
DETERMINISME DE LA PRESENCE DE PROTEINE PRION ANORMALE (PrP^{Sc}) DANS LE TISSU MAMMAIRE DES BREBIS ETUDE RETROSPECTIVE DANS UN TROUPEAU NATURELLEMENT ATTEINT DE TREMBLANTE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Antoine PLAT

Né le 29 mars 1982 à ROMORANTIN-LANTHENAY (Loir-et-Cher)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Caroline LACROUX

JURY

PRESIDENT :

M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

ASSESEUR :

Mme Caroline LACROUX
M. François SCHELCHER

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

MEMBRE INVITE :

M. Olivier ANDREOLETTI

Docteur Vétérinaire

DETERMINISME DE LA PRESENCE DE PROTEINE PRION ANORMALE (PrPSc) DANS LE TISSU MAMMAIRE DES BREBIS ETUDE RETROSPECTIVE DANS UN TROUPEAU NATURELLEMENT ATTEINT DE TREMBLANTE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Antoine PLAT

Né le 29 mars 1982 à ROMORANTIN-LANTHENAY (Loir-et-Cher)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Caroline LACROUX

JURY

PRESIDENT :

M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

ASSESEUR :

Mme Caroline LACROUX
M. François SCHELCHER

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

MEMBRE INVITE :

M. Olivier ANDREOLETTI

Docteur Vétérinaire



ECOLE
NATIONALE

TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAUX	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

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

PROFESSEURS 2^o CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Pharmacologie et Thérapeutique*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Réproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique Equine*
M. REYNOLDS Brice, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES 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 (classe normale)

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants.*
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
Mme TROGELER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle BUCK-ROUCH, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DOUET Jean-Yves, *Ophtalmologie*
M. SEGUELA Jérôme, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M VERSET Michaël, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. GIN Thomas, *Production et pathologie porcine*
M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*
Mlle TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Remerciements

A Monsieur le professeur Alexis VALENTIN

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Zoologie-Parasitologie

Merci de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,

Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Caroline LACROUX

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie Pathologique des animaux de rente

En hommage à cette thèse que vous m'avez donnée. Merci pour tout ce que vous avez fait.

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale du Bétail et des animaux de Basse-Cour

Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Olivier ANDREOLETTI

Ingénieur de Recherche, UMR INRA-ENVT 1225, Toulouse

Hommages à votre savoir et votre soif de découverte à l'origine de nombreux travaux cités dans cette thèse.

A mes parents

Pour m'avoir toujours soutenu : papa qui m'a toujours poussé vers le haut (« tu ne vas pas te faire battre par quand même »). Maman qui m'a accompagné à cet oral tant redouté à Paris, moment où son soutien a été si important. Merci également pour tous tes petits repas préparés en prépa. Si j'en suis là ce jour c'est avant tout grâce à vous.

A ma sœur

Que je n'ai pas suivi pour son sérieux dans les études mais que je rejoins au rang de Docteur aujourd'hui. Même si un épicier reste un épicier, je te souhaite beaucoup de réussite pour ta future carrière et pour ta vie perso. Petite remarque : 4 épiciers contre 3 vétérinaires, l'écart se resserre...

A ma « petite femme » Cindy

Qui a su me redonner le goût de sourire à un moment où je n'espérais plus rien de l'Amour. Je te remercie, me supporter au quotidien (moi et mon bordel) demande une telle patience... On a encore bien des choses à découvrir à deux...je t'aime.

A mes grands-parents, pépé Bernard et mémé Paco

Vous avez toujours été présents pour me soutenir. Merci pour tout. A bientôt pour un petit apéro un samedi soir...

A ttantta Monique

Tu m'as toujours soutenu surtout dans les moments durs de la prépa. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. A tant donné tu ne recevras jamais assez, mais tu peux compter sur moi à tout moment, je n'oublierai pas ce que tu as fait. Merci otto Jean-Marie pour tes boulots d'été. Tu m'as fait connaître un autre type d'élevage et ta passion pour cela.

A Jean-Marie

Plus qu'un grand-frère, celui avec qui on a poussé tant d'astrea dans ces pentes de Banca, celui aussi qui m'a fait boire mes premiers verres d'alcool aux fêtes d'Oihansoro. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

A otto Gratien Lekaio

Tu m'as fait partager sa passion pour les brebis. Je n'oublierai jamais tes colères mémorables à la bergerie ou à Adarza pour trier les brebis, mais aussi ta patience pour faire téter ces agneaux habillés...

A ttantta Gracie qui m'a accueilli comme un fils pendant les vacances.

A ceux qui nous ont quittés trop tôt mais qui j'espère auraient été fiers ce jour.

A toute la famille que je n'ai pas citée mais elle est tellement nombreuse...

A toi ma petite Hélène

« Hélène comment ? Hélène petit lapin » : ma mère à l'école et pourtant si jeune. J'espère que la distance ne nous séparera jamais, le téléphone en cas de soucis au boulot ça nous connaît, et msn existe toujours...merci pour ta gentillesse et tous ces moments partagés à l'école, à faire des gâteaux, à aller courir, nager... On a encore plein de choses à partager.

A Xavier

le piroman, frère de substances inflammables

A quelques rares amies de la promo

Marjo : la seule qui a su me supporter 4 ans durant ces folles années de l'ENVT. A toi « sonore », amie de ronéo à taper le dimanche (ça me broute.....), amie de séries débiles (frères Scott....). Bon courage pour la suite en espérant qu'on ne se perdra jamais de vue malgré les km.

Viviane : la blondasse de Monaco. Merci pour ta naïveté qui nous a toujours bien fait rire. Continue de jouer ta petite blatte en clientèle. Je te souhaite tout plein de bonheur et d'épanouissement au boulot.

Fabienne « la niac » : toi que je ne connaissais pas, à qui j'avais fait la gueule suite à une pizza partagée au cercle et avec qui on a quand même fini par partager de nombreux autres repas.

A Max, Alice et Sud

Connaissances de prépa, amis pour toujours j'espère même si on se voit peu depuis quelques temps. A tous ces moments partagés en prépa et en dehors (fêtes de Bayonne...)

A Julien, Léa et Niconours

Amis fidèles rencontrés en Soule... que de bons moments à la plage à Capbreton, de sorties dans ces fêtes souletines. Julien le surdoué du vélo m'a converti au VTT, je crois en toi Julien, tu vas revenir plus fort que jamais l'année prochaine avec un peu d'entraînement.

A Mr et Mme PERRIN

Vétérinaires qui m'ont fait connaître ce métier, qui m'ont accueilli en stage et m'ont fait partager leur journée de travail avec une telle passion... Merci pour tout. Merci aussi d'avoir pensé à moi pour mes premiers pas dans le monde professionnel.

Je remercie également Thibault et Claire pour les stages et merci à Camille grâce à qui j'ai commencé à me balader seul dans la campagne berrichonne.

A mes patrons

Pascal et Monique TROTTIER qui m'ont fait confiance malgré mon jeune âge. J'espère que le « bébé » (pensée pour vous Mr Etcheberry) est à la hauteur de ce que vous espériez.

A Caro

Cette thèse, c'est la tienne, merci pour tout, je n'oublierai jamais. Venez prendre quelques jours de vacances au Pays-Basque dès que vous voulez, la porte de la maison est ouverte.

A Olivier,

Pour tous ces matchs de squash, j'espère être aussi en forme que toi dans 10 ans. Toujours le cerveau en ébullition, à l'Ecole pour toujours en savoir plus sur cette foutue tremblante, sur les terrains de squash pour savoir quel nouveau coup inventer ou quelle tactique employer... Progresser sans cesse semble être ta devise que ça soit au boulot ou ailleurs. Quand tu veux pour un match à Mauléon, tu ne joueras pas à domicile pour une fois...

Enfin à tous ceux que j'oublie de citer et qui ont cru en moi.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LA TREMBLANTE, ARCHETYPE DES MALADIES A PRION :.....	14
A. CARACTERES CLINIQUES ET LESIONNELS :.....	14
1. Tableau clinique :	14
a. Animaux atteints :	14
b. Evolution :.....	15
c. Symptômes :	15
2. Lésions :	17
a. Lésions macroscopiques :.....	17
b. Lésions microscopiques :	18
B. TRANSMISSIBILITE DE LA TREMBLANTE :.....	19
1. Transmission horizontale :	19
2. La possibilité d'une transmission verticale ?	21
C. LE PRION : UN AGENT TRANSMISSIBLE NON CONVENTIONNEL :	21
1. La théorie d'un virus :	22
2. La théorie d'un virino :.....	23
3. La théorie de la protéine prion ou du « tout protéique » :.....	24
4. Les limites du concept prion :	25
5. Morphologie de l'agent :	25
6. Le gène PRP :	26
7. La PrPc :	26
8. PrPSc ou PrPres : la protéine anormale :.....	29
9. Propriétés physico-chimiques de cet ATNC :.....	30
D. PATHOGENESE DE LA TREMBLANTE :.....	31
1. La phase de lympho-invasion :.....	31
2. La phase de neuro-invasion :.....	32
3. Génétique de la tremblante chez les ovins :.....	33
4. Lutte génétique contre la tremblante :	36
II. LE MAEDI-VISNA :	37
A. ETIOLOGIE :.....	37
1. Structure des particules lentivirales :	39
2. Organisation génomique du virus Maedi-Visna : (Pépin <i>et al.</i> , 1998).....	40
3. Les protéines du Maedi-Visna et leurs rôles :.....	42
4. Les récepteurs et cibles cellulaires du Maedi-Visna :	44
5. Le cycle lentiviral :.....	45
6. Propriétés biologiques :.....	46
7. Propriétés physico-chimiques :	47
B. PHYSIOPATHOGENIE GENERALE :.....	47
1. Contamination des animaux :.....	47
2. Phase quiescente :.....	48
3. Apparition des lésions :.....	50

C.	SYMPTOMES ET LESIONS DE L'INFECTION PAR LE MVV DANS LA MAMELLE :	50
1.	Lésions macroscopiques et microscopiques :	50
2.	Conséquences cliniques :	51
III.	TREMBLANTE ET MAEDI : LA QUESTION DU PRION DANS LA MAMELLE DES BREBIS	53
	DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	55
I.	MATERIEL ET METHODES :	56
A.	SELECTION DES CAS DE L'ETUDE :	56
B.	TECHNIQUES HISTOLOGIQUES :	57
1.	Technique histologique conventionnelle :	57
2.	Technique immunohistochimique :	57
3.	PET-Blot (Paraffin Embedded Tissue Blot) :	58
C.	DETECTION DE LA PrPSc PAR METHODES BIOCHIMIQUES :	58
1.	Méthode ELISA :	59
2.	Méthode Western-Blot :	59
D.	VERIFICATION DU STATUT MAEDI-VISNA PAR PCR :	60
II.	RESULTATS :	61
A.	STATUT DES BREBIS VIS-A-VIS DE LA TREMBLANTE :	61
B.	STATUT DES BREBIS VIS-A-VIS DU VIRUS MAEDI-VISNA :	63
C.	DETECTION DE LA PrPSc DANS LA MAMELLE :	64
III.	DISCUSSION :	69
A.	PRESENCE DE LA PROTEINE PRION ANORMALE (PrPSc) DANS LE TISSU MAMMAIRE :	69
B.	ROLE DE LA CO-INFECTION PRION / VIRUS MAEDI-VISNA :	70
C.	IMPORTANCE DE LA GENETIQUE DANS LA DISSEMINATION DU PRION DANS LE TISSU MAMMAIRE :	71
D.	INFECTIOSITE DU LAIT ET DU COLOSTRUM :	72
E.	ROLE DU LAIT ET DU COLOSTRUM DANS LA TRANSMISSION DE LA TREMBLANTE :	74
F.	INFECTIOSITE DU LAIT ET DU COLOSTRUM DANS LES AUTRES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES :	74
	CONCLUSION	77
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78

LISTE DES FIGURES

<i>Figure n°1 : Répartition des cas de tremblante français de 1996 à 2006 en fonction des catégories d'âge des ovins.....</i>	<i>p 15</i>
<i>Figure n°2 : Incoordination motrice chez un ovin atteint de tremblante.....</i>	<i>p 16</i>
<i>Figure n°3 : Rictus lors de grattage en zone dorso-lombaire d'une brebis atteinte de tremblante. Noter également la toison dépenaillée.....</i>	<i>p 17</i>
<i>Figure n°4 : Lésions de spongiose neuronale dans le tronc cérébral d'un ovin atteint de tremblante.....</i>	<i>p 18</i>
<i>Figure n°5 : Distribution des lésions de vacuolisation et de la PrPres dans les cas de tremblante classique et atypique.....</i>	<i>p 19</i>
<i>Figure n°6 : Les trois théories pour expliquer la nature de l'agent infectieux responsable des ESST.....</i>	<i>p 22</i>
<i>Figure n°7 : Virino entouré des protéines de l'hôte formant une coque protectrice.....</i>	<i>p 23</i>
<i>Figure n°8 : Structures secondaires des deux protéines prion, cellulaire et scrapie ; la PrPSc est plus riche en feuillets β que la PrPc.....</i>	<i>p 24</i>
<i>Figure n°9 : Structure de la PrPc.....</i>	<i>p 27</i>
<i>Figure n°10 : Estimation du nombre de cas de tremblante par million de moutons de chaque génotype en Grande-Bretagne par an et degré de résistance/sensibilité attribué à ces génotypes par le Plan National Tremblante.....</i>	<i>p 35</i>
<i>Figure n° 11 : Structure du virus Maedi-Visna.....</i>	<i>p 39</i>
<i>Figure n°12 : Organisation génomique du virus Maedi-Visna.....</i>	<i>p 41</i>
<i>Figure n°13 : Le cycle lentiviral</i>	<i>p 46</i>
<i>Figure n°14 : Détection de la PrPSc dans le système nerveux central de brebis atteinte de tremblante par immunohistochimie.....</i>	<i>p 61</i>
<i>Figure n°15 : Lésions de spongiose neuronale.....</i>	<i>p 62</i>
<i>Figure n°16 : PCR Maedi-Visna positives sur 32 brebis de l'étude.....</i>	<i>p 63</i>
<i>Figure n°17 : PrPSc dans les follicules lymphoïdes ectopiques mammaires détectée par IHC.....</i>	<i>p 64</i>
<i>Figure n°18 : Double marquage IHC des cellules PrPSc positives (sérum polyclonal R521 – dépôts noirs) dans les follicules lymphoïdes ectopiques mammaires démontrant le phénotype CD68+ (clone Ki-M6, dépôts rouges) de ces cellules (révélation AEC-NBT/BCIP, x400)..</i>	<i>p 65</i>
<i>Figure n°19 : Cellules PrPSc positives et granules de PrPSc libres dans la lumière des canaux lactifères.....</i>	<i>p 66</i>

Figure n°20 : IHC (image de gauche, anticorps 8G8, révélation DAB, x200) et PET-Blot (image de droite, anticorps Sha-31, dépôts noirs de NBT/BCIP, x200) sur deux coupes successives de mamelle confirmant que le matériel observé dans les follicules lymphoïdes ectopiques et la lumière des canaux lactifères est protéinase K-résistant.....p 67

Figure n°21 : Western Blot sur deux échantillons de mamelle positive en IHC et ELISA (Piste1 : PrPc, Pistes 2 et 7 : Témoin Langlade SNC de brebis naturellement contaminées, Pistes 3 et 8 : marqueur de poids moléculaire, Pistes 4 et 5 : deux échantillons de mamelle positive, Piste 6 : contrôle négatif) (anticorps Sha-31, révélation ECL).....p 68

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau n°1 : Polymorphisme aux codons 136, 154 et 171 du gène PRP chez les ovins.....</i>	<i>p 33</i>
<i>Tableau n°2 : Données relatives à l'infectiosité des sécrétions et excréctions ovines dans la littérature.....</i>	<i>p 53</i>
<i>Tableau n°3 : PrPSc dans le système nerveux central, le système lymphoréticulaire, la mamelle et la lumière des canaux lactifères de brebis naturellement atteintes de tremblante et de différents génotypes aux codons 136, 154 et 171 du gène PRP.....</i>	<i>p 62</i>

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA TREMBLANTE, ARCHETYPE DES MALADIES A PRION :

Première Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible (ESST) décrite, la tremblante des petits ruminants peut être considérée comme l'archétype des maladies à prions. Cette maladie neurodégénérative est connue depuis plus de 200 ans, et représente un modèle d'étude des ESST. Les ESST sont décrites dans plusieurs espèces animales (Encéphalopathie Spongiforme Bovine ou Féline...) et chez l'Homme (maladie de Creutzfeld-Jakob sporadique et son nouveau variant, Insomnie Fatale Familiale, syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker...).

A. CARACTERES CLINIQUES ET LESIONNELS :

1. Tableau clinique :

L'âge d'apparition de la maladie et les modalités d'évolution sont deux caractéristiques indispensables pour établir une suspicion clinique (Schelcher, Androletti *et al.*, 2002 ; Schelcher, Lacroux *et al.*, 2002).

a. Animaux atteints :

La tremblante naturelle touche de façon préférentielle les ovins (*Ovis aries*), mais peut survenir également chez les caprins (*Capra hircus*) et les mouflons (*Ovis musimon*). La répartition géographique mondiale de la tremblante est très large, présente dans tous les pays à l'exception notable de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande.

Au sein des troupeaux atteints, l'incidence annuelle de la maladie est très variable pouvant aller de 1% (cas sporadiques) jusqu'à un maximum de 20 à 30 % (formes enzootiques). Les animaux sont généralement atteints entre 2 et 6 ans (âge d'atteinte préférentielle : entre 18 et 30 mois) (figure n°1), même si de rares cas ont été rapportés dès l'âge d'un an (Joubert, Lapras *et al.*, 1972) ou encore à plus de 11 ans (Detwiler et Baylis, 2003). La tremblante touche indifféremment les ovins des deux sexes.

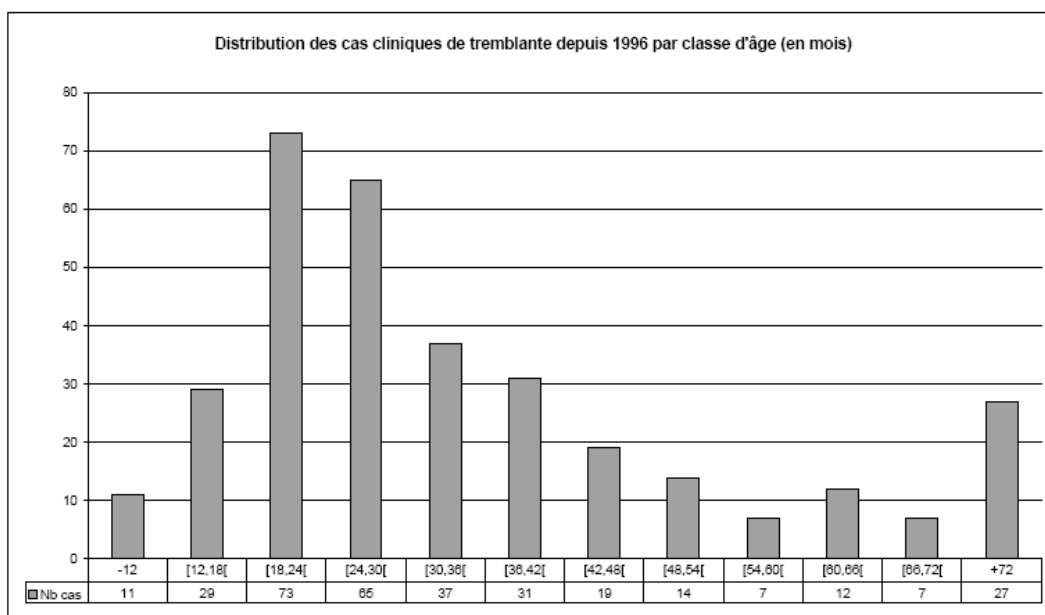


Figure n°1 : Répartition des cas de tremblante français de 1996 à 2006 en fonction des catégories d'âge des ovins.

(Source : Annexe 1 de l'avis de l'AFSSA du 20/07/06, saisine 2006-SA-0099).

L'AFSSA a estimé qu'avant 2002 en France, si l'on tient compte du fait que les cas ne sont parfois ni bien identifiés, ni bien déclarés, on pouvait évaluer le nombre de cas à environ 3% du cheptel ovien (AFSSA, Saisine n° 2004-SA-0390).

b. Evolution :

La durée d'évolution clinique est généralement longue (de quelques semaines à plusieurs mois) (Machen, 2001). De rares cas ont été décrits avec une durée d'évolution relativement rapide, inférieure à 2 semaines (Clark et Moar, 1992). L'évolution est progressive avec des périodes d'aggravation au cours du temps, parfois entrecoupées de périodes de stagnation. Ces phases de « rémission apparente » peuvent correspondre soit à une rémission temporaire de la tremblante, soit, plus généralement, à la guérison d'une maladie intercurrente (Schelcher, Andreoletti *et al.*, 2002).

c. Symptômes :

Les symptômes de la tremblante sont décrits dans de nombreuses études (Dickinson 1976 ; Clark 1980 ; Clark et Moar, 1992 ; Detwiler 1992 ; Capucchio, Guarda *et al.*, 2001 ; Schelcher, Andreoletti *et al.*, 2002 ; Schelcher, Lacroux *et al.*, 2002).

Les symptômes observés sont essentiellement dominés par des troubles nerveux :

- modifications du comportement : notamment lors du passage en salle de traite pour les brebis laitières (les brebis ne veulent plus passer à la salle de traite, elles sont inquiètes) ou lors du rassemblement des animaux (isolement, hyperexcitabilité), modifications souvent discrètes,
- troubles locomoteurs, mouvements anormaux : incoordination motrice avec une démarche titubante évoluant au cours du temps (figure n°2) ; la brebis tombe de plus en plus souvent, mettant de plus en plus de temps à se relever, elle finit par se retrouver en décubitus permanent. Le pas accéléré est caractéristique avec un trot des antérieurs et un galop des postérieurs, ou un levé exagéré des antérieurs. Les tremblements sont des signes tardifs, ils se localisent essentiellement au niveau de la tête et sont de faible intensité ; ils peuvent s'accompagner de balancements anormaux de la tête.



Figure n°2 : Incoordination motrice chez un ovin atteint de tremblante (Source : Fediaevsky et al., 2007)

- prurit : frottements aux barrières ou aux murs ; les animaux se mordillent parfois les membres. La toison se retrouve dépenaillée. La brebis présente un rictus particulier lors de grattage manuel de la zone lombaire (figure n°3). Le grattage débute par les régions de la tête, du dos, des flancs et ensuite de la croupe. Ce rictus s'accompagne de mâchonnements et d'un léchage excessif. Le prurit est d'origine neurosensorielle et est associé au syndrome d'hyperesthésie générale de l'animal. Le prurit est parfois absent, dans certaines régions notamment (Islande par exemple).



Figure n°3 : Rictus lors de grattage en zone dorso-lombaire d'une brebis atteinte de tremblante. Noter également la toison dépenaillée. (Source : site de l'INRA [www-vim.jouy.inra.fr/IPn/mouton.jpg](http://www.vim.jouy.inra.fr/IPn/mouton.jpg))

L'amaigrissement des animaux est un signe inconstant et l'appétit est généralement conservé. Exceptionnellement d'autres symptômes ont pu être observés : cécité avec lésions rétiniennes, agressivité, bêlements anormaux, troubles de la miction, réduction de la motricité ruminale et de la rumination, régurgitations du contenu ruminal...

Selon les pays, la maladie est appelée en fonction d'un des symptômes prédominants observé : tremblements (« tremblante » en France), prurit (« scrapie » au Royaume-Uni), ataxie (« traberkrankheit » en Allemagne) ou amaigrissement (« rida » en Islande).

2. Lésions :

Des lésions macroscopiques et microscopiques peuvent être observées sur un animal atteint de tremblante. Les lésions macroscopiques ne sont généralement pas pathognomoniques, à l'inverse des lésions microscopiques qui sont, quant à elles, caractéristiques.

a. Lésions macroscopiques :

Les lésions macroscopiques sont en liaison directe avec les symptômes cliniques : des lésions dues au grattage avec un délainement et des lésions cutanées érosives, ainsi que des lésions liées aux troubles moteurs avec l'amaigrissement par exemple ou encore des lésions dues aux chutes ou provoquées par le décubitus. Ces lésions ne sont cependant pas spécifiques, et l'autopsie sur la simple base de l'observation des lésions macroscopiques ne

peut donc pas être considérée comme une méthode de diagnostic fiable dans le cadre de la tremblante.

b. Lésions microscopiques :

Les lésions microscopiques observées dans le système nerveux central d'un ovin atteint de tremblante à l'examen histologique conventionnel sont caractéristiques :

- une vacuolisation (ou spongiose) neuronale et neuropilaire (figure n°4)
- une perte neuronale plus ou moins importante
- la présence occasionnelle de « plaques amyloïdes », positives au Rouge Congo correspondant aux agrégats de protéine prion anormale
- une astrocytose

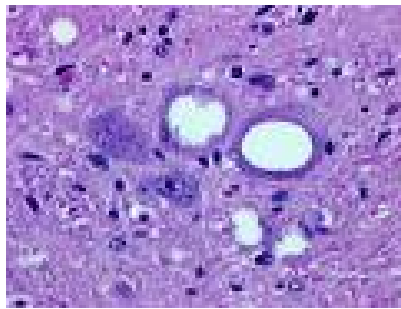


Figure n°4 : Lésions de spongiose neuronale dans le tronc cérébral d'un ovin atteint de tremblante

(Source : site de l'INRA <http://www.inra.fr/dpenv/images/scrapie2.gif>)

Les lésions de tremblante classique sont essentiellement retrouvées dans le tronc cérébral. Toutefois, l'intensité et la répartition des lésions sont variables et dépendent étroitement de la souche de prion ainsi que de l'espèce animale atteinte (figure n°5). En effet, les lésions observées chez des ovins atteints de tremblante atypique, découverte en 1998 en Norvège, sont principalement localisées au cervelet et au cortex cérébral.

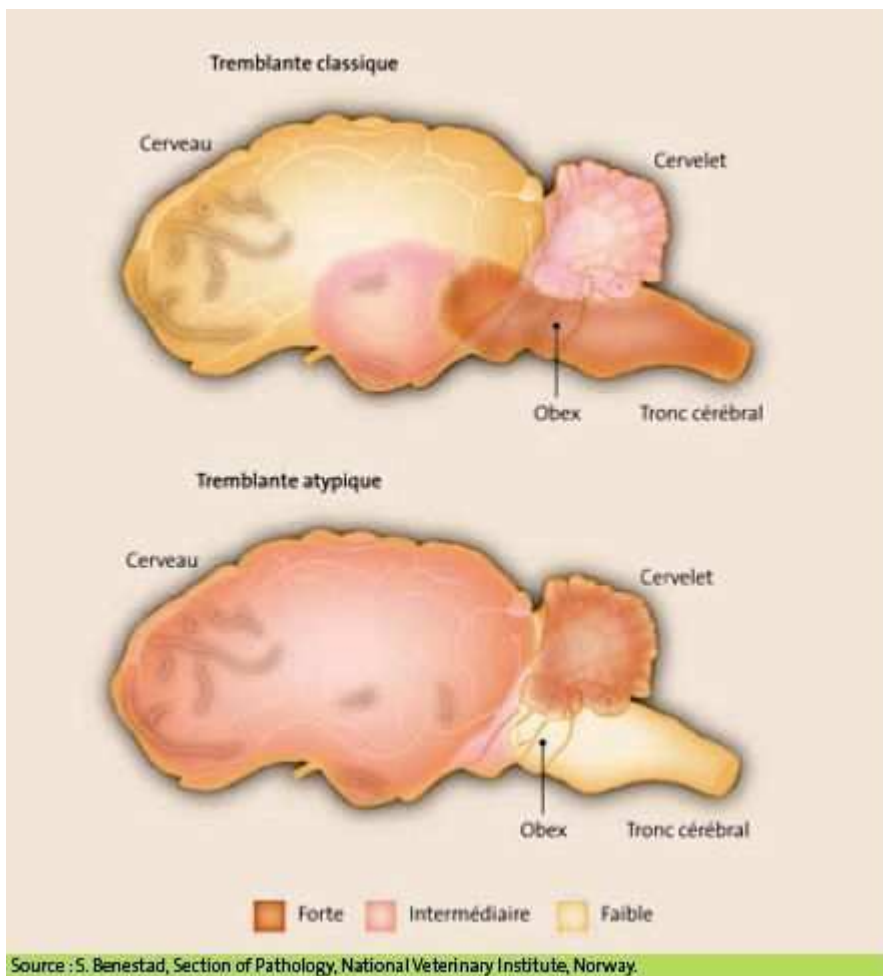


Figure n°5 : Distribution des lésions de vacuolisation et de la PrPres dans les cas de tremblante classique et atypique (Source : Fediaevsky et al., 2007).

B. TRANSMISSIBILITE DE LA TREMBLANTE :

Le caractère transmissible de la tremblante a été démontré dans les années 30 par Cuillé et Chelle (Cuillé et Chelle, 1936). Dans cette étude, la maladie a été reproduite en inoculant un broyat d'encéphales d'ovins atteints de tremblante à des ovins sains avec une période d'incubation pouvant aller jusqu'à 24 mois.

1. Transmission horizontale :

La transmission de la maladie entre les animaux s'effectue par voie orale soit à partir des pâtures contaminées (transmission horizontale dite indirecte), soit à partir des animaux infectés (transmission horizontale directe). Dans ce dernier cas, il a été prouvé que les ovins pouvaient se contaminer en ingérant le placenta de brebis en incubation de tremblante lors des

mise-bas, puisque cet organe peut contenir de grandes quantités de protéine prion anormale (Andréoletti *et al.*, 2002 ; Lacroux *et al.*, 2007). Hourrigan *et al.* en 1979 ont montré que l'introduction de 140 agneaux âgés de trois à neuf mois, provenant d'élevages dits indemnes, dans un élevage infecté s'est conclue par l'apparition de signes cliniques de tremblante sur cinq de ces agneaux dans un délai de 64 à 93 mois (Hourrigan *et al.*, 1979). Actuellement, on ne peut encore quantifier l'importance de la transmission horizontale directe par rapport à celle de la transmission horizontale indirecte (Schelcher, Andreoletti *et al.*, 2002). En effet, l'extrême résistance du prion dans le milieu extérieur favorise très probablement une transmission horizontale indirecte. A de nombreuses reprises, il a pu être noté que lors d'abattage total d'un troupeau suite à un épisode de tremblante, suivi d'un repeuplement, la maladie réapparaissait. Selon une étude faite par Georgsson G. *et al.* en 2006 en Islande, la tremblante est réapparue dans 33 exploitations suite à un plan d'éradication avec abattage des animaux, désinfection et repeuplement seulement 2 ou 3 ans après, à partir d'élevages pourtant sains. Neuf de ces rémanences se sont produites entre 14 et 21 ans suite à ce programme d'éradication, montrant une persistance à très long terme de l'agent de la tremblante, même si une contamination par introduction ne peut être complètement exclue (Georgsson *et al.*, 2006). L'étude de Johnson *et al.* (2007) démontre qu'une association du prion à des particules inorganiques du sol, telle que la montmorillonite (Mte) ou d'autres aluminosilicates, augmente l'infectiosité. L'association Mte-PrPres entraîne une meilleure transmission par voie orale que la PrPres seule. Cela pourrait être expliqué par une possible protection de la PrPres par la Mte dans le tube digestif ou une facilitation de l'endocytose de la PrPres par la Mte (Johnson *et al.*, 2007).

Une transmission indirecte par des vecteurs a été également suggérée, soit naturellement à partir d'acariens des fourrages, soit expérimentalement à partir de mouches de l'espèce *Sarcophaga carnaria* ou encore exceptionnellement lors de la vaccination contre le *Louping-ill* (vaccins préparés à partir de suspension d'encéphales de moutons infectés par la tremblante) (Schelcher *et al.*, 2002). Le rôle du vaccin contre *Mycoplasma agalactiae* a été récemment suspecté lors d'une augmentation de l'incidence de la tremblante en Italie (Caramelli *et al.*, 2001).

Enfin, les différentes études sur la transmission des ESST ont conclu à une dépendance entre la durée d'incubation et la dose infectante. Il est admis que la transmission expérimentale par voie intracérébrale (IC) est 100 000 fois plus efficace que la voie orale. Les autres voies sont intermédiaires, avec respectivement du plus efficace au moins efficace, les voies intraveineuse (IV), intra-péritonéale (IP) et sous-cutanée (SC) (Schelcher *et al.*, 2002).

2. La possibilité d'une transmission verticale ?

Une transmission verticale de la tremblante a été longtemps suspectée. Cependant, il est très difficile de déterminer ce qui est du ressort d'une transmission verticale *sensu stricto* (transplacentaire anténatale) par rapport à toutes les contaminations postnatales (allaitement, contact avec la mère et les eaux fœtales).

La positivité du placenta des ovins, obligatoire pour qu'une transmission verticale puisse exister, a été démontrée en 1972 (Pattison *et al.*, 1972). L'étude menée par Foster a montré qu'il existe une transmission *in utero* suite à la naissance par césarienne d'agneaux atteints de tremblante, nés de mères infectées. La transmission semble n'avoir lieu qu'à partir du stade de l'implantation puisque des embryons, issus de mères infectées et transférés à des mères porteuses saines, entraînent la naissance d'agneaux sains (Foster *et al.*, 1996).

En 2002, un cas probable de transmission verticale de la tremblante a été rapporté sur une brebis contaminée apportée au Laboratoire Départemental Vétérinaire de Limoges (Couquet *et al.*, 2005). L'agnelle née de cette brebis, exclusivement nourrie par allaitement artificiel (ce qui limite les possibilités de transmission horizontale mère/agneau), aurait développé des signes de tremblante, confirmée par des examens de laboratoire, à l'âge de 6 mois.

Les tissus génitaux mâles, en revanche, ne semblent pas accumuler de protéine prion anormale et une étude récente démontre l'absence de transmission de la maladie par inoculation de sperme de béliers atteints de tremblante à des souris transgéniques. Il semble donc qu'il y ait peu de risques de transmission de la tremblante par le sperme.

C. LE PRION : UN AGENT TRANSMISSIBLE NON CONVENTIONNEL :

Les maladies à prions sont transmissibles par inoculation expérimentale et sont infectieuses. Cependant l'agent en cause dans ces maladies demeure encore largement méconnu d'où son appellation « agent transmissible non conventionnel » (ATNC), par opposition aux agents conventionnels que sont les virus, bactéries ou parasites. L'absence de réaction humorale dans les maladies à prions n'a pas facilité la mise en évidence de l'agent responsable de ces maladies (Porter *et al.*, 1973 ;Kascsak *et al.*, 1987).

Plusieurs hypothèses (figure n°6) ont été avancées par les scientifiques concernant la nature de l'agent : une hypothèse virale ou d'un virino, et une hypothèse d'agent infectieux

protéique (Prusiner, 1982), cette dernière étant désormais admise par la communauté scientifique, même si elle ne permet pas parfois d'expliquer toutes les caractéristiques liées à la maladie.

Nature de l'agent infectieux

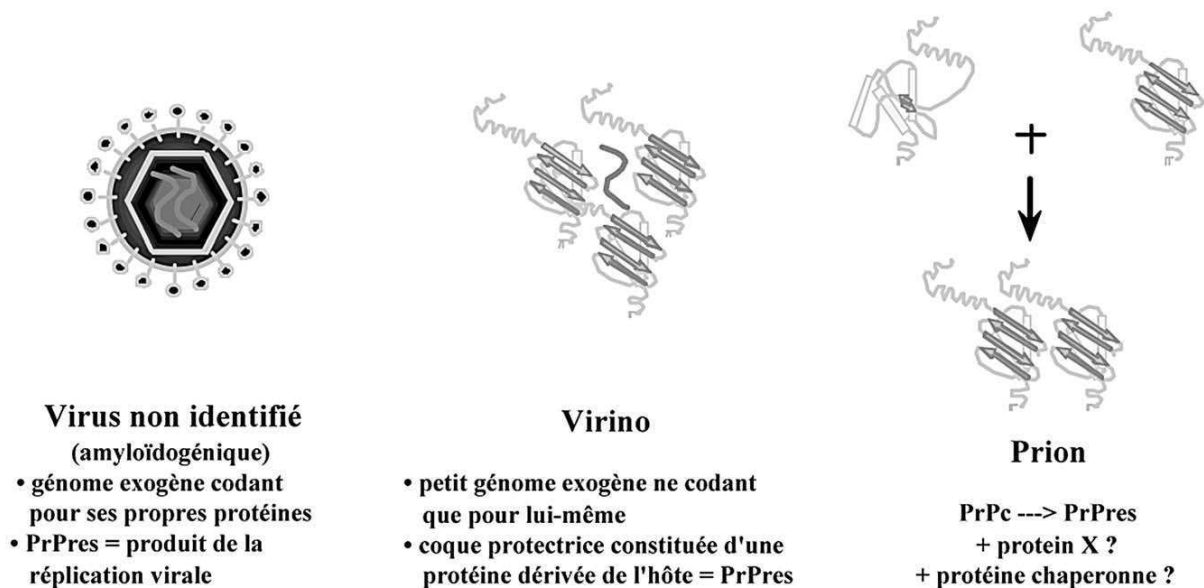


Figure n°6 : Les trois théories pour expliquer la nature de l'agent infectieux responsable des ESST (source Deslys, 2003).

1. La théorie d'un virus :

Première hypothèse émise par Sigurdsson en 1954, le « virus » de la tremblante serait selon cette théorie un « virus lent ». Ce virus serait cependant doué de propriétés physiques et chimiques hors normes (résistance à certains traitements physico-chimiques peu en accord avec une hypothèse virale). Il posséderait un acide nucléique de très petite taille et un matériel protéique lui permettant d'assurer sa propre réplication (Detwiler *et al.*, 2000). De plus, Ozel et Diringer ont détecté en 1994 des éléments de très petite taille dans des cerveaux de hamsters infectés expérimentalement par la tremblante et dans les cerveaux d'humains atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob. La taille et la densité de ces particules sont compatibles avec l'hypothèse d'un virus comme agent causal des maladies à prion. De même, l'absence de réaction immunitaire ne permet pas d'exclure cette hypothèse dans la mesure où certains virus latents échappent à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Lu *et al.*, 2004).

Malgré tout cette hypothèse n'a pas été retenue comme hypothèse majeure par les scientifiques par l'absence de détection systématique d'acides nucléiques ou de structure évocatrice d'un virus dans les organes d'animaux atteints d'ESST.

2. La théorie d'un virino :

Un virino est une structure hybride comprenant un très petit acide nucléique infectieux, non enveloppé, qui aurait la particularité de ne coder pour aucune protéine virale reconnue par le système immunitaire. Il pourrait cependant se lier à des protéines de l'hôte formant une coque (figure n°7), ce qui permettrait une protection en échappant à la reconnaissance du système immunitaire (Detwiler *et al.*, 2000).

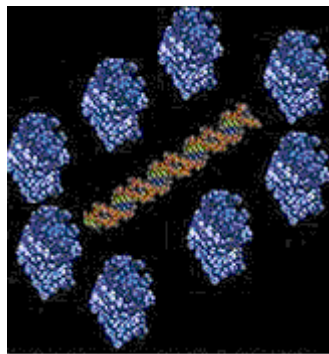


Figure n°7 : Virino entouré des protéines de l'hôte formant une coque protectrice. (Source : site de l'INRA <http://www-rocq.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/Micro/Prion.html>).

Les acides nucléiques expliqueraient l'infectiosité et les différentes souches de prion pourraient s'expliquer par des mutations d'ADN ou d'ARN dans le génome viral. La coque formée par les protéines de l'hôte autour de l'acide nucléique pourrait également expliquer la résistance du virino vis-à-vis de certains traitements physico-chimiques (protéases notamment, qui détruiraient d'abord la coque protéique protégeant l'acide nucléique). Là encore, malgré certains aspects pourtant convaincants, la théorie du virino n'a jamais été envisagée comme agent causal des ESST de la part de l'ensemble des scientifiques travaillant sur les prions.

3. La théorie de la protéine prion ou du « tout protéique » :

L'agent responsable du prion serait une protéine (la PrP^{Sc} pour Prion Protein Scrapie ou PrP^{Res} pour Prion Protein Résistante) résultant de la trans-conformation d'une protéine cellulaire normale de l'hôte (la PrP^C pour Prion Protein Cellulaire). Cette protéine anormale s'accumulerait dans différents organes au cours de l'évolution de la maladie. Les différences entre les deux protéines relèvent de la structure tertiaire puisque la PrP^{Sc} est enrichie en feuillets β par rapport à la protéine normale, ce qui lui conférerait ses propriétés de résistance aux agents physico-chimiques et notamment aux protéases (figure n°8). En revanche, les séquences primaires ainsi que les modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation...) des deux protéines sont identiques.

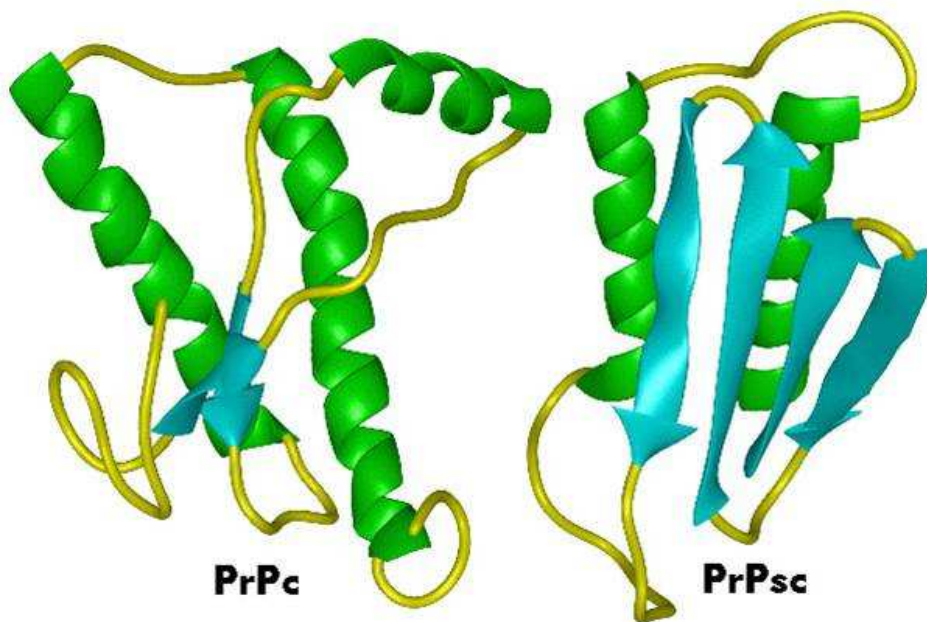


Figure n°8 : Structure secondaire des deux protéines prion, cellulaire et scrapie ; la PrP^{Sc} est plus riche en feuillets β que la PrP^C.

La théorie de la protéine infectieuse a été proposée dès le début des années 1980 (Prusiner, 1982). Elle permettrait d'expliquer le caractère héréditaire et transmissible des ESST (Griffith, 1967). De plus, l'impossibilité de transmettre et/ou de propager la maladie chez des souris Knock-Out pour le gène codant pour la protéine cellulaire (gène PRP, souris

PRP^{0/0}) renforce cette hypothèse du « tout protéique ». De même, la durée d'incubation de la maladie dans différentes espèces animales est inversement proportionnelle au niveau d'expression de la PrPc, la durée d'incubation ne décroissant toutefois pas de façon linéaire avec le nombre de copies du gène (au-delà d'un certain nombre de copies, la durée d'incubation ne diminue plus) (Westaway *et al.*, 1994).

4. Les limites du concept prion :

Cette hypothèse de protéine infectieuse a été mise à mal par une publication (Lasmezas *et al.*, 1997) dans laquelle il a été prouvé qu'il pouvait exister un découplage entre présence de PrPSc et infectiosité : chez des souris inoculées avec de la BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), les auteurs se sont rendu compte que de l'infectiosité prion pouvait être présente dans l'encéphale des animaux inoculés en l'absence de PrPSc détectable.

A l'heure actuelle, et malgré l'absence d'explication de ce phénomène de découplage entre l'infectiosité et la présence de PrPSc, l'hypothèse de protéine infectieuse reste celle admise par la communauté scientifique. Les travaux visant à préciser si un agent autre que protéique (viral par exemple) pourrait être impliqué dans les maladies à prions sont toutefois toujours d'actualité.

5. Morphologie de l'agent :

Par ultra-filtration et irradiation, la taille de l'agent est estimée à quelques dizaines de nanomètres (15 à 25 nm)(Manuelidis, 1994). Cependant, il ne s'agit que d'une estimation car l'agrégation possible de l'agent pourrait être à l'origine d'une surestimation de sa taille.

Au microscope électronique, des particules tubulo-vésiculeuses sont observées dans les processus neuronaux des individus en incubation d'ESST, aussi bien dans les formes naturelles qu'expérimentales. Cette observation est décelable très tôt dans la phase d'incubation de la maladie et leur nombre semble augmenter avec le stade d'incubation et le titre infectieux. La nature exacte de ces particules et leur rôle restent à déterminer.

Des agrégats fibrillaires (Scrapie Associated Fibrils ou SAF) d'une vingtaine de nanomètres de diamètre et de 100 à 200 nanomètres de long ont été observés au microscope électronique dans des tissus d'individus atteints d'ESST (maladie naturelle ou expérimentale) alors qu'ils sont absents dans les tissus d'individus sains (Merz *et al.*, 1984). Ces fibrilles sont

droites ou plus rarement en hélices au niveau de la fraction synaptosomale-mitochondriale. Ces SAF sont observées après action de la protéinase K sur les tissus. L'inoculation de SAF purifiées issues de cerveaux de hamsters inoculés avec la souche 263K ou de souris inoculées avec la souche ME7 a permis de reproduire la maladie. Le constituant majeur des SAF est un polypeptide de 27-30 kDa (Prusiner *et al.*, 1983), codé par un gène cellulaire, le gène PRP (Basler *et al.*, 1986). Le gène PRP code ainsi pour une protéine pouvant exister sous deux isoformes : la PrPc (protéine prion cellulaire) présente chez tous les individus, et la PrPSc (protéine prion scrapie) que l'on n'observe que chez des individus atteints d'une maladie à prion.

6. Le gène PRP :

Le gène PRP est connu chez toutes les espèces de mammifères mais également chez les oiseaux (Harris *et al.*, 1993). Ce gène code pour une protéine d'environ 250 acides aminés contenant plusieurs domaines. La concentration en ARNm codant pour la PrP serait identique chez les individus sains et chez les individus malades (Oesch *et al.*, 1985).

7. La PrPc :

Le nombre d'acides aminés de la PrPc varie en fonction des espèces (253 chez l'homme, 254 chez le hamster, 256 chez la souris et le mouton et 269 chez la vache), mais la majeure partie de la protéine possède une structure hautement conservée chez tous les mammifères.

La PrPc comprend 4 régions :

- Région I : partie N-terminale de 95 acides aminés, comprenant un site de liaison au cuivre ($K_d=10^{-14}$ mol). L'extrémité N-terminale (1-23) permet l'entrée dans le réticulum endoplasmique.
- Région II : acides aminés 96 à 112, région hydrophobe transmembranaire. Cette partie semble contrôler la localisation de la protéine, elle est hautement conservée chez les mammifères.
- Région III : acides aminés 113 à 230 avec 2 sites de N-glycosylation servant d'ancrage pour 2 chaînes oligo-saccharidiques. La glycosylation semble nécessaire au transport intra-cellulaire.
- Région IV : partie C-terminale (acides aminés 231 à 254). Constituée d'une séquence hydrophobe avec un site de fixation d'un glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) sur une

sérine (AA 231), elle permet la fixation de la PrPc à la face externe de la membrane plasmique. Une phospholipase spécifique clivant les ancrés GPI permet la solubilisation de la PrPc extra-cellulaire.

Molécule composée de 3 hélices stabilisées par un unique pont di-sulfure entre les hélices 2 et 3 (Riek *et al.*, 1996), sa structure déterminée par cristallographie semble être symétrique ce qui augmenterait son aptitude à s'organiser en structure amyloïde (figure n°9). Une zone plus flexible a été mise en évidence, elle serait à l'origine du changement de conformation induit par la PrPSc (Bousset *et al.*, 2001).

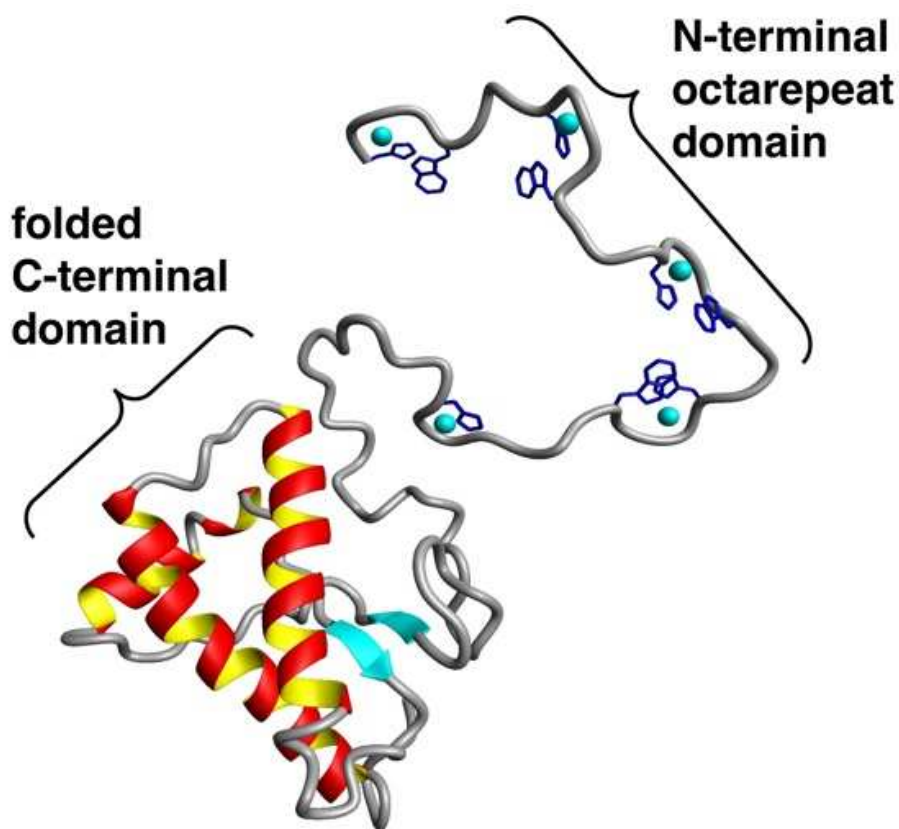


Figure n°9 : Structure de la PrPc (Source : site du Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Cruz <http://www.chemistry.ucsc.edu/~glennm/>).

La PrPc est exprimée dans de nombreux tissus à des niveaux variables. L'organe le plus riche en PrP reste le SNC (neurones, cellules gliales), mais cette protéine est présente également dans le système nerveux périphérique, le poumon, le muscle squelettique et les

organes lymphoïdes. La PrPc est également exprimée par les précurseurs myéloïdes de très nombreuses lignées cellulaires sanguines (CD34+).

La PrPc est aussi présente dans les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques matures et immatures et les cellules dendritiques folliculaires (FDC). Ces types cellulaires expriment fortement la protéine (Mc Bride *et al.*, 1992, Brown *et al.*, 1999) alors que les lymphocytes ne l'expriment que peu ou pas (Cashman *et al.*, 1990; Mabbott *et al.*, 1997; Kubosaki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001). De même, la quantité de PrPc semble avoir tendance à diminuer dans les polynucléaires au cours de leur différenciation (Dodelet *et al.*, 1998 ; Brown *et al.*, 1999 ; Burthem *et al.*, 2001 ; Sugaya *et al.*, 2002).

La question majeure qui se pose encore à l'heure actuelle est celle de la fonction de cette protéine cellulaire. Une délétion partielle des résidus 32 à 106 n'entraîne aucune modification du développement par contre une délétion plus importante (32 à 121) entraîne une ataxie et une perte neuronale cérébelleuse, anomalie parfois compensée par insertion d'un gène normal PRP (Shmerling *et al.*, 1998). Cependant, des souris, ou plus récemment des bovins, PrP0/0 ont une vie et un comportement absolument normaux. De nombreuses études ont été consacrées à l'étude de la fonction de la PrPc et ont permis d'établir son rôle dans différents domaines, sans toutefois lui conférer un rôle majeur et indispensable :

- un rôle de récepteur membranaire dans la transduction de signaux externes par l'intermédiaire d'une protéinase K (Dabaghian *et al.*, 2004),

- une régulation de la concentration des ions cuivre, ainsi qu'une participation au fonctionnement des enzymes intracellulaires par des changements conformationnels grâce à la fixation possible des ions cuivre sur le partie N-terminale, mais aussi des ions Zn, Mn, Ni de façon moins importante (Mabbott et Bruce, 2001 ; Brazier *et al.*, 2006). Cependant, il faut savoir également que la fixation des ions cuivre par la PrPc est dépendante des conditions du milieu (Kramer *et al.*, 2001),

- un rôle dans la lutte contre le stress oxydatif, du fait de son activité superoxyde dismutase (Mabbott et Bruce, 2001),

- une intervention possible dans la régulation du sommeil, dans la transmission synaptique au niveau de l'hippocampe et dans la survie à long terme des cellules de Purkinjé (Mabbott *et al.*, 1998 ; Mabbott et Bruce, 2001)

- des interactions diverses avec différentes protéines.

8. PrPSc ou PrPres : la protéine anormale :

L'étude complète de cette protéine en cristallographie est rendue difficile par son insolubilité lors du processus de purification. Cependant, la spectroscopie infra-rouge de Fourier et le dichroïsme circulaire ont montré la présence d'une plus forte proportion de feuillets β et un nombre diminué d'hélices α par rapport à la protéine normale PrPc (Pan *et al.*, 1993) (figure n°8). Les deux isoformes possèdent la même séquence primaire (Oesch *et al.*, 1985 ; Stahl *et al.*, 1993), contredisant le fait qu'à une séquence primaire correspond une unique conformation biologiquement active. La PrPSc dériverait d'une modification post traductionnelle de la PrPc (Meyer *et al.*, 1986 ; Prusiner *et al.*, 1991). La grande résistance aux procédés physico-chimiques de la PrPSc a été attribuée à sa structure tertiaire (feuillets β) la rendant très stable (Muramoto, 1996). Ces feuillets β seraient à l'origine de la résistance à la protéinase K notamment. La structure de la PrPSc interviendrait également dans le catabolisme de la PrPc aboutissant à une accumulation progressive de la PrPSc, en jouant un rôle de nucléateur (Prusiner *et al.*, 1991 ; Harris 1999).

La PrPres une fois introduite dans l'organisme catalyse la transformation de PrPc en PrPres. Deux mécanismes de transformation sont suspectés :

- le premier appelé « template assistance mechanism » : la PrPSc s'accroche à une PrPc pour former un hétérodimère se transformant en homodimère de PrPSc donnant ainsi deux molécules de PrPSc qui peuvent alors transformer à leur tour la PrPc,
- le second mécanisme appelé « nucleated polymerization mechanism » ferait intervenir des oligomères de PrPSc qui s'accrocheraient à une molécule de PrPc laquelle serait alors transformée en protéine pathologique. Les expériences *in vitro* pour mettre en évidence un tel mécanisme ont été concluantes mais nécessitent un large excès de PrPSc par rapport à la PrPc, ce qui n'est pas le cas *in vivo* au moins au début de l'infection. *In vivo*, une protéine dite X appartenant à la famille des chaperonnes pourrait faciliter cette réaction en se fixant à leurs substrats, favorisant le repliement des protéines lors de leur synthèse et leur transport dans les organites cellulaires mais aussi en évitant l'agrégation des protéines lors de stress cellulaire. Certaines chaperonnes de levure et de bactérie augmentent d'ailleurs de façon significative la formation de PrPSc.

9. Propriétés physico-chimiques de cet ATNC :

L'agent de la tremblante, tout comme les autres prions, est particulièrement résistant aux différentes méthodes utilisées pour inactiver les bactéries, virus et autres parasites. Cette résistance varie en fonction des isolats, de la matrice support du matériel biologique à inactiver (lyophilisation, taille du matériel...) (Kimberlin *et al.*, 1983). La résistance de cet agent est connue vis-à-vis de différents procédés physiques, chimiques ou enzymatiques.

Concernant les procédés physiques, les rayons UV comme les rayons X sont inefficaces dans l'inactivation de tissus infectés (Latarjet *et al.*, 1970). Il en va de même pour les traitements par micro-ondes ou ultrasons (Gibbs *et al.*, 1978). L'efficacité des traitements par la chaleur sèche dépend de l'état d'hydratation de l'échantillon : plus l'échantillon est déshydraté, plus sa résistance au traitement est importante (durée de traitement supérieure, température supérieure). En deçà d'un certain seuil (température insuffisante ou durée insuffisante), l'agent infectieux reste décelable (Dickinson *et al.*, 1978). L'efficacité du traitement dépend également des souches de prions soumises au traitement (par exemple la transmissibilité d'une souche d'ESB a été démontrée malgré un traitement à 600°C pendant 15 min) (Brown *et al.*, 2000). L'inactivation par passage dans un autoclave (chaleur humide) varie en fonction de la nature du matériel biologique utilisé (le passage successif de certains isolats de tremblante sur des rongeurs augmente la résistance) (Dickinson *et al.*, 1978 ; Kimberlin *et al.*, 1983 ; Taylor *et al.*, 1994), de l'état d'hydratation du tissu (l'inactivation du prion est d'autant plus importante que l'échantillon est hydraté) et de la nature du traitement (couple température-temps).

Les produits chimiques sont également peu actifs sur les ATNC. La résistance des isolats de prions est étroitement dépendante de la souche considérée et les résultats obtenus pour une souche ne sont pas forcément transposables à une autre. Les détergents, agents alkylants, solvants organiques et oxydants sont peu efficaces, n'abaissant que très faiblement le titre infectieux. Les plus efficaces semblent être les détergents-dénaturants comme le sodium-dodécyl-sulfate (SDS). Cependant, ils ne font que réduire de façon importante mais incomplète le titre infectieux. Associé à un traitement physique tel que l'autoclave ou l'ébullition, ce traitement (SDS) semble plus efficace (Taylor *et al.*, 1999, Tateishi *et al.*, 1991). Le formol ou l'éthanol renforcent quant à eux la résistance aux autres techniques de décontamination (Taylor *et al.*, 1988, Taylor *et al.*, 1996).

Les solutions dont le pH est compris entre 2 et 10 semblent peu efficaces dans l'inactivation des ATNC. L'acide formique est capable de diminuer de façon importante le titre infectieux (Brown *et al.*, 1990 ; Taylor 1995), cet acide solubilisant les protéines. Une solution molaire de soude permet de réduire en grande partie l'infectiosité après une durée de traitement d'une heure. Malgré toutes ces résistances, l'association d'un traitement à l'autoclave avec un traitement à la soude semble détruire les souches les plus résistantes (souches 263K, traitement à 121°C pendant 90 min en soude molaire (Prusiner *et al.*, 1984) ou 301V, une minute d'ébullition en soude molaire (Taylor *et al.*, 1999)).

Enfin, les ATNC sont relativement résistants aux traitements enzymatiques, qui sont ainsi la base de nombreuses méthodes de diagnostic (élimination de la PrPc par des protéases tout en conservant la PrPSc). La protéinase K (PK) permet toutefois de réduire le titre infectieux après un contact prolongé avec les tissus infectés (Prusiner *et al.*, 1981).

D. PATHOGENESE DE LA TREMBLANTE :

L'agent étiologique n'étant pas encore clairement identifié, certains aspects de la pathogénie de la maladie demeurent encore méconnus. Toutefois, de nombreux éléments du schéma de dissémination de l'agent dans l'organisme sont à présents établis. L'infection naturelle peut être divisée en deux grandes phases successives :

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

1. La phase de lympho-invasion :

Lors de tremblante, il semble établi que la voie majeure de contamination est digestive. Après exposition à l'agent, une accumulation de PrPSc est rapidement décelable dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif, les plaques de Peyer. L'agent de la tremblante subit alors une phase de réplication/propagation dans l'ensemble des tissus lymphoréticulaires, initialement dans ces plaques de Peyer (Andreoletti *et al.*, 2000) puis dans les nœuds lymphatiques associés au tube digestif, et enfin dans l'ensemble des formations

lymphoïdes secondaires (amygdales, rate...). Cette phase d'envahissement lymphoïde peut durer plusieurs mois, avant que l'agent de la tremblante n'atteigne le système nerveux central (Detwiler et Baylis, 2003). La PrPSc peut être détectée dans les plaques de Peyer iléales dès 21 jours chez des animaux sensibles, puis dans l'ensemble du tissu lymphoïde associé à l'intestin, la rate, les amygdales et les autres nœuds lymphatiques de l'agneau (à l'exception notable du thymus) à partir de 4 mois. Cet âge minimal de détection de la PrPSc dans les différents tissus dépend de la souche de tremblante considérée mais également du génotype de l'hôte, ainsi que de la dose infectante.

2. La phase de neuro-invasion :

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

Les organes lymphoïdes sont largement innervés par des fibres sympathiques et l'hypothèse d'une contamination de ces fibres au contact des organes lymphoïdes a été très tôt proposée (Kimberlin et Walker, 1980). De plus, le réseau du système nerveux autonome (SNA, ensemble de neurones organisés en plexus dans la paroi digestive) comporte de très nombreuses fibres nerveuses amyéliniques dont certaines innervent la zone superficielle des follicules lymphoïdes. La contamination du SNA et des fibres sympathiques se ferait donc par l'ensemble des sites d'interface du tissu lymphoïde annexé au tube digestif.

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

- les fibres nerveuses sympathiques (nerfs splanchniques) qui innervent les organes digestifs et leurs formations lymphoïdes,
- les fibres parasympathiques et notamment celles du nerf vague, comme en témoigne la présence précoce de PrPSc dans le noyau dorsal du nerf vague chez les ovins atteints de tremblante.

La PrPSc est ainsi détectée vers à l'âge de 9 mois dans le noyau dorsal du nerf vague et les colonnes intermédo-latérales de la moelle épinière thoracique. La translocation de la PrPSc par les fibres nerveuses pourrait se faire soit grâce au transport axonal, soit par un mécanisme non axonal mettant en jeu les cellules de Schwann. Une hypothèse de circulation de l'agent par voie sanguine (Hunter *et al.*, 2002) des organes lymphoïdes vers le système nerveux central a également été proposée.

Après atteinte du système nerveux central, une redistribution secondaire du prion dans l'organisme semble possible, comme en témoigne l'atteinte des nerfs périphériques ou des fibres musculaires (Andréoletti *et al.*, 2004).

3. Génétique de la tremblante chez les ovins :

Même si la tremblante est associée à une origine infectieuse, la variabilité naturelle rencontrée dans les formes naturelles de tremblante suggère une influence génétique. Des études portant sur des lignées ovines sélectionnées en fonction de leur durée d'incubation ont permis à Dickinson *et al.* (1968) de montrer l'existence d'un déterminisme génétique mendélien. Ils décrivent alors le gène *Sip* (*Scrapie incubation period*), gène à effet majeur autosomal, possédant deux allèles *sA* (*short incubation*) et *pA* (*prolongated incubation*). Par la suite, il a été établi que *Sip* et PRP ne sont qu'un seul et même gène (Lantier *et al.*, 1995).

La variabilité au locus PRP est bien connue actuellement et quatorze allèles ont été décrits pour le gène PRP ovin. Toutefois, différentes études ont montré qu'il existe des codons principaux (136, 154 et 171) dont la nature influence directement la susceptibilité à la tremblante et des codons secondaires dont les mutations sont dites muettes et n'ont pas d'influence sur la maladie. Le tableau n°1 présente les différentes formes observables sur le gène PRP aux trois principaux codons ; les formes mutées dérivent toutes de la forme ancestrale ARQ (tableau n°1).

Codons	136	154	171
Forme ancestrale	Ala (A)	Arg (R)	Gln (Q)
Formes mutées	Val (V)	Arg (R)	Gln (Q)
	Ala (A)	His (H)	Gln (Q)
	Ala (A)	Arg (R)	Arg (R)
	Ala (A)	Arg (R)	His (H)
	Threo (T)	Arg (R)	Gln (Q)
	Ala (A)	Arg (R)	Lys (K)

Tableau n°1 : Polymorphisme aux codons 136, 154 et 171 du gène PRP chez les ovins (Arg = arginine, Gln = Glutamine, His = Histidine, Val = Valine, Threo = Thréonine, Lys = Lysine).

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

- des animaux résistants qui, placés dans un environnement fortement contaminant ou inoculés expérimentalement, ne déclenchent pas la maladie : c'est le cas des ovins de génotype ARR-ARR, qui sont considérés comme très résistants à la maladie ; jusqu'à récemment, aucun cas de tremblante n'avait été détecté chez des ovins de ce génotype, mais il semblerait tout de même qu'il puisse exister de rares cas de tremblante chez de tels individus (Groshup *et al.*, 2007), la résistance à la tremblante n'étant ainsi plus considérée comme absolue.
- des animaux intermédiaires, qui développeront la maladie avec une incidence variable mais faible, et avec une longue période d'incubation : c'est le cas des ovins hétérozygotes ARR, et homozygotes ou hétérozygotes AHQ. Sur des ovins de race Romanov, l'incidence est inférieure à 5% et l'âge à la mort est par ailleurs plus tardif que chez des ovins sensibles (Elsen *et al.*, 1999).
- des animaux très sensibles qui, placés en milieu contaminant, développent la maladie sous une incidence très élevée et une durée d'incubation courte. Sur un millier de moutons de race Romanov issus d'un troupeau français naturellement infecté (troupeau de Langlade), les animaux homozygotes VRQ semblent les plus sensibles à la tremblante (76% des ovins atteints). Cette sensibilité est élevée mais moindre pour les animaux hétérozygotes ARQ/VRQ (52% des cas) et homozygotes ARQ (42% des cas) (Elsen *et al.*, 1999) (figure n°10).

Génotype	Cas par millions	classe du <i>plan national tremblante</i>
ARR/ARR	0	A
ARR/AHQ	0,3	B
ARR/ARQ	0,4	B
ARR/ARH	0	B
AHQ/AHQ	5	C
ARQ/AHQ	9	C
AHQ/ARH	0	C
ARH/ARH	2	C
ARQ/ARH	5	C
ARQ/ARQ	37	C
ARR/VRQ	6	D
AHQ/VRQ	0,7	E
ARQ/VRQ	225	E
ARH/VRQ	405	E
VRQ/VRQ	545	E

Figure n°10 : Estimation du nombre de cas de tremblante par million de moutons de chaque génotype en Grande-Bretagne par an et degré de résistance/sensibilité attribué à ces génotypes par le Plan National Tremblante (Source :Detwiler et Baylis, 2003)

A : Moutons génétiquement les plus résistants à la tremblante

B : Moutons génétiquement résistants à la tremblante, mais qui ont besoin d'être soigneusement sélectionnés pour la reproduction

C : Moutons avec une petite résistance génétique à la tremblante, mais qui peuvent être utilisés ou vendus pour la reproduction dans des périodes exceptionnelles

D : Moutons génétiquement susceptibles à la tremblante, mais qui peuvent être utilisés exceptionnellement pour la reproduction dans le contexte d'un plan de reproduction approuvé

E : Moutons hautement sensibles à la tremblante et non utilisés pour la reproduction. Les mâles doivent être abattus ou castrés

Les fréquences de ces différents allèles sont très diverses en fonction des races, entraînant l'existence de races ovines plus résistantes que d'autres à la tremblante. Une étude de l'INRA a porté sur une vingtaine de races ovines allaitantes, où les chercheurs ont typé une centaine de béliers par race, ainsi que sur 5 races ovines laitières françaises et 3 races étrangères (Site de l'INRA : « variabilité de la sensibilité génétique à la tremblante dans différentes races ovines en France et en Europe »). Les chercheurs ont ainsi démontré une prédominance, quelle que soit la race, de l'allèle ancestral ARQ. Il existe également des races où il y a une forte proportion de l'allèle ARR, comme la race Berrichon du Cher ou Ile de France, conférant aux animaux une plus grande résistance à la tremblante. Les races de croisement terminal sont relativement résistantes à la tremblante avec des fréquences d'ARR de 60 à 80% (sauf Charmoise, Texel et Vendéenne). La race Charolaise semble avoir une résistance moyenne à la tremblante, alors que les races rustiques du Sud sont assez sensibles

avec une proportion d'ARR de 20 à 45%. Les fréquences sont très variées chez les races laitières (Elsen *et al.*, 2002).

La capacité de résistance d'un génotype donné à la tremblante est également dépendante de la souche de prion. Une étude de Goldman *et al.* (1994) a montré que le génotype ARQ/ARQ était plus sensible aux ESST que le génotype VRQ/VRQ lors d'inoculation expérimentale par la souche CH1641 et la souche de l'ESB, alors que lors d'inoculation par la souche SSBP/1, la sensibilité est plus grande pour les VRQ/VRQ. Cela bien entendu pose la question de l'existence de souches auxquelles les ARR/ARR pourraient être sensibles (Goldman *et al.*, 1994).

4. Lutte génétique contre la tremblante :

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

Compte tenu des connaissances actuelles, l'utilisation de l'allèle ARR comme moyen de lutte contre la maladie semble une approche intéressante. Même si certaines questions fondamentales restent en suspens (existence d'un portage sain, universalité de la résistance des ARR, cas de la tremblante atypique découverte en 1998...), des programmes de lutte basés en grande partie sur la sélection d'animaux résistants ont vu le jour en Grande-Bretagne, en France et aux Pays-Bas. Ces programmes de lutte ont eu pour objectifs majeurs :

- l'élimination de l'allèle VRQ, puisque une fréquence élevée de cet allèle représente un facteur de risque important,
- la sélection de l'allèle ARR dans le noyau de sélection,
- le renouvellement des cheptels atteints avec des reproducteurs résistants à la tremblante,
- la qualification des cheptels reproducteurs.

Ces programmes ont prouvé depuis quelques années leur capacité à diminuer le nombre de cas de tremblante et le nombre de troupeaux atteints dans les pays qui les ont mis en œuvre.

II. LE MAEDI-VISNA :

Le Maedi (*essoufflement* en islandais) est une pathologie pulmonaire qui a pris de l'ampleur en Islande peu avant la seconde guerre mondiale. Il s'agit d'une pneumonie interstitielle progressive touchant les ovins. La maladie est caractérisée par une évolution lente, apyrétique, avec une dégradation progressive de l'état général, une perte de poids importante allant jusqu'à la cachexie, et par une dyspnée plus ou moins marquée pendant et après l'effort (Palsson, 1990). Cette maladie est apparue en Islande suite à l'introduction de béliers en provenance d'Allemagne (Palsson, 1990).

Le Visna (*dépérissement* en Islandais) est quant à lui une encéphalomyélite virale progressive, caractérisée par une faiblesse des membres postérieurs au début de la maladie, avec évolution vers une paralysie dans sa phase terminale (Palsson, 1990). Cette maladie n'est présente que dans les élevages atteints de Maedi.

Les premiers travaux de Sigurdsson ont permis de montrer que ces deux maladies sont dues à deux virus identiques ayant un tropisme différent, l'un pour le système nerveux, l'autre pour le parenchyme pulmonaire, entraînant des signes cliniques au bout d'une période d'incubation très longue (Sigurdsson *et al*, 1952 ; Sigurdsson *et al*, 1957). Dès 1975, des mammites apyrétiques sur des brebis souffrant de pneumonie progressive ont été décrites ; elles résultent d'une prolifération lymphocytaire massive à l'origine d'une induration mammaire chronique (Oliver *et al.*, 1981). Cinq ans plus tard, Van-Der-Molen *et al.* observent les mêmes lésions et décrivent ces lésions comme une autre manifestation possible de l'infection par le Maedi Visna Virus (Van-Der-Molen *et al.*, 1985).

A. ETIOLOGIE :

Le MVV (Maedi Visna Virus) a été le premier lentivirus identifié dans la famille des *Retroviridae*, bien avant les virus humains HIV (Human immunodeficiency virus) et HTLV (Human T-lymphotropic virus). Il a été pendant longtemps le premier modèle d'étude des lentivirus.

Dans la famille des *Retroviridae*, on distingue plusieurs genres au sein de deux sous-familles :

- La sous-famille des *Orthoretrovirinae* :

Le genre *Alpharetrovirus* dont le prototype est le virus de la leucémie aviaire (ALV : Avian Leukosis Virus).

Le genre *Betaretrovirus* dont le représentant majeur est le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus).

Le genre *Gammaretrovirus* dont le représentant est le virus de la leucémie murine (MLV : Murine Leukaemia Virus).

Le genre *Deltaretrovirus* est représenté par le virus de la leucémie bovine (BLV : Bovine Leukaemia Virus) et les virus des leucémies à cellules T humaines 1 et 2 (HTLV : Human T-Lymphotropic Virus).

Le genre *Epsilonretrovirus* présente comme virus type le virus du sarcome dermique du saumon 'Walleye' (WDSV : Walleye Dermal Sarcoma Virus).

Le genre *Lentivirus* dont le prototype a été à l'origine le virus Maedi-Visna (MVV) du mouton présente actuellement comme modèle le virus de l'immunodéficience humaine (HIV).

- La sous-famille des *Spumaretrovirinae* :

Le genre *Spumavirus* dont les prototypes sont le virus spumeux du chimpanzé (CFV : Chimpanzee Foamy Virus) et le virus spumeux humain (Human Spumavirus).

Le genre *Lentivirus*, auxquels appartiennent le MVV (Visna-Maedi Virus), le CAEV (Caprine Arthritis Encephalitis Virus), le BIV (Bovine Immunodeficiency Virus), le FIV (Feline Immunodeficiency Virus), le SIV (Simian Immunodeficiency Virus), le EIAV (Equine Infectious Anemia Virus) et le HIV (Human Immunodeficiency Virus), est constitué de plusieurs virus ayant une structure génétique et des mécanismes moléculaires de réplication communs mais des interactions biologiques avec leur hôte qui leur sont propres (Blacklaws *et al.*, 1995). Les lentivirus sont à l'origine d'infections persistantes et progressives, donc de maladies à évolution lente, caractérisées par une longue période de latence aboutissant à la dégénérescence de multiples organes et à la mort (Pépin *et al.*, 1998).

Le Maedi-Visna Virus appartient donc aux maladies dites à virus lents, maladies ayant les caractéristiques suivantes (Sigurdsson, 1954) :

- une incubation longue pouvant aller de quelques mois à quelques années : les symptômes apparaissent le plus souvent sur des animaux adultes (3-4 ans), toujours de plus de deux ans (Bouchard *et al.*, 1980), rarement avant trois ans (Faye, 1979). Les signes cliniques apparaissent essentiellement à l'agnelage et au cours de la lactation (Faye, 1979 ; Palsson, 1990 ; Savey *et al.*, 1988). L'incubation du Visna dure entre 9 et 55 mois (Bouchard *et al.*, 1980 ; Dawson, 1980),

- une évolution inexorable vers la mort,
- une infection limitée à une seule espèce et des lésions confinées à un seul type d'organes ou de tissus.

Seule une proportion très faible des individus atteints développent des symptômes (Savey, 1988) : « l'infection est la règle, la maladie est l'exception ». Ainsi la morbidité du MVV est de 2 à 5% du troupeau (Faye, 1979), jusqu'à 15% dans de rares cas. La mortalité est toujours de 100%.

1. Structure des particules lentivirales :

Comme tous les rétrovirus, le MVV est un virus enveloppé. Il est constitué d'un génome viral à ARN associé à une reverse transcriptase et à des nucléoprotéines contenues dans la capsid. Cette nucléocapside est entourée d'une enveloppe virale constituée de phospholipides issus de la membrane plasmique de la cellule infectée et de glycoprotéines virales de surface (SU) et transmembranaires (TM). Le diamètre des particules lentivirales peut varier de 80 à 140 nm (figure n°11).

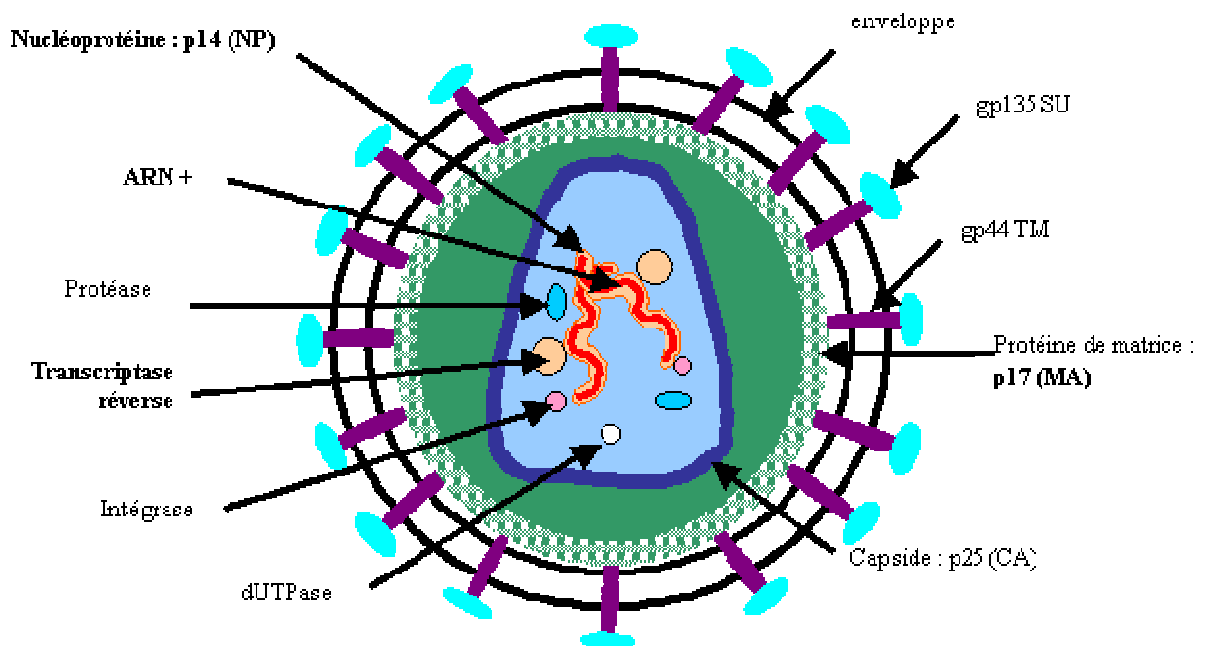


Figure n° 11 : Structure du virus Maedi-Visna

2. Organisation génomique du virus Maedi-Visna : (Pépin *et al.*, 1998)

Le MVV possède une organisation typique de lentivirus (figure n°12). Il est constitué de deux molécules d'ARN simple brin de polarité (+) et comprend trois gènes de structure codant pour l'enveloppe virale (*env*, 'enveloppe'), la capsidie (*gag*, 'group-specific antigen'), les enzymes virales (*pol*, 'polymerase'), et trois gènes accessoires : *vif*, *rev* et *tat*. Le nombre et le rôle de ces gènes accessoires varient en fonction du lentivirus considéré.

L'ARN viral est encadré par deux régions terminales (U3 et U5) jouant un rôle au cours de la réplication précoce du virus. L'extrémité 5' de l'ARN viral débute par une courte séquence dite répétée (R). L'organisation générale du génome est R-U5-gag-pol-env-U3-R, avec une extrémité 3' coiffée et une extrémité 5' polyadénylée. La région U3 contient une séquence promotrice et une séquence activatrice qui constituent le site d'action des produits de certains gènes transactivateurs viraux et aussi de facteurs de transcription cellulaires.

Lors de la réplication, chaque molécule d'ARN servira de matrice pour la synthèse de l'ADN proviral. L'ADN du MVV a une taille de 9,2 Kb. Le génome proviral est flanqué de régions terminales non codantes : les LTR (Long Terminal Repeat) nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire et également responsables de la régulation de l'expression des gènes viraux. Les lentivirus diffèrent des autres rétrovirus par leur capacité à réguler l'expression de leurs propres gènes.

Les trois gènes principaux : *gag*, *pol* et *env* du MVV codent des précurseurs qui seront ensuite clivés pour donner les protéines de structure et les enzymes virales (figure n°12):

- Le gène *gag* code pour des protéines de structure essentielles dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Il code notamment pour un précurseur protéique Pr55^{gag} dont le clivage permet l'obtention des protéines de la matrice (MA) p17, de la capsidie (CA) p25 et de la nucléoprotéine (NP) p14.
- Le gène *pol* code pour les enzymes nécessaires à la réplication du virus, à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales. Le précurseur Pr^{gag-pol} sera scindé en plusieurs enzymes : la reverse transcriptase associée à une activité ribonucléase H (RNase H), l'intégrase et la protéase. Dans le cas du virus Maedi Visna, il existe une autre enzyme : la dUTPase. Ce gène est absent du génome des lentivirus de primates.
- Le gène *env* code pour un large précurseur (Pr160^{env}) qui est clivé par une protéase cellulaire pour donner naissance à la glycoprotéine de surface (SU) (gp135) et à la glycoprotéine transmembranaire (TM) (gp44) constituant, en association avec les protéines de la membrane cellulaire, l'enveloppe virale.

Le génome comprend également des petits cadres ouverts de lecture situés entre les gènes *pol* et *env* et dans le gène *env*, codant pour différentes protéines régulatrices : *Tat* (transactivator of transcription), *Rev* (regulation of expression of viral proteins) et une protéine accessoire *Vif* (virion infectivity factor).

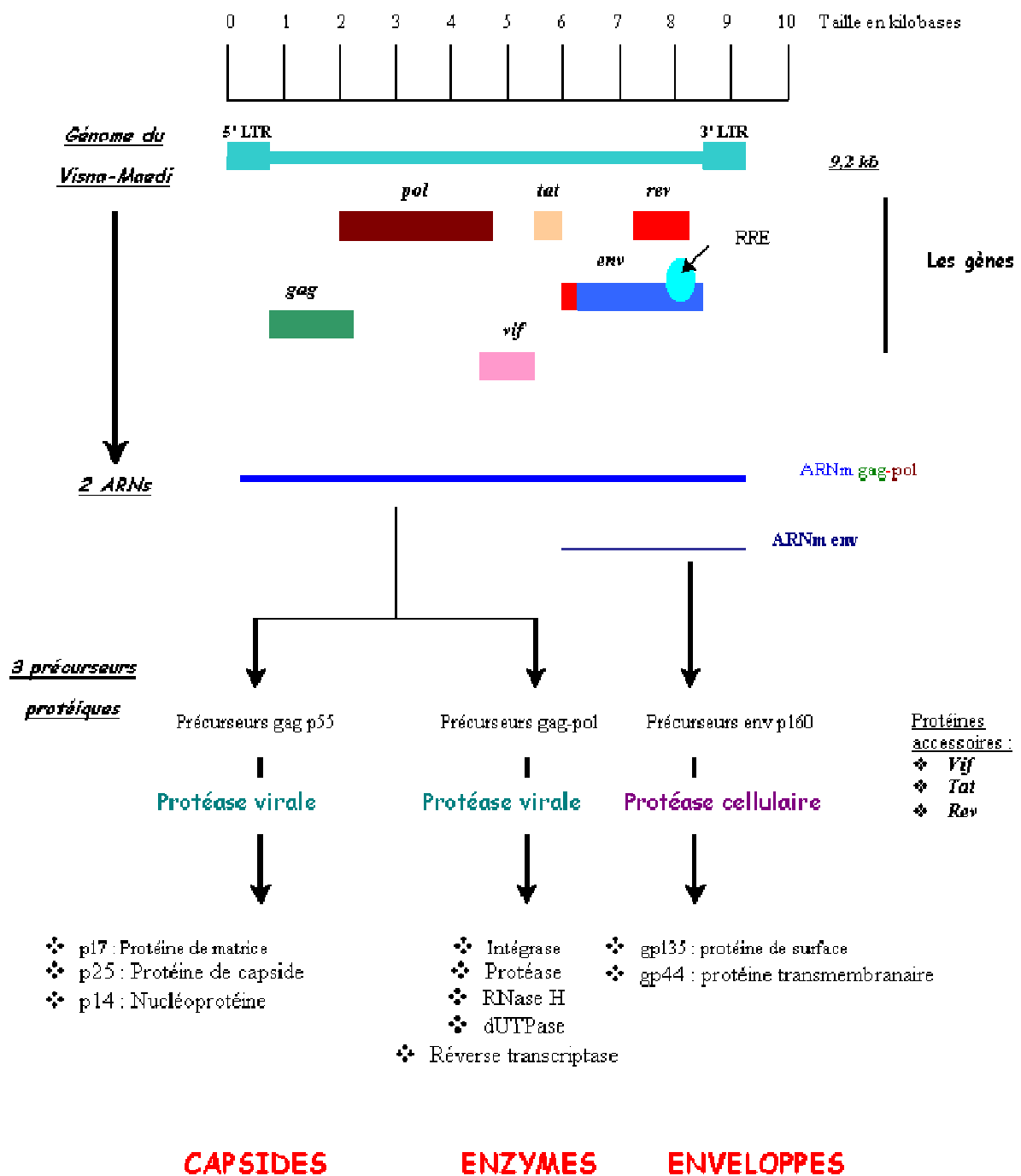


Figure n°12 : Organisation génomique du virus Maedi-Visna

3. Les protéines du Maedi-Visna et leurs rôles :

* Les enzymes virales sont issues du précurseur Pr^{gag-pol} (Pepin *et al.*, 1998).

L'enzyme clé des rétrovirus est une ADN polymérase-ARN dépendante codée par le gène *pol*. Elle permet la transcription de l'ARN viral en ADN monocaténaire puis bicaténaire, formant ainsi le provirus capable de s'intégrer alors dans le génome de la cellule hôte. Cette protéine élimine ensuite l'ARN matrice.

La séquence génomique codant la dUTPase est localisée dans le gène *pol*. Cette enzyme, présente chez le FIV, l'EIAV, le CAEV et le MVV a pour rôle de diminuer la fréquence des mutations G-A.

Une intégrase est associée à l'ARN viral. Elle permet, comme son nom l'indique, l'intégration du génome viral sous forme d'ADN bicaténaire dans l'ADN de la cellule hôte, après que le provirus issu de la transcription réverse dans le cytoplasme ait migré dans le noyau.

Enfin, une protéase virale clive les précurseurs protéiques Pr^{gag-pol} et Pr55^{gag}. Elle est impliquée dans la maturation des protéines virales et agit en fin de cycle de réplication.

*Les protéines régulatrices : dans le cas du MVV, on retrouve les protéines *Tat* et *Rev*, qui régulent l'expression des autres gènes, et *Vif* qui contrôle la production des particules virales infectieuses. Les ARNm codants pour *Tat* et *Rev* sont produits précocement après le début de la transcription.

La protéine *Tat* du MVV (10 kDa) est codée par un seul exon. Les lentivirus sont classés en deux groupes en fonction du mode d'action de leur protéine *Tat*. Le premier groupe comprend les HIV, SIV, BIV et EIAV pour lesquels *Tat* se lie à une structure en boucle de l'ARN appelé TAR (trans-activation response element) ; le second groupe formé par le MVV, le CAEV et le FIV ne possède pas de séquence TAR. La fonction trans-activatrice de *Tat* qui permet l'accumulation d'ARNm viraux s'exercerait *via* les sites AP-1 et AP-4 situés dans la région U3 des LTR (Gdovin et Clements, 1992 ; De Parseval et Elder, 1999). La protéine *Tat* du MVV est caractérisée par un faible potentiel de trans-activation (Davis et Clements, 1989 ; Villet *et al.*, 2003). La trans-activation est une activation de gènes opérant à distance par un facteur diffusible, pour moduler l'expression des gènes d'autres molécules d'ADN.

La protéine *rev* du MVV est codée par quatre exons situés de part et d'autre du gène *env* ; il est transcrit en un ARNm de 1,4 Kb. La protéine Rev (19 Kda) possède un signal d'exportation nucléaire et facilite l'exportation des ARNm non épissés du noyau vers le

cytoplasme en se fixant sur une région appelée RRE (Rev-responsive element) présente dans le gène *env* du génome. Les virus mutants *rev* sont non infectieux (Pépin *et al.*, 1998).

La protéine Vif (29 Kda) est transcrite lors des phases tardives de la réplication virale (Audoly *et al.*, 1992 ; Harmache *et al.*, 1995). L'importance de Vif lors de la réplication du MVV n'est pas démontrée mais cette protéine faciliterait l'infectiosité et la propagation du virus dans les lymphocytes et macrophages.

*Les protéines virales de structure : Le MVV est constitué de deux protéines d'enveloppe :

- une glycoprotéine de surface gp135 SU qui se fixe sur les récepteurs spécifiques de la cellule hôte. Elle porte les déterminants antigéniques qui seront les cibles des anticorps neutralisants et des cellules T cytotoxiques dans la réponse immunitaire dirigée contre le virus,
- une glycoprotéine transmembranaire gp44 TM qui participerait au processus de fusion et de pénétration du virus dans la cellule hôte (Narayan et Clements, 1989).

Les glycoprotéines d'enveloppe des lentivirus ont des fonctions biologiques importantes et contiennent les épitopes responsables à la fois de l'induction d'anticorps neutralisants et de l'interaction des virus avec le ou les récepteur(s) membranaire(s) à la surface des cellules hôtes. Il semblerait que le virus Visna-Maedi et le CAEV, deux lentivirus très proches en termes de structure et de séquence de leur génome, auraient des épitopes de nature différente contenus au niveau de leur glycoprotéine d'enveloppe respective (Chebloune *et al.*, 1996).

Les protéines de capsid sont représentées chez le MVV par p25, p14 et p17 (Cheevers *et al.*, 2003). La protéine de matrice (MA ou p17) est responsable de l'association du précurseur Pr55^{gag} avec la membrane cellulaire. La p17 est située entre l'enveloppe virale et la protéine de capsid (CA ou p25) du virus. La p25, protéine majeure du core, est l'antigène inducteur d'une forte réponse anticorps utilisée dans les tests de dépistage. La nucléoprotéine (NP ou p14) est directement associée aux molécules d'ARN viral.

4. Les récepteurs et cibles cellulaires du Maedi-Visna :

La nature précise des récepteurs du MVV, mais également du CAEV, n'est pas encore clairement connue. Des anticorps dirigés contre une protéine de 50 kDa présente à la surface des cellules de plexus choroïde ovines empêchent l'infection de ces cellules par le MVV (Crane *et al.*, 1991). Jolly *et al.* (1989) ont montré l'entrée du MVV dans les macrophages par l'intermédiaire du récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines. L'infection des cellules de membrane synoviale de chèvre par le CAEV est bloquée par la pré-incubation de ces cellules avec la glycoprotéine de surface gp135. On peut supposer que l'infection de ces cellules met en jeu une interaction entre la gp135 et un/ou plusieurs récepteurs cellulaires (Hullinger *et al.*, 1993). L'équipe de Hotzel (2001) a réalisé des mutants du virus CAEV exprimant des glycoprotéines de différentes souches de Maedi-Visna et montré qu'en fonction de l'origine de la souche de Visna utilisée, l'infection par ce virus recombinant n'était pas toujours limitée à l'infection des cellules de petits ruminants. La capacité du MVV à se répliquer dans une large gamme de cellules suggère qu'il utilise soit une molécule très commune, soit différents récepteurs. Plus récemment, l'équipe de J.E. Clements (Bruett *et al.*, 2000 ; Barber *et al.*, 2000) a identifié un récepteur cellulaire du virus Maedi-Visna. La première étude réalisée par Bruett *et al.* (2000), a mis en évidence un complexe protéique constitué de deux protéines majeures de 30 et 45 Kda. Cette protéine de 30 kDa est un protéoglycane portant un groupement GAG (chondroitin sulfate glycosaminoglycan) associé à la membrane cellulaire. La présence d'un inhibiteur de l'addition du groupement GAG sur le protéoglycane réduit de manière significative l'infection des cellules de plexus choroïde par le MVV. Une seconde étude (Barber *et al.*, 2000) a permis d'identifier la structure de la protéine de 45 kDa. Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase présente dans les cellules susceptibles d'être infectées par le MVV. La protéine de 45 Kda associée à une autre protéine de 56 Kda est mise en évidence dans des cellules infectées et capables de produire de nouvelles particules virales. Cette protéine de 56 Kda pourrait être le substrat de la sérine thréonine kinase qui aurait un rôle auxiliaire dans la réplication virale.

Les cellules cibles du virus Maedi-Visna et du CAEV sont essentiellement les cellules de la lignée monocytes / macrophages. Au début de la maladie, seuls quelques monocytes et pro-monocytes issus de la moelle osseuse sont infectés avec une réplication limitée : le virus réside alors sous la forme d'ADN proviral. Lors de la maturation et de la différenciation des monocytes en macrophages, l'augmentation du nombre de récepteurs viraux et la production

de certains facteurs cellulaires stimulent la transcription virale ce qui augmente la sensibilité à l'infection (Clements *et al.*, 1994). Mais d'autres populations cellulaires peuvent également être la cible des lentivirus. Certaines cellules du système nerveux central sont infectées par le MVV : les cellules épithéliales, les fibroblastes des plexus choroïdes, les astrocytes et les oligodendrocytes. S'il est clairement établi aujourd'hui que la principale cible du lentivirus ovin est bien la lignée monocyttaire, il est reconnu que d'autres cellules peuvent également être infectées *in vivo*, comme des lymphocytes. Le pourcentage de lymphocytes infectés reste malgré tout assez faible et la réplication virale au sein de ces cellules semble non productive (Zinck et Johnson, 1994).

5. Le cycle lentiviral :

Le cycle lentiviral a surtout été étudié dans le cas du HIV-1. *In vitro*, le cycle de réplication du virus Maedi-Visna a principalement été observé sur cellules de plexus choroïde de mouton. L'interaction entre le virion et le récepteur cellulaire entraîne un changement de conformation de la glycoprotéine de surface, suivi de sa coupure protéolytique et du démasquage du domaine de fusion situé à l'extrémité amino-terminale de la protéine membranaire. Après fixation de la glycoprotéine gp135 sur le récepteur cellulaire et la fusion des lipides viraux et cellulaires, la capsid est éjectée dans le cytoplasme de la cellule puis dégradée, permettant la libération de l'ARN viral. La transcriptase inverse présente dans la capsid virale va synthétiser un brin d'ADN complémentaire du génome viral, avec formation d'un hybride ARN-ADN ; le brin d'ARN sera éliminé grâce à l'activité RNase H de la transcriptase reverse. Le brin d'ADN sera dupliqué en ADN bicaténaire dans le cytoplasme. L'ADN bicaténaire migre dans le noyau où il s'intègre à l'ADN cellulaire grâce à l'endonucléase virale ou intégrase. Les lentivirus, à la différence des autres rétrovirus, peuvent s'intégrer dans une cellule qui n'est pas en division. A partir de l'ADN proviral et à la faveur d'une activation par des facteurs extérieurs ou physiologiques, la transcription débutera. Il y a d'une part formation d'ARNm non épissés (ARN génomique) codant pour les protéines *gag*, *pol* et *env*, qui seront encapsidés, et d'autre part formation d'ARNm épissés qui permettront la synthèse des protéines régulatrices et des protéines de structure. Après assemblage des protéines de capsid et encapsidation des deux ARNs génomiques et des nucléoprotéines, les virions sont alors libérés par bourgeonnement à la surface de la cellule infectée.

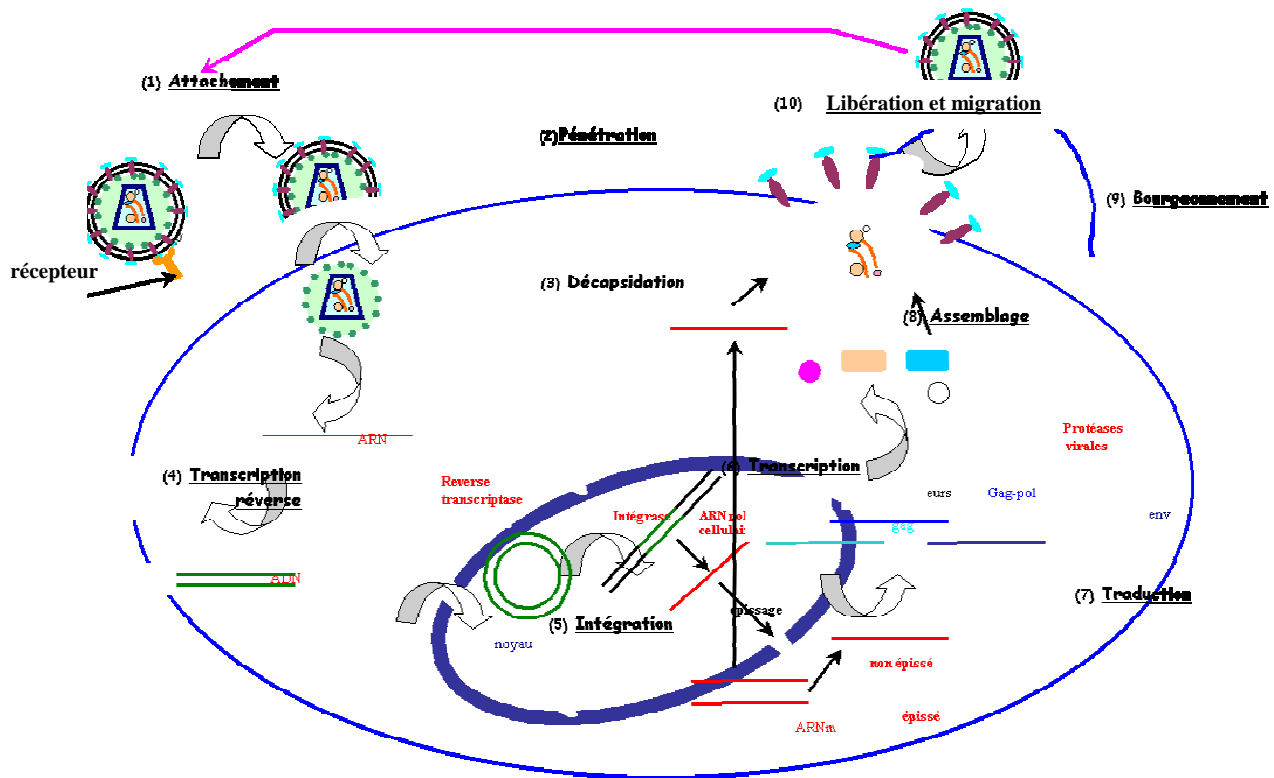


Figure n°13 : Le cycle lentiviral

6. Propriétés biologiques :

La réplication des lentivirus a lieu uniquement dans certains types de cellules et contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus peuvent se développer dans des cellules en différenciation et non nécessairement en division (Pyper *et al.*, 1990). Le MVV possède un pouvoir de réplication intense et provoque un effet cytopathogène important. L'infection par le MVV est à l'origine d'une importante production d'anticorps neutralisants (Pyper *et al.*, 1990). Comme tous les lentivirus, le MVV n'est pas hémagglutinant (Petursson, 1990). *In vivo*, le virus peut être isolé après inoculation au bout d'une à deux semaines dans le système nerveux central, la rate, les nœuds lymphatiques médiastinaux et mésentériques et les poumons (Petursson, 1990) à des titres infectieux très peu élevés ; cette propriété est appelée 'phénomène de restriction'. Seule une cellule sur 10^5 ou 10^6 contient le virus (Haase, 1986), il existe ainsi une restriction de l'expression virale chez les animaux infectés. Cette propriété disparaît lors de cultures cellulaires *in vitro* (Petursson, 1990).

7. Propriétés physico-chimiques :

Le Maedi-Visna est un virus enveloppé ce qui lui confère une grande fragilité dans le milieu extérieur. Sensible aux agents détergents et chimiques tels que l'éther et le chloroforme (Palsson, 1978), le formol, l'éthanol et le phénol (Russo *et al.*, 1980 ; Faye, 1979), le virus est également très sensible aux conditions de température et pH : il est en effet inactivé en 10 min à une température de 56°C et à pH de 4,2 (Palsson, 1978 ; Petursson, 1990). Il résiste malgré tout jusqu'à -50°C plusieurs mois (Faye, 1979 ; Russo *et al.*, 1980 ; Petursson, 1990). De même le virus reste relativement résistant aux UV, résistance semblable aux Oncovirus (Thormar, 1965). En raison de la fragilité et de la sensibilité physico-chimique du MVV, la transmission du virus entre animaux ne peut donc se réaliser qu'après un contact très étroit.

B. PHYSIOPATHOGENIE GENERALE :

1. Contamination des animaux :

La contamination des agneaux a lieu essentiellement dans la période néonatale, lors de l'absorption du colostrum puis du lait. En effet, le colostrum est très riche en macrophages, cellules cibles des lentivirus. La contamination est d'autant plus importante à l'intérieur même d'un troupeau que les agneaux sont nourris à partir de lait de mélange (Pyper *et al.*, 1990). La principale porte d'entrée du virus est donc la muqueuse gastro-intestinale. Au cours de la lactation, le nombre de macrophages présents dans le lait diminue, cependant la machine à traire reste une source importante de contamination pour les adultes (Asso *et al.*, 1990). Une seconde porte d'entrée connue est la muqueuse respiratoire, via le liquide broncho-alvéolaire contenant des monocytes et macrophages infectés (Haase, 1986). Cette voie de contamination a été le principal mode de contamination en Islande lors du confinement hivernal des animaux (Bulgin, 1990 ; Pyper *et al.*, 1990).

La transmission verticale a été mise en évidence (Dawson, 1980) mais semble peu fréquente et peu efficace. La transmission sanguine est très peu fréquente en raison du faible nombre de cellules sanguines infectées ($1/10^6$) mais également par l'état de latence du virus se trouvant dans ces cellules (Dawson, 1987).

Le système de conduite du troupeau joue donc un rôle prépondérant dans la vitesse de transmission du virus au sein d'un troupeau (allaitement par lait de mélange, machine à traire, air ambiant dans le bâtiment, confinement prolongé...) (Bulgin, 1990 ; Pyper *et al.*, 1990 ; Watt *et al.*, 1992).

Une fois dans l'organisme, le virus colonise les cellules mononucléées. Il se réplique lors de son entrée dans l'organisme puis s'étend dans tout ce dernier par voie sanguine essentiellement (Haase, 1986). Le virus atteint ainsi les différents organes cibles (poumons, plexus choroïdes, nœuds lymphatiques, rate, moelle osseuse et reins) (Dawson, 1980). Lorsqu'il est infecté, l'organisme va mettre en place des moyens de défense non spécifiques (interférons, cellules natural killers, macrophages) puis spécifiques suite aux interactions entre les macrophages et les antigènes présentés par les lymphocytes. Malgré tout, l'organisme reste incapable de se débarrasser complètement du virus (Haase, 1986).

2. Phase quiescente :

Le virus possède en effet une stratégie perfectionnée lui permettant de persister sans entraîner de réponse immunitaire trop importante, ce qui signerait sa mort. Il réussit ainsi à se multiplier lentement en envahissant progressivement l'organisme et en entraînant des lésions de plus en plus importantes. L'organisme réagit à l'infection en mettant en place une réaction immunitaire à médiation cellulaire, puis une réaction à médiation humorale dans un second temps.

La réaction immunitaire à médiation cellulaire est la première à apparaître lors d'inoculation par voie parentérale dans un délai variant selon la voie d'inoculation, la dose et la souche inoculée (Adams *et al.*, 1980 ; Larsen *et al.*, 1982 ; Sihvonen *et al.*, 1980). Un pic est observé deux semaines post-inoculation puis la réaction diminue pour devenir indétectable six semaines post-inoculation (Adams *et al.*, 1980). Cette réaction à médiation cellulaire réapparaît dans le temps (Larsen *et al.*, 1982). Ceci pourrait s'expliquer par une concentration variable d'antigènes viraux circulants (restriction et latence/activation ou réinfection) (Larsen *et al.*, 1982). Lors d'infection naturelle, la réaction immunitaire à médiation cellulaire n'apparaît qu'au cours de la seconde année (Sihvonen, 1984).

La réponse immunitaire à médiation humorale apparaît plus tard que la précédente. Elle est caractérisée par une production d'anticorps variable selon la voie d'inoculation (l'inoculation parentérale induit une production d'anticorps plus précoce que l'inoculation intra-nasale) et la souche utilisée (Larsen *et al.*, 1982).

Malgré ces deux réactions immunitaires, le virus persiste et se multiplie lentement. Pour persister, le virus a mis au point plusieurs stratégies lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et donc à sa destruction. Les déterminants antigéniques reconnus par le système immunitaire induisent certes la production d'anticorps neutralisants mais cette production demeure trop lente pour neutraliser le virus et ce dernier peut donc

fusionner avec les cellules avant l'arrivée sur place des anticorps neutralisants (Zinck *et al.*, 1987). En effet, le MVV est un virus intracellulaire bénéficiant de ce fait de la protection de la cellule hôte vis-à-vis des anticorps (Haase, 1986). De plus la quantité d'anticorps neutralisants réellement produite reste inférieure à celle qui serait nécessaire pour neutraliser la totalité des virus (Narayan *et al.*, 1987).

La deuxième stratégie pour échapper au système immunitaire est la dérive antigénique qui résulte d'une mutation du gène codant pour les glycoprotéines de l'enveloppe (Haase, 1986), et plus particulièrement pour les épitopes neutralisants (Narayan *et al.*, 1987). Cependant, la souche virale initiale persistant et n'étant pas complètement remplacée par les nouveaux variants, ce phénomène peut être donc considéré comme ayant peu d'importance pour expliquer la persistance du MVV dans l'organisme, contrairement au CAEV (Haase, 1986).

Le phénomène le plus important d'échappement à la réponse de l'organisme hôte du MVV est probablement la restriction de la réplication virale. Celle-ci permettrait d'éviter une réaction trop violente de l'organisme suite à une grande quantité d'antigènes présentée (Haase, 1986). *In vivo*, la restriction se produit essentiellement après la transcription de l'ARN en ADN proviral dans les monocytes (Dawson, 1987). Les macrophages infectés produisent une substance activant les lymphocytes T, qui produisent un facteur semblable à un interféron (Narayan *et al.*, 1985). Cette substance appelée lentivirus-interféron inhibe la maturation des monocytes en macrophages (Dawson, 1987 ; Zinck *et al.*, 1987), au cours de laquelle l'expression du provirus augmente ; l'inhibition de la réplication virale est alors indirecte. Cet interféron active les macrophages en augmentant l'expression du CMH II à leur surface et permet ainsi une stimulation antigénique continue (Pyper *et al.*, 1990 ; Cadore, 1989). Enfin l'interféron pourrait agir sur l'expression des gènes viraux codant pour les protéines régulatrices soit en activant des gènes inhibiteurs, soit en inhibant des gènes activateurs de l'expression virale (Cadore *et al.*, 1988).

En agissant sur les mécanismes de mort cellulaire programmée, les virus ont développé des stratégies pour échapper au système immunitaire et faciliter leur dissémination au cours de l'infection (Barber, 2001). Ainsi certains virus retardent ou inhibent la mort de la cellule hôte, facilitant une production plus importante de virions. La suppression des voies apoptotiques cellulaires peut également entraîner une persistance et une latence virale. Quelques études *in vitro* ont montré que le MVV et le CAEV pouvaient induire l'apoptose des cellules qu'ils infectent (Gendelman *et al.*, 1997 ; Duval *et al.*, 2002). L'activation des

caspases-3, -8 et -9 est caractéristique de l'apoptose MVV-induite ; elle est directement associée aux effets cytopathologiques du virus (Duval *et al.*, 2002).

3. Apparition des lésions :

Le mécanisme immunopathogénique qui conduit à l'apparition des lésions lors d'infection par le MVV est le même quelque soit l'organe cible : il s'agit d'une hyperplasie lymphocytaire et d'une infiltration interstitielle de cellules mononucléées. Les stimulations répétées du système immunitaire par activation du provirus ou réinfection sont à l'origine du développement progressif de l'hyperplasie lymphoïde (Bulgin, 1990). Dans la mamelle par exemple, les lésions débutent par une desquamation de l'épithélium des acini puis un œdème inflammatoire s'installe. Les lymphocytes s'infiltrant alors de l'épithélium vers l'espace libre entre cellules acineuses et tissu conjonctif. La dégénérescence cellulaire concerne alors les cellules épithéliales de l'acinus et des canaux excréteurs (Perl *et al.*, 1991). Il n'existe pas de corrélation entre sévérité des lésions et durée de séropositivité (Houwens, 1988).

C. SYMPTOMES ET LESIONS DE L'INFECTION PAR LE MVV DANS LA MAMELLE :

Comme nous l'avons décrit précédemment, lors d'infection d'ovins par le MVV, différents organes (système nerveux central, poumon...) peuvent être atteints. Nous nous intéresserons plus spécifiquement ici aux lésions qui concernent le tissu mammaire, et aux conséquences cliniques de ces lésions.

1. Lésions macroscopiques et microscopiques :

La mamelle est le siège d'une induration homogène secondaire à une mammite interstitielle d'évolution chronique avec une fibrose des deux quartiers ((Perl *et al.*, 1991 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1985). La palpation de la mamelle permet donc de mettre en évidence une induration diffuse bilatérale du parenchyme (Dawson, 1987 ; Anderson *et al.*, 1985 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1985). La forme clinique est associée à une mamelle turgescente : mamelle qualifiée de « pis de bois ». A la coupe, le parenchyme mammaire est uniformément lisse (perte de la granulosité) et les nœuds lymphatiques rétro-mammaires sont hypertrophiés (Van-Der-Molen *et al.*, 1985 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1987).

La lésion mammaire microscopique caractéristique est une prolifération lymphoïde sous forme de follicules lymphoïdes I ou II (Georgsson, 1990). Ces nodules péri-canaliculaires peuvent s'avancer dans la lumière et ainsi être à l'origine de l'oblitération partielle et d'une déformation des canaux galactophores. Ces follicules peuvent aussi être observés dans le parenchyme. D'autre part, le parenchyme glandulaire est envahi par une population cellulaire constituée essentiellement de lymphocytes (Cutlip *et al.*, 1985 ; Cutlip *et al.*, 1988 ; Deng *et al.*, 1986 ; Georgsson, 1990 ; Lujan *et al.*, 1991 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1985 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1987). A ces lymphocytes peuvent être associés quelques plasmocytes dans l'interstitium glandulaire, rarement dans les parois et dans la lumière des canaux ou des acini. On peut même parfois observer des macrophages (Lujan *et al.*, 1991). Enfin, de rares éosinophiles et mastocytes ont été observés dans l'infiltrat mais jamais de neutrophiles (Georgsson, 1990).

L'épithélium canaliculaire adjacent aux nodules peut être hyperplasique faisant alors saillie dans la lumière (Cutlip *et al.*, 1985) ; il est souvent en voie de dégénérescence et se détache dans la lumière canaliculaire (Deng *et al.*, 1986 ; Georgsson, 1990 ; Lujan *et al.*, 1991 ; Cutlip *et al.*, 1985). Dans les stades avancés, les acini sont parfois détruits et remplacés par du tissu fibreux (Anderson *et al.*, 1985 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1985).

De nombreux follicules II sont observés également dans les nœuds lymphatiques rétro-mammaires hypertrophiés (Van-Der-Molen *et al.*, 1985).

2. Conséquences cliniques :

La forme mammaire semble toucher 25% des animaux séropositifs (Perrin *et al.*, 1987). Cependant, l'induration mammaire peut atteindre jusqu'à 63% des brebis, généralement des brebis de 3 à 5 ans (Anderson *et al.*, 1985), mais les agnelles peuvent également être atteintes dans des proportions assez élevées (Houwens *et al.*, 1988). Les éleveurs sont généralement alertés par une faible performance des agneaux (Palsson, 1990), surtout lors de naissances multiples (Houwens *et al.*, 1988). Ce retard de croissance des agneaux est la conséquence directe de la chute de production de lait des brebis atteintes. La chute de lait voire l'agalactie n'est souvent remarquée qu'à la seconde mise-bas (Bulgin, 1990).

L'hypo ou l'agalactie observée est secondaire à la compression des sinus lactifères (Anderson *et al.*, 1985) mais également à l'hyperplasie lymphocytaire autour des canaux excréteurs avec protrusion de follicules lymphoïdes dans la lumière et dans le parenchyme alvéolaire. A ceci s'ajoute souvent une atrophie et la disparition du tissu alvéolaire conduisant à une chute de production de lait (Van-Der-Molen *et al.*, 1985). La quantité de lait extraite des

trayons est très faible voire nulle (Anderson *et al.*, 1985), mais l'aspect du lait ou du colostrum reste normal (Lerondelle *et al.*, 1989).

III. TREMBLANTE ET MAEDI : LA QUESTION DU PRION DANS LA MAMELLE DES BREBIS

Une des grandes questions concernant l'infectiosité possible de tissus ou sécrétions d'ovins en incubation de tremblante est celle de la présence ou non de prion dans le lait et le colostrum des brebis (tableau n°2). Parce que les investigations menées depuis les années 1960 n'ont pas permis de mettre en évidence l'agent des ESST dans le lait des ruminants atteints, ce produit a toujours été considéré comme « sain » (Pattison et Millson, 1961 ; Hadlow *et al.*, 1982). En effet, les tentatives d'inoculation d'échantillons de lait ou de colostrum à des souris conventionnelles, tout comme l'inoculation intra-cérébrale de caprins avec du lait provenant de chèvres en phase clinique de tremblante, n'ont jusque là jamais permis de transmettre la maladie.

Excrétion, sécrétion	Origine		Détection		Résultat nombre + / nombre ov ou cp	Référence
	espèce	phase clinique	espèce	voie		
fèces	ovin	-	souris	IC	0/8	Hadlow 1982
	ovin	?	souris	IC	0/4	Hourrigan 1980
	caprin	+	souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	caprin	+	caprin	IC	0/1	Pattison 1961
salive	caprin	+	caprin	VO	0/?	Pattison 1964
	ovin	+	souris	IC	0/9	Hadlow 1982
	ovin	?	souris	IC	0/1	Hourrigan 1990
	caprin	+	caprin	IC	0/?	Pattison 1961
urine	caprin	+	caprin	VO	0/4	Pattison 1964
	ovin	?	souris	IC	0/3	Hourrigan 1990
	caprin	+	souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	caprin	+	caprin	IC	0/1	Pattison 1961
liquide amniotique	caprin	+	caprin	IC	0/14	Pattison 1962
	ovin	?	souris	IC	1/1	Hourrigan 1990
	colostrum	-	souris	IC	0/1	Hadlow 1982
	ovin	?	souris	IC	0/3	Hourrigan 1990
lait	ovin	?	souris	IC	0/6	Hourrigan 1990
	caprin	+	souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	caprin	+	caprin	IC	0/1	Pattison 1961
sperme	ovin	?	souris	IC	0/21	Hourrigan 1990

Tableau n°2 : Données relatives à l'infectiosité des sécrétions et excréments ovines dans la littérature (source Schelcher *et al.*, 2002a).

Le débat quant à la présence de protéine prion dans la mamelle et donc l'infectiosité du lait a été relancé récemment suite à la publication de Ligios *et al.* (2005) dans *Nature Medicine*. Dans cette étude, de la PrPSc a été mise en évidence dans le tissu mammaire de quatre brebis atteintes de tremblante. Les dépôts de PrPSc étaient associés aux follicules

lymphoïdes ectopiques qui se développent dans la mamelle en réponse à l'infection par le virus Maedi-Visna, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent. Le MVV et les lentivirus des petits ruminants sont endémiques dans quasiment tous les pays d'Europe (Peterhans *et al.*, 2004). Les données obtenues dans cette étude suggèrent donc que l'infection par le MVV pourrait accroître la dissémination du prion dans l'organisme des ovins atteints de tremblante et, en particulier, favoriser l'accumulation de PrPSc dans la mamelle. De même, les dépôts de protéine prion dans les cellules CD68+ des follicules lymphoïdes ectopiques mammaires, associés au passage accru de macrophages dans les sécrétions lactées lors de mammite chronique liée au MVV, posent sérieusement la question de la présence de prion dans le lait des brebis co-infectées tremblante-Maedi.

Les objectifs de notre travail de thèse présenté ici ont donc été de :

- Vérifier, sur un grand nombre d'animaux (n=160), la présence ou l'absence de protéine prion anormale dans le tissu mammaire de brebis mortes de tremblante entre 2003 et 2006, issues du troupeau expérimental Langlade de l'INRA, en incluant dans l'étude des brebis de différents génotypes PRP,
- confirmer l'association présence de PrPSc dans la mamelle / infection par le virus Maedi-Visna, puisque ce virus circule avec une incidence élevée dans ce troupeau d'ovins,
- caractériser la localisation des dépôts de PrPSc dans la tissu mammaire (follicules lymphoïdes ectopiques, épithélium des acini des mammaires, cellules inflammatoires libres dans les canaux galactophoriques ?).

Ce travail s'inscrivait dans le cadre d'un projet plus large (projet européen 'BSE in Sheep' coordonné par O. Andréoletti) visant à rechercher la présence possible de protéine prion anormale et d'infectiosité dans les fractions de lait et de colostrum de brebis en incubation ou mortes de tremblante au moyen de bio-essais sur souris transgéniques.

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE
EXPERIMENTALE**

I. MATERIEL ET METHODES :

A. SELECTION DES CAS DE L'ETUDE :

Les animaux sélectionnés pour cette étude rétrospective correspondent à des brebis issues du troupeau du domaine INRA de Langlade (31450 Pompertuzat). Il est composé d'environ 700 ovins de race Romanov et de quelques autres ovins de race Lacaune ou Texel ; une forte incidence annuelle de tremblante (de l'ordre de 30%) sévit depuis 1993 dans ce troupeau (Elsen *et al.*, 1999). Depuis 1997, le polymorphisme du gène PrP aux codons 136 (A/V), 154 (R/H) et 171(R/Q/H) est déterminé pour tous les ovins du troupeau à l'âge de deux mois par une technique SNP-MGB (single-nucleotide polymorphism minor groove binding) par le laboratoire Labogena (Van Poucke *et al.*, 2005).

Un total de 175 brebis ont été incluses dans l'étude :

- 143 brebis de génotypes considérés comme sensibles ou très sensibles à la tremblante (ARR-VRQ, ARQ-ARQ, ARQ-VRQ et VRQ-VRQ), mortes de tremblante au cours de la période 2003-2006. La confirmation du statut positif ou négatif pour la maladie a été effectuée sur le tronc cérébral par une méthode histologique conventionnelle en hémalun-éosine (recherche de vacuoles intra-neuronales et/ou neuropilaires, caractéristiques de la maladie) ou par méthode immunohistochimique (anticorps 8G8) (cf infra),
- 32 brebis de génotype considéré comme résistant à la tremblante classique (ARR-ARR), mortes des suites d'une maladie intercurrente, et confirmées négatives dans le système nerveux central et le système lymphoïde (méthode immunohistochimique), servant de témoins négatifs pour l'étude.

A l'autopsie, pour chacune des brebis, le système nerveux central, différents organes lymphoïdes (rate, nœuds lymphatiques iléal et préscapulaire) ont été prélevés, ainsi qu'un fragment de parenchyme mammaire et le nœud lymphatique mammaire. Ces échantillons ont été divisés en deux parties égales :

- la première a été fixée immédiatement dans une solution de formol à 10%, en vue d'analyse histologique conventionnelle et de recherche de la PrPSc par méthode immunohistochimique,
- la seconde a été congelée à -20°C pour permettre une détection de la PrPSc par méthodes ELISA et Western Blot ultérieures.

B. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES :

Les prélèvements récoltés lors de l'autopsie, dont le tissu mammaire, ont été fixés pendant au moins 48 heures dans la solution de formol à 10% avant d'être déshydratés et inclus en paraffine.

1. Technique histologique conventionnelle :

Les sections de tissu mammaire, de 2-5 μm d'épaisseur, ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica) et récupérées sur des lames glycinées, puis séchées et colorées selon une méthode conventionnelle de coloration à l'hémalun-éosine. La lecture de ces lames a permis notamment la recherche de follicules lymphoïdes présents au sein du tissu mammaire, ainsi qu'une appréciation globale du parenchyme (degré d'involution mammaire, parenchyme en lactation...).

2. Technique immunohistochimique :

Des sections de parenchyme mammaire de 2-5 μm d'épaisseur ont été obtenues à partir des blocs de paraffine et recueillies sur des lames prétraitées (lames Superfrost Plus, Labonord). Ces lames ont été incubées pendant une nuit à 56°C avant d'être déparaffinées et réhydratées (deux bains successifs de toluène de 10 minutes, un bain d'acétone de 5 min et rinçage à l'eau courante).

Ces lames ont ensuite été immergées dans un bain d'acide formique à 98% pendant 30 minutes puis chauffées à 121°C pendant 15 minutes sous pression (2.1 bars) immergées en tampon citrate (pH=6.1-6.2), dans une cocotte-minute ; ces deux étapes permettant le démasquage antigénique de la PrPSc.

La détection de la PrPSc par méthode immunohistochimique a ensuite été réalisée selon le protocole suivant, à l'aide d'un automate à immunohistochimie (DAKO Autostainer) :

- inhibition des peroxydases endogènes : immersion des lames pendant 5 minutes dans une solution de méthanol contenant 0.3% (w/w) de peroxyde d'hydrogène (solution S2023 prête à l'emploi, DAKO),
- rinçage 5 minutes à l'eau courante,
- blocage des sites antigéniques non spécifiques : incubation de 10 minutes avec du sérum normal de chèvre à 20% dans du PBS,

- incubation avec l'anticorps primaire 8G8 (anticorps monoclonal produit chez la souris ; IgG2a, dirigée contre l'épitope 95-108 de la PrP recombinante humaine) dilué au 1/4000^{ème}, pendant 25 minutes,
- rinçage des lames (tampon PBS-lait 0.5% Tween 20),
- incubation avec un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre les immunoglobulines de souris, dilué au 9/10^{ème} dans du sérum normal de mouton, pendant 15 minutes (kit K5001, DAKO),
- rinçage des lames (tampon PBS-lait 0.5% Tween 20),
- incubation avec un complexe streptavidine-peroxydase HRP (solution prête à l'emploi, kit K5001, DAKO), pendant 15 minutes,
- rinçage des lames (tampon PBS-lait 0.5% Tween 20),
- incubation avec la solution de DAB (kit K5001, DAKO) pendant 5 minutes,
- rinçage des lames à l'eau courante,
- contre-coloration des lames par une solution d'hématoxyline de Mayer pendant 2 minutes,
- rinçages des lames à l'eau courante et réhydratation puis montage des lamelles.

3. PET-Blot (Paraffin Embedded Tissue Blot) :

Afin de caractériser la nature PK (protéinase K) résistante de la PrPSc, ainsi que sa localisation dans le parenchyme mammaire, des tissus positifs et négatifs après IHC et inclus en paraffine ont été soumis à une technique de PET Blot (Schulz-Schaeffer *et al.*, 2000 ; Andréoletti *et al.*, 2004).

C. DETECTION DE LA PrPSc PAR METHODES BIOCHIMIQUES :

Les échantillons conservés à -20°C en vue de la détection de PrPSc par méthodes biochimiques sont d'abord aliquotés à raison de 175mg +/- 10% de tissus dans des tubes grinding contenant 1.4 ml de glucose à 5% (Biorad) et broyés à l'aide d'un ribolyseur (Precess 48, Biorad) (quatre cycles de 45s de broyage) afin d'obtenir des homogénats tissulaires à 10%. Les méthodes biochimiques (ELISA et Western Blot) sont alors réalisées sur ces homogénats de tissu.

1. Méthode ELISA :

L'ELISA de détection de la PrPSc est réalisé avec le test TeSEe Sheep and Goat Biorad selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 250 µL d'homogénat de tissu à 10% sont incubés pendant 10 minutes à 37°C dans 250µL de Tampon A' additionné de 2 µL/mL de protéinase K. Les tubes sont homogénéisés par renversement après ajout de 250 µL de tampon B et centrifugés pendant 7 minutes à 20,000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots obtenus sont incubés pendant 5 minutes à 100°C. Par la suite, 125 µL de tampon R6 sont rajoutés aux culots protéiques ainsi obtenus et 100 µL d'échantillon sont déposés en plaque ELISA (R1) et incubés 1h30min à 37°C. Après 3 lavages, les plaques sont incubées avec 100µL d'anticorps secondaire R7 dilué au 1/10^{ème} pendant 1 heure à 4°C. Les puits sont alors lavés 5 fois puis incubés avec 100µL de chromogène (solution R8/R9 avec dilution au 1/11^{ème} du R9) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée par ajout de 100 µL par puits de solution Stop et lues au moyen d'un lecteur de plaque (longueur d'onde 450 nm).

2. Méthode Western-Blot :

Afin de vérifier le profil électrophorétique de la PrPSc contenue dans les échantillons positifs en ELISA et/ou IHC, ces mêmes échantillons sont analysés en Western Blot (TeSEe Western Blot, Biorad) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 200 µL d'homogénat tissulaire sont incubés dans 200 µL de tampon A additionné de 6 µL de protéinase K / ml pendant 10 minutes à 37°C. Après incubation, 200 µL de tampon B sont ajoutés puis les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 15,000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont solubilisés à 100°C pendant 5 minutes dans 100 µL de solution de Laemmli complétée avec 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol et 2% (w/v) de SDS (sodium dodécyl sulfate). Les échantillons sont alors centrifugés à nouveau pendant 15 minutes à 15,000g à 4°C. Les surnageants obtenus sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes avant électrophorèse.

La séparation électrophorétique est réalisée sur des gels acrylamide SDS-PAGE (home made) à 15% (resolving gel) et 4% (stacking gel) pendant 30 minutes à 80V et 1h30 à 120V. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF à 115V pendant 60 minutes. Après transfert, les membranes sont successivement plongées dans des bains de PBS, éthanol 100% et eau distillée puis saturées pendant 30 minutes avec une solution de blocage. Les

membranes sont alors incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps Sha 31 (4 µg/mL en PBS-Tween) dirigé contre la séquence YEDRYYYRE (148-155) de la séquence PrP (Féraudet *et al.*, 2005) et couplé à la peroxydase. Après deux lavages en PBS-Tween, les membranes sont révélées par une réaction chémiluminescente (ECL+, Amersham) et visualisées avec un système d'analyse d'images assisté par ordinateur (Chemidoc XRS, Biorad).

D. VERIFICATION DU STATUT MAEDI-VISNA PAR PCR :

Afin de vérifier pour chaque brebis, le statut porteur ou non porteur du virus Maedi-Visna, une PCR a été réalisée à partir des homogénats de tissu mammaire à 10%. L'extraction d'ADN génomique est effectuée sur 100 µL d'homogénat suivant le protocole DNEasy Tissue and Blood Kit (Qiagen), avec les amorces spécifiques de ce virus décrites par Sonigo *et al.* (1985) :

- Primer Forward : 5' - CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA-3'
- Primer Reverse : 5'-TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG-3'

La PCR a été effectuée selon le protocole suivant : 95°C pendant 5 minutes, suivies de 40 cycles de PCR (30s à 95°C, 30s à 58°C, 30s à 72°C) puis 72°C pendant 7 minutes.

Dans chaque série de PCR ont été inclus un contrôle positif (correspondant à un plasmide vérifié par séquençage dans lequel a été clonée la séquence d'intérêt du virus Maedi-Visna) et un contrôle négatif (brebis non porteuse du virus).

Les produits de PCR (291 paires de bases) ont été migrés en gels d'agarose à 2% dans du TAE. Les échantillons positifs ont alors été identifiés sur la base de la taille du produit de PCR par rapport au contrôle positif (plasmide).

II. RESULTATS :

A. STATUT DES BREBIS VIS-A-VIS DE LA TREMBLANTE :

Le tableau n°3 résume les résultats obtenus pour la détection de PrPSc dans les différents organes examinés pour les 175 brebis incluses dans l'étude.

Les brebis de génotype ARR-ARR (considérées comme résistantes vis-à-vis de la tremblante classique) (n=32) sont négatives en IHC et en ELISA dans l'ensemble des organes soumis aux analyses (système nerveux central, système lymphoréticulaire et parenchyme mammaire), confirmant l'absence de développement d'une maladie à prion chez ces animaux, qui ont servi de contrôle négatif dans cette étude.

Pour les brebis des quatre autres génotypes étudiés (VRQ-VRQ, ARQ-VRQ, ARQ-ARQ et ARR-VRQ), une accumulation de PrPSc a été détectée dans le système nerveux central par IHC (figure n°14) et ELISA, confirmant le développement de la tremblante chez ces animaux. La plupart de ces brebis présentaient d'ailleurs des signes cliniques évidents de tremblante lors de leur euthanasie et pour la majorité d'entre elles, des lésions caractéristiques de spongiose neuronale et neuropilaire ont été observées en histologie classique dans leur système nerveux central (figure n°15). Ces lésions sont classiquement retrouvées en phase terminale de la maladie chez les individus atteints.

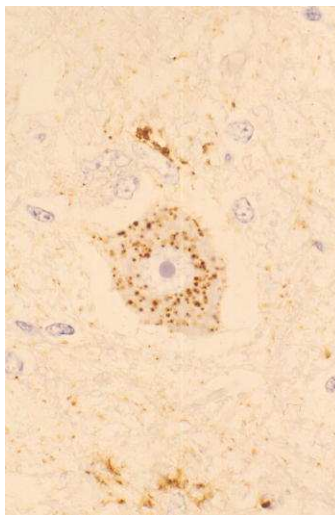


Figure n°14 : Détection de la PrPSc dans le système nerveux central de brebis atteinte de tremblante par immunohistochimie (anticorps 8G8, révélation DAB, x400).

Génotype	Nombre de brebis	PrPSc dans l'obex	PrPSc dans l'amygdale, la rate et les NL pré-scapulaire et mammaire	PrPSc dans la mamelle	Follicules lymphoïdes ectopiques dans la mamelle	PrPSc dans les canaux lactifères
VRQ-VRQ	n=110	Positif	Positif	Positif n=45 Négatif n=65	n=45 n=0	n=27 n=0
ARQ-VRQ	n=11	Positif	Positif	Positif n=2 Négatif n=9	n=2 n=0	n=1 n=0
ARQ-ARQ	n=13	Positif	Positif n=6 Négatif n=7	Positif n=3 Négatif n=3 Négatif n=7	n=3 n=0 n=3	n=1 n=0 n=0
ARR-VRQ	n=9	Positif	Négatif	Négatif	n=3	n=0
ARR-ARR	n=32	Négatif	Négatif	Négatif	n=16	n=0

Tableau n°3 : PrPSc dans le système nerveux central, le système lymphoréticulaire, la mamelle et la lumière des canaux lactifères de brebis naturellement atteintes de tremblante et de différents génotypes aux codons 136, 154 et 171 du gène PRP.

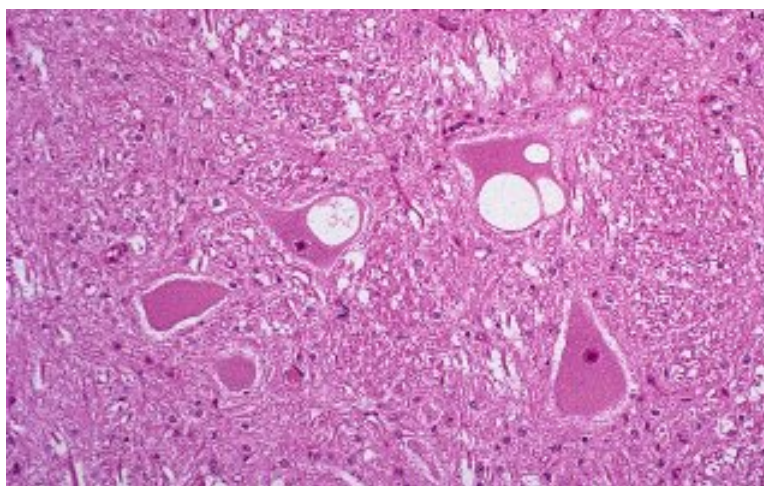


Figure n°15 : Lésions de spongiose neuronale (hémalum-éosine, x400).

B. STATUT DES BREBIS VIS-A-VIS DU VIRUS MAEDI-VISNA :

Le tissu mammaire de l'ensemble des brebis incluses dans l'étude a été soumis à une recherche de virus Maedi-Visna par PCR. Toutes les brebis se sont révélées porteuses du virus puisque nous avons observé une bande caractéristique à 291 paires de bases pour tous les échantillons analysés en PCR, à l'exception des contrôles négatifs inclus dans chaque série de PCR (figure n°16). Ce résultat n'est pas surprenant puisque le virus Maedi-Visna est endémique dans ce troupeau depuis plus de 10 ans : sérologies positives réalisées sur plusieurs brebis préalablement à cette étude, et survenue régulière de cas cliniques de formes pulmonaires de Maedi (pneumonies interstitielles lymphocytaires avec forte hyperplasie des formations lymphoïdes associées aux bronches ou BALT=Bronchiolar Associated Lymphoid Tissue).

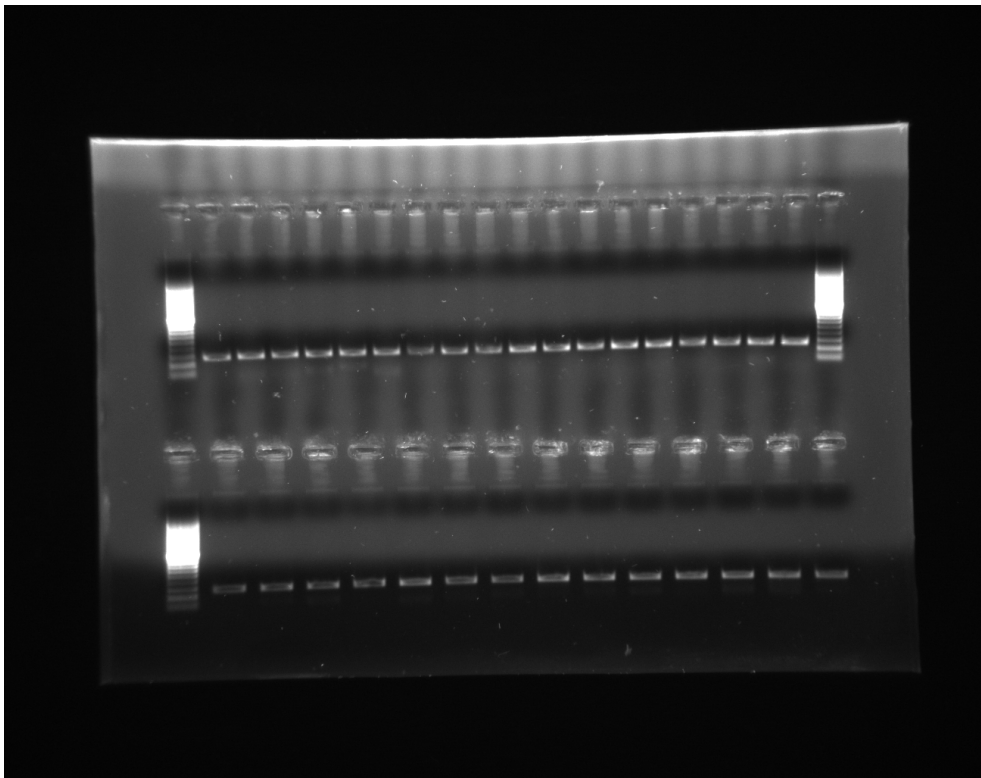


Figure n°16 : PCR Maedi-Visna positives sur 32 brebis de l'étude (produit de PCR à 291 bp, migration en gel d'agarose 2% en TAE, révélation du Bromure d'Ethidium aux UV).

Cette infection par le virus Maedi-Visna se traduit dans notre échantillon par la présence de follicules lymphoïdes ectopiques dans le tissu mammaire chez 72 brebis (soit 41% des animaux), tous génotypes confondus (figure n°17). Ces mammites chroniques lympho-prolifératives sont classiques lors d'infections sub-cliniques des brebis par ce virus.

C. DETECTION DE LA PrPSc DANS LA MAMELLE :

La PrPSc a été détectée par IHC et/ou ELISA dans le tissu mammaire de 50 brebis (soit environ 28%) de notre étude (tableau n°3 et figure n°17). La positivité du tissu mammaire n'est cependant observée que chez des brebis :

- hébergeant des follicules lymphoïdes ectopiques dans le parenchyme mammaire,
- et montrant une accumulation de PrPSc dans le système lympho-réticulaire (accumulation de protéine prion pathogène dans la rate, les amygdales et les nœuds lymphatiques).

En effet, les 50 brebis de génotype hypersensible VRQ-VRQ ayant des follicules lymphoïdes ectopiques mammaires accumulent de la PrPSc dans la mamelle, tout comme deux brebis de génotype ARQ-VRQ et trois de génotype ARQ-ARQ (tableau n°3).

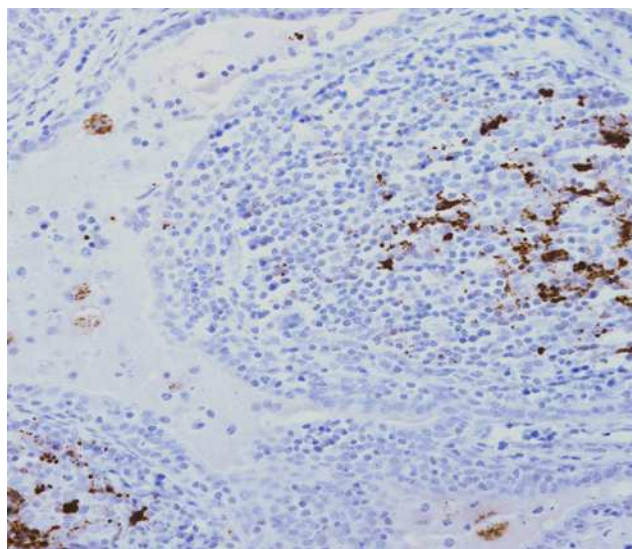


Figure n°17 : PrPSc dans les follicules lymphoïdes ectopiques mammaires détectée par IHC (anticorps 8G8, révélation DAB, x200).

Chez les brebis de génotype ARQ-ARQ et ARR-VRQ négatives en PrPSc dans le système lympho-réticulaire, on n'observe aucune accumulation de PrPSc dans la mamelle et ce, malgré la présence possible de follicules lymphoïdes ectopiques (cas de trois brebis ARQ-ARQ et de trois brebis ARR-VRQ) (tableau n°3).

Il semble donc que la présence de PrPSc dans le tissu mammaire soit dépendante à la fois de la présence des follicules lymphoïdes ectopiques mammaires (et donc de lésions de mammite chronique liée à l'infection par le virus Maedi), mais également de l'accumulation dans les organes lymphoïdes par la protéine prion pathogène. Les follicules ectopiques observés dans le tissu mammaire se comporteraient donc comme de véritables formations lymphoïdes, tels que les organes lymphoïdes de l'organisme, et pourraient à ce titre accumuler et éventuellement répliquer la protéine prion.

Un double marquage protéine prion/marqueurs de surface cellulaire (CD3 pour les lymphocytes T, BLA-36 pour les lymphocytes B et Ki-M6/CD68 pour les cellules phagocytaires) réalisé en IHC a permis de montrer que les cellules hébergeant la PrPSc dans les follicules lymphoïdes ectopiques sont de phénotype CD68 positif, ce qui suggère que ces cellules sont de type phagocytaires (phénotype qui comprend à la fois des cellules macrophagiques et des cellules dendritiques) (figure n°18 ; données relatives aux doubles marquages PrPSc/CD3 et PrPSc/BLA-36 non présentées).

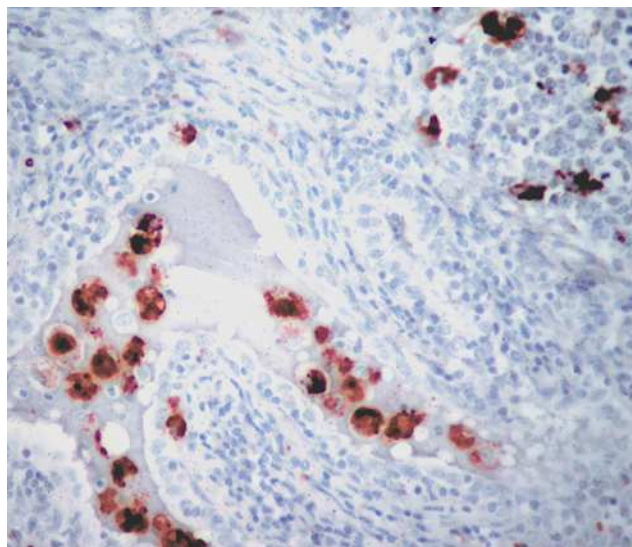


Figure n°18 : Double marquage IHC des cellules PrPSc positives (sérum polyclonal R521 – dépôts noirs) dans les follicules lymphoïdes ectopiques mammaires démontrant le phénotype CD68+ (clone Ki-M6, dépôts rouges) de ces cellules (révélation AEC-NBT/BCIP, x400).

Dans les mamelles PrPSc positives, l'accumulation de PrP anormale survient majoritairement au sein des follicules lymphoïdes ectopiques et donc des cellules CD68 positives. Cependant, dans la moitié des cas (n=29, tableau n°3), des cellules PrPSc positives ou des granules libres de PrPSc ont été observés dans la lumière des canaux lactifères (figure n°19), suggérant ainsi un passage possible de la protéine prion anormale dans la lumière des canaux lactifères et donc dans le lait ou le colostrum de brebis atteintes de tremblante. Cette observation a été faite pour des brebis de génotype VRQ-VRQ, ARQ-VRQ et ARQ-ARQ suggérant que ce passage potentiel de PrPSc dans les sécrétions lactées n'est pas restreint à un seul génotype.

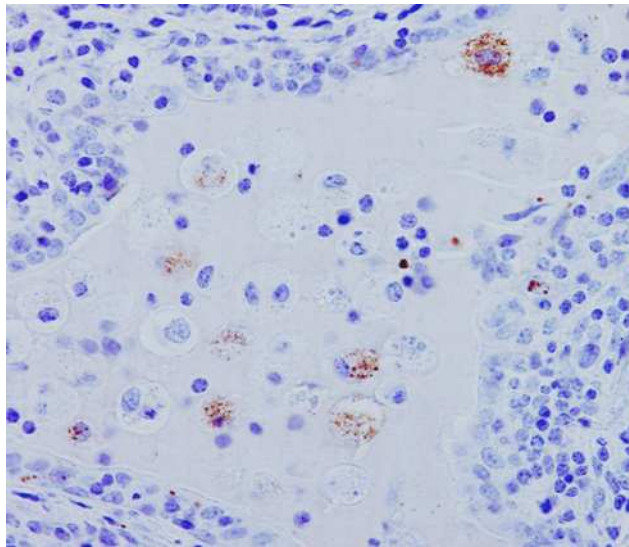


Figure n°19 : Cellules PrPSc positives et granules de PrPSc libres dans la lumière des canaux lactifères (IHC, anticorps 8G8, révélation DAB, x400).

La nature PK (protéinase K)-résistante de la protéine prion anormale au sein des follicules lymphoïdes ectopiques mammaires ou dans les canaux lactifères a été confirmée par PET-Blot sur les coupes en paraffine des mamelles positives en IHC (coupes successives d'un même bloc soumises aux deux techniques, IHC et PET-Blot, afin d'obtenir des sections quasi-identiques du tissu pour comparaison) (figure n°20).

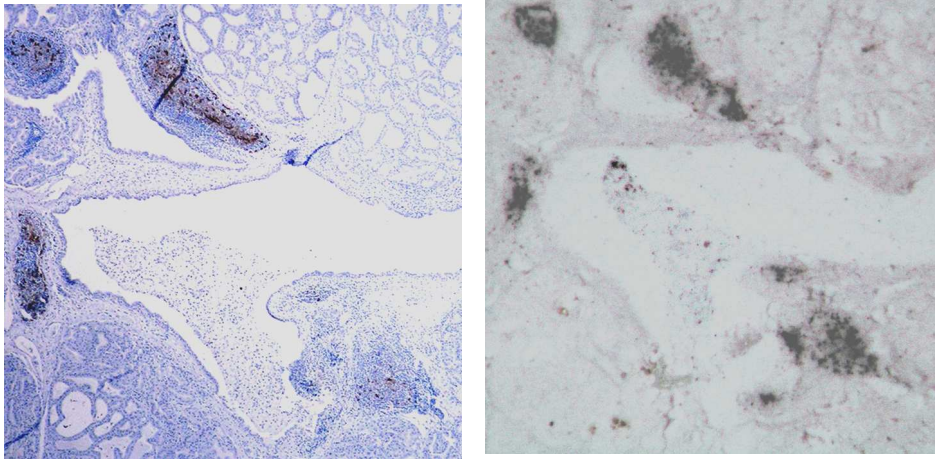


Figure n°20 : IHC (image de gauche, anticorps 8G8, révélation DAB, x200) et PET-Blot (image de droite, anticorps Sha-31, dépôts noirs de NBT/BCIP, x200) sur deux coupes successives de mamelle confirmant que le matériel observé dans les follicules lymphoïdes ectopiques et la lumière des canaux lactifères est protéinase K-résistant.

Enfin, la nature de la souche de prion s'accumulant dans le tissu mammaire des brebis a été contrôlée par Western Blot sur des homogénats à 10% de ce tissu. Les résultats obtenus ont permis d'obtenir un profil WB caractéristique en trois bandes de la PrP^{Sc} correspondant respectivement aux formes bi-, mono- et non-glycosylées de la PrP, avec cette dernière migrant à 21kDa, et une bande bi-glycosylée majoritaire en terme d'intensité de signal (figure n°21). Ce profil électrophorétique est identique à celui observé dans le système nerveux central des brebis de notre étude et correspond à l'isolat Langlade 21K Slow, qui circule dans le troupeau expérimental de l'INRA Langlade depuis plus d'une décennie.

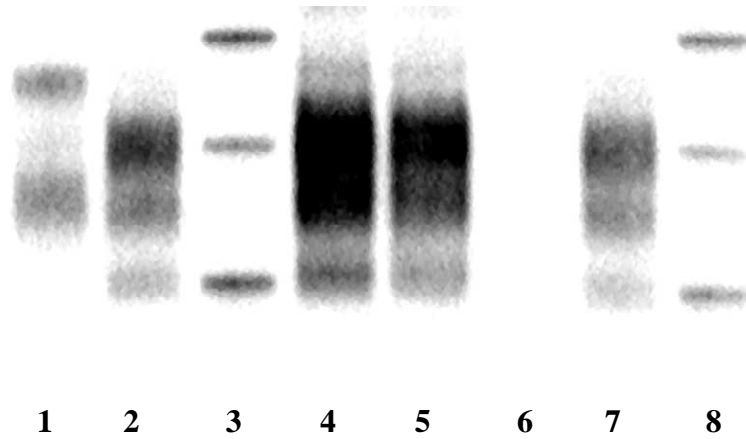


Figure n°21 : Western Blot sur deux échantillons de mamelle positive en IHC et ELISA (Piste1 : PrPc, Pistes 2 et 7 : Témoin Langlade SNC de brebis naturellement contaminées, Pistes 3 et 8 : marqueur de poids moléculaire, Pistes 4 et 5 : deux échantillons de mamelle positive, Piste 6 : contrôle négatif) (anticorps Sha-31, révélation ECL).

III. DISCUSSION :

A. PRESENCE DE LA PROTEINE PRION ANORMALE (PrPSc) DANS LE TISSU MAMMAIRE :

Notre étude permet de confirmer la présence de PrPSc dans le tissu mammaire de brebis atteintes de tremblante, sur un effectif d'animaux largement supérieur à celui décrit par les travaux précédents dans ce domaine (Ligios *et al.*, 2005). Nous avons donc mis en évidence l'accumulation de protéine prion anormale au sein des follicules lymphoïdes ectopiques que l'on peut observer dans la mamelle. Ce phénomène n'est pas restreint à quelques cas particuliers puisque 50 brebis sur les 143 brebis atteintes (soit environ 35%) de tremblante dans notre échantillon sont positives en PrPSc dans le parenchyme mammaire.

La PrPSc s'accumule dans des cellules CD68 positives, qui correspondent à des cellules de la lignée phagocytaire (monocytes / macrophages et cellules dendritiques). Ainsi, dans les follicules lymphoïdes ectopiques du tissu mammaire, l'accumulation de protéine prion anormale semble identique à celle que l'on peut observer dans n'importe quel organe lymphoïde, où là encore ce sont principalement des cellules CD68 + qui accumulent de la PrPSc (Andréoletti *et al.*, 2000). Nous avons également mis en évidence, par immunohistochimie et PET-Blot, la présence de PrPSc dans des cellules CD68 + et sous forme de granules libres dans la lumière des canaux galactophoriques (n=27 brebis sur les 45 ayant une mamelle positive). Cette observation ne semble pas cantonnée aux brebis de génotype hypersensible (VRQ-VRQ) puisque ce matériel positif au sein même des canaux galactophoriques est retrouvé chez deux brebis de génotypes respectifs ARQ-VRQ et ARQ-ARQ. Cette donnée, nouvelle puisque non décrite dans les travaux précédents (Ligios *et al.*, 2005), représente certainement le résultat le plus important de notre étude étant donné qu'il conforte l'hypothèse d'un passage possible de la protéine prion dans les sécrétions lactées (colostrum et lait) chez des animaux porteurs de PrPSc dans leur tissu mammaire. Il semblerait que des cellules PrPSc positives des follicules lymphoïdes ectopiques pourraient migrer au travers de l'épithélium des canaux galactophoriques et être éliminées dans les sécrétions.

Dans notre étude, la détection de la protéine prion anormale dans la mamelle a été réalisée au moyen de deux techniques : une technique histologique (immunohistochimie), et une technique biochimique (ELISA), afin de maximiser les chances de détection de la protéine prion. Les résultats finaux exprimés dans le tableau n°3 rendent compte des animaux positifs par une méthode ou l'autre, ou bien par les deux techniques. Dans un nombre

relativement restreint de cas, les résultats ELISA et IHC étaient parfois discordants, avec principalement des résultats IHC positifs associés à un ELISA négatif. Cette discordance peut aisément s'expliquer par le fait que l'immunohistochimie permet souvent de détecter des quantités minimales de PrPSc (souvent uniquement quelques cellules positives), dans le cas par exemple où le nombre de follicules ectopiques dans le tissu mammaire est très faible avec une charge en PrPSc également très faible. L'ELISA réalisé sur ces cas là peut s'avérer négatif étant donné que l'on ne travaille que sur quelques milligrammes de tissu et que quelques cellules positives peuvent passer inaperçues avec un test biochimique.

B. ROLE DE LA CO-INFECTION PRION / VIRUS MAEDI-VISNA :

Dans notre étude ainsi que dans celle de Ligios *et al.* (2005), nous avons également montré que la présence de PrPSc dans la mamelle des brebis atteintes de tremblante était conditionnée par deux aspects :

- l'envahissement du système lympho-réticulaire (présence de PrPSc dans les nœuds lymphatiques, l'amygdale, la rate...),
- la présence de follicules lymphoïdes ectopiques au sein même du tissu mammaire.

L'observation de follicules lymphoïdes dans le parenchyme mammaire semble étroitement liée à l'infection des animaux par le virus Maedi-Visna. En effet, ce lentivirus ovin est généralement à l'origine d'une infection persistante sans signes cliniques associés. Il peut entraîner, chez une fraction des individus infectés, des modifications lymphoprolifératives incluant une infiltration lymphocytaire interstitielle diffuse et/ou des agrégations « folliculaires » péri-canalaires dans le tissu mammaire. Chez ces brebis, la maladie ne s'exprime que sous une forme sub-clinique, avec sécrétion de lait et de colostrum d'aspect macroscopique normal (Anderson *et al.*, 1985 ; Van-Der-Molen *et al.*, 1985).

Notre étude a été réalisée dans un troupeau dans lequel la circulation du MVV est importante : 100% des brebis incluses dans notre échantillon sont d'ailleurs porteuses du virus (PCR positives dans le tissu mammaire pour l'ensemble des animaux testés). Ce lentivirus non oncogène est d'ailleurs largement répandu dans la population ovine et sa prévalence réelle est ainsi difficile à quantifier. Dans plusieurs pays européens, il a été rapporté que plus de 70% des troupeaux pouvaient être infectés.

Le MVV n'est pas le seul agent pathogène pouvant induire des modifications lésionnelles du parenchyme mammaire. En effet, les infections bactériennes telles que les mycoplasmoses (principalement *Mycoplasma agalactiae* chez les petits ruminants) peuvent également être à l'origine d'infiltrations lymphocytaires interstitielles mammaires et pourraient, à ce titre, favoriser l'accumulation de protéine prion anormale dans le tissu mammaire de brebis atteintes simultanément de tremblante et de mycoplasmoses. Cependant, il semble que la formation de follicules lymphoïdes organisés, avec présence de cellules lymphocytaires et de cellules CD68 positives, ne soit pas fréquente lors d'infection mycoplasmaïque des petits ruminants. Celle-ci se limiterait plus à une infiltration cellulaire de type lymphocytaire diffuse dans le parenchyme. Ainsi l'impact des Mycoplasmes sur l'accumulation de PrPSc dans le tissu mammaire des brebis serait largement plus limité que celui du MVV.

De même, les mammites cliniques et sub-cliniques d'origine bactérienne sont extrêmement fréquentes dans les populations de brebis laitières et peuvent impacter considérablement sur la composition cellulaire de la sécrétion lactée (De Graves et Fetrow, 1993). L'inflammation générée dans le parenchyme mammaire par les infections bactériennes augmente l'afflux sanguin (congestion, hémorragies dans les phases précoces de la réaction inflammatoire) vers cet organe et permet l'afflux de cellules inflammatoires vers le site lésionnel. Un passage accru du prion dans la mamelle et éventuellement dans le lait pourrait ainsi être favorisé, soit à partir du sang (l'infectiosité du sang dans les maladies à prions a récemment été mise en évidence) (Hunter *et al.*, 2002), soit au travers des cellules inflammatoires recrutées. Ainsi l'impact de ces mammites bactériennes, y compris celles d'origine mycoplasmaïque, sur le passage éventuel de protéine prion dans le lait mériterait d'être évalué.

C. IMPORTANCE DE LA GENETIQUE DANS LA DISSEMINATION DU PRION DANS LE TISSU MAMMAIRE :

Comme cela a été décrit précédemment, chez certaines (n=7/13) brebis de génotype ARQ-ARQ (Ligios *et al.*, 2006) et chez l'ensemble des brebis ARR-VRQ (n=9) de notre étude (van Keulen *et al.*, 1996 ; Andréoletti *et al.*, 2002), nous n'avons pas détecté de PrPSc dans le système lympho-réticulaire en dépit d'une accumulation typique de protéine prion anormale dans le système nerveux central. Chez ces brebis, nous n'avons également pas mis en

évidence de PrPSc dans la mamelle, même lorsque des follicules lymphoïdes ectopiques étaient présents.

Cette observation renforce l'idée que la sélection génétique d'animaux portant l'allèle ARR permet de limiter la diffusion de la protéine prion pathogène dans l'organisme puisqu'il ne semble pas y avoir d'envahissement lymphoïde chez les animaux de génotype ARR-XXX y compris lorsqu'ils sont en incubation de tremblante. Chez ces animaux, il semble également qu'il n'y ait aucune accumulation de PrPSc dans la mamelle, y compris dans les cas où des follicules lymphoïdes ectopiques existent. Ils seraient donc moins à même d'excréter de la protéine prion dans leurs sécrétions lactées si un passage entre la mamelle et le lait est possible.

En raison du nombre restreint d'animaux de génotype ARR-VRQ et ARQ-ARQ dans notre étude, il serait toutefois important de confirmer ces observations sur un plus large échantillon, puisque environ 5% des ovins ARR-VRQ accumulent de la PrPSc dans leurs organes lymphoïdes (van Keulen *et al.*, 1996 ; Androletti *et al.*, 2002).

D. INFECTIOSITE DU LAIT ET DU COLOSTRUM :

Notre étude, tout comme celle publiée précédemment (Ligios *et al.*, 2005), ont permis de mettre en évidence de la protéine prion pathogène dans le tissu mammaire des brebis atteintes de tremblante. Toutefois, la question de l'infectiosité ou non du lait et du colostrum est restée en suspens. Comme nous l'avons évoqué dans la synthèse bibliographique, les travaux menés dans ce domaine n'ont jamais permis de démontrer l'infectiosité du lait (Pattison et Millson, 1961 ; Hadlow *et al.*, 1982) et ont conclu que cette sécrétion pouvait être considérée comme non infectieuse en termes de prion.

Depuis que nous avons entrepris ce travail, les recherches dans ce domaine se sont poursuivies. En 2008, une équipe anglaise s'est intéressée à la transmission de la tremblante *via* le lait en nourrissant des agneaux nés de brebis saines avec du lait issu de brebis en incubation ou en phase terminale de tremblante (Konold *et al.*, 2008). Cette étude a été la première à évoquer une transmission possible de la tremblante entre animaux *via* le lait. Le lait de 12 brebis provenant d'un élevage avec une forte incidence de tremblante a été administré à 18 agneaux de génotype hypersensible (VRQ-VRQ) originaires de Nouvelle-Zélande (considérés comme indemnes d'ESST). Les brebis 'donneuses' étaient toutes positives en PrPSc dans leurs organes lymphoïdes. Deux agneaux nourris avec le lait de ces brebis ont été sacrifiés quelques mois après leur naissance en raison de maladies

intercurrentes et de la PrPSc a été détectée dans les plaques de Peyer associées au tube digestif. Les auteurs ont donc conclu à une transmission de la tremblante par le lait. Toutefois, cette étude, même pionnière en la matière, souffre de quelques points faibles et défauts expérimentaux. En effet, en parallèle du groupe expérimental, les auteurs avaient créé un lot témoin d'agneaux nourris exclusivement avec des lacto-remplaceurs. Quelques agneaux ont également été sacrifiés dans ce groupe et se sont avérés positifs (PrPSc dans les plaques de Peyer), ce qui ne permet pas d'exclure une contamination artéfactuelle (horizontale ? environnementale ?) des agneaux témoins et expérimentaux. Enfin, cette étude, même si elle suggère une transmission possible de la tremblante par le lait, n'apporte aucune information quant aux fractions du lait qui sont infectieuses : crème, petit lait (ou lactosérum), cellules ?. Elle ne permet pas non plus de déterminer quels titres infectieux seraient présents dans les sécrétions lactées.

A partir des animaux inclus dans cette étude, le laboratoire ayant initié ce travail a ré-inoculé des fractions de lait et de colostrum issus de quelques brebis de notre échantillon. Le lait et le colostrum avaient été prélevés au cours de l'incubation de la maladie chez ces animaux, à environ 20 mois d'âge (soit quelques mois avant apparition des signes cliniques et euthanasie des brebis). Ces échantillons ont été fractionnés par centrifugation pour obtenir les trois composantes majeures de la sécrétion : crème, lactosérum et cellules. Une technique d'immuno-précipitation mise au point par une équipe du CEA de Saclay au moyen de trois anticorps dirigés contre la protéine PrP a permis de concentrer l'éventuelle l'infectiosité de ces fractions sous un volume très faible pour pouvoir ré-inoculer celles-ci à raison de 20 μ L d'échantillon à des souris transgéniques par voie intra-cérébrale. Le modèle rongeur utilisé est une souris transgénique surexprimant l'allèle VRQ ovin (souris Tg338) (Lacroux *et al.*, 2008).

Les résultats de ces bio-essais sur souris transgéniques ont permis de détecter l'infectiosité prion dans les trois fractions de lait et de colostrum utilisées, prouvant de manière définitive que le lait est infectieux chez des brebis en incubation de tremblante. Ces bio-essais ont également révélé que le lait et le colostrum contenaient de l'infectiosité prion non seulement chez des brebis ayant des lésions de Maedi dans le tissu mammaire (avec accumulation de PrPSc dans les follicules lymphoïdes ectopiques), mais aussi chez des brebis n'ayant aucune lésion mammaire associée (absence de follicules ectopiques, mamelle négative en IHC et ELISA pour la PrPSc) (Lacroux *et al.*, 2008). Ainsi, même si le virus Maedi-Visna représente un facteur de risque vis-à-vis de l'excrétion de prion dans le lait de brebis avec des mamelles positives en PrPSc, il ne peut pas être considéré comme condition

nécessaire et exclusive pour obtenir un lait ou un colostrum infectieux chez des brebis en incubation de tremblante.

Enfin, cette série d'expérimentations a également permis de quantifier les titres infectieux présents dans les sécrétions lactées. Le titre infectieux le plus élevé ayant été obtenu par millilitre de lait ou de colostrum est équivalent à celui contenu dans 6 µg de tronc cérébral postérieur d'un ovin en phase terminale de tremblante (Lacroux *et al.*, 2008).

E. ROLE DU LAIT ET DU COLOSTRUM DANS LA TRANSMISSION DE LA TREMBLANTE :

La preuve récente et définitive de l'infectiosité prion du lait et du colostrum de brebis en incubation de tremblante a amené la communauté scientifique à reconsidérer le risque éventuel associé aux sécrétions lactées en termes de santé animale et humaine.

On peut désormais estimer que le lait peut jouer un rôle dans la dissémination inter-animale de la tremblante au sein même des troupeaux ovins et participer à la contamination des agneaux en parallèle des autres sources de contamination (placenta, environnement), soit directement par l'allaitement maternel, soit par le biais de l'allaitement artificiel. Peu de données sont disponibles à l'heure actuelle dans ce domaine et les futures enquêtes épidémiologiques au sein des troupeaux prendront certainement en compte le lait comme facteur de risque dans la transmission inter-individuelle de la tremblante.

De même, les conséquences pour l'Homme de la présence de prion dans le lait de brebis en incubation de tremblante devront certainement être prises en considération et évaluées en termes de risque pour la santé humaine. Toutefois, Lacroux *et al.* (2008) estiment que l'impact de l'exposition humaine au prion *via* le lait et les fromages fabriqués à partir du lait de brebis est relativement faible (titres infectieux peu élevés), par comparaison aux autres sources de prion qui peuvent entrer dans la chaîne alimentaire (tissus lymphoïdes d'ovins en incubation de tremblante notamment).

F. INFECTIOSITE DU LAIT ET DU COLOSTRUM DANS LES AUTRES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES :

La preuve de l'infectiosité du lait et du colostrum de brebis en incubation de tremblante amène à se poser la question de l'infectiosité possible du lait des autres espèces de ruminants laitiers, en particulier les bovins et les caprins. Là encore, aucune donnée de la littérature n'est

disponible dans ce domaine mais il est probable que de futurs travaux de recherche s'intéressent à la question.

La dissémination du prion dans l'organisme des caprins en incubation de tremblante est relativement proche de celle observée chez les ovins. Ainsi, une accumulation de PrPSc dans la mamelle et un passage possible du prion dans le lait pourrait être suspectés. D'autant plus que les caprins peuvent également être infectés par un lentivirus proche du MVV : le CAEV (Caprine Arthritis and Encephalitis Virus). Le CAEV est à l'origine d'infiltrations cellulaires de type lymphocytaire dans plusieurs organes, notamment le poumon et les capsules articulaires. Il n'est pas exclu d'observer des lésions similaires dans le parenchyme mammaire, qui pourraient ainsi favoriser l'accumulation de protéine prion anormale dans cet organe. Toutefois, comme avec les Mycoplasmes chez les ovins, la formation de follicules lymphoïdes ectopiques est peu fréquente. En l'absence de données sur l'infectiosité du lait de caprins, la mise en œuvre d'études spécifiques sera nécessaire afin de vérifier si la pathogénie de la tremblante des caprins peut conduire à un passage de prion dans le lait dans cette espèce.

Ces résultats amènent également à reconsidérer l'hypothèse du passage de protéine prion et/ou d'infectiosité dans le lait des bovins. Toutefois il existe des différences majeures en termes de pathogénèse périphériques entre l'ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) chez les bovins et les ESST chez les autres ruminants. Chez les bovins, l'accumulation de PrPSc et d'infectiosité dans les organes périphériques reste assez marginale et ceci est particulièrement vrai pour le système lympho-réticulaire. De telles différences ne permettent donc pas d'extrapoler les résultats obtenus en tremblante ovine aux cas d'ESB chez les bovins laitiers. Néanmoins les résultats obtenus dans notre étude et celle de Lacroux *et al.* (2008) plaident clairement pour une ré-examen de la présence ou l'absence de prions dans le lait des bovins atteints d'ESB.

Enfin, se pose également la question de l'infectiosité du lait d'ovins atteints de tremblante atypique. Cette nouvelle forme de tremblante a été découverte en 1998 en Norvège (Benestad *et al.*, 2003) et diagnostiquée depuis dans la plupart des pays européens, dont la France. Cette forme particulière d'encéphalopathie spongiforme transmissible se caractérise par un profil atypique de la protéine prion pathogène en Western Blot, clairement différent de celui observé pour des formes de tremblante classique. La tremblante atypique atteint également des ovins considérés jusqu'à présent comme 'résistants' ou peu sensibles aux formes classiques de tremblante (Lühken *et al.*, 2007), ce qui pose un problème par rapport aux schémas de sélection génétique des ovins vis à vis de la tremblante dans plusieurs pays de la Communauté Européenne. Les modalités de transmission inter-animale de cette maladie

ainsi que les tissus porteurs de protéine prion anormale ou d'infectiosité sont encore mal connus et la question de la présence ou non de prions dans le lait et le colostrum d'animaux atteints de cette forme particulière de tremblante reste donc entière.

CONCLUSION

Notre travail a permis de démontrer dans une première phase que, chez des brebis atteintes de tremblante, la protéine prion anormale pouvait s'accumuler dans des follicules lymphoïdes ectopiques au sein du tissu mammaire lors d'infection concomitante des brebis par le lentivirus Maedi-Visna. La protéine prion est également détectée dans les cellules phagocytaires présentes dans les lumières des canaux galactophores, et donc possiblement dans le lait ou le colostrum.

Ces observations ont initié, dans une deuxième phase, une série d'expérimentations démontrant que le lait et le colostrum de brebis atteintes ou en incubation de tremblante contiennent de l'infectiosité prion. La co-infection des animaux par le virus Maedi-Visna augmenterait les risques de passage de la protéine prion ou de l'infectiosité dans les sécrétions lactées.

Ces résultats amènent aujourd'hui à s'interroger sur le rôle possible du lait et du colostrum dans la transmission de la maladie au sein des troupeaux, mais également sur le risque potentiel d'exposition de l'Homme au prion par le lait de brebis. La sélection génétique d'ovins porteurs d'au moins un allèle de résistance à la tremblante, mise en place en France et dans plusieurs pays d'Europe depuis quelques années et qui a prouvé son efficacité en terme de réduction du nombre de cas de tremblante, devrait contribuer à limiter ce risque.

Toutefois d'autres questions subsistent, notamment pour savoir dans quelle mesure ces résultats obtenus dans le modèle ovin de tremblante classique peuvent être étendus à d'autres modèles de maladies à prions (espèces humaine et animales, souches différentes de prions). Ce domaine devrait prochainement faire l'objet d'évaluations spécifiques de risque. D'un point de vue plus fondamental, les modalités de dissémination (voie sanguine ? voie lymphatique ?) du prion vers le tissu mammaire mériteraient d'être explorées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS S. *et al.*

Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis encephalitis virus
Infect Immun, 1980, **28**, 421-427

AUDOLY G., SAUZE N. *et al.*

Identification and subcellular localization of the Q gene product of visna virus
Virology, 1992, **189**, 734-739

ANDERSON B., BULGIN M.S. *et al.*

Firm udder in periparurient ewes with lymphocytic accumulation, retrovirus infection and milk unavailable at the teat
JAVMA, 1985, **186**, 391-393

ANDREOLETTI O., BERTHON P. *et al.*

Early accumulation of PrP^{Sc} in gut associated lymphoid and nervous tissue of susceptible sheep from Romanov flock with natural scrapie.
J Gen Virol, 2000, **81**: 3115-3126

ANDREOLETTI O., LACROUX C. *et al.*

PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission
J Gen Virol, 2002, **83** (Pt 10), 2607-2616

ANDREOLETTI O., SIMON S. *et al.*

PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie
Nat Med, 2004, **10** (6), 591-593

ASSO J. *et al.*

Induction de l'expression du virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre chez les animaux séropositifs
Sci Tech Anim Lab, 1990, **15**, 101-103

BARBER S.A., BRUETT L. *et al.*

Involvement of a membrane-associated serine/threonine kinase complex in cellular binding of visna virus
Virology, 2000, **274**, 321-330

BARBER G.N.

Host defense, viruses and apoptosis
Cell Death and Differentiation, 2001, **8**, 113-126

BASLER K., OESCH B., *et al.*

Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene
Cell, 1986, **46** (3), 417-428

BENESTAD S.L., SARRADIN P. *et al.*

Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type Nor98
Vet Rec, 2003, **153** (7), 202-208

BLACKLAWS B. *et al.*

Early events in infection of lymphoid tissue by a lentivirus, maedi-visna
Trends in Microbiology, 1995, **3**, 434-440

BOUCHARD N., LARENAUDIE B. *et al.*

La visna-maedi du mouton
Bull Soc Vet Prat de France, 1980, **64**, 755-772

BOUSSET L., BELRHALI H. *et al.*

Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*
Structure, 2001, **9** (1), 39-46

BRAZIER M.W., LEWIS V. *et al.*

Correlative studies support lipid peroxidation is linked to PrPres propagation as an early primary pathogenic event in prion disease
Brai Res Bull, 2006, **68**, 346-354

BROWN P., LIBERSKI P.P. *et al.*

Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C : practical and theoretical implications
J Infect Dis, 1990, **161** (3), 467-472

BROWN K.L., STEWART K. *et al.*

Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells
Nat Med, 1999, **5** (11), 1308-1312

BROWN K.L., RAU E.H. *et al.*

New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent : threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication
Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (7), 3418-3421

BRUETT L., BARBER S.A. *et al.*

Characterisation of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection
Virology, 2000, **271**, 132-141

BULGIN M.S.,

Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis encephalitis and related lentiviral diseases of sheep and goats
Vet Clinics of North Am : Food Anim Prac, 1990, **6**, 691-704

BURTHEM J. *et al.*

The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells
Blood, 2001, **98** (13), 3733-3738

CADORE J.L., GOZON G. *et al.*

Physiopathologie de la pneumonie interstitielle diffuse due au virus Visna-Maedi chez le mouton

Sci Vet Med Comp, 1988, **90**, 151-157

CADORE J.L.

Mise en évidence des lymphocytes T activés dans le lavage broncho-alvéolaire au cours des pneumonies interstitielles à lentivirus

Concours d'agrégation de sémiologie, de pathologie médicale des équidés et des carnivores et de législation, 1989, Nantes

CAPUCCHIO M.T., GUARDA F. *et al.*

Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy : a comparative study in sheep and goats

J Vet Med Series A- Physiol Pathol Clin Med, 2001, **48** (1), 23-31

CARAMELLI M. *et al.*

Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*

Vet Rec, 2001, **148**, 531-536

CASHMAN N.R., LOERTSCHER R. *et al.*

Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation

Cell, 1990, **61** (1), 185-192

CHEBLOUNE Y., SHEFFER D. *et al.*

Restrictive type of replication of ovine/caprine Lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures

Virology, 1996, **222**, 21-30

CHEEVERS W.P., SNEKVIK K.R. *et al.*

Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis

Virology, 2003, **306**, 116-125

CLARK W.W.

Clinical signs of scrapie in sheep and goats

Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 1980, **84**, 479-482

CLARK A.M., MOAR J.A.

Scrapie : a clinical assessment

Vet Rec, 1992, **130** (17), 377-378

CLEMENTS J.E., ZINCK M.C. *et al.*

Lentivirus infection of macrophages

Immunol. Ser., 1994, **60**, 589-600

COUQUET C. *et al.*

Observation d'un cas de transmission maternelle de la tremblante du mouton

Bull Acad Vet Fr, 2005, **158**, 25-29

- CRANE S.E., BUZY J. *et al.*
Identification of cell membrane proteins that binds Visna virus
J Virol, 1991, **65**, 6137-6143
- CUILLE J., CHELLE P.L.
La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?
Sciences de Paris, 1936, **26**, 1552-54
- CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. *et al.*
Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep
Am J Vet Res, 1985, **46**, 326-328
- CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. *et al.*
Vasculitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep
Am J Vet Res, 1985, **46**, 61-64
- CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. *et al.*
Ovine progressive pneumonia (Maedi-Visna) in sheep
Vet Microbiol, 1988, **17**, 237-250
- DABAGHIAN R.H. *et al.*
Prospects for the development of pre-mortem laboratory diagnostic tests for Creutzfeldt-Jakob disease
Rev. Med. Virol., 2004, **14**, 345-361
- DAVIS J.L., CLEMENTS J.E.
Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein.
Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86**, 414-418
- DAWSON M.
Maedi-Visna : a review
Vet Rec, 1980, **106**, 212-216
- DAWSON M.
Pathogenesis of Maedi-Visna
Vet Rec, 1987, **9**, 451-454
- DENG P., CUTLIP R.C. *et al.*
Ultrastructure and frequency of mastitis caused by ovine progressive pneumonia virus infection in sheep
Vet Pathol, 1986, **23**, 184-189
- DESLYS J.P.
Prions et risques pour la transfusion sanguine: le point en 2003
Transfus Clin Biol, 2003, **10**, 13-125
- DETWILER L.A.
Scrapie
Revue scientifique et technique, 1992, **11** (2), 491-537

DETWILER L.A. *et al.*

Transmissible Spongiform Encephalopathies

In : *Emerging diseases of animals*. Ed. by BROWN C. et BOLIN C., 2000, Washington DC, ASM Press: 131-153

DETWILER L.A., BAYLIS M.

The epidemiology of scrapie

Revue scientifique et technique de l'OIE, 2003, **22** (1), 121-143

DE GRAVES F.J., FETROW F.

Economics of mastitis and mastitis control

Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1993, **9**

DE PARSEVAL A., ELDER J.H.

Demonstration that the orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity

J Virol, 1999, **73**, 608-617

DICKINSON A.G. *et al.*

Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice

J Comp Pathol, 1968, **78** (3), 293-299

DICKINSON A.G.

Scrapie in sheep and goats

Front Biol, 1976, **44**, 209-241

DICKINSON A.G., TAYLOR D.M.

Resistance of scrapie agent to decontamination.

N Engl J Med, 1978, **299** (25), 1413-1414

DODELET V.C., CASHMAN N.R.

Prion protein expression in human leukocyte differentiation

Blood, 1998, **91** (5), 1556-1561

DUVAL R., BELLET V. *et al.*

Implication of caspases during maedi-visna virus-induced apoptosis

J Gen Virol, 2002, **83**, 3153-3161

DUVAL R., DELEBASSEE S. *et al.*

Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis

Arch Virol, 2002, **147**, 943-959

ELSEN J.M., AMIGUES Y. *et al.*

Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov

Arch Virol, 1999, **144** (3), 431-445

- ELSEN J.M., BARILLET F. *et al.*
Génétique de la sensibilité à la tremblante des ovins
Bull G.T.V., 2002, **13**, 49-54
- FAYE
Les syndromes « visna et maedi » des ovins
Bull Soc Vet Prat de Fr, 1979, **63**, 411-430
- FEDIAEVSKY A., ARSAC J-N, CAZEAU G., DUCROT C., CALAVAS D.
Tremblante atypique: chemin vers une caractérisation
Le Point Vétérinaire, 2007, **280**, 23-26
- FEDIAEVSKY A., ARSAC J-N, CAZEAU G., DUCROT C., CALAVAS D.
Tremblante atypique: tableau épidémioclinique et contrôle
Le Point Vétérinaire, 2007, **281**, 23-26
- FERAUDET C. *et al.*
Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells
J Biol Chem, 2005, **280**, 11247-11258
- FOSTER J.D. *et al.*
Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer
Vet Rec, 1996, **138**, 559-562
- GDOVIN S.L., CLEMENTS J.E.
Molecular mechanisms of visna virus Tat : identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post-transcriptional effect
Virology, 1992, **188**, 438-450
- GENDELMAN R., ORZECH Y. *et al.*
Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis
J Gen Virol, 1997, **78**, 801-805
- GEORGSSON G.
Maedi-Visna. Pathology and pathogenesis
In : "Maedi-Visna and related diseases". Ed by PETURSSON G. and HOFF-JÖRGENSEN R.. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1990, 19-53
- GEORGSSON G. *et al.*
Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years
J Gen Virol, 2006, **87**, 3737-3740
- GIBBS C.J. Jr, GAJDUSEK D.C. *et al.*
Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie
Proc Natl Acad Sci USA, 1978, **75** (12), 6268-6270

GOLDMAN W., HUNTER N. *et al.*

PrP genotypes and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie
J Gen Virol, 1994, **75**, 989-995

GRIFFITH J.S.

Self-replication and scrapie
Nature, 1967, **215**, 1043-1044

GROSCHUP M.H., LACROUX C. *et al.*

Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France
Emerg Infect Dis, 2007, **13** (8), 1201-1207

HAASE A.T.

Pathogenesis of lentivirus infections
Nature, 1986, **322**, 130-136

HADLOW W.J. *et al.*

Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus
J Infect Dis, 1982, **146**, 657-664

HARMACHE A., BOUYAC M. *et al.*

The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication
J Virol, 1995, **69**, 3247-3257

HARRIS D.A. *et al.*

Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization
Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (9), 4309-4313

HARRIS D.A.

Cell biological studies of the prion protein
Curr Issues Mol Biol, 1999, **1**, 65-75

HOTZEL I., CHEEVERS W.P.

Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system
J Virol, 2001, **75**, 7384-7391

HOURRIGAN J.L. *et al.*

Epidemiology of scrapie in the United States
In: *Transmissible Diseases of the Nervous System*. Ed. by S.B. Prusiner, W.J. Hadlow, 1979, Academic Press: 331-336

HOUWERS D.J.,

Zwoegerziekte virus: a lentivirus, its mode of persistence in the host and the pathogenesis of the lesions

Ovine lentivirus infections, thèse de doctorat, 1988, 13-22, 23-60

HOUWERS D.J., PEKELDER J.J. *et al.*

Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with Maedi-Visna virus

Vet Rec, 1988, **122**, 435-437

HULLINGER G.A., KNOWLES D.P. *et al.*

Caprine arthritis encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells

Virology, 1993, **192**, 328-331

HUNTER N., FOSTER J. *et al.*

Transmission of prion diseases by blood transfusion

J. Gen. Virol., 2002, **83**, 2897-2905

HUNTER N., HOUSTON F. *et al.*

Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion : evidence from sheep experiments

Dev Biol (Basel), 2002, **108**, 93-98

JOHNSON C. *et al.*

Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles

PLoS Pathogens, 2007, **3**, (issue 7, e93), 874-881

JOLLY P.E., HUSO D.L. *et al.*

Modulation of lentivirus replication by antibodies : Fc portion of immunoglobulin molecule is essential for enhancement of binding, internalization, and neutralization of visna virus in macrophages

J Virol, 1989, **63**, 1811-1813

JOUBERT L., LAPRAS M. *et al.*

Un foyer de tremblante du mouton en Provence. Sur les virus lents en quête de pathologie comparée

Bull Soc Vet Med Comp Lyon, 1972, **74**, 165-184

KASCSAK R.J. *et al.*

Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins

J Virol, 1987, **61** (12), 3688-3693

KIMBERLIN R.H., WALKER C.A.

Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS

J Gen Virol, 1980, **51** (Pt 1), 183-187

KIMBERLIN R.H., WALKER C.A. *et al.*

Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrappy agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents

J Neurol Sci, 1983, **59** (3), 355-369

KONOLD T., MOORE S.J. *et al.*

Evidence of scrapie transmission via milk

BMC Vet Res, 2008, **4**, 14

KRAMER M.L., KRATZIN H.D. *et al.*

Prion protein binds copper within the physiological concentration range
J Biol Chem, 2001, **276**, 16711-16719

KUBOSAKI A., YUSA S. *et al.*

Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice
Biochem Biophys Res Commun, 2001, **282** (1), 103-107

LACROUX C. *et al.*

Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep
J Gen Virol, 2007, **88** (Pt 3), 1056-61

LACROUX C., SIMON S. *et al.*

Prions in milk from ewes incubating natural scrapie
PLoS Pathog, 2008, **4** (12,e1000238)

LANTIER F., BERTHON P. *et al.*

Génétique des encéphalopathies spongiformes animales.
Médecine des Maladies Infectieuses, 1995, **25**, 259-263

LARSEN H.J., HYLLSETH B. *et al.*

Experimental maedi-visna infection in sheep: early cellular and humoral immune response following parenteral inoculation
Am J Vet, 1982, **43**, 379-383

LASMEZAS C.I., DESLYS J.P., ROBAIN O. *et al.*

Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein
Science, 1997, **275**, 402-405

LATARJET R., MUEL B. *et al.*

Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light
Nature, 1970, **227** (265), 1341-1343

LERONDELLE C., FLEURY C. *et al.*

La glande mammaire : organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite encéphalite caprine
Ann Rech Vet, 1989, **20**, 57-64

LIGIOS C., SIGURDSON C.J. *et al.*

PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis
Nat Med, 2005, **11**, 1137-1138

LIGIOS C., CANCEDDA M.G. *et al.*

PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie
Arch Virol, 2006, **151** (10), 2007-2020

LIU T., LI R. *et al.*

Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells

J Immunol, 2001, **166** (6), 3733-3742

LU Z.Y. *et al.*

New molecular markers of early and progressive CJD brain infection

J Cell Biochem, 2004, **93**, 644-652

LÜHKEN G., BUSCHMANN A. *et al.*

Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases

Vet Res, 2007, **38** (1), 65-80

LUJAN L., GARCIA MARIN J.F. *et al.*

Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection

Vet Rec, 1991, **129**, 51-54

MABBOTT N.A., BROWN K.L. *et al.*

T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein

Immunology, 1997, **92** (2), 161-165

MABBOTT N.A. *et al.*

Involvement of the immune system in TSE pathogenesis

Immunol. Today, 1998, **19**, 201-203

MABBOTT N.A., BRUCE M.E.

The immunobiology of TSE diseases

J Gen Virol, 2001, **82**, 2307-2318

MACHEN M.

Scrapie: deciphering its pathophysiology and cause

Comp Contin Educ Pract Vet, 2001, **23** (4), S52-S58

MANUELIDIS L.

The dimensions of Creutzfeld-Jakob disease

Transfusion, 1994, **34** (10), 915-928

McBRIDE P.A., EIKELENBOOM P. *et al.*

PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice

J Pathol, 1992, **168** (4), 413-418

MERZ P.A., ROHWER R.G., *et al.*

Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases

Science, 1984, **225** (4660), 437-440

MEYER R. K., McKINLEY M. P. *et al.*

Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins

Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, **83**, 2310-2314

MURAMOTO T., SCOTT M. *et al.*

Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble
Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**, 15457-15462

NARAYAN O., CLEMENTS J.E. *et al.*

Mecanisms of escape of visna lentiviruses from immunological control
Contr Microbiol Immunol, 1987, **8**, 60-76

NARAYAN O., CLEMENTS J.E.

Biology and pathogenesis of lentivirus
J Gen Virol, 1989, **70**, 1617-1639

OESCH B., WESTAWAY D. *et al.*

A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein
Cell, 1985, **40** (4), 735-746

OLIVER R.E., GORHAM J.R. *et al.*

Ovine progressive pneumonia : pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease
Am J Vet Res, 1981, **42**, 1554-1559

OZEL M., DIRINGER H.

Small virus-like structures in fractions from scrapie hamster brain
Lancet, 1994, **343**, 894-895

PALSSON A.

Maedi-visna, History and clinical description

In: "*Maedi-visna and related diseases*". Ed by PETURSSON G. AND HOFF JÖRGENSEN
R.Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1990, 1-17

PALSSON A.

Le maedi-visna virus, une maladie à virus lents

Bull Off Int Epiz, 1978, **89**, 477-486

PAN K.M. *et al.*

Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (23), 10962-10966

PATTISON I.H. *et al.*

Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep

Vet Rec, 1972, **90**, 465-468

PATTISON I.H., MILLSON G.C.

Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome
J Comp Pathol, 1961, **71**, 101-109

PEPIN M., VITU C. *et al.*

Maedi-visna virus infection in sheep : a review
Vet Res, 1998, **29**, 341-367

PERL S., YACOBSON B. *et al.*

Udder involvement in maedi infected milking ewes
Isr J Vet Med, 1991, **46**, 34-36

PERRIN G. *et al.*

L'arthrite encéphalite caprine (arthritis encephalitis caprine) études sérologiques et anatomoclinique. Procédures d'assainissement
Bull Acad Vet de Fr, 1987, **60**, 125-136

PETERHANS E. *et al.*

Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes
Vet Res, 2004, **35**, 257-274

PETURSSON G.

Maedi-visna. Etiology and immune response

In: "Maedi-visna and related diseases". Ed by PETURSSON G. and HOFF-JÖRGENSEN R.
Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1990

PORTER D.D. *et al.*

Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice
J Immunol, 1973, **111** (Pt 5), 1407-1410

PRUSINER S.B., McKINLEY M.P. *et al.*

Scrapie agent contains a hydrophobic protein
Proc Natl Acad Sci USA, 1981, **78** (11), 6675-6679

PRUSINER S.B.

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie
Sciences, 1982, **216** (4542), 136-144

PRUSINER S.B., McKINLEY M.P. *et al.*

Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods
Cell, 1983, **35** (2 Pt 1), 349-358

PRUSINER S.B. *et al.*

Purification and structural studies of a major scrapie prion protein
Cell, 1984, **1**, 127-134

PRUSINER S.B. *et al.*

Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans
Brain Pathol, 1991, **1** (4), 297-310

PYPER J.M., CLEMENTS J.E. *et al.*

Variations in clinical disease during replication of lentiviruses

In: "Maedi-visna and related diseases". Ed by PETURSSON G. and HOFF-JÖRGENSEN R.
Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1990

RIEK R., HORNEMANN S. *et al.*

NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-321)

Nature, 1996, **382** (6587), 180-182

RUSSO P., REMOND M. *et al.*

La maladie maedi-visna des petits ruminants

Bull Acad Vet de Fr, 1980, **1**, 17-22

SAVEY M. *et al.*

Eléments du diagnostic des maladies à virus lents des ovins et caprins

Bull Soc Vet de Fr, 1988, **72**, 17

SCHELCHER F., ANDREOLETTI O. *et al.*

La tremblante des petits ruminants : diagnostic

Bull G.T.V., 2002, **13**, 113-118

SCHELCHER F., ANDREOLETTI O. *et al.*

La tremblante des petits ruminants : modalités de transmission chez les ovins

Bull G.T.V., 2002, **13**, 45-48

SCHELCHER F., LACROUX C. *et al.*

La tremblante des petits ruminants

Le Point Vétérinaire, 2002, **33** (pathologie ovine et caprine), 58-62

SCHULZ-SCHAEFFER W.J. *et al.*

Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot

Arch Virol Suppl, 2000, (16), 173-180

SHMERLING D., HEGYI I. *et al.*

Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions

Cell, 1998, **93** (2), 203-214

SIGURDSSON B. *et al.*

Maedi, a chronic progressive infection of sheep lungs

J Infect Dis, 1952, **90**, 233-241

SIGURDSSON B.

Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infection which develop slowly and some of their special characteristics

Br Vet J, 1954, **110**, 341-354

SIGURDSSON B. *et al.*

Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep

J Neuropathol Exp Neurol, 1957, **16**, 389-403

SIHVONEN L., ESTOLA T. *et al.*
Experimental maedi infection in sheep
Acta Vet Scand, 1980, **21**, 124-133

SIHVONEN L.
Late immune responses in experimental maedi
Vet Microbiol, 1984, **9**, 205-213

Site de l'AFSSA : <http://www.afssa.fr/>

Site de l'INRA : <http://www.inra.fr/>

Site du département de chimie et biochimie de l'université Santa-Cruz de Californie :
<http://www.chemistry.ucsc.edu/~glennm/>

STAHL N., BALDWIN M.A. *et al.*
Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing
Biochemistry, 1993, **32** (8), 1991-2002

SUGAYA M., NAKAMURA K. *et al.*
Expression of cellular prion-related protein by murine Langerhans cells and keratinocytes
J Dermatol Sci, 2002, **28** (2), 126-134

TAYLOR D.M., McCONNELL I.
Autoclaving does not decontaminate formol-fixed scrapie tissues
Lancet, 1988, **1** (8600), 1463-1464

TAYLOR D.M., FRASER H. *et al.*
Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie
Arch Virol, 1994, **139** (3-4), 313-326

TAYLOR D.M.
Survival of mouse-passaged bovine spongiform encephalopathy agent after exposure to paraformaldehyde-lysine-periodate and formic acid
Vet Microbiol, 1995, **44** (1), 111-112

TAYLOR D.M.
Inactivation of the causal agents of Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases
Brain Pathol, 1996, **6** (2), 197-198

TAYLOR D.M., FERNIE K. *et al.*
Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat
Vet Microbiol, 1999, **67** (1), 13-16

THORMAR H.
A comparison of visna and maedi viruses
Res Vet Sci, 1965, **6**, 117-129

VAN-DER-MOLEN E.J. *et al.*

A chronic indurative mastitis in sheep associated with maedi-visna virus infection
Vet Quart, 1985, **7**, 112-119

VAN-DER-MOLEN E.J. *et al.*

Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with maedi-visna virus
Vet Quart, 1987, **9**, 193-202

VAN KEULEN L.J., SCHREUDER B.E. *et al.*

Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie
J Clin Microbiol, 1996, **34** (5), 1228-1231

VAN POUCKE M. *et al.*

A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep
BMC Infect Dis, 2005, **5**, 13

VILLET S., FAURE C. *et al.*

Lack of trans-activation function of Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus tat proteins
Virology, 2003, **307**, 317-327

WATT N.J., KING T.J. *et al.*

Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated maedi-visna virus infection
Vet Rec, 1992, **14**, 455-461

WESTAWAY D., DE ARMOND S.J. *et al.*

Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins
Cells, 1994, **76** (1), 117-129

ZINCK M.C., JOHNSON L.K.

Pathology of lentivirus infections in sheep and goats
Virus Res, 1994, **32**, 139-154

ZINCK M.C., NARAYAN O. *et al.*

Pathogenesis of maedi-visna and caprine arthritis encephalitis: new leads of the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation
Vet Immunol Immunopathol, 1987, **15**, 167-180

Toulouse, 2009

NOM : PLAT

PRENOM : Antoine

TITRE :

Déterminisme de la présence de protéine prion anormale (PrPSc) dans le tissu mammaire des brebis : Etude rétrospective dans un troupeau naturellement atteint de tremblante

RESUME :

La tremblante ovine représente l'archétype des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST). Pendant de nombreuses années, le lait des petits ruminants atteints de tremblante a été considéré comme exempt d'infectiosité prion et rentre ainsi de façon non restrictive dans les chaînes alimentaires.

Dans un troupeau naturellement co-infecté par la tremblante et le virus Maedi-Visna (MVV), nous nous sommes intéressés au déterminisme de l'accumulation de protéine prion anormale (PrPSc) dans le tissu mammaire. Nous avons mis en évidence la présence de PrPSc dans des follicules lymphoïdes ectopiques mammaires se développant suite à l'infection par le MVV et dans la lumière des canaux galactophoriques, chez un tiers des brebis mortes de tremblante incluses dans l'étude.

Cette observation soulève de nombreuses questions quant à l'éventuel passage de prion dans le lait de petits ruminants atteints de tremblante et au risque d'exposition de l'Homme à travers les produits lactés.

MOTS CLES :

Prion – Brebis – Tissu mammaire – Virus Visna-Maedi – Tremblante - Lait

ENGLISH TITLE :

Determinism of abnormal prion protein (PrPSc) accumulation in sheep mammary gland: Retrospective study in a natural scrapie affected flock

ABSTRACT :

Ovine scrapie represents the archetype of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) or 'prion diseases'. Since many years, milk from scrapie-affected small ruminants was considered as prion 'safe' and enters unrestricted into the animal and human food chain.

In a scrapie and Maedi-Visna virus (MVV) naturally co-infected flock, we studied the determinism of the abnormal prion protein (PrPSc) accumulation in the mammary tissue. Here we show the presence of PrPSc in mammary ectopic lymphoid follicles, which are developed consequently to MVV infection, but also in the lumen of lacteal ducts, in one third of the studied ewes.

This observation raises numerous concerns about the potential shedding of prion in the milk of scrapie-affected small ruminants, and the risk to humans of TSE exposure associated with milk products from ovine and other TSE-susceptible dairy species.

KEYWORDS :

Prion – Ewes – Mammary tissue – Maedi-Visna virus – Scrapie - Milk