimique a mis en évidence une augmentation du nombre de neurones hypothalamiques sécréteurs de CRF chez le hamster infecté expérimentalement avec la souche 139H de la tremblante [YE, X., *et al.*, 1994].

Notre première étude, réalisée dans le but de comparer les sécrétions de corticoïdes des brebis saines et des brebis en phase terminale de tremblante, a mis en évidence une hyperstimulation de la fonction corticosurrénalienne des brebis en phase clinique de tremblante.

Une deuxième expérience a été réalisée afin d'évaluer la reproductibilité et l'évolution de l'altération de la fonction corticosurrénalienne au cours de la phase clinique de la maladie.

Cette étude a permis de confirmer l'hyperstimulation de la fonction corticosurrénalienne et de montrer que l'atteinte de l'axe corticotrope est relativement précoce puisqu'elle est détectée dès les premiers stades cliniques de la maladie.

Ces résultats suggèrent fortement que les métabolites sanguins ou urinaires du cortisol pourrait constituer des marqueurs de choix pour un test diagnostique non invasif de la tremblante. Dans le but de mettre au point et d'évaluer un test diagnostique de la tremblante fondé sur la détermination des concentrations plasmatiques et urinaires de ces métabolites, nous avons évalué leur valeur discriminante dans une étude de population (200 brebis) regroupant des brebis saines à différents stades physiologiques, des brebis atteintes de différentes pathologies chroniques incluant des pathologies nerveuses et des brebis en phase clinique de tremblante.

Enfin, l'évolution chronologique des marqueurs plasmatiques et urinaires surrénaux a été déterminée par l'exploration de la fonction corticotrope pendant les phases préclinique et clinique de la maladie.



**I - MATERIELS ET METHODES COMMUNS AUX DIFFERENTES  
EXPERIENCES**



Nous décrivons ici les techniques communes aux différentes expériences.

## I – 1. PRELEVEMENTS D'URINE

Les brebis ont été sondées avec une sonde de Foley charrière 12 siliconée et stérile (RUSCH) (photo 3). Après avoir repéré l'ostium urétral en introduisant un doigt dans le vestibule, l'urètre a été cathétérisé jusqu'à ce que l'urine s'écoule.



**Photo 3:** Matériel de prélèvement urinaire comprenant la sonde de Foley, la seringue de 50 mL et les pots à congélation.

L'urine a été récoltée par aspiration modérée à l'aide d'une seringue de 50 mL. L'urine est répartie dans des pots de prélèvements de 30 mL, le volume des urines obtenues est reportée sur la feuille de prélèvement. Ces pots sont conditionnés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la réalisation des dosages.

## I – 2. DOSAGE DES CORTICOÏDES PLASMATIQUES ET URINAIRES

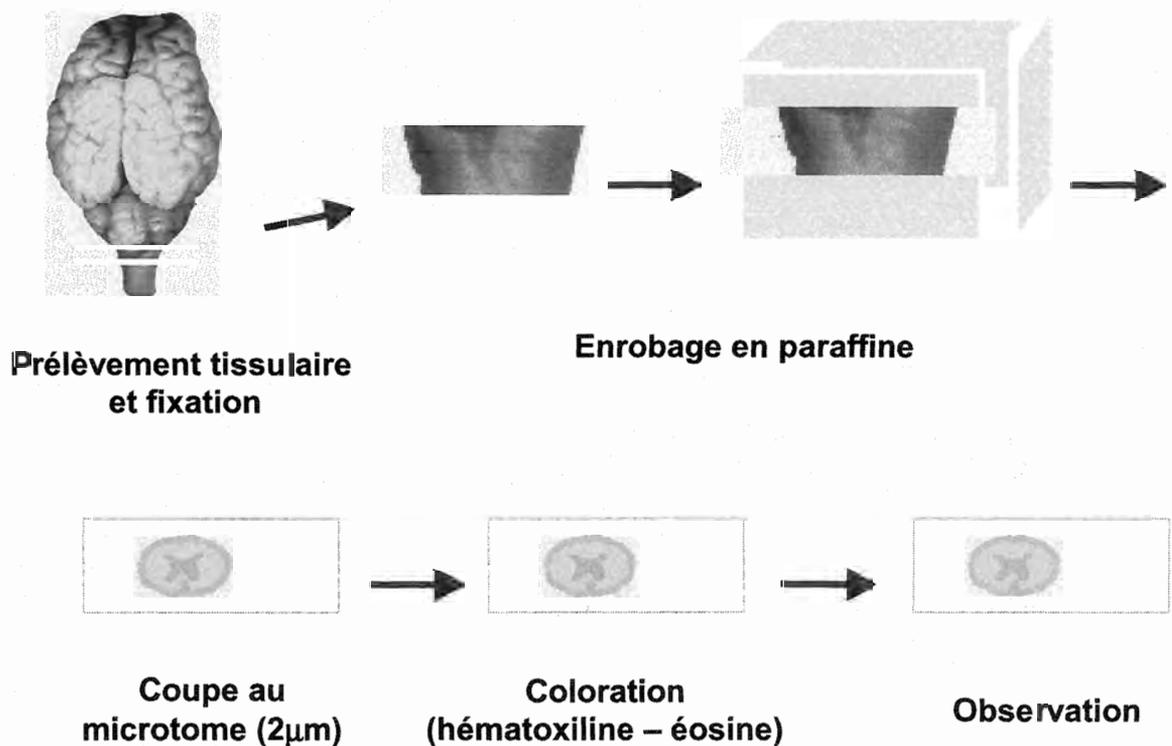
Les concentrations plasmatiques en corticoïdes (cortisol,  $20\beta$ -dihydrocortisol et cortisone) ont été déterminées grâce à un dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) après extraction avec du chlorure de méthylène [ALVINERIE, M., *et al.*, 1982].

La reproductibilité et la répétabilité des dosages avaient des coefficients de variation inférieurs à 15%. L'exactitude était de 89-105% et le coefficient d'extraction a varié entre 75 et 85%. La limite de quantification de la méthode de dosage a été de 2,5 ng/mL.

Les concentrations urinaires en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone) ont été mesurées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. La limite de quantification des corticoïdes a été fixée à 20 ng/mL ; la répétabilité et la reproductibilité avaient des coefficients de variation inférieurs à 10%.

### I – 3. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE

En fin d'évolution de la maladie (pas de relevé spontané), les brebis ont été euthanasiées par une injection intraveineuse de pentobarbital sodique®, (Ceva Santé Animale, Libourne, France – 10 mg/kg) puis saignées. Les tissus prélevés (obex, pons, et surrénales) ont été fixés dans une solution de formol tamponnée à 10% dans du sérum physiologique, en respectant les proportions de 1 volume de tissu pour 10 volumes de fixateur.



**Figure 2 :** Principales étapes de l'analyse histologique conventionnelle.

Après fixation, les échantillons ont subi une déshydratation dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes, puis une clarification (toluène à température ambiante) avant d'être inclus en paraffine. Des coupes de 2 µm d'épaisseur ont été réalisées et étalées sur des lames électrostatiquement chargées, puis séchées à l'étuve à 37°C.

Enfin, pour une analyse histologique conventionnelle, les lames ont été colorées avec la méthode classique hématoxiline-éosine (figure 2).

Si l'examen histologique était douteux, pour confirmer le diagnostic, un marquage *in situ* de la PrPres a été réalisé par immunohistochimie. Les lames sorties de l'étuve ont été déparaffinées dans le toluène puis plongées dans l'acétone avant d'être réhydratées dans un bain d'eau courante.

Afin de ne mettre en évidence que la PrPres, on détruit la PrPc normalement présente en prétraitant les lames dans un bain d'acide formique à température ambiante, suivi d'une trypsination. Cette étape s'achève par un autoclavage à 121°C.

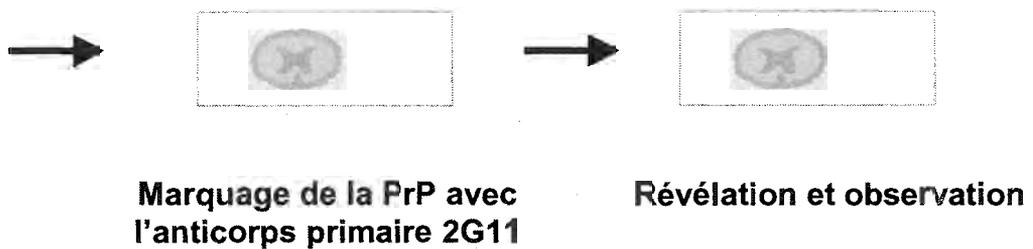
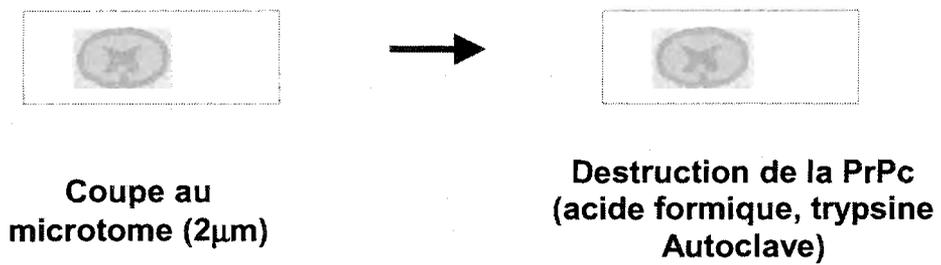
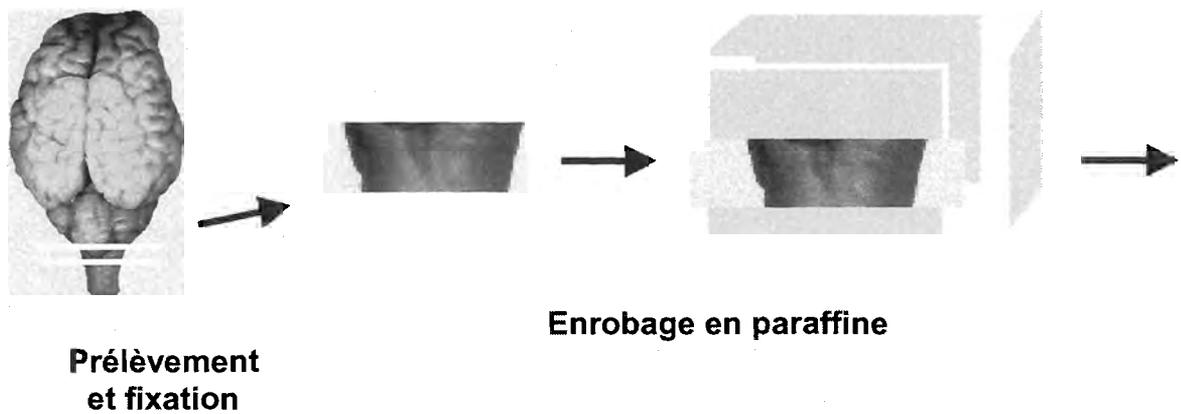
Le marquage de la PrPres a été réalisé en recouvrant les lames d'une solution contenant l'anticorps primaire monoclonal 2G11 [ANDREOLETTI, O., *et al.*, 2000]. Un anticorps secondaire de chèvre biotinylé a ensuite été déposé suivi du complexe streptavidine peroxydase.

La révélation de l'activité peroxydasique a été réalisée par la diaminobenzidine tétra HCl (DAB). Une contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline de Harris pure a été pratiquée. Les lames ont été rincées à l'eau courante afin de bleuir les noyaux.

Pour le montage, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'alcool, puis placées dans un bain de toluène (figure 3).

Les critères d'interprétation du marquage sont :

- le bruit de fond,
- la présence/absence de marquage,
- la distribution topographique du marquage, les types de cellules marquées et la localisation cellulaire,
- l'intensité et les caractères du marquage (granulaire, diffus, etc.),
- et les dégradations tissulaires.



**Figure 3 :** Principales étapes de l'immunohistochimie.

## **II - REALISATIONS EXPERIMENTALES**



## II – 1. HYPERCORTISOLEMIE MAJEURE CHEZ LES BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE

### II – 1 – 1. MATERIELS ET METHODES

#### a) Animaux

Deux séries d'expériences ont été réalisées. La première a été conduite avec 11 brebis de race Romanov : 5 brebis saines et 6 brebis atteintes de tremblante naturelle. Elles ont été maintenues sous une photopériode naturelle. Au cours de la deuxième expérience, 7 brebis saines (5 de race Romanov dont 4 ayant déjà servi pour la première expérience, et 2 de race Lacaune) et 7 brebis atteintes de tremblante (3 de race Romanov et 4 de race Manech Tête Rousse) ont été soumises à une photopériode contrôlée avec une durée d'éclairage de 9 heures par jour (de 08h00 à 17h00). L'âge des brebis saines et malades variait entre 1,5 et 5 ans. La description de la population est récapitulée dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Caractéristiques physiologiques et pathologiques des brebis incluses dans le protocole expérimental.

N° Brebis	Statut	Race	Sexe	Age (an)	Poids (kg)
483	Saine	Lacaune	F	2	65
450	Saine	Lacaune	F	2	64
123	Saine	Romanov	F	5	51
404	Saine	Romanov	F	2	52
226	Saine	Romanov	F	4	49
200	Saine	Romanov	F	4	63
523	Saine	Romanov	F	1	53
205	Tremblante	Manech Tête Rousse	F	4	33
5305	Tremblante	Romanov	F	4	32
466	Tremblante	Manech Tête Rousse	F	2	35
5102	Tremblante	Romanov	F	1	37
501	Tremblante	Manech Tête Rousse	F	1	40
172	Tremblante	Manech Tête Rousse	F	5	42
408	Tremblante	Manech Tête Rousse	F	2	55
5163	Tremblante	Romanov	F	1	33

L'effectif du groupe témoin est resté constant tout au long de l'essai alors que l'effectif du groupe tremblante a diminué au cours du temps en raison des euthanasies des brebis en fin d'évolution de maladie. Les brebis saines ont été incluses sur la base d'une absence de signes cliniques évocateurs de tremblante. Aucune des brebis considérées comme saines au moment des expériences n'a développé des signes cliniques de tremblante dans les 6 mois qui ont suivi les expériences. Le diagnostic de tremblante, basé sur des critères cliniques (comportement anormal, ataxie, tremblements, prurit), a été établi chez les brebis au moins 10 jours avant le début des expériences et confirmé en fin d'essai après euthanasie des brebis et examen histopathologique. Les brebis ont été placées dans des cages individuelles à métabolisme au moins 6 jours avant le début des expériences afin de réaliser une période d'habituation aux conditions expérimentales. Elles ont reçues quotidiennement une ration à base de concentrés et de foin à volonté ; elles avaient libre accès à l'abreuvoir.

## **b) Protocole expérimental**

L'objectif de la première expérience était de comparer le profil nyctéméral des sécrétions de corticoïdes des brebis saines et des brebis en phase terminale de tremblante. Des prélèvements sanguins ont été réalisés simultanément sur l'ensemble des animaux de 11 heures le premier jour à 8 heures le lendemain, à des intervalles de 30 minutes à 3 heures.

La deuxième expérience avait pour but d'examiner le temps d'occurrence du syndrome d'hypercortisolémie des brebis au cours de la phase clinique de tremblante. Les prélèvements de sang ont été réalisés simultanément sur tous les animaux pendant 24 heures au cours de 4 périodes séparées d'au moins 10 jours. Au cours de chacune des périodes, les prélèvements sanguins ont été obtenus toutes les 2 à 4 heures. Les urines ont été prélevées avant et après la deuxième période de prélèvements sanguins de la deuxième série d'expériences.

Les brebis atteintes de tremblante ont été sacrifiées quand elles ont manifesté les signes cliniques d'une évolution irréversible de la maladie (décubitus).

## **c) Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire gauche au moins 2 heures avant le début des prélèvements sanguins. Le sang a été recueilli

sur héparinate de sodium, rapidement centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes puis conservé à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

## **d) Analyse des résultats**

Les moyennes et les écart-types ont été présentés. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel STATGRAPHICS. Une valeur de P inférieure à 0,05 atteste la signification du test. Toutes les valeurs significatives ont été inférieures à 0,01 dans notre étude. Les concentrations de corticoïdes inférieures à la limite de quantification du dosage ont été arbitrairement fixées à 2,5 ng/mL pour le plasma et à 20 ng/mL pour l'urine. Pour l'expérience 1, les concentrations plasmatiques en corticoïdes ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance pour des mesures répétées avec 3 facteurs : l'état pathologique (témoin versus tremblante), l'effet brebis à l'intérieur de chaque groupe, et l'heure du prélèvement. Pour l'expérience 2, les résultats des concentrations plasmatiques et urinaires en corticoïdes ont été analysés grâce à une analyse de variance avec 3 facteurs : l'état pathologique (témoin versus malade), l'effet brebis à l'intérieur de chaque groupe et la période du prélèvement. L'effet du groupe pathologique a été testé en prenant la variance de l'effet brebis comme terme d'erreur.

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne  $\pm$  écart-type (intervalle de variation).

## **II – 1 – 2. RESULTATS**

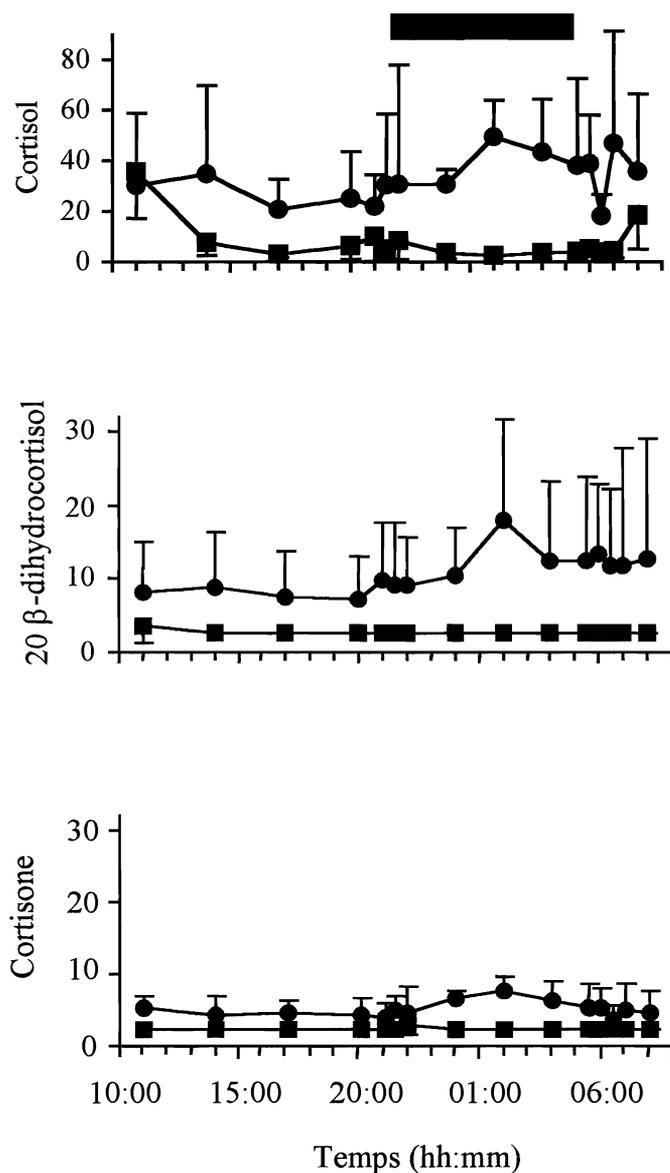
### **a) Concentrations plasmatiques en corticoïdes**

Aucun stress n'a été noté durant les différentes périodes de prélèvements et les brebis atteintes de tremblante ont eu un comportement normal et ont continué à s'alimenter normalement jusqu'à ce qu'elles soient exclues de l'expérience quand elles ont présenté des signes sévères de la maladie.

La figure 4 indique les variations nyctémérales des concentrations moyennes plasmatiques en corticoïdes observées durant la première expérience chez les brebis témoins et atteintes de tremblante. La 20 $\beta$ -dihydrocortisone plasmatique n'a jamais été détectée ni chez les brebis témoins, ni chez les brebis atteintes de tremblante.

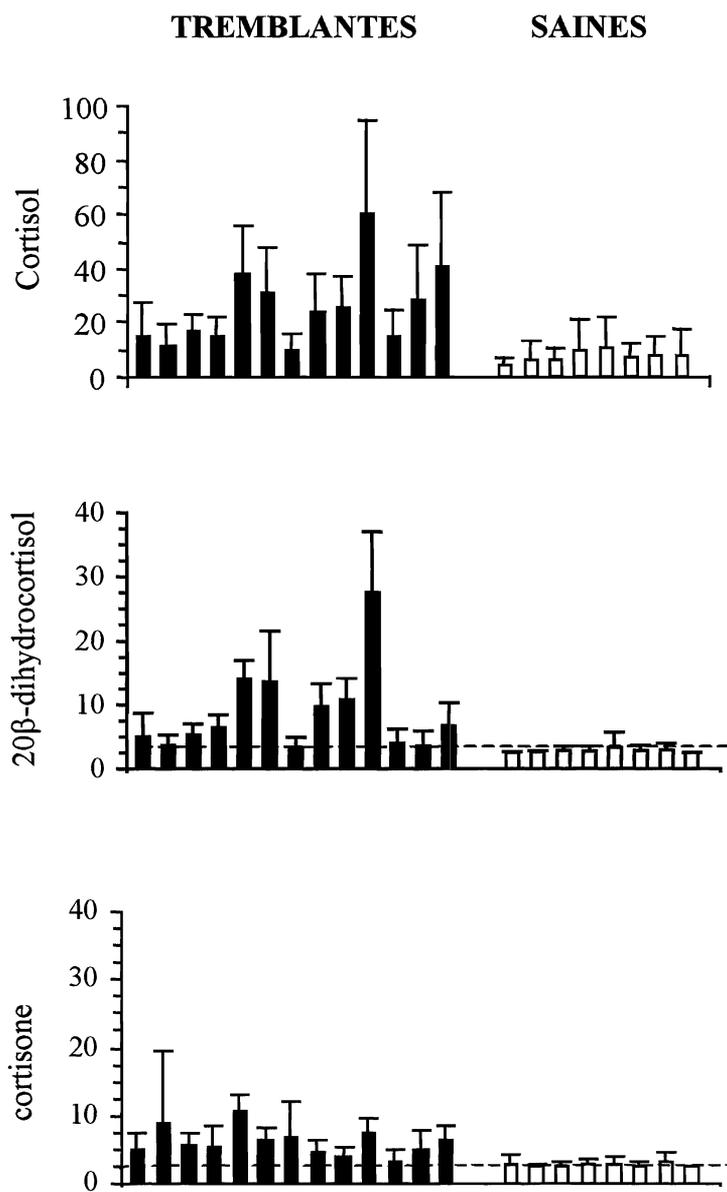
Les concentrations plasmatiques en cortisol dans les 2 groupes d'animaux (témoins et malades), ont montré de fortes variations intra-individuelles reflétant la pulsativité de la

sécrétion du cortisol. Par contre, les concentrations plasmatiques moyennes en 20 $\beta$ -dihydrocortisol et en cortisone ont montré beaucoup moins de fluctuations, et sont très proches de la limite de quantification du dosage chez les brebis témoins.



**Figure 4 :** Variations nyctémérales des concentrations plasmatiques en corticoïdes (moyenne  $\pm$  écart-type, ng/mL) chez les brebis atteintes de tremblantes (● ; n=6) et les brebis témoins (■ ; n=5). La période obscure du nyctémère est représentée par la barre noire.

Les concentrations plasmatiques en corticoïdes des brebis atteintes de tremblante sont significativement supérieures à celles des brebis saines, à l'exception de la concentration en cortisol du premier prélèvement.



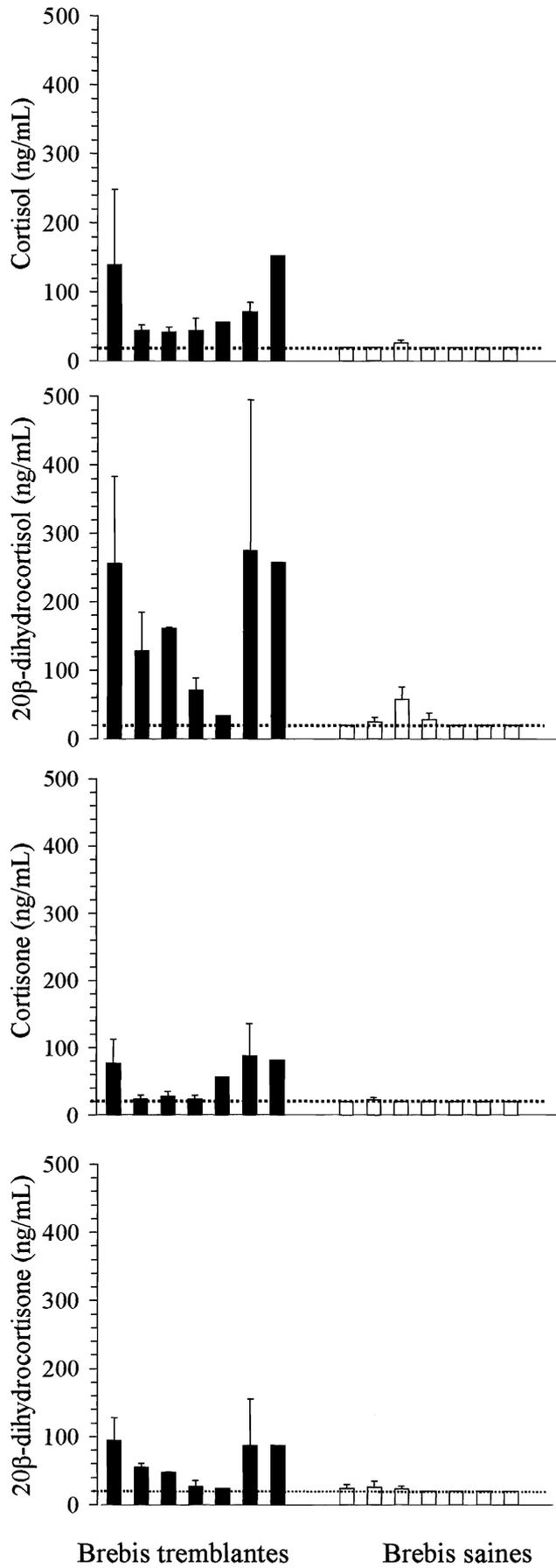
**Figure 5 :** Concentrations moyennes globales plasmatiques en corticoïdes (moyenne ± écart-type) observées sur 24 heures sur des brebis en phase clinique de tremblante (aire noire) et sur des brebis témoins (aire blanche). La ligne en pointillés représente la limite de quantification du dosage, i.e. 2,5 ng/mL. Chaque histogramme indique la valeur moyenne obtenue pour une brebis.

L'analyse de variance effectuée sur les résultats de la deuxième série d'expériences a montré un effet significatif de la tremblante sur les concentrations plasmatiques en corticoïdes. Les moyennes globales sur les 4 périodes des concentrations plasmatiques en corticoïdes pour chacune des brebis saines et atteintes de tremblante ont été représentées dans la figure 5.

La moyenne globale des concentrations plasmatiques en cortisol des brebis atteintes de tremblante a été de  $24 \pm 20$  ng/mL (10-60 ng/mL) alors que celle des brebis témoins a été de  $7,5 \pm 1,5$  ng/mL (4,5-10 ng/mL). La moyenne globale des concentrations plasmatiques en 20 $\beta$ -dihydrocortisol des brebis tremblantes a été de  $9,0 \pm 8,0$  ng/mL (3,5-27,5 ng/mL) alors que celle des brebis témoins a été  $3,0 \pm 1,0$  ng/mL (2,5-3,5 ng/mL). De la même façon, la moyenne globale des concentrations plasmatiques en cortisone des brebis malades a été de  $6,4 \pm 5,0$  ng/mL (3,5-10,5 ng/mL), celle des brebis témoins de  $2,9 \pm 1,0$  ng/mL (2,5-3,5 ng/mL).

## **b) Concentrations urinaires en corticoïdes (figure 6)**

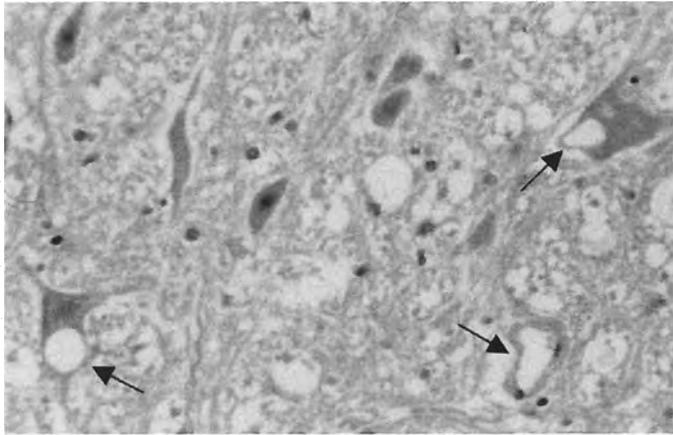
La moyenne globale des concentrations urinaires en cortisol des brebis atteintes de tremblante ( $80 \pm 59$  ng/mL ; 42-152 ng/mL) a été significativement supérieure à celle obtenue chez les brebis témoins ( $21 \pm 3$  ng/mL ; 20-26 ng/mL). Malgré les variations interindividuelles de concentrations urinaires de cortisol, il n'existe pas, à la différence du plasma, de superposition entre les concentrations urinaires de cortisol des brebis témoins et des brebis atteintes de tremblante. Les concentrations urinaires moyennes en 20 $\beta$ -dihydrocortisol des brebis atteintes de tremblante ( $173 \pm 118$  ng/mL ; 34-275 ng/mL) ont été significativement plus élevées que celles des brebis témoins ( $29 \pm 16$  ng/mL ; 20-57,5 ng/mL). De même les concentrations urinaires moyennes en cortisone des brebis malades ( $51 \pm 34$  ng/mL 24-87,5 ng/mL) ont été plus élevées que celles des brebis saines ( $20 \pm 2$  ng/mL, 20-22,5 ng/mL). Enfin, les concentrations urinaires moyennes en 20 $\beta$ -dihydrocortisone des brebis atteintes de tremblante ( $61 \pm 36$  ng/mL ; 24-94 ng/mL) ont été significativement plus élevées que celles des brebis témoins ( $22 \pm 4$  ng/mL ; 20-26 ng/mL). En ce qui concerne les métabolites du cortisol, les variations interindividuelles ont augmenté et des superpositions entre leurs concentrations urinaires chez les brebis tremblantes et les témoins sont apparues. Il n'y a pas d'effet des périodes de prélèvements sur les concentrations urinaires en corticoïdes.



**Figure 6 :** Concentrations urinaires (moyenne  $\pm$  écart-type) en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone) chez les brebis saines (n = 7) et atteintes de tremblante (n = 7). Chaque histogramme représente la valeur moyenne obtenue pour une brebis.

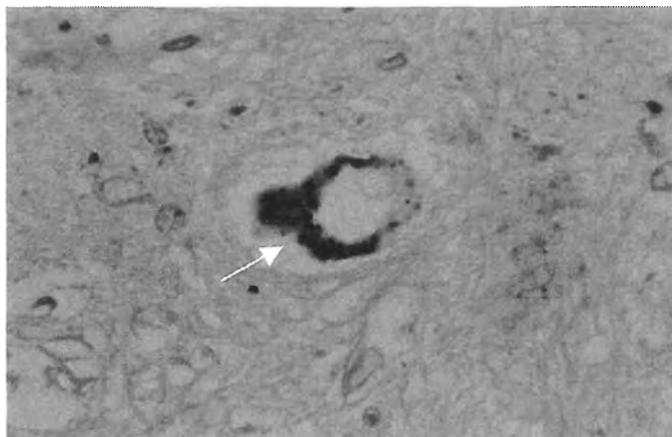
### c) Histologie

Le diagnostic de tremblante a été confirmé par l'identification de la vacuolisation des péricaryons et/ou des neuropiles dans au moins un des 3 noyaux gris (pons, mésencéphale, thalamus) (photo 4).



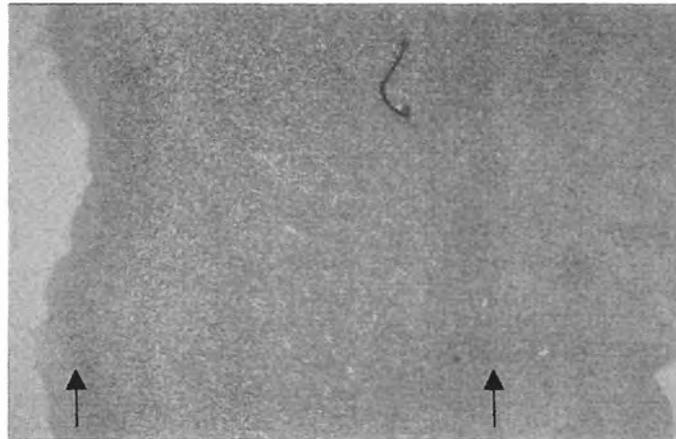
**Photo 4:** Vue microscopique (grossissement 400 fois) de la vacuolisation des neurones (flèches).

Si le diagnostic histologique est douteux, l'immunohistochimie permet de mettre en évidence des dépôts de PrPres (photo 5).



**Photo 5:** Vue microscopique (grossissement 1000 fois) du dépôt de PrPres (flèches) en immunohistochimie.

L'observation au microscope des surrénales a révélé une hypertrophie des cellules de la zone fasciculée du cortex surrénalien (photo 6).



**Photo 6 :** Vue microscopique (grossissement 40 fois) de l'hypertrophie de la zone fasciculée de la cortico-surrénale (délimitée par les 2 flèches).

## II – 1 – 3. DISCUSSION

Le principal résultat de cette étude est que les concentrations plasmatiques et urinaires de corticoïdes (cortisol,  $20\beta$ -dihydrocortisol et cortisone) sont significativement augmentées chez les brebis atteintes de tremblante suggérant que cette maladie à prion s'accompagne d'un syndrome d'hypercortisolémie. L'augmentation des concentrations plasmatique et urinaire a été associée à une hypertrophie du cortex surrénalien chez les brebis atteintes de tremblante.

Dans notre expérience, les concentrations plasmatiques de cortisol chez les brebis saines correspondent aux valeurs physiologiques classiquement observées dans cette espèce [FULKERSON, W., *et al.*, 1982]. Nous n'avons pas mis en évidence de rythme nyctéméral de sécrétion de cortisol ni chez les brebis saines ni chez les brebis atteintes de tremblante.

Chez les brebis atteintes de tremblante, les concentrations plasmatiques de cortisol ont été significativement augmentées et ont atteint des valeurs supérieures aux valeurs obtenues dans différentes situations physiologiques : profils nyctéméraux plasmatiques [MCNATTY, K., *et al.*, 1972], réponse à un stimulus tel que la distribution journalière de la ration [SIMONETTA, G., *et al.*, 1991], au cours de la gestation [GOMEZ BRUNET, A., *et al.*, 1991] ou au cours du cycle sexuel [BELL, M., *et al.*, 1991]. L'hypercortisolémie pourrait être une manifestation endocrine spécifique de la maladie à prions, et non le simple reflet d'un état de souffrance chronique car aucun signe de stress n'a été observé chez les brebis atteintes de tremblante et la plupart des prélèvements ont été obtenus alors que les signes cliniques de la maladie étaient encore modérés. De plus, il a été démontré que la douleur chronique associée à la boiterie n'entraînait pas une augmentation mais une diminution des concentrations plasmatiques de cortisol chez la brebis [LEY, S., *et al.*, 1991 ; LEY, S., *et al.*, 1994]. Cependant, d'autres études ont montré qu'un stress aigu, d'intensité majeure, comme l'isolement, le transport, ou le piétinement dans l'eau pendant une heure, entraînait une hypercortisolémie [PARROT, R., *et al.*, 1994].

Dans le cadre de la recherche d'un marqueur précoce de la tremblante, il serait d'un grand intérêt de pouvoir déterminer si la perturbation de l'axe corticotrope est présente dès la phase préclinique de la maladie spontanée chez la brebis.

Le syndrome d'hypercortisolémie de brebis atteintes de tremblante pourrait être exploité pour le développement d'un test diagnostique de la maladie à prions. Cependant, les concentrations plasmatiques de cortisol présentent des fluctuations importantes d'origine endogène (pulsatilité ou rythme circadien des sécrétions) ou exogène (par exemple en réponse à un stimulus tel que le stress aigu occasionné par le prélèvement). Par conséquent, certains pics des concentrations plasmatiques de cortisol des brebis saines sont supérieures aux valeurs "en creux" de cortisol plasmatique des brebis atteintes de tremblante, ce qui limite l'intérêt potentiel de la concentration plasmatique de cortisol pour discriminer les brebis atteintes de tremblante des brebis saines. Cet inconvénient est supprimé lorsque les métabolites du cortisol sont considérés car la lenteur du processus métabolique a un effet tampon qui se traduit par des variations temporelles moins importantes des concentrations plasmatiques en métabolites. Le mécanisme tampon est amplifié dans les urines car les concentrations urinaires de cortisol reflètent la production hormonale pendant la période qui sépare la dernière miction du moment du prélèvement. Pour ces raisons, le cortisol urinaire ou les

métabolites du cortisol, plasmatiques ou urinaires, représentent des marqueurs biologiques potentiels de la fonction corticosurrénalienne. Le 20 $\beta$ -dihydrocortisol, métabolite principal du cortisol chez la brebis, est probablement le meilleur marqueur pour discriminer les brebis saines des brebis atteintes de tremblante.

La stimulation de la fonction surrénalienne chez les brebis atteintes de tremblante est en accord avec l'augmentation anormale de la taille des glandes surrénales (photo 7 a et b) précédemment observée chez les brebis naturellement atteintes de tremblante [BELL, M., *et al.*, 1991] et chez les souris [KIM, Y., *et al.*, 1988] ou les hamsters [CARP, R., *et al.*, 1990], [YE, X., *et al.*, 1996] infectés expérimentalement.

a



b



**Photo 7 :** Vue macroscopique (a) et coupe sagittale (b) de 2 glandes surrénales : à droite, glande surrénale pesant 1,84 g d'une brebis saine (41 kg) et à gauche, glande surrénale pesant 2,92 g d'une brebis atteinte de tremblante (27,5 kg).

D'un point de vue physiopathologique, la stimulation de l'activité de la surrénale chez les brebis atteintes de tremblante pourraient résulter d'une altération spécifique du système neuronal impliqué dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou d'une hyperactivité autonome de la glande surrénale chez les animaux infectés. La première hypothèse est la plus probable car une hypertrophie fonctionnelle du système neurosécrétoire supraopticoinfundibulaire a été mis en évidence chez les brebis atteintes de tremblante [PARRY, H., *et al.*, 1973]. Plus récemment, une augmentation du nombre des neurones à CRF a été observée dans l'hypothalamus de hamsters expérimentalement infectés par une souche de tremblante [YE, X., *et al.*, 1994].

Quelle que soit son origine, l'hyperactivité de la glande surrénale pourrait avoir une signification et des répercussions physiopathologiques importantes en raison de l'exposition chronique à des concentrations élevées de cortisol. En effet, il a été montré que les glucocorticoïdes pourraient présenter des effets protecteurs en ralentissant la progression de la maladie d'Alzheimer puisque l'activation des mécanismes inflammatoires spécifiques contribuent à la neurodégénérescence [AISEN, P., *et al.*, 1998]. Des études récentes suggèrent qu'une production gliale de cytokines induite par un dépôt de PrPsc pourrait contribuer au développement de lésions pathologiques dans un modèle murin de tremblante [WILLIAMS, A., *et al.*, 1997]. La nature inflammatoire des lésions cérébrales pourrait expliquer la diminution de la sensibilité à la tremblante produite par l'administration de stéroïdes chez les souris infectées expérimentalement [OUTRAM, G., *et al.*, 1974]. On peut aussi supposer que l'hypercortisolémie observée dans cette étude, est une réponse pour neutraliser les phénomènes inflammatoires dans le système nerveux central. En effet, les glucocorticoïdes sont de puissants inhibiteurs des facteurs nucléaires  $\kappa B$ , facteurs de transcription participant à l'activation de gènes impliqués dans la réponse du système nerveux central aux stimuli pathogènes entraînant la mort neuronale [GRILLI, M., *et al.*, 1999]. A l'opposé, une sécrétion importante et prolongée de glucocorticoïdes pourrait exacerber le processus neurodégénératif caractéristique des maladies à prions. En effet, on a pu montré que, chez les rongeurs, une exposition excessive aux glucocorticoïdes a des effets délétères sur des régions cérébrales présentant des concentrations élevées de récepteurs aux glucocorticoïdes [MCINTOSH, L., *et al.*, 1996 ; SAPOLSKY, R., 1996].

De même, la surexposition aux corticoïdes du système immunitaire des animaux infectés pourrait expliquer l'absence de réponse immunitaire observée dans les maladies à prions [SCHREUDER, B., 1994].

En conclusion, nous avons montré que les concentrations plasmatiques et urinaires des corticoïdes étaient augmentées chez les brebis atteintes de tremblante comparativement à celles des brebis saines. Nos résultats suggèrent que le  $20\beta$ -dihydrocortisol mérite une attention particulière comme marqueur biologique potentiel de la tremblante. Ainsi, la relative stabilité au cours du nyctémère des niveaux plasmatiques du  $20\beta$ -dihydrocortisol nous a conduit à envisager l'utilisation de ce marqueur pour discriminer les brebis malades des brebis saines.

## II – 2. MISE AU POINT ET EVALUATION D’UN TEST DIAGNOSTIQUE BASE SUR LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUE ET URINAIRE DU 20 $\beta$ -DIHYDROCORTISOL

### II – 2 – 1. VALEUR DISCRIMINANTE DES CORTICOÏDES URINAIRES ET PLASMATIQUES : ETUDE DE POPULATION

La surveillance et l’éradication de la tremblante nécessite l’utilisation d’un test diagnostique du vivant de l’animal. Actuellement le diagnostic de tremblante repose sur les signes cliniques, il est toujours confirmé par un examen post mortem tels que l’inoculation à des animaux de laboratoire, l’histopathologie, la détection des SAF (scrapie associated fibrils) par microscopie électronique [STACK, M., *et al.*, 1995 ; CHAPLIN, M., *et al.*, 1998], la mise en évidence de la protéine prion résistante à la protéinase K par immunohistochimie (IHC), Elisa ou Western Blot. Toutes ces techniques sont longues à mettre en œuvre, coûteuses et ne sont utilisables que post-mortem.

Il est établi que, du vivant de l’animal, la protéine prion s’accumule dans les tissus lymphoïdes : on retrouve de la PrPres par IHC, environ un an avant le début des signes cliniques dans les amygdales [VAN KEULEN, L., *et al.*, 1996 ; SCHREUDER, B., *et al.*, 1998 ; ANDREOLETTI, O., *et al.*, 2000] et dans les follicules des troisièmes paupières sur des ovins de 14 mois [O’ROURKE, K., *et al.*, 1998 ; O’ROURKE, K., *et al.*, 2000]. L’inconvénient majeur de l’utilisation de ces tissus est la biopsie qui nécessite obligatoirement une anesthésie générale pour la biopsie d’amygdales ou locale pour celle de la troisième paupière. De plus l’IHC n’est pas actuellement automatisable, ce qui limite son intérêt pour l’application à une grande série d’échantillons [FARQUHAR, C., *et al.*, 1989].

La mise en place d’un test de dépistage de la tremblante à l’échelle d’une population, sur des animaux vivants ne peut être réalisée que sur des échantillons biologiques faciles à réaliser et peu invasifs. Le sang et l’urine paraissent être les 2 seules matrices prélevables du vivant de l’animal.

Un test diagnostique de la tremblante doit permettre de distinguer les animaux atteints de tremblante des animaux sains. Par définition, un test peut se tromper par défaut : un ovin atteint de tremblante peut ne pas être détecté (c'est ce que l'on appelle les faux négatifs) et à l'opposé un ovin sain peut aussi être considéré comme atteint de tremblante d'après le test (c'est ce que l'on nomme les faux positifs). Dans l'idéal, un test doit toujours être évalué par rapport à une méthode de référence, dans cette étude, l'histopathologie ou l'immunohistochimie. La qualité et l'efficacité d'un test doivent être appréciées à partir de ses valeurs intrinsèques indépendantes de la prévalence de la maladie : la sensibilité et la spécificité.

La sensibilité est la probabilité de diagnostiquer les vrais positifs parmi les animaux malades alors que la spécificité est la capacité de diagnostiquer les animaux sains parmi les non malades (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Paramètres d'évaluation de la valeur d'un test diagnostique.

	Tremblante	
	OUI	NON
Test positif	Vrai Positif (VP)	Faux Positif (FP)
Test négatif	Faux Négatif (FN)	Vrai Négatif (VN)
	Sensibilité = $\frac{VP}{VP+FN}$	Spécificité = $\frac{VN}{VN+FP}$

En général, lorsque l'on débute le dépistage d'une maladie dans une population, on privilégie d'abord la sensibilité (c'est à dire la détection du maximum de vrais positifs). On accepte de se tromper à l'excès dans un premier temps pour ensuite utiliser un test plus spécifique qui dépistera ces faux négatifs [THRUSFIELD, M., 1995].

Dans les maladies à prions, un test sérologique mettant en évidence une réponse immunitaire ne paraît pas envisageable car aucune réponse immunitaire n'a pu être mise en évidence au cours de l'évolution physiopathologique de la tremblante. La recherche directe de la protéine prion dans le sang pourrait être la solution d'avenir. L'électrophorèse capillaire a permis la mise en évidence de la PrPres dans le sang de moutons infectés de tremblante [SCHMERR, M., *et al.*, 1998 ; SCHMERR, M., *et al.*, 1999].

Une approche alternative pourrait être l'identification de marqueurs non spécifiques sanguins et/ou urinaires (métabolites endogènes, hormones, enzymes...) dont les concentrations sont modifiées au cours du développement de la tremblante. Ainsi, l'étude de la fonction corticosurrénalienne des brebis en phase clinique de tremblante nous a permis de mettre en évidence une stimulation très importante des sécrétions de corticoïdes (cortisol et ses différents métabolites) dès les premiers stades cliniques de la maladie [SCHELCHER, F., *et al.*, 1999]. Les concentrations plasmatiques moyennes de cortisol des brebis atteintes de tremblante, au cours du nyctémère, ont été de  $24 \pm 20$  ng/mL tandis que celles des brebis saines ont été  $10 \pm 12$  ng/mL. En ce qui concerne le 20 $\beta$ -dihydrocortisol, les concentrations moyennes ont été respectivement de  $9,0 \pm 8,0$  ng/mL et  $3,0 \pm 1,0$  ng/mL pour les brebis atteintes de tremblante et saines (figure 4 page 32).

Nous avons donc orienté la recherche d'un test diagnostique non invasif de la tremblante vers l'identification d'un marqueur de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien

Le 20 $\beta$ -dihydrocortisol constitue un marqueur de choix pour un test diagnostique non invasif de la tremblante pour deux raisons :

-tout d'abord, les concentrations de ce métabolite reflètent directement le niveau de l'activité corticotrope des brebis ;

-ensuite, les processus de métabolisation tamponnent les brusques variations des sécrétions de la molécule mère. En conséquence, les variations des concentrations plasmatiques des métabolites du cortisol ne sont pas soumises au caractère pulsatile des sécrétions de cortisol. De plus, ce métabolite de clairance faible, n'est pas immédiatement éliminé après sa formation, son volume de distribution est suffisant pour assurer une certaine rémanence dans l'organisme et pas trop grand pour garantir des concentrations plasmatiques suffisamment élevées pour être quantifiables par une technique d'analyse HPLC.

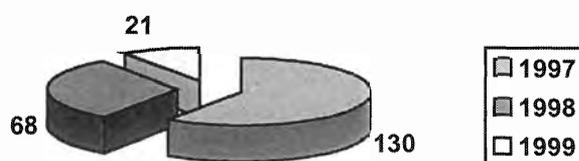
Une approche alternative pourrait consister en la détermination des concentrations des corticoïdes dans les urines qui reflètent leur taux de production pendant la période qui sépare la dernière miction du prélèvement urinaire.

Pour évaluer un test diagnostique de la tremblante basé sur les concentrations plasmatiques et urinaires en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone), nous avons déterminé la capacité de ces différents paramètres à discriminer les brebis en phase clinique de tremblante des brebis saines dans une étude de population.

## a) Matériels et méthodes

La population étudiée était constituée de 219 ovins (9 mâles et 210 femelles). La description de la population et les conditions de prélèvements sanguins et urinaires sont récapitulées dans le tableau 3 (page 47).

213 prélèvements plasmatiques et 167 prélèvements urinaires ont été collectés au cours des années 1997, 1998 et 1999 (figure 7).



**Figure 7 :** Répartition des ovins selon l'année de prélèvement.

Les deux races les plus représentées étaient la race Romanov (n = 108 ; 49,3 %) et la race Manech Tête Rousse (n = 77 ; 35,1%), deux races connues pour leur sensibilité à la tremblante (figure 8).

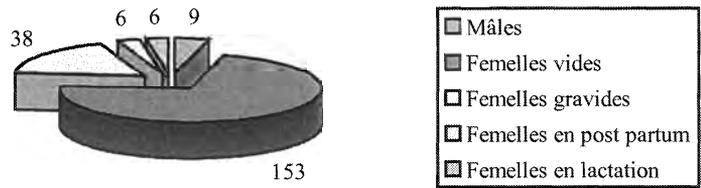


**Figure 8 :** Répartition des ovins selon leur race.

**Tableau 3 :** Description de la population étudiée.

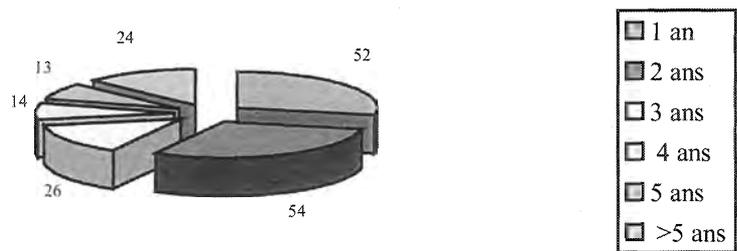
<b>Année de prélèvement</b> (n=219)	<b>1997</b>		<b>1998</b>		<b>1999</b>	
	130 (59,4%)		68 (31,0%)		21 (9,6%)	
<b>Race</b> (n=219)	<b>Manech Tête Rousse</b>		<b>Romanov</b>		<b>Autres</b>	
	108 (49,3%)		77 (35,1%)		34 (15,6%)	
<b>Statut physiologique</b> (n=212)	<b>Mâles</b>			<b>Femelles</b>		
		<b>Vide</b>	<b>Gravide</b>	<b>Post-partum</b>	<b>Lactation</b>	
	9 (4,3%)	153 (72,2%)	38 (17,9%)	6 (2,8%)	6 (2,8%)	
<b>Age en année</b> (n=183)	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>&gt;5</b>
	52 (28,4%)	54 (29,5%)	26 (14,2%)	14 (7,7%)	13 (7,1%)	24 (13,1%)
<b>Génotype</b> (n=74)	<b>ARQ-ARQ</b>	<b>ARQ-VRQ</b>	<b>ARR-ARQ</b>	<b>ARR-ARR</b>	<b>Autres</b>	
	26 (35,1%)	22 (29,7%)	5 (6,8%)	12 (16,2%)	9 (12,2%)	
<b>Intensité de stress</b> (n=219)	<b>faible</b>		<b>intermédiaire</b>		<b>forte</b>	
	207 (94,5%)		10 (4,6%)		2 (0,9%)	
<b>Mois de prélèvement</b> (n=219)	<b>1-2</b>	<b>3-4</b>	<b>5-6</b>	<b>7-8</b>	<b>9-10</b>	<b>11-12</b>
	33 (15,0%)	82 (37,4%)	52 (23,8%)	2 (0,9%)	22 (10,1%)	28 (12,8%)
<b>Heure de prélèvement</b> (n=211)	<b>9-10</b>	<b>11-12</b>	<b>13-14</b>	<b>15-16</b>	<b>17-19</b>	
	21 (9,9%)	84 (39,8%)	62 (29,4%)	36 (17,1%)	8 (3,8%)	
<b>Période d'habitation</b> (jours) (n=218)	<b>&lt;8</b>		<b>8-30</b>		<b>&gt;30</b>	
	83 (38,1%)		42 (19,3%)		93 (42,6%)	
<b>Délai prélèvement- mort (jours)</b> (n=218)	<b>&lt;8</b>		<b>8-30</b>		<b>&gt;30</b>	
	42 (19,2%)		50 (23,0%)		126 (57,8%)	

La majorité des brebis étaient vides (n = 153 ; 72%) (figure 9).



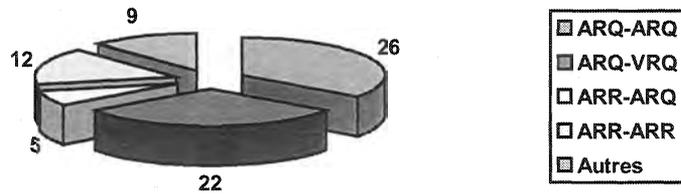
**Figure 9 :** Répartition des ovins selon leur sexe et leur stade physiologique.

Plus de la moitié (n = 106) avaient moins de 2 ans (figure 10).



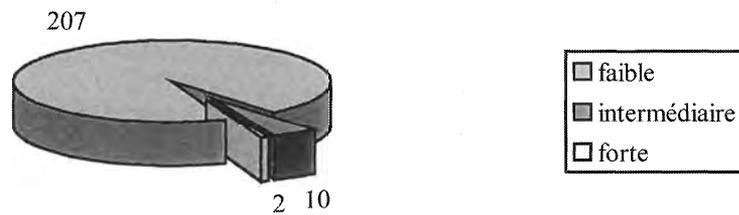
**Figure 10 :** Répartition des ovins selon leur âge.

Les génotypes ont été déterminés pour 74 ovins. La répartition des trois génotypes considérés comme sensibles [ELSEN, J., *et al.*, 1996 ; ELSEN, J., *et al.*, 1999] étaient la suivante : 35% ARQ/ARQ, 30% ARQ/VRQ et 5% VRQ/VRQ (figure 11).



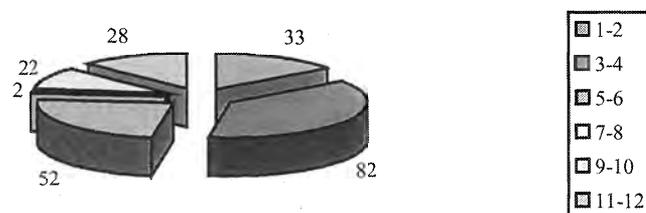
**Figure 11 :** Répartition des ovins selon leur génotype.

Le stress de la prise d'échantillon a été grossièrement évalué sur une échelle de 3 (aucun, léger et fort). Avec cette classification, 95% des ovins pouvaient être considérés comme non stressés au moment du prélèvement (figure 12).

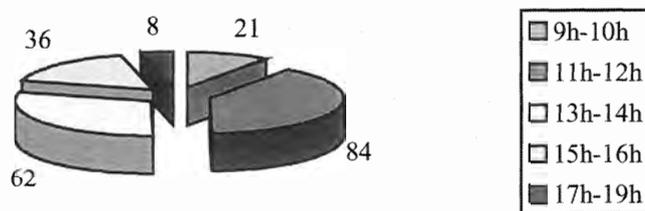


**Figure 12 :** Répartition des ovins selon l'intensité du stress au cours du prélèvement sanguin.

Les moments de prélèvement sanguin et urinaire (mois et heures) sont répertoriés dans les figures 13 et 14 :



**Figure 13 :** Répartition des ovins selon les mois de prélèvement.



**Figure 14 :** Répartition des ovins selon l'heure de prélèvement.

La majorité des ovins (84%) ont été amenés et prélevés à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

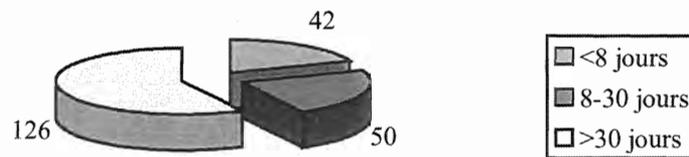
Les périodes d'habitué, (c'est à dire le temps séparant l'arrivée de l'animal et le prélèvement), ont été classées en trois catégories : moins de 8 jours, entre 8 et 30 jours et plus de 30 jours (figure 15). La répartition des animaux prélevés à l'ENVT, selon ces périodes était respectivement de 38,1, 19,3 et 42,6%.



**Figure 15 :** Répartition des ovins selon la durée de leur période d'habitué.

La période d'habitué pour les ovins prélevés dans leurs lieux d'élevage a été considérée arbitrairement supérieure à 30 jours (figure 16).

Le délai entre le prélèvement et la mort a été supérieur à 30 jours pour 58% des animaux. Les animaux présentant des signes cliniques de tremblante sont généralement sacrifiés après une courte période de décubitus. Le délai prélèvement-mort permet de situer très approximativement l'évolution clinique de la maladie.



**Figure 16 :** Répartition des ovins selon la durée du délai prélèvement-mort.

Pour les ovins encore vivants, la durée entre le prélèvement et la mort a été considérée arbitrairement supérieure à 30 jours.

Le diagnostic de tremblante a d'abord été établi sur des critères cliniques, c'est à dire prurit, changement de comportement, tremblement et incoordination locomotrice, puis a été confirmé, après autopsie, par examen histopathologique et en cas de doute par immunohistologie. Les brebis témoins malades étaient principalement atteintes de pathologies locomotrices (arthrites), de maladies respiratoires, de cachexie associée à du parasitisme ou au vieillissement, ou de pathologies neurologiques (nécrose du cortex cérébral, listériose et toxémie de gestation). Le critère d'inclusion des brebis témoins saines a été l'absence de signes cliniques de tremblante ou d'autres maladies. Aucun des signes cliniques classiques de tremblante n'a été observé sur ces brebis au moins 6 mois après leur prélèvement. Les brebis atteintes de tremblante ont été sacrifiées dès qu'elles ont manifesté les derniers stades de la maladie.

### **Prélèvements de sang et dosages**

Un échantillon de 5 mL de sang a été prélevé par ponction directe de la veine jugulaire gauche afin de mesurer les concentrations plasmatiques en corticoïdes (photo 8). Les échantillons ont été prélevés par 13 préleveurs différents, ils ont été recueillis sur tubes héparinés, et centrifugés à 1200 g pendant 10 minutes. Le plasma a été stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la réalisation du dosage.



**Photo 8 :** Matériel nécessaire à la ponction veineuse comprenant un porte-tube, une aiguille et deux tubes héparinés.

Les concentrations plasmatiques en corticoïdes (cortisol,  $20\beta$  dihydrocortisol et cortisone) ont été déterminées par HPLC après extraction avec du chlorure de méthylène [ALVINERIE, M., *et al.*, 1982].

La limite de quantification des corticoïdes a été fixée à 2,5 ng/mL pour tous les métabolites ; la répétabilité et la reproductibilité avaient des coefficients de variations inférieurs à 15%. L'échelle de précision a été de 89-105% et le rendement de l'extraction a été de 75 à 85%.

### **Prélèvements d'urines et dosages**

Les urines ont été prélevées par cathétérisme du méat urinaire uniquement sur les femelles par 11 préleveurs différents, juste après le prélèvement de sang. Si la vessie était vide, un autre prélèvement a été réalisé quelques jours après dans la mesure du possible.

La créatinine urinaire des ovins a été déterminée d'après la méthode de Jaffé [SLOT, C., 1965]. Brièvement, 50  $\mu$ l d'urine ont été placés dans une plaque de 96 puits avec 50  $\mu$ l d'une solution d'acide picrique à 8,8 mM mélangée à 0,4 M de soude. Une calibration standard (5 à 200  $\mu$ g/mL) et un contrôle de qualité a été effectué en double dans les mêmes conditions. L'absorption à 492 nm du rouge picrate formé a été déterminée grâce à un spectrophotomètre ( $\mu$ Quant, Bio-Tek Instruments, Winooski, USA) après 1 heure d'incubation à température ambiante. Cette méthode a été validée selon des normes spécifiées [SHAH, V., *et al.*, 1992]. La limite de quantification de la créatinine urinaire a été fixée à 5  $\mu$ g/mL ; la répétabilité et la reproductibilité avaient des coefficients de variation inférieurs à 10%.

La densité urinaire a été mesurée avec un réfractomètre digital (UG-1, Atago Co, LTD, Tokyo, Japan) à température contrôlée. La réfraction de la lumière a été exprimée par l'indice de réfraction.

## **b) Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SYSTAT 8.0 (SPSS Inc. Chicago, IL.). Les résultats sont exprimés par leur moyenne  $\pm$  écart-type pour chaque variable.

Les concentrations en corticoïdes inférieures à la limite de quantification du dosage ou non détectables ont été arbitrairement fixées à 1,25  $\mu\text{g/mL}$  et 0,625  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement pour le plasma, et à 5 $\mu\text{g/mL}$  et 2,5 $\mu\text{g/mL}$ , respectivement pour l'urine. Les différents facteurs de variations possibles (espèce, stade physiologique, âge, génotype, année de prélèvement, mois de prélèvement, heure de prélèvements, durée d'habituance, et niveau de stress) ont été explorés et testés en utilisant un modèle général linéaire incluant les facteurs ci-dessus. Aucune interaction n'a été testée avec cette analyse.

Pour l'analyse discriminante, seules les brebis saines et les brebis atteintes de tremblante ont été considérées. Les brebis atteintes d'autres maladies ont été ignorées. L'analyse discriminante a calculé la fonction linéaire des variables (analytes plasmatiques et/ou urinaires) qui sépare le mieux les moutons en deux groupes prédéfinis (contrôle et tremblante). La sélection des variables entrées dans le modèle a été effectuée par une méthode pas à pas descendante.

Pour les différents modèles, nous avons reporté le pourcentage de classification correcte. Pour tester la robustesse de la classification, nous avons utilisé la méthode de jackknife qui enlève et remplace un ovin à chaque fois.

## **c) Résultats**

A partir des critères suivants : durée de vie, examen clinique et examen histologique post-mortem, 129 ovins ont été inclus dans le groupe tremblante (59%), 60 dans le groupe sain

(27%) et 30 (14%) dans le groupe autres maladies. Aucun effet significatif ( $p > 0,05$ ) de la race, du statut physiologique, de l'âge, des génotypes, de l'année de prélèvement, du mois de prélèvement, de l'heure de prélèvement, du stress et de la période d'habitation, n'a été mis en évidence sur les concentrations plasmatiques de cortisol. Un effet significatif, année de prélèvement a été observé ( $p < 0,05$ ) sur les concentrations plasmatiques en 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone, ces concentrations ayant augmenté de la première à la dernière année de prélèvement. Nous n'avons trouvé aucune explication pour cette différence. Il n'y a pas d'effet significatif ( $p > 0,05$ ) des facteurs susmentionnés sur les différents marqueurs urinaires cortico-surrénaux (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone). Les tableaux rapportent des statistiques descriptives (moyenne  $\pm$  écart-type) concernant l'âge et le poids des ovins selon leur statut pathologique (tableau 4) ainsi que les concentrations plasmatiques et urinaires en corticoïdes (tableau 5), les densités urinaires et la créatinine urinaire (tableau 6).

**Tableau 4 :** Age et poids des ovins selon leur statut physiologique (moyenne  $\pm$  écart-type).

Statut pathologique	Age (année)	Poids (kg)
Sain témoin	3,2 $\pm$ 1,99	52,0 $\pm$ 11,7
Tremblante	2,33 $\pm$ 1,68	37,0 $\pm$ 9,0
Autres maladies	5,74 $\pm$ 3,77	36,8 $\pm$ 9,2

**Tableau 5 :** Concentrations plasmatiques en corticostéroïdes (ng/mL) les ovins selon leur statut pathologique (moyenne  $\pm$  écart-type et rang).

Statut pathologique	Cortisol	20 $\beta$ -dihydrocortisol	Cortisone
Sain témoin	16,34 $\pm$ 13,93	1,12 $\pm$ 0,72	1,79 $\pm$ 1,22
n = 52	1,25-85,6	0,63-3,59	0,63-7,18
Tremblante	32,0 $\pm$ 42,73	5,54 $\pm$ 6,99	6,95 $\pm$ 6,15
n = 126	0,63-30,9	0,63-48,3	0,63-30,4
Autres maladies	35,3 $\pm$ 39,8	4,95 $\pm$ 5,13	8,14 $\pm$ 6,69
n = 29	0,63-21,1	0,63-19,8	0,63-23,0

**Tableau 6 :** Concentrations urinaires en corticostéroïdes, créatinine (ng/mL) et densité urinaire chez les ovins selon leur statut pathologique (moyenne  $\pm$  écart-type et rang).

<b>Statut physiologique</b>	<b>Cortisol</b>	<b>20<math>\beta</math>-dihydrocortisol</b>	<b>Cortisone</b>	<b>Créatinine</b>	<b>Densité urinaire</b>
Sain témoin	n = 56	n = 55	n = 51	n = 49	n = 47
	36,1 $\pm$ 45,2	34,0 $\pm$ 45,1	32,7 $\pm$ 72,1	940 $\pm$ 858	103 $\pm$ 0,02
	2,5-286	2,5-240	2,5-479	73-4188	1,00-1,06
Tremblante	n = 87	n = 87	n = 82	n = 93	n = 95
	75,6 $\pm$ 97,1	65,8 $\pm$ 75,6	64,5 $\pm$ 68,5	2427 $\pm$ 1564	1,05 $\pm$ 0,02
	2,5-644	2,5 – 441	2,5-324	58-7588	1,00 – 1,08
Autres maladies	n = 24	n = 24	n = 22	n = 25	n = 25
	51,7 $\pm$ 48,5	58,5 $\pm$ 74,1	29,6 $\pm$ 33,8	1102 $\pm$ 947	1,03 $\pm$ 0,01
	5,0-152	5,0-278	2,5-122	118-3326	1,0 – 1,06

Nous avons réalisé une analyse discriminante prenant en compte uniquement les brebis saines et atteintes de tremblante, et nous avons montré que les concentrations urinaires en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone) avaient une valeur discriminante significative mais relativement faible. En considérant séparément les concentrations plasmatiques de chaque corticoïde, 83%, 96% et 98% des ovins sains ont été correctement classés, respectivement, avec le cortisol, le 20 $\beta$ -dihydrocortisol et la cortisone. Par contre la classification correcte des ovins atteints de tremblante était très basse (respectivement 37, 42 et 58%). Un modèle prenant en compte simultanément les concentrations plasmatiques des trois corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone), la créatinine urinaire et la densité urinaire a permis de classer correctement 91% des ovins sains et 79% des ovins atteints de tremblante. En utilisant seulement l'un des deux meilleurs prédicteurs (20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone) et la créatinine urinaire, l'analyse a permis de discriminer 93% des ovins sains et respectivement 71 ou 74% des ovins atteints de tremblante (tableau 7). La classification par jackknife a donné les mêmes résultats.

Une amélioration de la classification a été obtenue en prenant en compte l'intensité du stress au moment des prélèvements. En prenant en compte le score du stress, les deux meilleurs prédicteurs ont été le 20 $\beta$ -dihydrocortisol plasmatique et la créatinine qui ont permis de discriminer 98% des ovins sains et 82% des ovins atteints de tremblante (tableau 7).

**Tableau 7 :** Classification des moutons sains et des moutons atteints de tremblante selon plusieurs combinaisons de variables prédictives (corticoïdes plasmatiques, créatinine et densité urinaire et intensité du stress).

Prédicteurs sélectionnés	Valeur de F	Pourcentage de classification correcte		
		Témoins	Tremblante	Population totale
Cortisol	10,32			
20 $\beta$ -dihydrocortisol	4,15			
Cortisone	21,27	91	79	82
Créatinine	9,81	(n = 35)	(n = 90)	(n = 125)
Densité urinaire	4,03			
Cortisol	18,23			
20 $\beta$ -dihydrocortisol	8,19	98	66	75
Cortisone	31,73	(n = 52)	(n = 125)	(n = 177)
Cortisol	5,01	93	71	78
Créatinine	31,05	(n = 41)	(n = 90)	(n = 131)
20 $\beta$ -dihydrocortisol	14,54	93	71	78
Créatinine	32,92	(n = 41)	(n = 90)	(n = 131)
Cortisone	29,69	93	74	80
Créatinine	30,89	(n = 41)	(n = 90)	(n = 131)
Cortisol	19,07			
20 $\beta$ -dihydrocortisol	4,98	93	76	81
Cortisone	32,29	(n = 41)	(n = 90)	(n = 131)
Créatinine	36,41			
Cortisol	6,65	83	37	51
		(n = 52)	(n = 126)	(n = 178)
20 $\beta$ -dihydrocortisol	20,58	96	42	58
		(n = 52)	(n = 125)	(n = 177)
Cortisone	38,87	98	58	70
		(n = 52)	(n = 126)	(n = 178)
Créatinine	38,2	88	70	76
		(n = 49)	(n = 93)	(n = 142)
Densité urinaire	31,15	66	74	71
		(n = 47)	(n = 95)	(n = 142)
20 $\beta$ -dihydrocortisol	34,50			
Créatinine	13,32	98	82	87
Intensité de stress	15,70	(n = 41)	(n = 90)	(n = 131)

En sélectionnant les animaux prélevés au moins 30 jours avant la mort (pour le groupe tremblante), des résultats similaires ont été obtenus (tableau 8). Si on considère uniquement les concentrations plasmatiques (n=99), le taux global de classification correcte était de 83%. Avec les 2 meilleurs prédicteurs plasmatiques (20 $\beta$ -dihydrocortisol ou cortisone) et la créatinine urinaire, la meilleure classification globale a atteint respectivement 77 et 76%.

**Tableau 8 :** classification des ovins prélevés au moins 30 jours avant leur mort selon plusieurs combinaisons de variables prédictives (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone plasmatique, créatinine urinaire, et intensité de stress).

Prédicteurs sélectionnés	Valeur de F	Pourcentage de classification correcte		
		Témoins	Tremblante	Moyenne
Cortisol	6,26			
Cortisone	35,01	98	79	89
Créatinine	13,65	(n = 47)	(n = 28)	(n = 75)
Intensité de stress	9,37			
Cortisol	7,35			
20 $\beta$ -dihydrocortisol	6,59	98	70	85
Cortisone	24,61	(n = 65)	(n = 34)	(n = 99)
Intensité de stress	6,98			
Cortisol	9,24			
20 $\beta$ -dihydrocortisol	8,03	98	66	83
Cortisone	24,69	(n = 67)	(n = 32)	(n = 99)

En définitive, la meilleure classification pour ce sous-ensemble de données a été obtenue en prenant les concentrations plasmatiques en cortisol et cortisone, la créatinine urinaire et l'intensité du stress. 89% des animaux (98% des ovins sains et 79% des ovins atteints de tremblante) ont alors été classés correctement.

## d) Discussion

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de test idéal de dépistage de la tremblante, applicable aux animaux vivants. On pourrait toutefois envisager un dépistage systématique de la maladie adapté à de larges populations et réalisé en 2 temps : un premier dépistage rapide et peu coûteux pourrait permettre de subdiviser la population testée en deux groupes : les animaux très probablement sains versus les autres. Dans un second temps, d'autres tests plus complexes et plus chers pourraient discriminer les ovins ayant une forte probabilité d'atteinte de tremblante. Une telle approche suppose l'existence de marqueurs physiologiques discriminants ayant une bonne sensibilité c'est à dire capable de ne classer comme sains que les ovins réellement sains. Cette approche suppose aussi que la tremblante déclenche des phénomènes pathologiques relativement précoces et accentués de manière à ce que l'altération de la concentration plasmatique et/ou urinaire soit facilement détectable grâce à la mesure des analytes. Après avoir démontré une altération de la fonction de la corticosurrénale chez les ovins atteints de tremblante, nous avons voulu étudier la valeur discriminante des concentrations en corticoïdes plasmatiques et urinaires pour la sélection des animaux atteints d'ESST. Pour réaliser cette analyse nous avons comparé les brebis atteintes de tremblante seulement aux brebis saines. En effet, nos brebis témoins malades étaient pour la plupart en phase terminale de maladies, et présentaient des concentrations plasmatiques et urinaires de corticoïdes élevées (tableau 5). De plus, en pratique, un tel test doit pouvoir servir à un dépistage précoce, et donc être appliqué à des brebis apparemment saines.

Notre étude confirme que la fonction corticosurrénalienne est perturbée durant la phase clinique de tremblante mais que le cortisol, principale hormone corticoïde surrénalienne, est le plus mauvais marqueur de la phase clinique de tremblante. En effet, si l'on considère uniquement les concentrations plasmatiques en cortisol, seulement 37% des ovins atteints de tremblante se retrouvent correctement classés. Ceci peut s'expliquer par de grandes variations intra et interindividuelles des cortisolémies dues au rythme nyctéméral de sécrétion du cortisol [MCNATTY, K., *et al.*, 1972] ou au stress causé par le prélèvement. Cependant, les concentrations plasmatiques en cortisol des ovins sains correspondent aux valeurs classiquement observées dans cette espèce [FULKERSON, W., *et al.*, 1982].

Chez les ovins atteints de tremblante, les cortisolémies ne sont que peu augmentées. Ce phénomène pourrait être expliqué par la réduction de la capacité maximale de fixation de la

transcortine, transporteur spécifique du cortisol dans le sang, comme cela a déjà été montré précédemment [PICARD HAGEN, N., *et al.*, 2000].

Les concentrations plasmatiques en 20 $\beta$ -dihydrocortisol et cortisone, qui sont les premiers métabolites du cortisol, ont une valeur discriminante supérieure à celle du cortisol et permettent de classer correctement, respectivement 42 et 58% des ovins atteints de tremblante. La meilleure valeur discriminante de ces métabolites est probablement due au fait que, contrairement au cortisol, ils ne sont pas soumis au caractère pulsatile des sécrétions de cortisol car les processus de métabolisation tamponnent les brusques variations des sécrétions de la molécule mère. Ainsi, les concentrations plasmatiques ponctuelles des métabolites ne reflètent pas une sécrétion instantanée, mais au contraire intègrent des événements de sécrétion antérieure. Malgré cette amélioration, la spécificité et la sensibilité d'un test à valeur de diagnostic, fondé sur un seul métabolite du cortisol reste insuffisante.

Les concentrations urinaires en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone) reflètent la production de cortisol de la dernière miction spontanée jusqu'au moment du prélèvement urinaire. Pour ces raisons, nous avons proposé que les corticoïdes urinaires (cortisol et ses métabolites) pourraient être des marqueurs biologiques potentiels de l'altération de la fonction corticosurrénalienne [SCHELCHER, F., *et al.*, 1999]. Cependant, notre étude indique que les corticoïdes urinaires, malgré une concentration moyenne multipliée par 2 chez les ovins atteints de tremblante, ont une faible valeur discriminante. Ceci n'est pas lié à la dilution de l'urine comme le montre l'augmentation de la densité urinaire et de la créatininurie chez la brebis atteinte de tremblante. Initialement, nous avons mesuré la créatininurie pour standardiser la concentration urinaire en corticoïdes en exprimant les résultats sous forme de ratio concentration de corticoïdes / créatininurie. De façon inattendue, la présentation des résultats sous forme de rapport a effacé les différences entre les ovins sains et ceux atteints de tremblante et la créatininurie en elle même est apparue comme un bon marqueur de tremblante permettant de classer correctement 70% des ovins atteints de tremblante. La tremblante est une maladie cachectisante et la multiplication par 2,6 de la valeur de créatininurie chez les ovins atteints de tremblante peut s'expliquer par des phénomènes de fonte musculaire. En associant la créatininurie et la concentration plasmatique en 20 $\beta$ -dihydrocortisol (ou en cortisone), la valeur discriminante devient très intéressante et atteint 90% pour les ovins sains et 70% pour les ovins atteints de tremblante, ce qui illustre l'intérêt d'un dépistage biochimique reposant sur la mesure de marqueurs différents reflétant des dysfonctionnements variés.

La précocité de la valeur discriminante des analytes  $20\beta$ -dihydrocortisol plasmatique et créatinine urinaire est de la plus grande importance pour la mise en pratique d'un test. Dans notre population, 49 ovins atteints de tremblante, ont survécu au moins 30 jours après les prélèvements, ce qui indique que les ovins n'étaient pas en phase terminale de tremblante. Les symptômes étaient assez discrets et il n'y avait pas d'altérations majeures des différentes fonctions physiologiques. En utilisant ces 49 brebis et le groupe témoin ( $n=60$ ), nous avons montré que la valeur discriminante des concentrations plasmatiques des métabolites du cortisol et la créatininurie était du même ordre de grandeur que chez les ovins en phase terminale de la maladie (taux global de classification correcte de 89%) (tableau 8). Ceci montre que les marqueurs physiologiques que nous avons sélectionnés sont vraiment associés avec l'évolution de la tremblante et ne sont pas seulement des marqueurs non spécifiques de stress qui seraient associés à la phase terminale de la maladie.

Une analyse discriminante doit être validée. Quand la base de données est assez grande, on peut réaliser une validation croisée en prélevant au hasard deux échantillons ; le premier échantillon est utilisé pour établir les critères de classification qui sont ensuite testés sur le second échantillon. La proportion de classification correcte de l'échantillon testé est une mesure empirique de la qualité de la discrimination. Comme nous n'avions pas assez de moutons pour réaliser cette validation croisée, nous avons essayé de valider la base de données en utilisant une matrice de classification "jackknife" qui consiste à calculer une fonction en éliminant un cas à la fois et en appliquant la classification au cas éliminé. Avec cette approche, les résultats de la classification étaient à peu près similaires à ceux qui avaient été obtenus à partir de l'ensemble des cas, indiquant que la fonction retenue comporte un nombre adéquat de prédicteurs.

En conclusion, nous avons montré que par la prise en compte simultanée des concentrations plasmatiques de corticoïdes et de la créatininurie, on pouvait obtenir une bonne discrimination des ovins sains et atteints de tremblante. Cette méthode présente une bonne sensibilité et n'est pas trop lourde à réaliser, elle s'intègre très bien dans la première phase d'élaboration d'un test diagnostique de la tremblante. Notre approche de dépistage pourrait être étendue à d'autres ESST, en particulier à l'ESB. Mais, la recherche d'autres molécules, dont les concentrations seraient altérées lors de l'évolution des maladies à prions, et fournissant une information complémentaire serait indispensable pour pouvoir envisager un dépistage de première intention des maladies à prions.

## **II – 2 – 2. EXPLORATION DE LA FONCTION CORTICOTROPE DE LA BREBIS A GENOTYPE SENSIBLE A LA TREMBLANTE PENDANT LES PHASES PRECLINIQUE ET CLINIQUE DE LA MALADIE**

L'objectif de cette étude a été de déterminer la précocité du marqueur plasmatique et urinaire surrénalien et sa sensibilité pendant les phases précliniques et cliniques de la tremblante par l'exploration de la fonction corticotrope de brebis à génotype sensible ou résistant à la tremblante pendant les phases préclinique et clinique de la maladie [PICARD HAGEN, N., *et al.*, 2001].

Le gène majeur de sensibilité à la tremblante est le gène Prn-p qui code pour la protéine PrPc. Les codons 136, 154 et 171 du gène Prn-p jouent un rôle majeur dans le contrôle de la sensibilité à la tremblante avec une protection apportée par les allèles arginine en position 171 et histidine en position 154. Le codon 136 joue un rôle modulateur de la sensibilité qui augmente avec le nombre d'exemplaires de l'allèle valine (0, 1, 2) [ELSEN, J., *et al.*, 1999]. Ainsi, les individus à génotype AARRRR sont résistants, les individus à génotype AARRQQ, AVRRQQ et VVRRQQ sont respectivement sensibles, fortement sensibles et très sensibles.

### **a) Matériels et méthodes**

Nous avons réalisé une étude longitudinale de 3 ans, sur 49 brebis, issues du troupeau Romanov de la SAGA (Station INRA d'Amélioration Génétique des Animaux). Ce troupeau présente une très forte incidence de tremblante (environ 250 cas de tremblante en moins de trois ans dans un troupeau d'un effectif initial de 600 têtes). La population de 49 brebis comprenait 10 brebis à génotype résistant (AARR), 3 brebis à génotype très sensible (VVQQ), 13 brebis à génotype fortement sensible (AVQQ) et 23 brebis à génotype sensible (AAQQ) (tableau 9).

**Tableau 9:** Répartition des brebis du troupeau expérimental en fonction du polymorphisme aux codons 136, 154 et 171 du gène Prn-p et des caractères correspondants de sensibilité/résistance à la tremblante

	AARRRR	AARRQQ	AVRRQQ	VVRRQQ	Total
Sensibilité vs résistance	Résistants	Sensibles (30%)	Fortement sensibles (50%)	Très sensibles (100%)	
Nombre brebis	10	23	13	3	49

A : allèle Alanine, R : allèle Arginine, V : allèle Valine, Q : allèle glutamine

Les codons 136, 154 et 171 du gène Prn-p jouent un rôle majeur dans le contrôle de la sensibilité à la tremblante avec une protection apportée par les allèles arginine en position 171 et histidine en position 154. Le codon 136 joue un rôle modulateur de la sensibilité qui augmente avec le nombre d'exemplaires de l'allèle valine (0, 1, 2).

Le nombre entre parenthèses indique pour chaque génotype, le pourcentage théorique de brebis atteintes de tremblante avant l'âge de 3 ans.

Le tableau 10 indique la répartition des brebis en fonction de leur année de naissance dans les différents groupes.

**Tableau 10 :** Répartition des brebis du troupeau expérimental en fonction de leur génotype et de leur année de naissance.

Année de naissance	AARRRR Résistants	AARRQQ Sensibles	AVRRQQ Fortement sensibles	VVRRQQ Très sensibles	Total
1987			1		1
1988			2		2
1990			1		1
1991		13			13
1992		4	1		5
1993		1			1
1994		4	1		5
1995		1	1		2
1996	10		6	3	19
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>23</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>49</b>

Des prélèvements sanguins et urinaires ont été réalisés tous les 2 mois jusqu'au 15.02.2000, soit 18 séances de prélèvements. Au cours de l'étude, les brebis qui ont manifesté des troubles cliniques (symptômes nerveux, toxémie de gestation, diarrhée, arthrite...) ont été transférées à l'ENVT en vue de prélèvements en phase clinique de la maladie. Les brebis ont été sacrifiées en fin d'évolution de la maladie et ont subi un examen histopathologique standard pour confirmer ou infirmer le diagnostic de tremblante. Pour les brebis à génotype sensible dont le diagnostic histopathologique s'est révélé négatif, cet examen a été complété par une détection de la PrPsc par immunocytochimie. Les dosages des corticoïdes urinaires et plasmatiques ont été réalisés par HPLC. Les valeurs de concentrations inférieures à la limite de quantification du dosage ont été arbitrairement fixées à 1,25 ng/ml, les valeurs non détectées ont été fixées à 0,625 ng/ml.

## b) Résultats

Le tableau 11 montre la répartition des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histopathologie ou immunohistochimie parmi les brebis mortes au cours des différentes années de l'étude, en fonction de leur génotype et de leur année de naissance.

**Tableau 11 :** Répartition des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie parmi les brebis mortes au cours de l'étude en fonction de leur génotype et de leur année de naissance.

Année de naissance	AARRRR Résistants	AARRQQ Sensibles	AVRRQQ Fortement sensibles	VVRRQQ Très sensibles	Total
1987			0/1		<b>0/1</b>
1988			0/1		<b>0/1</b>
1990			1/1		<b>1/1</b>
1991		3/7			<b>3/7</b>
1992		1/2			<b>1/2</b>
1993					
1994					
1995		0/1	1/1		<b>1/2</b>
1996	0/2		4/5	2/3	<b>6/10</b>
<b>Total</b>		<b>4</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>12/24</b>

Parmi les 24 brebis mortes, 12 brebis à génotype sensible (2/3 VVRRQQ, 6/9 AVRRQQ, 4/10 AARRQQ) ont été diagnostiquées tremblante, la moitié d'entre elles avaient moins de 3 ans. La plupart des brebis ont été diagnostiquées tremblante en 1998 (n=7). Depuis décembre 1998, seulement 3 nouveaux cas de tremblante ont été détectés au sein du troupeau expérimental.

Le tableau 12 indique la répartition des brebis mortes au cours de l'étude selon leur génotype en fonction de l'établissement ou non du diagnostic de tremblante et du signe du diagnostic.

**Tableau 12** : Répartition des brebis mortes au cours de l'étude en fonction de l'établissement ou non du diagnostic positif ou négatif de tremblante selon leur génotype.

	AARRRR Résistants	AARRQQ Sensibles	AVRRQQ Fortement sensibles	VVRRQQ Très sensibles	<b>Total</b>
Diagnostic positif		4	6	2	<b>12</b>
Diagnostic négatif	2	4	1	1	<b>8</b>
Pas de diagnostic		2	2		<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>24</b>

Ainsi, pour 4 brebis à génotype sensible mortes spontanément, le diagnostic histopathologique n'a pu être réalisé. Le prélèvement de l'encéphale sur 4 brebis à génotype sensible mortes spontanément a permis d'établir le diagnostic de tremblante pour 3 d'entre elles. Parmi les 17 brebis ayant présenté des troubles cliniques et transférées à l'ENVN, 10 ont été diagnostiquées atteintes de tremblante. Des prélèvements sanguins et/ou urinaires ont pu être obtenus en phase clinique pour 8 d'entre elles (le jour de l'euthanasie pour 4 brebis et aux temps J-1, J-5, J-29 ou J-77 avant l'euthanasie pour les autres). Le tableau 13 montre la répartition des brebis mortes au cours de l'étude selon la nature des troubles cliniques et en fonction de l'établissement ou non d'un diagnostic positif ou négatif de tremblante.

**Tableau 13 :** Répartition des brebis mortes au cours de l'étude en fonction de la nature des troubles cliniques et de l'établissement ou non du diagnostic positif ou négatif de tremblante.

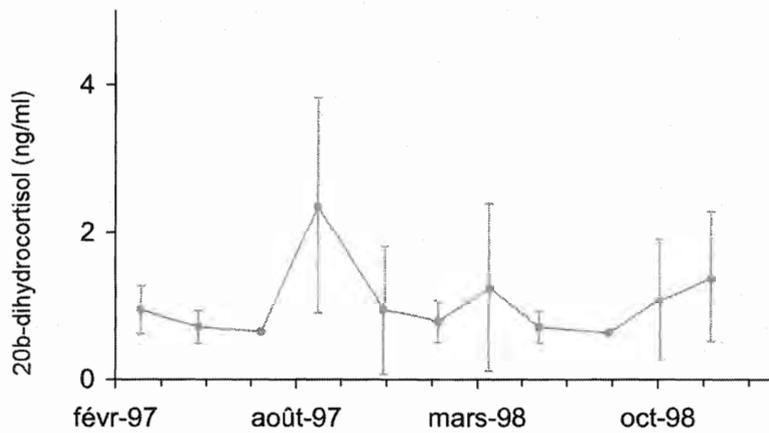
Signes cliniques	Diagnostic positif	Diagnostic négatif	Pas de diagnostic	Total
Signes nerveux	11	2		<b>13</b>
Autres signes (problèmes respiratoires, arthrite, avortement, ostéomyélite mandibulaire...)	1	6		<b>7</b>
Absence (mort spontanée)			4	<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>24</b>

Parmi les 12 brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi, 11 brebis avaient manifesté des troubles nerveux. Deux brebis ayant présenté des signes nerveux n'ont pas été diagnostiquées atteintes de tremblante par histopathologie ou immunohistochimie.

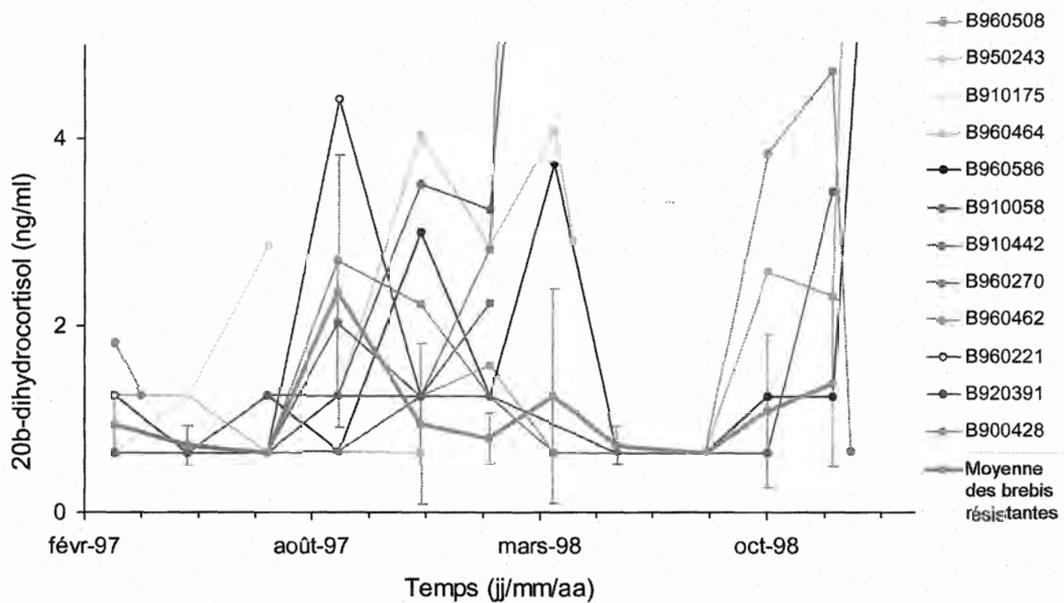
Les dosages des corticoïdes plasmatiques et urinaires des échantillons issus de 8 brebis à génotype résistant toujours vivantes à la fin de l'étude (brebis saines) ont été systématiquement réalisés du 11/03/97 au 01/12/98 (figure 17).

Les dosages des corticoïdes plasmatiques et urinaires des échantillons issus des brebis qui ont été diagnostiquées tremblantes ont été effectués. Les tableaux 15 à 20 en annexe illustrent les variations temporelles des concentrations plasmatiques et urinaires en corticoïdes des brebis qui ont été diagnostiquées atteintes de tremblante et les variations concomitantes au cours de l'année des concentrations moyennes (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines.

Huit brebis sur 12 ont présenté en phase clinique de tremblante des concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol supérieures ou égales à la moyenne incrémentée de 2 fois l'écart-type des valeurs des brebis saines à la même période de l'année. L'augmentation des concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol a été détectée à des moments variables par rapport à la date de mort des animaux: aux temps J0, J-23, J-60, J-78, J-103, J-110, J-164, J-210 avant l'euthanasie (figure 18).



**Figure 17 :** Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques (moyenne  $\pm$  SD) en 20 $\beta$ -dihydrocortisol des brebis à génotype résistant à la tremblante (brebis témoins) au cours de la première année de l'étude expérimentale



**Figure 18 :** Evolution au cours du temps des concentrations plasmatiques individuelles de 20 $\beta$ -dihydrocortisol chez les brebis sensibles à la tremblante et ayant développé la maladie au cours de la période févr-97 - févr-99. Les courbes interrompues correspondent à des animaux morts en cours de suivi. La courbe grise plus épaisse représente la moyenne des concentrations en 20 $\beta$ -dihydrocortisol de 8 brebis à génotype résistants (voir figure 17)

## c) Conclusion

Les valeurs des cortisolémies observées chez les brebis saines à génotype résistant sont équivalentes aux valeurs physiologiques décrites chez cette espèce montrant que les prélèvements ont été réalisés dans des conditions non stressantes et adéquates pour interpréter des variations des profils de concentrations. Le nombre de brebis atteintes de tremblante (12) est du même ordre que celui prévu par les généticiens d'après la composition du lot expérimental initial (16 brebis, il est à noter que le diagnostic n'a pu être obtenu pour 3 brebis à génotype sensible mortes spontanément). Actuellement, compte tenu de l'âge des brebis (>4 ans) et du nombre de brebis à génotype sensible (17 dont 4 à génotype fortement sensible et 13 à génotype sensible), la probabilité d'occurrence de nouveaux cas de tremblante dans les prochaines années est faible et justifie la décision de conclure cette étude.

Les résultats obtenus confirment l'existence d'un syndrome d'hypercorticisme chez la majorité des brebis atteintes de tremblante (de l'ordre de 70%). L'absence de ce syndrome chez près de 30% des brebis laisse présager une sensibilité insuffisante d'un test diagnostique basé sur l'évaluation des marqueurs de la fonction corticosurrénalienne.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Nous avons démontré l'existence d'un syndrome d'hypercorticisme des brebis naturellement atteintes de tremblante. Les concentrations plasmatiques et urinaires en corticoïdes (cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol, cortisone et 20 $\beta$ -dihydrocortisone) des brebis atteintes de tremblante étaient plus élevées que celles des brebis témoins [SCHELCHER, F., *et al.*, 1999]. En utilisant uniquement deux marqueurs, la concentration plasmatique en 20 $\beta$ -dihydrocortisol et la créatininurie, nous avons été capables de discriminer efficacement 2 sous-populations : une population vraisemblablement saine et une population de brebis susceptibles d'être atteintes de tremblante.

Plus récemment nous avons montré que cet hypercorticisme des ovins atteints de tremblante était associé à (i) une augmentation de la sécrétion d'ACTH hypophysaire (ii) une hyperréactivité des glandes surrénales à l'action de l'hormone corticotrope [GAYRARD, V., *et al.*, 2000 ; GALEA-GRANDJEAN, J., 2001], (iii) une réduction de la capacité maximale de fixation de la protéine spécifique du transport du cortisol, la CBG ou transcortine [PICARD HAGEN, N., *et al.*, 2000 ; TOURON, C., 2001] et (iv) une diminution du rétrocontrôle exercé par la dexaméthasone au niveau hypophysaire. Ces résultats sont en faveur d'une atteinte des systèmes neuronaux de rétrocontrôle du cortisol.

Chez la brebis, les systèmes adrénergiques centraux exercent un contrôle stimulateur de la sécrétion de GH via l'activation des récepteurs centraux  $\alpha$ 2-adrénergiques. Une perturbation de ces récepteurs centraux  $\alpha$ 2-adrénergiques a été rapportée chez les vaches atteintes de BSE [BRAUN, U., *et al.*, 1999]. L'intégrité des systèmes  $\alpha$ 2-adrénergiques centraux des brebis atteintes de tremblante a été testée par l'exploration de la fonction somatotrope. Les premiers résultats montrent que la sécrétion de GH est fortement accrue chez les brebis atteintes de tremblante et que la réponse à une stimulation pharmacologique des récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques est amplifiée chez ces animaux. Une étude est en cours de réalisation au laboratoire pour caractériser la sécrétion pulsatile de GH et identifier les mécanismes impliqués dans l'augmentation importante de ses sécrétions chez les brebis atteintes de tremblante par l'évaluation de bilans métaboliques (insuline, glycémie, acide gras, libres, IGFI, IGFII et leptine) et par la réalisation de tests d'exploration fonctionnelle.

Maintenant, notre but est d'étendre la plasmathèque de brebis saines, atteintes de tremblante ou d'autres maladies afin de déterminer une combinaison de signaux biologiques (endocriniens ou métaboliques) qui permettront de discriminer, dans les élevages ou à

l'abattoir, une population de moutons susceptibles de présenter la tremblante. Sur cette population d'animaux à risque, des tests plus coûteux et plus invasifs pourraient être réalisés (biopsie d'amygdales, par exemple) afin de diagnostiquer plus spécifiquement les animaux atteints de tremblante.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**M. GRANDJEAN Christophe, Jean-Philippe**

a été admis(e) sur concours en : 1995

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 8 juillet 1999

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussignée, Nicole HAGEN-PICARD, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, déclare que j'ai lu la thèse de :

**M. GRANDJEAN Christophe, Jean-Philippe**

intitulée :

*Hypercortisolémie majeure chez la brebis atteinte de tremblante : application à la recherche de marqueurs de la tremblante*

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



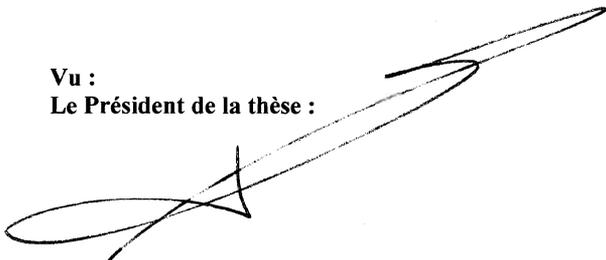
**Docteur Nicole HAGEN-PICARD**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



**Professeur Gilbert BONNES**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**



**Professeur Jean PARINAUD**

**Vu le : 22 mai 2001  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**



**Professeur R. BASTIDE**



## **BIBLIOGRAPHIE**



- AISEN, P. and PASINETTI, G.  
Glucocorticoids in Alzheimer's disease  
*Drug & Aging*, 1998, **12**, 1, 1-6.
- ALVINERIE, M. and TOUTAIN, P.  
Simultaneous determination of corticosterone, hydrocortisone, and dexamethasone in dog plasma using high performance liquid chromatography  
*J. Pharm. Sci.*, 1982, **71**, 7, 816 - 818.
- ANDREOLETTI, O., BERTHON, P., MARC, D., SARRADIN, P., GROSCLAUDE, J., VAN KEULEN, L., SCHELCHER, F., ELSEN, J. and LANTIER, F.  
Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie  
*J. Gen. Virol.*, 2000, **81**, 3115-3126.
- BANISSI-SABOURDY, C., PLANQUES, B., DAVID, J.-P., JEANNIN, C., POTEL, M., BIZIEN, A., DI MENZA, C., BRUGERE-PICOUX, J., BRUGERE, H., CHATELAIN, J. and BUVET, R.  
Electroanalytical characterization of Alzheimer's disease and ovine spongiform encephalopathy by repeated cyclic voltammetry at a capillary graphite paste electrode.  
*J. Electroanal. Chem.*, 1992, **343**, 127-147.
- BARALON, P. and GARY, F.  
Filière bovine : conséquences économiques de la "crise de la vache folle".  
*Point Vét.*, 1996, **28**, 179, 697-703.
- BARALON, P. and GARY, F.  
Autopsie d'une crise.  
*Bull. GTV*, 2000, **9**, 170-174.
- BARNETT, K. and PALMER, A.  
Retinopathy in sheep affected with natural scrapie  
*Res. Vet. Sci.*, 1971, **12**, 383-385.
- BECK, E., DANIEL, P. and PARRY, H.  
Degeneration of the cerebellar and hypothalamo-neurohypophysial systems in sheep with scrapie and its relationship to human system degenerations.  
*Brain*, 1964, **87**, 153-176.
- BELL, M., WOOD, C. and KELLER-WOOD, M.  
Influence of reproductive state on pituitary-adrenal activity in the ewe.  
*Domest. Anim. Endocrinol.*, 1991, **8**, 245-254.
- BRAUN, U., ABGOTTSPON, S., GUBLER, E. and SCHWEIZER, T.  
Decreased sedation by xylazine and high blood pressure in cows with BSE  
*Vet. Rec.*, 1999, **44**, 715 - 717.

- CARP, R., KIM, S. and CALLAHAN, S.  
Pancreatic lesions and hypoglycemia-hyperinsulinemia in scrapie-infected hamster  
*J. Infect. Dis.*, 1990, **161**, 462-466.
- CHAPLIN, M., ALDRICH, A. and STACK, M.  
Scrapie associated fibril detection from formaldehyde fixed brain tissue in natural cases of ovine scrapie  
*Res. Vet. Sci.*, 1998, **64**, 41 - 44.
- CUILLE, J. and CHELLE, P.  
Pathologie animale. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?  
*C. R. Acad. Sci.* , 1936, **26**, 1552-1554.
- DETWILER, L.  
Scrapie  
*Revue des Sciences et des Techniques*, 1992, **11**, 2, 491 - 537.
- DORMONT, D.  
Les agents transmissibles non conventionnels ou prions  
*Rev. Prat.*, 1994, **44**, 7, 882-887.
- ELSEN, J., AMIGUES, Y., SCHELCHER, F., DUCROQ, V., ANDREOLETTI, O., EYCHENNE, F., TIEN KHANG, J., POIVEY, J., LANTIER, F. and LAPLANCHE, J.  
Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie : detailed analysis of an endemic in a closed flock of romanov  
*Arch. Virol.*, 1999, **144**, 431 - 445.
- ELSEN, J., VU TIEN KHANG, J. and CLOUSCARD, C.  
Sensibilité génétique aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles  
*Point Vét.*, 1996, **28**, 179, 655 - 660.
- FARQUHAR, C., SOMERVILLE, R. and RITCHIE, L.  
Post-mortem immunodiagnosis of scrapie and bovine spongiform encephalopathy  
*J. Virol. Methods*, 1989, **24**, 1 - 2, 215 - 221.
- FULKERSON, W. and JAMIESON, P.  
Pattern of cortisol released in sheep following administration of synthetic ACTH or imposition of various stressor agents  
*Aust. J. Biol. Sci.*, 1982, **35**, 215 - 222.
- GAILLY, G.  
Etudes des voies majeures de métabolisation du cortisol chez le cheval  
Th. : Med. vet., Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 1998, 4045,
- GALEA-GRANDJEAN, J.  
Exploration fonctionnelle de l'axe corticotrope de la brebis atteinte de tremblante  
Th. : Med. vet., Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 2001,
- GAYRARD, V., HAGEN-PICARD, N., GRINO, M., SAUZE, N., GRANDJEAN, C., GALEA, J., ANDREOLETTI, O., SCHELCHER, F. and TOUTAIN, P.  
Major hypocorticism is an endocrine feature of ewes with naturally occurring scrapie  
*Endocrinology*, 2000, **141**, 3, 988 - 994.

- GOMEZ BRUNET, A. and LOPEZ SEBASTIAN, A.  
Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes  
*Anim. Reprod. Sci.*, 1991, **26**, 251-268.
- GRASSI, J., CREMINON, C., FROBERT, Y., FRETIER, P., TURBICA, I., REZAEI, H., HUNSMANN, G., COMOY, E. and DESLYS, JP.  
Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE.  
*Arch. Virol. Suppl.*, 2000, **16**, 197-205.
- GRILLI, M. and MEMO, M.  
Nuclear factor-kappaB/Rel proteins. A point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction  
*Biochem. Pharmacol.*, 1999, **57**, 1-7.
- HADLOW, W., KENNEDY, R. and RACE, R.  
Natural infection of suffolk sheep with scrapie virus.  
*J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 657-664.
- HEGGEBO, R., PRESS, C., GUNNES, G., LIE, K., TRANULIS, M., ULVUND, M., GROSCHUP, M. and LANDSVERK, T.  
Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent  
*J. Gen. Virol.*, 2000, **81**, 2327-2337.
- HOURRIGAN, J., KLINGSPORN, A., CLARK, W. and DECAMP, M.  
Epidemiology of scrapie in United States.  
In: S. H. PRUSINER, WG., Slow transmissible diseases of the nervous system: New York, Academic Press, 1979, 331-356
- KIM, H., O'ROURKE, K., WALTER, M., PURCHASE, H., ENCK, J. and SHIN, T.  
Immunohistochemical detection of scrapie prion proteins in clinically normal sheep in Pennsylvania  
*J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 89-91.
- KIM, Y., CARP, R., CALLAHAN, S. and WISNIEWSKY, H.  
Adrenal involvement in scrapie-induced obesity.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1988, **189**, 21 - 27.
- KORTH, C., STIERLY, B., STREIT, P., MOSER, M., SCHALLER, O., FISCHER, R., SCHULZ-SCAEFFER, W., KRETZSCHMAR, H., RAEBER, A., BRAUN, U., EHRENSPERGER, F., HORNEMANN, S., GLOCKSHUBER, R., RIEK, R., BILLETER, M., WUTHRICH, K. and OESCH, B.  
Prion (PrP<sup>sc</sup>)-specific epitope defined by a monoclonal antibody.  
*Nature*, 1997, **390**, 74-77.
- LEY, S., LIVINGSTON, A. and WATERMAN, A.  
Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep  
*Vet. Rec.*, 1991, **129**, 45-47.

- LEY, S., WATERMAN, A., LIVINGSTON, A. and PARKINSON, T.  
Effect of chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep : a field study  
*Res. Vet. Sci.*, 1994, **57**, 332 - 335.
- MADEC, J. Y., BELLI, P., CALAVAS, D. and BARON, T.  
Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France  
*Vet Rec*, 2000, **146**, 3, 74-76.
- MCINTOSH, L. and SAPOLSKY, R.  
Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity  
*Neurotoxicology*, 1996, **17**, 873-882.
- MCNATTY, K., CASHMORE, M. and YOUNG, A.  
Diurnal variation in plasma cortisol levels in sheep  
*J. Endocrinol.*, 1972, **54**, 361-362.
- O'ROURKE, K., BASZLER, T., BESSER, T., MILLER, J., CUTLIP, R., WELLS, G., RYDER, S., PARISH, S., HAMIR, A., COCKETT, N., JENNY, A. and KNOWLES, D.  
Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue  
*J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 9, 3254 - 3259.
- O'ROURKE, K., BASZLER, T., PARISH, S. and KNOWLES, D.  
Preclinical detection of PrPsc in nictating membrane lymphoid tissue of sheep  
*Vet. Rec.*, 1998, **142**, 489 - 491.
- OUTRAM, G., DICKINSON, A. and FRASER, H.  
Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration  
*Nature*, 1974, **249**, 855-856.
- PARROT, R., MISSON, B. and DE LA RIVA, C.  
Differential stressor effects on the concentrations of cortisol, prolactin and catecholamines in the blood of sheep  
*Res. Vet. Sci.*, 1994, **56**, 234 - 239.
- PARRY, H. and LIVETT, B.  
A new hypothalamic pathway to the median eminence containing neurophysin and its hypertrophy in sheep with natural scrapie  
*Nature*, 1973, **242**, 63 - 64.
- PATTISON, I.  
Fifty years with scrapie : a personal reminiscence.  
*Vet. Rec.*, 1988, **123**, 26-27, 661-666.
- PICARD-HAGEN, N., GAYRARD, V., ALVINERIE, M., LAROUTE, V., GRANDJEAN, C., ANDREOLETTI, O., ELSÉN, J.M., SCHELCHER, F and TOUTAIN, P.-L.  
Discriminant value of blood and urine corticoids for the pre-mortem diagnosis of scrapie  
*Vet. Rec.*, accepté

PICARD HAGEN, N., GAYRARD, V., ALVINERIE, M., LAROUTE, V., TOURON, C., ANDREOLETTI, O. and TOUTAIN, P.-L.

Naturally occurring scrapie is associated with a lower CBG binding capacity in ewes  
*J. Endocrinol.*, 2000, **165**, 527-532.

PICARD-HAGEN, N., GAYRARD, V., ANDREOLETTI, O., GALEA, J., GRANDJEAN, C., MANDON-MAURICE, F., CABANIE, P., SCHELCHER, F. and TOUTAIN, P.-L.

Melatonin and prolactin secretion profile in naturally occurring scrapie in ewe  
*J. Pineal Res.*, 1998, **24**, 117 - 122.

PORTALUPPI, F., CORTELLI, P., AVONI, P., VERGNANI, L., CONTIN, M., MALTONI, P., PAVANI, A., SFORZA, E., UBERTI, E., GAMBETTI, P. and LUGARESI, E.

Diurnal blood pressure variation and hormonal correlates in fatal familial insomnia.  
*Hypertension*, 1994, **23**, 569-576.

PRUSINER, S.

The prion diseases

*Brain Pathol.*, 1998, **8**, 3, 499-513.

PRUSINER, S. and SCOTT, M.

Prion protein biology

*Cell*, 1998, **93**, 3, 337-348.

REITER, R.

The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals

*Endocr. Rev.*, 1980, **1**, 2, 109-131.

SAPOLSKY, R.

Why stress is bad for your brain

*Science*, 1996, **273**, 749-750.

SCHELCHER, F., ANDREOLETTI, O. and CABANIE, P.

La tremblante des ovins

*Point Vét.*, 1996, 661-666.

SCHELCHER, F., PICARD-HAGEN, N., LAROUTE, V., GAYRARD, V., POPOT, M., ANDREOLETTI, O. and TOUTAIN, P.

Corticoid concentrations are increased in the plasma and urine of ewes with naturally occurring scrapie

*Endocrinology*, 1999, **140**, 2422-2425.

SCHMERR, M. and JENNY, A.

A diagnostic test for scrapie-infected sheep using a capillary electrophoresis immunoassay with fluorescent-labeled peptides

*Electrophoresis*, 1998, **19**, 409 - 414.

SCHMERR, M. and JENNY, A.

Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with transmissible spongiform encephalopathy

*J. Chromatogr. A*, 1999, **853**, 207 - 214.

SCHNEIDER, J. and HORSTMANN, P.  
Effects of incubating compound E and related steroids with various surviving rat tissues  
*J. Biol. Chem.*, 1952, **196**, 629 -639.

SCHREUDER, B.  
Animal spongiform encephalopathies - an update part 1. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies  
*Vet. Quarterly*, 1994, **16**, 174 - 181.

SCHREUDER, B.  
Animal spongiform encephalopathies - an update part 2. Bovine spongiform encephalopathy  
*Vet. Quarterly*, 1994, **16**, 182 - 192.

SCHREUDER, B., VAN KEULEN, L., VROMANS, M., LANGEVELD, J. and SMITS, M.  
Tonsillar biopsy and PrPsc detection in the preclinical diagnosis of scrapie  
*Vet. Rec.*, 1998, **142**, 564 - 568.

SHAH, V., MIDHA, K., DIGHE, S., MCGILVERAY, I., SKELLY, J., YACOBI, A., LAYLOFF, T., VISWANATHAN, C., EDGAR COOK, C., MCDOWALL, RDPITTMAN, K. and SPECTOR, S.  
Analytical methods validation : bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies  
*J. Pharm. Sci.*, 1992, **81**, 3, 309 - 312.

SIMONETTA, G., WALKER, D. and MCMILLEN, I.  
Effect of feeding on the diurnal rythm of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone concentrations in the pregnant ewe and sheep fetus.  
*Exp. Physiol.*, 1991, **76**, 219-229.

SLOT, C.  
Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffé reaction method  
*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* , 1965, **174**, 381 - 387.

STACK, M., ALDRICH, A., KITCHING, A. and SCOTT, A.  
Comparative study of electron microscopical techniques for the detection of scrapie-associated fibrils  
*Res. Vet. Sci.*, 1995, **59**, 247 - 254.

STRAIN, G., OLCOTT, B. and WILLIAM, F.  
Electroencephalogram and evoked potentials in naturally occurring scapie in sheep.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 828-836.

TESSONEAUD, A., COOPER, H., CADANI, M., LOCATELLI, A. and VIGUIER-MARTINEZ  
The suprachiasmatic nucleus in the sheep : retinal projections and cytoarchitectural organization.  
*Cell Tiss. Res.*, 1994, **278**, 65-84.

THRUSFIELD, M.  
Veterinary epidemiology. 2<sup>ème</sup> édition. Cambridge : Blackwell Science, 1995. 479 p.

TOBLER, I., GAUS, S., DEBOER, T., ACHERMANN, P., FISHER, M., RULICKE, T., MOSER, M., OESCH, B., MCBRIDE, P. and MANSON, J.

Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein

*Nature*, 1996, **380**, 639 - 642.

TOURON, C.

Mise en évidence d'un syndrome hypercorticisme majeur chez la brebis atteinte de tremblante  
Th. : Med. vet., Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 2001,

VAN KEULEN, L., SCHREUDER, B., MELOEN, R., MOOIJ-HARKES, G., VROMANS, M. and LANGEVELD, J.

Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie

*J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 5, 1228 - 1231.

WHITHALL, M. H., SMYTH, D. and GAINER, H.

Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats

*Neuroendocrinology*, 1987, **45**, 5, 420-424.

WILLIAMS, A., VAN DAM, A.-M., RITCHIE, D., EIKELENBOOM, P. and 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 Res.*, 1997, **754**, 171-180.

YE, X. and CARP, R.

Histopathological changes in the pituitary glands of female hamsters infected with the 139H strain of scrapie.

*J. Comp. Pathol.*, 1996, **114**, 291 - 304.

YE, X., CARP, R., YU, Y., KOZIELSKI, R. and KOZLOWSKI, P.

Effect of infection with the 139H scrapie strain on the number, area and/or location of hypothalamic CRF- and VP- immunostained neurons.

*Acta Neuropathol.*, 1994, **88**, 44-54.



**ANNEXES**



**Tableau 14 :** Classification et nomenclature des acides aminés et codons correspondants.

(U = Uracile, A = Adénine, C = Cytosine, G = Guanine)

Acides aminés	Nomenclature en 3 lettres	Nomenclature en 1 lettre	Poids moléculaire (daltons)	Codons correspondants
Alanine	Ala	A	89	GCA GCC GCG GCU
Cystéine	Cys	C	121	UGC UGU
Acide aspartique	Asp	D	133	GAC GAU
Acide glutamique	Glu	E	147	GAA GAG
Phénylalanine	Phe	F	165	UUC UUU
Glycine	Gly	G	75	GGA GGC GGG GGU
Histidine	His	H	155	CAC CAU
Isoleucine	Ile	I	131	AUA AUC AUU
Lysine	Lys	K	146	AAA AAG
Leucine	Leu	L	131	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
Méthionine	Met	M	149	AUG
Asparagine	Asn	N	132	AAC AAU
Proline	Pro	P	115	CCA CCC CCG CCU
Glutamine	Gln	Q	146	CAA CAG
Arginine	Arg	R	174	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Sérine	Ser	S	105	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Thréonine	Thr	T	119	ACA ACC ACG ACU
Valine	Val	V	117	GUA GUC GUG GUU
Tryptophane	Trp	W	204	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	181	UAC UAU

		GENOTYPE																
		VRRQQ				AVRRQQ								AARRQQ				
DATE	960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET				
11/03/97	0,7	0,7	1,8	1,3	1,3	0,7	0,7	1,3	0,7	0,7	1,3	0,7	1,0 ± 0,3	1,6				
<b>03/04/97</b>			<b>1,3</b>															
13/05/97	0,7	0,7		0,7	1,3	0,7	0,7	0,7	0,7	1,3	0,7	0,7	0,7 ± 0,2	1,1				
22/07/97	0,7	0,7		0,7	0,7	0,7	0,7	1,3	0,7	2,9	0,7	1,3	0,7 ± 0,0	0,7				
23/09/97	0,7	0,7		4,4	1,3	0,7	2,7	0,7	1,3		2,0	1,3	2,4 ± 1,5	5,3				
05/12/97	0,7	1,3		1,3	4,0	1,3	2,2	3,0	3,5		1,3	1,3	1,0 ± 0,9	2,7				
03/02/98		1,6			2,9	2,8	1,3	1,3	3,3		2,3	1,3	0,8 ± 0,3	1,4				
<b>26/03/98</b>						<b>18,9</b>												
31/03/98		0,7			4,1		0,7	3,7					1,3 ± 1,1	3,5				
<b>17/04/98</b>					<b>2,9</b>													
<b>29/04/98</b>																		
<b>14/05/98</b>									<b>18,1</b>									
26/05/98		0,7					0,7	0,7				0,7	0,7 ± 0,2	1,1				
11/08/98		0,7					0,7	0,7				0,7	0,7 ± 0,0	0,7				
06/10/98		2,6					3,9	1,3				0,7	1,1 ± 0,8	2,7				
01/12/98		2,3					4,7	1,3				3,5	1,4 ± 0,9	3,2				
<b>17/12/98</b>							<b>0,7</b>											
<b>22/12/98</b>		<b>10,3</b>																
<b>13/01/99</b>								<b>9,3</b>										
Date mort	02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99						

**Tableau 15 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de 20β-dihydrocortisol (ng/ml) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).

		GENOTYPE																				
		VRRQQ								AVRRQQ								AARRQQ				
DATE		960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET							
11/03/97		6,6	3,4	5,68	19,2	20,6	1,3	12,3	11,4	16,8	2,0	13,5	16,9	16,2 ± 10,1	36,5							
<b>03/04/97</b>				<b>9,69</b>																		
13/05/97		8,9	0,7		11,6	6,0	0,7	0,7	0,7	6,6	26,4	0,7	0,7	11,3 ± 5,2	21,8							
22/07/97		7,4	11,5		19,2	20,5	11,9	0,7	10,1	8,4	75,7	37,1	10,2	11,0 ± 4,8	20,5							
23/09/97		13,5	17,1		27,3	14,7	26,4	18,6	10,3	23,3		12,0	15,0	18,9 ± 8,4	35,6							
05/12/97		53,4	29,3		9,7	18,4	8,7	14,4	31,1	54,4		22,2	26,7	25,4 ± 16,2	58,0							
03/02/98			10,5			11,4	16,5	9,4	12,8	34,4		13,7	16,1	12,2 ± 4,7	21,6							
<b>26/03/98</b>							<b>164,9</b>															
31/03/98			17,5			40,3		12,0	13,9					12,4 ± 3,6	19,7							
<b>17/04/98</b>						<b>4,8</b>																
<b>29/04/98</b>																						
<b>14/05/98</b>										<b>117,2</b>												
<b>18/05/98</b>																						
26/05/98			0,7					0,7	0,7				0,7	6,9 ± 5,3	17,6							
11/08/98			0,7					0,7	11,0				0,7	6,3 ± 4,9	16,1							
06/10/98			14,7					48,3	19,8				0,7	15,0 ± 7,7	30,3							
01/12/98			10,0					69,2	37,8				14,6	18,9 ± 8,4	35,6							
<b>17/12/98</b>								<b>22,9</b>														
<b>22/12/98</b>			<b>64,9</b>																			
<b>13/01/99</b>									<b>10,0</b>													
Date		02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99									
mort																						

**Tableau 16 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de cortisol (ng/ml) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).

		GENOTYPE																	
		VRRQQ							AVRRQQ							AARRQQ			
DATE	960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET					
11/03/97	0,7	1,3	2,26	1,3	1,3	0,7	1,3	1,3	1,3	1,3	3,3	1,3	1,6 ± 0,7	3,0					
<b>03/04/97</b>			<b>6,16</b>																
13/05/97	0,7	0,7		0,7	4,3	0,7	0,7	0,7	0,7	12,5	0,7	0,7	1,3 ± 1,8	4,9					
22/07/97	0,7	0,7		0,7	0,7	0,7	0,7	9,9	0,7	19,0	0,7	0,7	0,7 ± 0,0	0,7					
23/09/97	0,7	0,7		7,8	13,3	0,7	1,3	0,7	20,0		13,2	0,7	3,2 ± 3,5	10,2					
05/12/97	6,2	1,3		6,3	3,2	0,7	1,3	3,2	1,3		1,3	3,1	3,0 ± 1,7	6,3					
03/02/98		0,7			4,7	5,1	6,2	0,7	15,7		6,7	0,7	1,5 ± 2,3	6,1					
<b>26/03/98</b>						<b>23,5</b>													
31/03/98		9,9			21,0		0,7	0,7					1,7 ± 2,8	7,3					
<b>17/04/98</b>					<b>4,0</b>														
<b>29/04/98</b>																			
<b>14/05/98</b>																			
<b>18/05/98</b>									<b>26,2</b>										
26/05/98		0,7					0,7	0,7				0,7	0,7 ± 0,0	0,7					
11/08/98		0,7					0,7	0,7				0,7	0,7 ± 0,1	0,9					
06/10/98		0,7					9,0	0,7				0,7	2,6 ± 2,7	8,0					
01/12/98		0,7					15,1	12,0				0,7	5,2 ± 3,0	11,3					
<b>17/12/98</b>							<b>9,5</b>												
<b>22/12/98</b>		<b>1,6</b>																	
<b>13/01/99</b>								<b>1,9</b>											
Date	02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99							
mort																			

**Tableau 17 :** Evolution au cours du temps des taux plasmatiques de cortisone (ng/ml) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).

		GENOTYPE																		
		VVRROQ							AVRROQ							AARROQ				
DATE		960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET					
11/03/97		73,4	14,3		25,9		39,31	36,7	5,0	98,3	53,4	58,15	145,7	73,7 ± 93,7	261,1					
<b>03/04/97</b>																				
13/05/97		2,5	10,3		13,2	120,4	16,13	18,7	2,5	14,0	35,9	14,26	2,5	61,4 ± 26,6	114,7					
22/07/97		114,9	49,4		24,0	57,7	11,28	39,8	2,5	54,8	182,5	107,59	47,5	156,6 ± 240,7	637,9					
23/09/97		90,8	45,0		194,6		37,19	61,2				5,0	120,3	38,2 ± 27,4	93,0					
05/12/97			53,0		78,4	33,4	90,15	41,4	57,8	37,9			26,2	33,3 ± 18,0	69,2					
03/02/98			20,2			56,2		74,6	29,6	36,2		35,6	84,7	64,6 ± 39,5	143,7					
<b>26/03/98</b>							<b>14,6</b>													
31/03/98			81,0			123,9								30,5 ± 19,8	70,0					
17/04/98																				
21/04/98																				
29/04/98																				
14/05/98																				
<b>18/05/98</b>										5,0										
26/05/98			15,1					5,0	73,3				17,7	41,4 ± 59,8	161,0					
11/08/98			2,5					13,7	14,4				43,9	21,9 ± 24,9	71,7					
06/10/98			25,9					64,4	23,3				122,0	41,8 ± 44,3	130,4					
01/12/98			179,2					134,8	956,9				57,8	57,6 ± 45,1	147,9					
<b>17/12/98</b>							<b>22,0</b>													
<b>22/12/98</b>																				
<b>13/01/99</b>																				
09/02/99													53,8							
07/04/99													26,8							
15/06/99													2,5							
11/08/99													163,0							
Date		02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99							
mort																				

**Tableau 18 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de 20 $\beta$ -dihydrocortisol (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).

		GENOTYPE																						
		VRRQQ							AVRRQQ							AARRQQ								
DATE	960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET										
11/03/97	15,8	5,0		5,0		5,0	9,1	5,0	29,7	16,2	16,7	82,5	40,8 ± 56,5	153,8										
<b>03/04/97</b>																								
13/05/97	2,5	5,0		5,0	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0	5,0	5,0	2,5	27,0 ± 20,8	68,6										
22/07/97	25,6	10,7		30,1	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	68,2	45,4	17,4	75,6 ± 85,6	246,8										
23/09/97	33,0	38,8		47,9		18,1	17,2				27,6	5,0	31,7 ± 14,7	61,1										
05/12/97		35,6		15,1	14,0	19,0	13,9	26,2	23,7			14,1	23,4 ± 9,1	41,6										
03/02/98		5,0			12,5		23,9	11,0	46,8		39,4	50,6	21,1 ± 15,7	52,5										
<b>26/03/98</b>						<b>31,6</b>																		
31/03/98		18,1			50,3								10,3 ± 5,7	21,6										
17/04/98																								
21/04/98																								
29/04/98																								
14/05/98																								
<b>18/05/98</b>									<b>34,0</b>															
26/05/98		5,0					13,4	14,3				10,4	18,1 ± 22,7	63,4										
11/08/98		2,5					5,0	5,0				18,9	4,4 ± 1,2	6,7										
06/10/98		5,0					13,2	10,7				29,1	25,2 ± 28,2	81,6										
01/12/98		41,1					65,9	509,7				31,9	28,5 ± 23,7	75,9										
<b>17/12/98</b>							<b>64,1</b>																	
<b>22/12/98</b>																								
<b>13/01/99</b>																								
09/02/99												21,1												
07/04/99												24,7												
15/06/99												2,5												
11/08/99												73,0												
Date	02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99												
mort																								

**Tableau 19 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de cortisol (ng/ml) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type) des brebis saines (8 brebis à génotype résistant) aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).

		GENOTYPE																		
		VRRQQ							AVRRQQ							AARRQQ				
DATE	960464	960508	900428	960221	960243	960270	960462	960586	910058	910175	910442	920391	Moyenne ± ET	Moy + 2 ET						
11/03/97	5,0	2,5		2,5		9,7	10,5	5,0	32,6	9,7	5,0	49,6	26,8 ± 35,0	97,1						
<b>03/04/97</b>																				
13/05/97	2,5	24,3		17,1	2,5	22,8	5,0	2,5	5,0	5,0	38,5	2,5	20,4 ± 10,7	41,8						
22/07/97	2,5	19,1		13,3	10,4	5,0	5,0	5,0	21,0	157,5	5,0	61,9	36,4 ± 29,4	95,2						
23/09/97	23,7	17,1		11,1		39,7	5,0					84,0	17,5 ± 15,1	47,6						
05/12/97		20,5		19,8	2,5	5,0	5,0	5,0				11,5	11,6 ± 12,0	35,7						
03/02/98		5,0			5,0	<b>56,1</b>		2,5			68,1	21,8	18,7 ± 16,1	50,9						
<b>26/03/98</b>																				
31/03/98		5,0			26,3								6,6 ± 6,7	19,9						
17/04/98																				
21/04/98																				
29/04/98																				
14/05/98																				
<b>18/05/98</b>									<b>5,0</b>											
26/05/98		12,4					36,4	5,0				22,5	20,7 ± 14,9	50,5						
11/08/98		2,5					50,6	12,4					23,5 ± 31,6	86,9						
06/10/98		2,5					5,0	5,0				92,4	9,9 ± 9,9	29,7						
01/12/98		39,0					52,0	170,7				41,9	18,3 ± 25,4	69,1						
<b>17/12/98</b>																				
<b>22/12/98</b>							<b>92,16</b>					<b>21,3</b>								
<b>13/01/99</b>																				
09/02/99																				
07/04/99																				
15/06/99																				
11/08/99																				
Date	02/02/98	23/12/98	03/04/97	31/01/98	3/07/98	26/03/98	17/12/98	11/02/99	18/05/98	31/08/97	03/04/98	29/10/99								
moit																				

**Tableau 20 :** Evolution au cours du temps des taux urinaires de cortisone (ng/mL) des brebis pour lesquelles le diagnostic de tremblante a été établi par histologie en fonction de leur génotype et taux plasmatiques moyens (moyenne ± écart-type) des brebis saines aux mêmes périodes. Les valeurs en gras correspondent aux dates de prélèvements réalisés en dehors des sessions normales de prélèvements (en phase clinique de tremblante).







TOULOUSE 2001

NOM : GRANDJEAN

PRENOM : CHRISTOPHE

TITRE : HYPERCORTISOLEMIE MAJEURE CHEZ LA BREBIS ATTEINTE DE TREMBLANTE : APPLICATION A LA RECHERCHE DE MARQUEURS DE LA TREMBLANTE.

RESUME :

La tremblante du mouton est une maladie neurodégénérative. Nous avons fait l'hypothèse que des lésions précoces du système nerveux central pourraient avoir des répercussions sur les systèmes neuroendocriniens.

L'étude de la fonction corticosurrénalienne des brebis en phase clinique de tremblante nous a permis de mettre en évidence une stimulation importante des sécrétions de corticoïdes dès les premiers stades clinique de la maladie. Nous avons donc orienté nos recherches vers le développement d'un test diagnostique non invasif de la tremblante fondé sur l'identification d'un marqueur de l'activité surrénalienne (le 20 $\beta$ -dihydrocortisol). Contrairement à celle du cortisol, la sécrétion de ce métabolite n'est pas pulsatile.

L'intérêt de ce métabolite est que, les analyses discriminantes réalisées sur une population de 209 ont montré que les concentrations de 20 $\beta$ -dihydrocortisol plasmatique et celles de créatinine urinaire présentaient une très bonne valeur prédictive et permettaient de classer correctement 93% des animaux sains et 71% de ceux atteints de tremblante.

Pour déterminer la précocité des marqueurs plasmatiques et urinaires surrénaliens, une étude longitudinale sur 3 ans a été réalisée sur 10 moutons à génotype résistant et 39 à génotype sensible à la tremblante.

Sur 70% des brebis atteintes de tremblante, une augmentation des concentrations plasmatiques de 20 $\beta$ -dihydrocortisol a été détectée à des moments variables par rapport à la mort. Les résultats obtenus confirment l'existence d'un syndrome d'hypercorticisme chez la majorité des brebis atteintes de tremblante mais laissent présager une sensibilité insuffisante d'un test diagnostique fondé sur l'évaluation des marqueurs de la fonction corticosurrénalienne.

La recherche d'autres molécules non spécifiques dont les concentrations seraient altérées au cours de la tremblante pourrait permettre d'envisager un test diagnostique à grande échelle et aider à la compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

MOTS CLES : BREBIS - TREMBLANTE - CORTICOIDES - SURRENALE - PRION DIAGNOSTIC - 20 $\beta$ -DIHYDROCORTISOL - MARQUEUR - ESST.

---

ENGLISH TITLE : INCREASED PLASMA CORTISOL CONCENTRATION IN SCRAPIE-AFFECTED EWES : POTENTIAL INTEREST FOR NON INVASIVE DIAGNOSTIC.

ABSTRACT :

Scrapie is a neurodegenerative disease. We hypothesised that central nervous system lesions could early alter neuroendocrine functions.

By studying adrenal cortex function in ewes with clinical scrapie, we evidenced a large stimulation of corticoids secretion even at first stages of disease. Therefore we elaborated a non invasive diagnostic test for scrapie based on 20 $\beta$ -dihydrocortisol as a marker for adrenal cortex activity. In contrast with cortisol, 20 $\beta$ -dihydrocortisol doesn't display a pulsatile secretion. Discriminant analyses performed on 209 sheep evidenced a good predictive value of both plasmatic 20 $\beta$ -dihydrocortisol and urinary creatinine levels and correctly classified 93% healthy sheep and 71% affected sheep.

In order to assess precocity of these markers, a 3 year longitudinal study was performed on 49 sheep, 10 of them having a resistant genotype and the 39 others a sensible genotype. 70% of sheeps affected with scrapie had plasmatic levels of 20 $\beta$ -dihydrocortisol higher than those of healthy sheep at various times from death. These results confirm an hypercorticism syndrome in most of the affected sheep (70%) but suggest that a diagnostic test based on marker of adrenal cortex function would not reach a sufficient level of sensibility. Search for other non specific markers whose levels would be altered by scrapie could allowed a significant progress for large testing and improve understanding of physiopathology of the disease.

KEY WORDS : EWES - SCRAPIE - CORTICOIDS - ADRENAL - GLAND - PRION - 20 $\beta$ -DIHYDROCORTISOL - MARKER - TSE.