



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4184](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4184)

**To cite this version :**

MERCIER, Sébastien. *Emergence et risques sanitaires associés à la tremblante atypique ovine* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 95 p.

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

---

# Emergence et risques sanitaires associés à la tremblante atypique ovine

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Sébastien MERCIER**  
Né, le 30 Avril 1970 à Roanne (42)

---

Directeur de thèse : **M. le Professeur François SCHELCHER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**Mme Bettina COUDERC**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. François SCHELCHER**  
**Mlle Caroline LACROUX**

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

## REMERCIEMENTS

**A notre jury de thèse,**

**Madame le Professeur Bettina COUDERC**

Professeur des Universités

*Institut Claudius Régaud - Biotechnologies*

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

**Hommages respectueux**

**Monsieur le Professeur François SCHELCHER**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*

**Qui nous fait l'honneur de diriger cette de thèse.**

**Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos plus sincères remerciements**

**Mademoiselle le Docteur Caroline LACROUX**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Anatomie Pathologique, Histologie*

**Qui nous fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse. Pour son intérêt dans ce travail.**

**Sincères remerciements**

**A Patrice....**

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	6
<b>LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES</b>	7
<b>INTRODUCTION</b>	8
<b>PREMIERE PARTIE : LE CONCEPT PRION</b>	10
<b>1. De l'agent des EST au prion</b>	11
1.1. Un Agent Transmissible Non Conventionnel	11
1.2. PrPc et PrPSc : un gène, deux isoformes protéiques	13
1.3. Une protéine infectieuse ?	14
<b>2. Diversité et transmission interspécifique des agents des EST</b>	17
2.1. Diversité des agents des EST	17
2.2. Diversité des agents des EST et concept Prion	18
2.3. Barrière de transmission et Prion	18
<b>DEUXIEME PARTIE : TREMBLANTE CLASSIQUE ET ESB DES PETITS RUMINANTS</b>	20
<b>1. Un regain d'intérêt récent</b>	21
<b>2. Polymorphisme PrP et sensibilité à la tremblante classique et à l'ESB</b>	22
2.1. Historique	22
2.2. Sensibilité/résistance à la tremblante classique	23
2.3. Sensibilité/résistance à l'ESB	23
2.4. Les 'limites' de la résistance génétique	24
<b>3. Epidémiologie de la tremblante classique et de l'ESB</b>	24
3.1. Système de surveillance des EST ovines	24
3.2. Prévalence de la tremblante classique dans la population générale et les troupeaux atteints	26
3.3. ESB des petits ruminants : mythe et prévalence	28
<b>4. Pathogénèse et transmission de la tremblante classique et de l'ESB</b>	31
4.1. Schéma général de dissémination de l'agent infectieux dans l'organisme	31
4.2. Dynamique de dissémination dans l'organisme	38
4.3. Impact des interactions génotype/souche sur la cinétique de dissémination	40
4.4. Un schéma alterne de dissémination dans l'organisme ?	40
<b>5. Transmission de la tremblante classique et de l'ESB</b>	41
<b>6. Contrôle et éradication de la tremblante classique et de l'ESB</b>	42
6.1. L'échec des mesures sanitaires classiques	42
6.2. Eradication de la tremblante par l'outil génétique dans les troupeaux atteints	43
6.3. Politique de sélection appliquée à la population ovine générale	44
6.4. Effet à long terme de la politique de sélection	50
<b>TROISIEME PARTIE : LA TREMBLANTE ATYPIQUE : UNE MALADIE EMERGENTE ?</b>	51
<b>1. Identification de la tremblante atypique</b>	52
<b>2. La tremblante atypique : une authentique EST</b>	53
2.1. Un agent infectieux unique ?	53
2.2. Une maladie de répartition mondiale	54
2.3. Prévalence de la tremblante atypique	55
2.4. Une maladie émergente ?	56

<b>3. La tremblante atypique : désordre spontané ou maladie contagieuse ?</b>	57
3.1. Age relatif des cas de tremblante classique et atypique	57
3.2. Facteurs de risque associés à la tremblante atypique	57
3.3. Pathogenèse de la tremblante atypique	58
3.4. Prévalence dans les troupeaux atteints	59
3.5. Le concept de trouble spontané : une explication plausible ?	60
3.6. Des arguments d'une extrême fragilité	61
<b>QUATRIEME PARTIE : RISQUES SANITAIRES ASSOCIES A LA TREMBLANTE ATYPIQUE</b>	64
<b>1. Une remise en question de la politique de lutte génétique contre les EST</b>	65
1.1. Tremblante atypique et polymorphismes du gène PRNP	65
1.2. Conséquences des choix passés	68
1.3. Impact sur la politique de lutte génétique contre les EST	69
<b>2. Tremblante atypique et sécurité sanitaire des aliments : le poids des incertitudes</b>	70
2.1. ESB et nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob	70
2.2. Potentiel zoonotique des agents animaux des EST autres que l'ESB classique	71
2.3. La maîtrise des risques d'exposition humaine aux agents des EST	73
2.4. Exposition à la tremblante atypique	75
2.5. Tremblante atypique et barrière de transmission	77
<b>CONCLUSION</b>	78
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	79

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure n°1</b>	SAF (Scrapie Associated Fibrils), Microscope électronique à transmission	12
<b>Figure n°2</b>	Isoformes de PrP : isoforme cellulaire normale (PrPc) et isoforme anormale résultant de la trans-conformation de la forme cellulaire normale (PrPSc) enrichie en feuillets $\beta$	14
<b>Figure n°3</b>	Représentation schématique des changements conformationnels de la PrPc, induits par la PrPSc	16
<b>Figure n°4</b>	Représentation schématique du trajet du prion à travers la barrière intestinale jusqu'au SNP et de la localisation des différents acteurs cellulaires	32
<b>Figure n°5</b>	Identification des cellules folliculaires dendritiques dans le centre germinatif d'un nœud lymphatique et double marquage de la PrPSc dans des FDC d'un nœud lymphatique mésentérique	33
<b>Figure n°6</b>	Quelques aspects cellulaires et moléculaires de la propagation du prion	34
<b>Figure n°7</b>	Détection immunohistochimique des dépôts de PrPSc dans différents tissus : système nerveux central et neurones d'un plexus myentérique d'un ovin VRQ/VRQ de 10 mois	35
<b>Figure n°8</b>	Organisation anatomo-fonctionnelle schématique du système nerveux entérique (SNE) chez l'homme	37
<b>Figure n°9</b>	Evolution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les races bouchères	47
<b>Figure n°10</b>	Evolution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les races laitières	47
<b>Figure n°11</b>	Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races bouchères	48
<b>Figure n°12</b>	Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races allaitantes	48
<b>Figure n°13</b>	Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races laitières	49
<b>Figure n°14</b>	Western Blot mettant en évidence plusieurs souches de tremblante classique et une souche de tremblante atypique	52
<b>Tableau n°1</b>	Comparaison des propriétés physico-chimiques des deux isoformes protéiques (PrPc et PrPSc)	15
<b>Tableau n°2</b>	Prévalence apparente de la tremblante classique ovine à l'abattoir de 2007 à mars 2010	27
<b>Tableau n°3</b>	Estimation de la prévalence potentielle de l'ESB dans l'espèce ovine selon les pays et selon différentes sensibilités considérées pour les tests de dépistage	30
<b>Tableau n°4</b>	Données sur les troupeaux ayant des cas atypiques et les troupeaux sains en Norvège entre 1998 et 2006	66
<b>Tableau n°5</b>	Génotype des cas index de tremblante atypique et classique provenant de foyers identifiés en France entre 2003 et 2007	67
<b>Tableau n°6</b>	Matériels à risque spécifié chez les bovins, les ovins et les caprins	74

## LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

<b>AFSSA</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>ATNC</b>	Agent Transmissible Non Conventionnel
<b>BIOHAZ</b>	<i>Scientific Panel on Biological Hazards</i> ou groupe scientifique sur les risques biologiques de l'EFSA
<b>CFD</b>	Cellules folliculaires dendritiques
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CWD</b>	<i>Chronic Wasting Disease</i> ou maladie du dépérissement chronique
<b>DC</b>	Cellules dendritiques
<b>DGAI</b>	Direction générale de l'alimentation
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> ou autorité européenne de la sécurité des aliments
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ESB</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
<b>EST</b>	Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles
<b>GALT</b>	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
<b>GPI</b>	Glycosyl phosphatidyl inositol
<b>MCJ</b>	Maladie de Creutzfeld-Jakob
<b>MRS</b>	Matériels à Risque Spécifié
<b>nv-MCJ</b>	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob
<b>OIE</b>	Office Internationale des Epizooties
<b>PK</b>	Protéinase K
<b>PrP<sup>C</sup></b>	Protéine prion cellulaire
<b>PrP<sup>Sc</sup></b>	Protéine prion pathologique
<b>SAF</b>	<i>Scrapie associated fibrils</i>
<b>SDS</b>	Sodium dodécylsulfate
<b>SCID</b>	<i>Severe Combined Immune Deficiency</i>
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SNE</b>	Système Nerveux Entérique
<b>SOD</b>	Super Oxyde Dismutase
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>v-MCJ</b>	Nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob

## INTRODUCTION

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles ou « maladies à prions » constituent un groupe de maladies neuro-dégénératives affectant l'Homme (maladie de Creutzfeld-Jakob, Insomnie Fatale Familiale, syndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker) et un large spectre d'espèces de mammifères, tels que les bovins (Encéphalopathie Spongiforme Bovine ou ESB) et les petits ruminants (Tremblante ovine et caprine), les cervidés sauvages (Maladie du Dépérissement Chronique des Cervidés).

Sur un plan clinique, les EST se caractérisent par une durée d'incubation asymptomatique généralement longue (jusqu'à 50 ans chez l'Homme), une évolution clinique progressive et une issue fatale. Aucune réponse immunitaire ou inflammatoire spécifique ne semble associée au développement de ces maladies. Sur le plan lésionnel, ces maladies, dans leur phase clinique, se caractérisent toutes par une spongiose (vacuolisation) du système nerveux central visible sur coupes histologiques ainsi qu'une astrocytose et une perte neuronale [92, 104]. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour ces maladies.

Dans les années 30, le caractère transmissible des EST fut démontré par Jean Cuillé et Paul Louis Chelle qui reproduisirent une tremblante clinique chez des ovins après l'injection d'un broyat de cerveaux issus d'ovins atteints [64]. La survenue de cas cliniques de maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ) (France, Royaume Uni, Etats-Unis d'Amérique) chez des patients traités par des hormones de croissance extractives vraisemblablement préparées à partir d'hypophyses d'individus décédés alors qu'il étaient en incubation de la maladie, illustre la caractère transmissible de ce type de maladie chez l'homme. En 1996 l'émergence d'une nouvelle forme d'EST chez l'homme (nouveau variant de la MCJ) consécutive à l'exposition alimentaire à des produits contaminés par l'encéphalopathie bovine est venue démontrer de façon dramatique le risque zoonotique que certaines EST animales endémiques pourraient représenter pour l'homme [41, 62].

Suite à la découverte du risque zoonotique associé à l'ESB, les autorités sanitaires Européennes ont mis en place un système d'épidémiologie-surveillance dite active, basée sur la recherche systématique de marqueurs des EST dans une proportion de la population de ruminants abattus ou équarris dans chaque état membre. Ce dispositif, outre le suivi de

l'épidémie d'ESB chez les bovins, a permis de découvrir l'existence de formes d'EST dites atypiques jusqu'alors inconnues non seulement chez les bovins (ESB types L et H) mais également chez les petits ruminants. Alors que les formes classiques d'EST (ESB bovine et tremblante des petits ruminants) ont fait l'objet de nombreux travaux, ces formes atypiques de découverte récente demeurent largement inconnues. Dans un contexte où l'ESB classique bovine est en voie d'éradication, les risques sanitaires potentiels associés aux formes d'EST atypiques et, en particulier à la tremblante atypique, font l'objet d'un intense débat.

## **PREMIERE PARTIE : LE CONCEPT PRION**

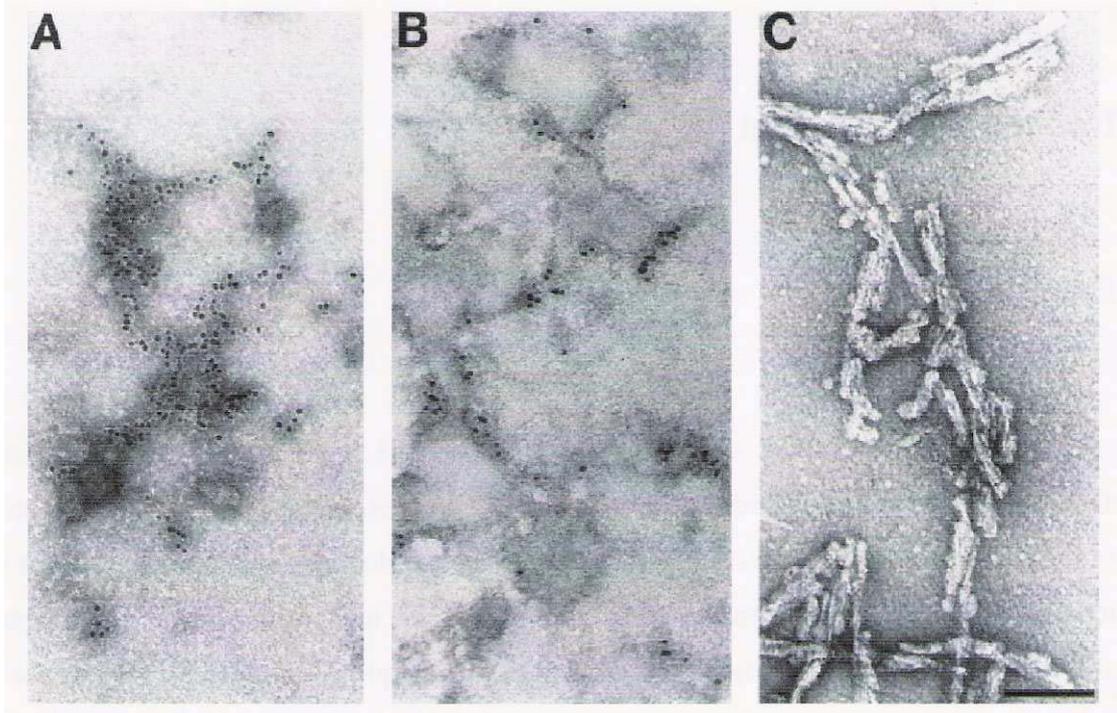
# 1. De l'agent des EST au prion

## 1.1. Un Agent Transmissible Non Conventionnel

Les échecs répétés d'isolement d'un agent transmissible responsable des EST par les méthodes classiques, bactériologiques et virologiques, ont historiquement conduit les expérimentateurs à limiter l'essentiel de leurs travaux sur ces maladies aux modèles animaux de transmission, sans réellement pouvoir appréhender la nature de l'agent transmissible.

Toutefois, en l'absence d'idée claire sur la nature de l'agent, un certain nombre de physiciens et de chimistes se sont penchés sur les propriétés de cet agent transmissible si peu conventionnel. En effet, les agents des EST se montrent particulièrement résistants aux différents procédés physico-chimiques utilisés pour inactiver les agents infectieux, tels que la chaleur sèche, les radiations, les acides, les détergents ou les agents chaotropes [151]. Par contre, de manière assez surprenante, alors que ces agents semblent insensibles à l'action des nucléases, le traitement d'un isolat infectieux par des protéases comme la protéinase K diminue de façon spectaculaire les titres infectieux.

Ce sont ces propriétés particulières qui ont conduit au début des années 1980 à l'étude au microscope électronique en contraste négatif de la fraction synaptosomale-mitochondriale de préparations digérées en détergents à la protéinase K, de cerveaux de brebis atteintes de tremblante [188]. Ces travaux menés chez les ovins mais aussi à partir de tissus de patients atteints de MCJ, de Kuru ou d'élans atteints de CWD, ont permis l'identification d'agrégats fibrillaires d'une vingtaine de nanomètres de diamètre et de 100 à 200 nanomètres de long. Ces fibrilles sont droites ou plus rarement arrangées en hélices [169, 170]. Ces agrégats ou Scrapie Associated Fibrills (SAF) (figure n°1) sont systématiquement retrouvées dans les tissus des individus atteints d'EST naturelle ou expérimentale et sont absentes des préparations de tissus issues d'animaux sains [187].



*Figure n°1 : SAF (Scrapie Associated Fibrils), Microscope électronique à transmission de PrP 27-30. Barre = 100 nm.*

L'inoculation de préparations de SAF purifiées (par protéolyse ménagée, extraction en détergent et gradients de concentration de sucrose) issues de cerveaux d'animaux atteints permettent de reproduire la maladie [76] [210].

Les SAF ont été utilisées pour générer des anticorps spécifiques qui à leur tour ont permis la conduite d'investigations biochimiques plus approfondies [76, 186].

Le constituant majeur des SAF extraites de cerveaux contaminés est un polypeptide d'un poids moléculaire de 27-30 kDa [210]. Le séquençage de quelques acides aminés N-terminaux de ce polypeptide a permis de montrer en 1985 qu'il était codé par un gène cellulaire [18, 199] et non par un acide nucléique propre. La protéine codée par ce gène est à la fois exprimée chez les individus sains et atteints. Toutefois, chez les individus sains, cette protéine est sensible à la Protéinase K alors que chez les individus atteints elle y est partiellement résistante [199].

Par la suite, une nomenclature particulière destinée à rendre compte des propriétés de cette protéine a fait son apparition [189] :

- la protéine est dénommée PrP pour ‘**Protease resistant Protein**’,
- le gène codant pour la protéine PrP a été baptisé PRNP,
- la protéine retrouvée chez les individus sains est devenue la Protéine Prion Cellulaire (**PrPc**),
- la protéine retrouvée chez les individus atteints est devenue la Protéine Prion Scrapie ou résistante (**PrPSc ou PrPres**).

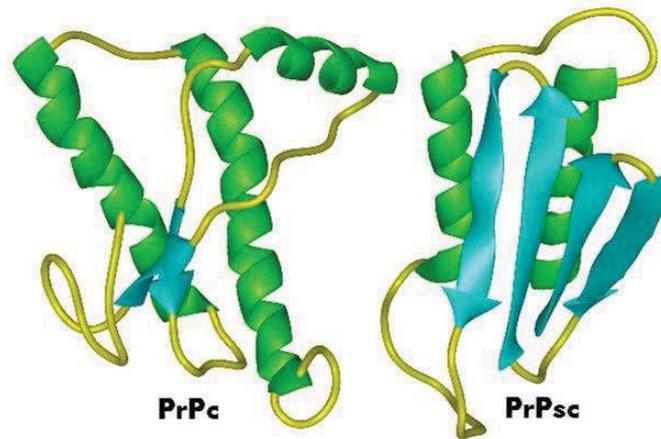
## 1.2. PrPc et PrPSc: Un gène, deux isoformes protéiques

La protéine PrPc est codée par le gène PRNP connu dans toutes espèces de mammifères et chez les oiseaux [118]. L’expression du gène PRNP est identique chez les individus sains et malades [199], et les quantités d’ARNm codant pour la protéine PrPc sont identiques dans les deux cas. La PrPc est synthétisée dans le réticulum endoplasmique puis transite par l’appareil de Golgi vers la surface cellulaire. Au cours de sa biosynthèse, elle subit le clivage de sa partie N-terminale, l’ajout de deux chaînes oligo-saccharidiques, la formation d’un pont disulfure ainsi que l’attachement d’une ancre GPI [117].

La PrPc est exprimée dans de nombreux tissus (dont le système nerveux central) et par de nombreux types cellulaires, à des niveaux variables [193].

La fonction ou les fonctions exactes de cette protéine ne sont pas encore élucidées, bien que différentes hypothèses aient été avancées : rôle de récepteur membranaire dans la transduction des signaux cellulaires [65], rôle dans la lutte contre le stress oxydatif en relation avec une activité superoxyde dismutase like [128]. Toutefois, des souris, ou plus récemment, des bovins knock-out pour le gène PRNP (animaux PrP 0/0) ont une vie et un comportement normaux [46, 180, 215].

L’étude structurale de la PrPSc, l’isoforme anormale de la PrPc, est rendue extrêmement difficile par l’insolubilité dont elle fait preuve lors de sa purification. Ces propriétés ont, jusqu’à présent, interdit toute étude de la protéine complète en cristallographie. Néanmoins, les mesures de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge basée sur la transformée de Fourier ont montré que la PrPSc est structurée avec davantage de feuillets  $\beta$  : 30% d’hélices  $\alpha$  et 45% de feuillets  $\beta$  [203], à la différence de la PrPc (43% d’hélices  $\alpha$  et très peu de feuillets  $\beta$ ) (figure n°2).



*Figure n°2 : Isoformes de PrP : isoforme cellulaire normale (PrPc) et isoforme anormale résultant de la trans-conformation de la forme cellulaire normale (PrPsc) enrichie en feuillets  $\beta$ .*

La PrPsc et la PrPc, ont la même séquence primaire. Les particularités physico-chimiques de la PrPsc, sont attribuées à sa structure tertiaire particulière, l'enchaînement de feuillets  $\beta$  conférant à la molécule une grande stabilité (tableau n°1). Toutefois, après renaturation dans des conditions oxydantes pour permettre la formation d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéine, la protéine redevient soluble et présente un contenu en hélice  $\alpha$  semblable à celui de la protéine PrPc [195].

La richesse en feuillets  $\beta$  de la PrPsc lui permettrait notamment de résister à la protéinase K ; seuls les premiers acides aminés de la PrPsc pouvant être hydrolysés efficacement. Cette structure pathologique interférerait également avec le catabolisme naturel de la protéine et aboutirait à une accumulation progressive de celle-ci [116, 209].

<b>PrPc</b>	<b>PrPSc</b>
Soluble	Hydrophobe
Monomérique en détergents	Forme des agrégats en détergents (amyloïde)
Digestion complète par les protéases	Digestion partielle par les protéases
Soluble en Sarkosyl	Insoluble en Sarkosyl
Localisation membranaire	Localisation intra-cytoplasmique dans les lysosomes secondaires, et extracellulaire
Turn-over intracellulaire rapide et demi-vie courte (quelques heures)	Catabolisme lent
Distribution ubiquiste	Dépôts principalement dans le SNC et les organes lymphoïdes
42% d'hélices $\alpha$ et 3% de feuillets $\beta$	30% d'hélices $\alpha$ et 45% de feuillets $\beta$

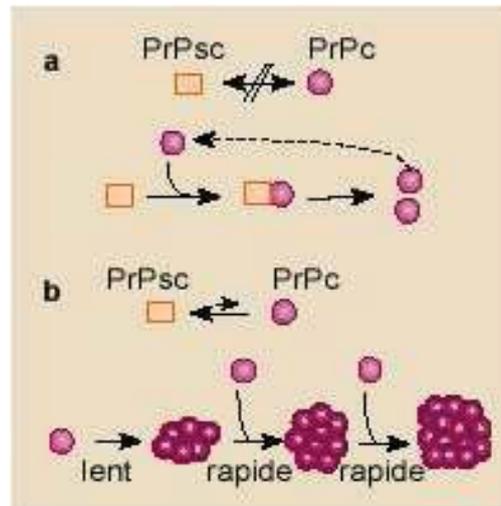
*Tableau n°1 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des deux isoformes protéiques (PrPc et PrPSc)*

### **1.3. Une protéine infectieuse ?**

Le développement des EST semble étroitement associé à l'accumulation, dans les tissus des individus atteints (dont le système nerveux central), de l'isoforme anormale (PrPSc) de la PrPc [208]. En outre, il est à présent établi que la PrPSc est issue d'un processus post-traductionnel de modification de la PrPc [116, 209].

A partir de la théorie développée par Griffith dès 1966 [110], Stanley Prusiner a énoncé au début des années 1980 l'hypothèse selon laquelle l'agent transmissible des EST serait l'isoforme anormale de la PrPc. Ce concept dit du Prion (pour Protéine Infectieuse Only) implique qu'une protéine serve de support à l'ensemble des caractéristiques propres d'un agent infectieux [208]. L'accumulation de l'isoforme anormale de la PrPc dans les tissus

serait le résultat d'un processus auto-catalytique de conversion au cours duquel la PrP<sup>Sc</sup> entraînerait elle-même la trans-conformation de la PrP<sup>C</sup>. Le développement des lésions serait, selon ce concept, consécutif à l'accumulation de l'isoforme anormale de la PrP dans le système nerveux central (figure n°3).



*Figure n°3 : Représentation schématique des changements conformationnels de la PrP<sup>c</sup>, induits par la PrP<sup>Sc</sup>.*

Le concept 'Prion' est aujourd'hui accepté par la plupart des scientifiques. La dernière décennie a en effet apporté des éléments probants tels que la capacité à produire *de novo* une EST authentique (transmissible à partir des individus atteints) par inoculation d'une protéine PrP recombinante trans-conformée *in vitro* [179]. Au-delà de ces aspects, de nombreux éléments, notamment ceux relatifs à la détermination de la diversité biologique des agents des EST, demeurent encore inconnus.

## 2. Diversité et transmission interspécifique des agents des EST

### 2.1. Diversité des agents des EST

Le passage en série de deux isolats de tremblante ovine à des chèvres a abouti à l'apparition de deux « lignées » stables développant des signes cliniques très différents ; l'une dite « Scratchy » (démangeaison) et l'autre « Drowsy » (sommolence) [204].

A partir de ces constatations et d'autres éléments tels que :

- la variété des symptômes observés chez les souris [54] ou les moutons [89] inoculés avec différents isolats d'ESST,
- la possibilité ou l'impossibilité de transmettre certains isolats lors d'inoculation hétérosécifique [148],
- l'extrême variabilité de thermostabilité de l'agent issu d'isolats différents [75],

s'est développé le concept de diversité biologique de l'agent causal des EST.

Les travaux menés dans les années 1960 – 1970 par l'équipe de Dickinson au NPU (NeuroPathogenesis Unit) [74] ont fait de la transmission à des lignées de souris l'outil de référence pour l'étude de la bio-diversité des agents des EST. Lorsqu'un isolat d'EST est inoculé à des souris de même lignée, on constate en cas de transmission effective, une réduction progressive de la durée d'incubation et une augmentation de l'efficacité de la transmission (nombre de souris atteintes / nombre de souris inoculées) au cours des sous-passages. Ces caractères se stabilisent généralement après 3 ou 4 passages en série [39, 92] et la durée d'incubation ainsi que le profil lésionnel (distribution des lésions vacuolaires dans l'encéphale des souris) permettent de caractériser le phénotype de la souche [42].

L'utilisation de cet outil a permis au cours des années 60-70 de confirmer l'existence d'une réelle diversité biologique des agents des EST notamment chez les petits ruminants sans toutefois permettre d'en décrire de façon cohérente l'entière diversité.

En effet l'une des limites majeures des bio-essais sur souris conventionnelles est que certains isolats, authentiquement transmissibles (par inoculation dans l'espèce homologue), s'avèrent totalement incapables de se propager sur les lignées de souris conventionnelles.

## **2.2. Diversité des agents des EST et concept Prion**

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

Les premiers éléments soutenant l'hypothèse selon laquelle la PrP<sup>Sc</sup> pourrait servir de support au caractère de souches ont été apportés par l'étude de deux isolats de prion issus du vison et propagés sur hamsters. Les souches 'Drowsy' et 'Hyper' [32] entraînent chez le hamster l'accumulation de deux types de PrP<sup>Sc</sup> biochimiquement différentes par (i) leur solubilité dans le N-laurylsarcosyl, (ii) leur résistance à la PK et (iii) leur profil de migration en gel de poly-acrylamide [33].

Des expériences de trans-conformation *in vitro* de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> par de la PrP<sup>Sc</sup> issue de hamsters atteints par les souches 'Hyper' et 'Drowsy' aboutissent à la néosynthèse de PrP<sup>Sc</sup> ayant les mêmes propriétés biochimiques que les souches d'origine [31]. Par ailleurs, des expériences similaires ont permis de démontrer que la PrP<sup>Sc</sup> elle-même est capable d'appliquer son propre profil de glycosylation à de la PrP<sup>C</sup> trans-conformée *in vitro* [124, 247].

Ces éléments démontrent l'existence d'une variabilité biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> et une relation entre le phénotype biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> et les caractères de souche. Sur un plan opérationnel, ces éléments permettent l'identification de certains agents des EST sur la base de la signature des propriétés biochimiques associée à la PrP<sup>Sc</sup> qui s'accumule dans les tissus des individus atteints.

## **2.3. Barrière de transmission et Prion**

Lors de l'inoculation d'un isolat d'EST d'une espèce animale à une autre, différents phénomènes sont susceptibles de se produire.

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

Certaines souches, biologiquement clonées, lorsqu'elles sont inoculées à une autre espèce, acquièrent des propriétés radicalement différentes de celles de la souche originelle. Ainsi, le passage en série de la souche murine 22C sur le hamster, puis sa ré-inoculation à la souris, conduit à l'émergence d'une nouvelle souche [150].

D'autres agents, comme la souche 139A (stable sur la souris), seront modifiés lors d'un passage en série sur une espèce (le hamster), mais demeureront inchangés par le passage sur une espèce tierce (le rat) [147].

Enfin, certains agents des EST comme l'ESB [41] ou la souche murine ME7 [148], conservent des propriétés inchangées par leur propagation dans un large spectre d'hôtes intermédiaires.

L'ensemble des phénomènes observés lors du passage trans-spécifique des souches est attribué à l'existence d'une barrière de transmission [205].

D'une façon générale, la capacité d'un agent des EST à (i) se propager efficacement dans un hôte d'une nouvelle espèce ou (ii) à évoluer/ demeurer stable lors de la transmission à un hôte hétérospécifique intermédiaire demeure imprévisible.

Les déterminants fondamentaux de la barrière de transmission restent largement inconnus. Toutefois, certains des éléments majeurs contribuant à la barrière de transmission ont été identifiés. La souche de tremblante 263K (hamster) ne peut être transmise à la souris. Chez des souris transgéniques pour le gène PRNP de hamster, la souche 263K peut être efficacement propagée. Ce résultat indique clairement que le gène PRNP est un déterminant majeur de la barrière de transmission [222].

Cette découverte a conduit au développement d'une longue liste de modèles de souris transgéniques additionnelles qui expriment le gène de la PrP ovine, bovine, porcine ou bien encore humaine [55, 56]. La plupart de ces modèles ont été développés sur des souris PrP KO permettant ainsi d'éviter une potentielle interférence de la PrP endogène de la souris [231]. Une corrélation inverse entre la durée d'incubation et le niveau d'expression du transgène PRP dans le cerveau a été rapportée chez les souris transgéniques pour les variants ovin, murin et hamster de la PrP [246].

Enfin, de nombreuses données illustrent aujourd'hui que les propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup> associée aux agents des TSE sont identiques après propagation sur l'espèce hôte naturelle ou chez la souris transgénique exprimant le gène PRNP de cette espèce [56, 69].

**DEUXIEME PARTIE : TREMBLANTE  
CLASSIQUE ET ESB DES PETITS RUMINANTS**

## 1. Un regain d'intérêt récent

La tremblante est considérée comme l'archétype des EST ; c'est l'un des modèles les plus étudiés en matière de pathogénèse et de diversité des souches. En effet, bien que les manifestations cliniques de cette maladie soient assez uniformes, les bio-essais sur souris conventionnelles ainsi que les investigations relatives à la diversité des signatures biochimiques PrP<sup>Sc</sup> associées à des isolats de terrain ont permis de révéler une certaine diversité des agents responsables de cette maladie [14, 15, 42, 43].

La tremblante est une maladie connue en Europe depuis plusieurs siècles. Elle fut décrite pour la première fois en Angleterre en 1732. Cette maladie touche les ovins et les caprins. Elle a été identifiée dans la plupart des pays membres de l'Office International des Epizooties possédant une population significative de petits ruminants.

Au 18<sup>ème</sup> siècle, la tremblante ovine a été considérée comme un danger pour l'économie Britannique : à cette époque, la laine, et donc le mouton, représentait le premier produit d'exportation de la grande Bretagne et en 1755 le parlement britannique statua sur « l'impact économique de l'augmentation d'une maladie fatale chez le mouton ». Plus récemment, les risques potentiels associés aux maladies à longue durée d'incubation (dont la tremblante, la paratuberculose et les maladies à lentivirus) ont été avancés par certains pays (Océanie) pour justifier la mise en place de mesures unilatérales d'embargo ou de restrictions à l'importation.

Au-delà de ces épisodes, la présence de la tremblante classique dans les populations de petits ruminants n'a suscité qu'un intérêt relatif de la part des autorités sanitaires en charge de la santé humaine ou animale. La survenue de la crise de l'ESB (1996), conjuguée à la mise en évidence de la sensibilité des ovins et des caprins à cet agent particulier des EST, a bouleversé cette situation.

La transmission expérimentale orale de l'ESB à des ovins résulte en le développement d'une EST qui sur des critères cliniques n'est pas différenciable de la tremblante classique (démangeaisons, ataxie, troubles comportementaux). Si la distinction entre ESB et agents responsables de la tremblante classique reste possible, cette démarche nécessite des examens complexes et longs, pouvant aller dans certains cas jusqu'au bio-essai.

En conséquence, bien que la tremblante n'ait pas été considérée au moment du déclenchement de la crise de l'ESB comme une maladie à potentiel zoonotique, la possibilité du

développement d'une épidémie d'ESB dans le cheptel des petits ruminants a conduit à la mise en place de mesures sanitaires de contrôle et d'éradication des EST dans l'espèce ovine.

## **2. Polymorphisme PrP et sensibilité à la tremblante classique et à l'ESB**

### **2.1. Historique**

Les travaux de transmission expérimentale de la tremblante, débutés en 1938 sur des ovins au Royaume-Uni, ont apporté une contribution essentielle à la découverte du contrôle génétique de la sensibilité aux EST [74].

L'exposition orale d'ovins, par un inoculum standardisé de tremblante, « SSBP/1 » (Sheep Scrapie Brain Pool n°1) a permis d'établir des 'lignées' sensibles ou résistantes à la maladie. Ces expériences ont été menées dans trois races ovines : Cheviot, Herdwick et Swaledale [134]. L'effet du croisement des deux lignées (acquisition d'une forte résistance à la maladie chez tous les animaux) a permis de conclure que le caractère résistant à l'infection était lié à un gène unique à effet dominant : le gène *Sip* (pour Scrapie incubation period). [74]

Vingt ans après cette découverte, il fut établi que le gène *Sip* et le gène PRNP (qui code pour la protéine Prion) étaient un seul et même gène et que certains polymorphismes du gène PRNP exercent un contrôle fort sur la sensibilité à la maladie [135].

Aujourd'hui, 26 polymorphismes majeurs confirmés et plusieurs autres mineurs (rapportés par un seul observateur) sont décrits et confirmés sur le gène PRNP ovin. (M112T, A116P, G127A/V/S, A136V/T, M137T, S138N, L141F, H143R, R151C, R154H, R167S, Q171R/H/K, N176K, H180Y, G189L/R, T195S, T196S, R211Q and P241S). [24, 34, 36, 60, 107, 108, 113, 163, 198, 233].

Les nombres correspondent à la position du codon sur le gène PRNP. La première lettre correspond à l'acide aminé sur le gène sauvage, et la seconde à l'acide aminé sur le gène muté. (Abréviations pour les acides aminés : A= Alanine, R= Arginine, N= Asparagine, D= Aspartate, C= Cystéine, Q= Glutamine, E= Glutamate, G= Glycine, H= Histidine, I= Isoleucine, L= Leucine, K= Lysine, M= Méthionine, F= Phénylalanine, P= Proline, S= Serine, T= Thréonine, W= Tryptophane, Y= Tyrosine, V= Valine).

Les méthodes phylogéniques ont permis d'établir que l'allèle A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> est le variant sauvage du gène PRNP ovin, la plupart des autres allèles identifiés dérivant de cet allèle par une mutation ponctuelle de la séquence [24, 36, 136, 164, 233].

## **2.2. Sensibilité/résistance à la tremblante classique**

Suite à l'identification de l'effet du gène PRNP sur la sensibilité à la maladie chez les ovins [135], de nombreuses études (la plupart reposant sur des dispositifs cas- témoins) ont été menées dans le but d'identifier les polymorphismes associés à la sensibilité/résistance à la tremblante. Parmi ces polymorphismes, ceux aux codons 136, 154 et 171 ont été considérés au cours des 20 dernières années comme les déterminants majeurs du phénomène de résistance/sensibilité génétique aux EST chez les ovins.

Ces travaux ont rapidement permis d'identifier que l'allèle ARR était associé à une forte résistance à la tremblante classique. Les animaux homozygotes ARR ne développent pas de signe clinique de la maladie, alors que les animaux hétérozygotes ARR ne sont atteints que sous une très faible incidence [79, 136, 137, 233, 235].

A l'inverse, l'allèle VRQ semble conférer une forte sensibilité dans les cheptels infectés [79, 136, 137, 233, 235]. L'allèle sauvage ARQ apparaît lui aussi au travers des différentes études comme associé à un sur-risque de développer la maladie (à l'état homozygote ou lorsqu'il est associé à un allèle autre que l'allèle ARR).

## **2.3. Sensibilité/résistance à l'ESB**

En l'absence de cas naturel d'ESB identifié chez les ovins, les travaux visant à caractériser l'effet des polymorphismes du gène PRNP sur l'infection par l'ESB ont été réalisés par inoculation expérimentale de groupes d'animaux, souvent limités, de différents génotypes.

La plupart des travaux initiaux ont été menés par inoculation orale ou intracérébrale en utilisant de l'ESB bovine.

Les résultats obtenus au cours de ces expérimentations ont permis de mettre en évidence, sur la base des durées d'incubation observées et de la présence de PrP anormale dans l'organisme des animaux atteints, que les allèles ARQ et AHQ étaient associés aux périodes d'incubation les plus courtes. De façon curieuse, l'allèle VRQ est associé à une moindre sensibilité à la maladie (durées d'incubation prolongées, taux d'attaque inférieur à 100%) [91, 143]. Chez les

animaux ARR/ARR, aucune des inoculations réalisées à cette époque n'a permis de montrer une transmission de la maladie.

## **2.4. Les 'limites' de la résistance génétique**

L'ensemble de ces résultats a conduit dès le milieu des années 1990 au concept de résistance génétique : les animaux homozygotes ARR étant considérés comme 'absolument' résistants et les animaux hétérozygotes ARR étant considérés comme marginalement sensibles aux EST.

Toutefois, même si le concept de résistance associée à l'allèle ARR repose sur un large socle d'observations, les années 2000 ont révélé que cette résistance ne pouvait en aucun cas être considérée comme absolue.

En effet, plusieurs cas de tremblante classique naturelle ont été identifiés en France et en Allemagne chez des animaux porteurs de ce génotype [112]. Ces cas font écho à celui rapporté dès 1994 par Ikeda, et considéré alors par la communauté scientifique comme douteux [138].

Dans le même temps, de nouvelles expérimentations ont permis de démontrer que l'ESB d'origine bovine pouvait se développer après inoculation intracérébrale chez des animaux homozygotes ARR/ARR. Dans ce cas, la maladie se développe avec des périodes d'incubations longues (environ 37 mois contre 19 mois chez les homozygotes ARQ) et le taux d'attaque demeure inférieur à 100%. Plus récemment, l'inoculation orale d'animaux homozygotes ARR avec de l'ESB adaptée à l'espèce ovine a permis de transmettre la maladie avec un taux d'attaque de 100% [5, 131].

L'ensemble de ces données indique clairement que même si l'allèle ARR semble conférer un niveau élevé de résistance en conditions naturelles d'exposition aux agents des EST responsables de la tremblante classique ou de l'ESB, il ne peut en aucun cas être considéré à l'échelle des individus comme conférant une résistance absolue à l'infection par ces agents.

## **3. Epidémiologie de la tremblante classique et de l'ESB**

### **3.1. Système de surveillance des EST ovines**

La détection des EST ovine est demeurée pendant de nombreuses années basée sur l'identification de cas cliniques suspects, confirmés ensuite par méthode de laboratoire (en

général, histologie sur le tronc cérébral). Ce système dit ‘passif’ de surveillance n’a permis que l’identification de quelques troupeaux atteints hormis dans des zones géographiques spécifiques où les EST se manifestaient sous forme épidémique. Compte tenu des périodes d’incubation longue et du caractère relativement peu spécifique des symptômes précoces de ces maladies (les éleveurs éliminant les animaux atteints avant qu’une suspicion ne soit posée), il est aujourd’hui considéré que le système de détection n’a qu’une sensibilité très limitée dans le contexte des EST animales.

Face à la crainte d’une éventuelle épidémie d’ESB chez les petits ruminants, un dispositif de surveillance ‘active’ des EST a été mis en place à l’échelle européenne dès 2002. Ce dispositif est basé sur la réalisation de tests de détection biochimique de la PrP anormale sur un échantillon de tronc cérébral (obex) d’un nombre prédéfini d’animaux prélevés de façon aléatoire en abattoir ou à l’équarrissage, et âgés de plus de 18 mois.

Bien que des différences de sensibilité analytique existent entre les tests utilisés, l’ensemble des tests validés pour le dépistage de la tremblante classique et de l’ESB sont considérés comme ayant des performances égales en termes de détection sur le terrain.

Un certain nombre de biais semble associé au système de surveillance actif. Ils concernent notamment le choix de l’échantillonnage et la conduite des prélèvements sur le terrain : sous ou sur-représentation de certaines zones géographiques sans prise en compte de la démographie, prélèvement réalisé de manière non aléatoire dans le temps, prise en compte de paramètres liés au troupeau ou au type de production lors du choix des animaux prélevés. Par ailleurs, il est à présent acquis que compte tenu de l’entrée tardive (cf infra) de l’agent pathogène dans le système nerveux central des animaux atteints, la valeur prédictive négative des tests rapides demeure imparfaite. Aucune étude ne permet à ce stade d’évaluer l’impact de ce paramètre sur la sensibilité de détection des cas ; la plupart des évaluations de risque menées dans le domaine considèrent qu’au mieux 50% des individus atteints testés sont identifiés par le système actuel d’épidémiologie-surveillance.

### **3.2. Prévalence de la tremblante classique dans la population générale et les troupeaux atteints**

Entre janvier 2007 et décembre 2009, 22 états membres de l'Union Européenne (Allemagne, Belgique, Bulgarie, Chypre, République Tchèque, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Grande-Bretagne, Hongrie, Irlande, Italie, Norvège, Pays-Bas, Pologne, Portugal, Roumanie, Slovaquie, Slovénie, Suède) ont rapporté des cas de tremblante classique chez des ovins. Un total 3920 cas pour 1 671 064 tests réalisés a ainsi été enregistré (0.23%, intervalle de confiance à 95% : 0.227 – 0.242). Parmi ces cas, 493 ont été détectés sur des animaux prélevés en abattoir (777 857 prélèvements réalisés soit 0.06%, intervalle de confiance à 95% : 0.058 – 0.069).

La prévalence apparente des cas de tremblante classique détectés en abattoir est extrêmement variable en fonction des pays considérés. Elle varie de 0.003% (4 / 153 490) au Portugal à 3.5% (12 / 343) en Slovénie. Ces données doivent toutefois être interprétées avec précaution dans la mesure où la structure génétique et démographique des populations de petits ruminants est susceptible de fortement varier en fonction des pays. Toutefois, à l'exception de la Slovénie et de Chypre, les prévalences détectées en Europe (tableau n°2) ont diminué entre 2002 et 2009, passant de 0.06% à 0.02 %.

Etat membre	Nombre de cas de tremblante classique	Nombre de tests rapides	Prévalence (%)	Intervalle de confiance à 95%
AUTRICHE	0	557	0.000	0.000 ; 0.660
BELGIQUE	0	6757	0.000	0.000 ; 0.055
BULGARIE	2	35255	0.006	0.001 ; 0.020
CHYPRE	108	13726	0.787	0.646 ; 0.949
REPUBLIQUE TCHEQUE	0	1632	0.000	0.000 ; 0.226
ESTONIE	0	2441	0.000	0.000 ; 0.151
FINLANDE	0	1944	0.000	0.000 ; 0.190
FRANCE	11	101918	0.011	0.005 ; 0.019
GRECE	3	18321	0.016	0.003 ; 0.048
HONGRIE	4	13706	0.029	0.008 ; 0.075
IRLANDE	10	46821	0.021	0.010 ; 0.039
ITALIE	29	107386	0.027	0.018 ; 0.039
LETTONIE	0	1413	0.000	0.000 ; 0.261
LITUANIE	0	7803	0.000	0.000 ; 0.047
LUXEMBOURG	0	722	0.000	0.000 ; 0.510
MALTE	0	56	0.000	0.000 ; 6.375
PAYS BAS	15	36929	0.041	0.023 ; 0.067
NORVEGE	0	26794	0.000	0.000 ; 0.014
POLOGNE	0	18032	0.000	0.000 ; 0.020
PORTUGAL	4	153490	0.003	0.001 ; 0.007
ROUMANIE	5	27247	0.018	0.006 ; 0.043
SLOVAQUIE	18	5040	0.357	0.212 ; 0.564
SLOVENIE	12	343	3.499	1.821 ; 6.031
ESPAGNE	0	19104	0.000	0.000 ; 0.019
SUEDE	0	7437	0.000	0.000 ; 0.050
GRANDE BRETAGNE	23	49838	0.046	0.029 ; 0.069

*Tableau n°2 : Prévalence apparente de la tremblante classique ovine à l'abattoir de 2007 à mars 2010.*

La prévalence de la maladie dans les troupeaux atteints a été étudiée dans différents pays Européens. Ces travaux indiquent que la propagation de la maladie dans les troupeaux est très variable. L'un des paramètres clés influant la prévalence de la maladie dans les troupeaux est représenté par la structure génétique (génotype PrP) des animaux du troupeau.

Dans un troupeau appartenant à l'INRA où l'allèle VRQ était fortement représenté, la fréquence des animaux atteints ou en incubation de la maladie a été rapportée comme pouvant atteindre 90% des porteurs de cet allèle [79]. Ces valeurs ont été obtenues dans un troupeau certes naturellement affecté mais dans un contexte où les animaux étaient soumis à une sélection génétique (reproduction des animaux porteurs de l'allèle VRQ) visant à favoriser le développement de la maladie.

Des études réalisées en Belgique [217], Allemagne [213], Islande [96, 233], Italie [244], Norvège [82], aux îles Shetland (UK) [140], aux Etats-Unis [52], ou encore aux Pays-Bas [162], dans des troupeaux naturellement atteints pour lesquels aucune politique de sélection sur le gène PRP n'avait été appliquée et où l'allèle ARQ représentait l'allèle dominant, semblent indiquer que la prévalence varie entre 3% [140] and 41% [171].

Les prévalences observées sont très supérieures à celle enregistrées dans la population générale, ce qui amène à considérer que les troupeaux atteints représentent des sources importantes d'agent infectieux à l'origine d'un sur-risque majeur d'exposition pour les consommateurs (produits alimentaires) et les populations animales.

### **3.3. ESB des petits ruminants : mythe et prévalence**

La crainte d'une épidémie d'ESB ovine consécutive à celle observée chez les bovins a été la principale motivation de la mise en place du programme d'épidémiologie-surveillance active chez les petits ruminants.

Dans le cadre de ce programme, les cas index identifiés dans chaque troupeau sont soumis à des tests biochimiques et/ou immunohistochimiques visant à discriminer, sur la base de la troncature N-terminale de la PrP<sup>Sc</sup> par des enzymes protéolytiques, les cas de tremblante classique de cas compatibles avec l'ESB (troncature N-terminale plus longue dans les cas d'ESB). [61, 162, 228, 229].

A ce jour, seul un cas d'ESB a été identifié puis confirmé chez un caprin Français [78], et deux cas hautement suspects, toujours chez des caprins, sont toujours en cours de confirmation (bio-essais sur souris RIII) au Royaume Uni. Aucun cas suspect n'a été rapporté chez les ovins.

Dès 2007, une analyse des résultats obtenus dans ce programme a été réalisée sous l'égide de l'EFSA (European Food Safety Authority - Opinion adopté le 25 janvier 2007) afin d'estimer quelle était la prévalence potentielle de l'ESB dans l'espèce ovine.

Cette étude a été réalisée en considérant que les tests discriminants avaient une sensibilité et une spécificité de 100% alors que les tests dits de criblage appliqués à la population générale afin d'identifier les cas d'EST avait une sensibilité variant de 70% à 100% (spécificité de 100%). En 2005-2006, dans les 25 états membres de l'union (ainsi que la Norvège), 397 cas d'EST ont été confirmés sur des ovins. Un total de 411 567 animaux abattus pour la consommation humaine a été testé. Seuls 125 de ces 397 cas ont été testés par les tests discriminants (cas index). Selon les paramètres utilisés (sensibilité des tests), le modèle statistique utilisé (loi hypergéométrique avec distribution binomiale des cas) prévoit sur la période étudiée:

- un nombre de cas inférieur à 4 au Royaume-Uni ( $p < 0.05$ ), pays le plus à risque en matière d'ESB,
- une prévalence variant de 0.3 à 0.5 animaux positifs pour 10 000 animaux abattus dans la population combinée du Royaume-Uni, de la France, de l'Irlande et du Portugal (pays ayant eu les plus fortes prévalences d'ESB bovine),

Table 1: Post-mortem TSE surveillance in 2005 and 2006.

Member state	TSE positives in slaughtered for human consumption			Estimated number tested with discriminatory test	BSE positives in tested TSE positives slaughtered for human consumption: discriminatory test results	Prevalence**		
	2005	2006	Combined [rate per 10,000]			Mean	Mode	Upper 95 <sup>th</sup> percentile
UK	30/11,816	7/7,774	37/19,590 [18.9]	29	0	0.70	0	2.20
UK+Ireland+Portugal+France	75/86,036	110/158,072	185/244,108 [7.6]	83	0	0.10	0	0.29
EU15* minus the above four	62/57,591	32/69,229	94/126,820 [7.4]	31	0	0.27	0	0.80
EU15*	137/143,627	142/227,301	279/370,928 [7.5]	114	0	0.08	0	0.23
Norway, EU25 minus EU15	109/22,366	9/18,273	118/40,639 [29.0]	11	0	2.32	0	6.67

\* Counted as EU15 = Austria, Belgium, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Luxembourg, Netherlands, Portugal, Spain, Sweden, UK.

\*\* Mean (per 10,000)  
Most likely (mode)  
Upper 95<sup>th</sup> percentile (per 10,000)

**Table 2: Prevalence estimates (in cases per 10,000) for different sensitivities of the TSE screening test**

	Sensitivity					
	90%		70%		50%	
	mean	P95	mean	P95	mean	P95
High Risk I (UK)	0.70	2.20	0.89	2.66	1.26	3.77
High Risk II (UK, Ireland, Portugal, France)	0.10	0.29	0.13	0.38	0.17	0.50

*Tableau n°3 : Estimation de la prévalence potentielle de l'ESB dans l'espèce ovine selon les pays (données du tableau supérieur) et selon différentes sensibilités considérées pour les tests de dépistage (données du tableau inférieur).*

Depuis 2007, 1 671 064 tests de criblage supplémentaires ont été réalisés chez des ovins et 4612 cas positifs ont été identifiés. Parmi ces cas, aucun cas d'ESB n'a été à ce jour identifié. Ces données suggèrent qu'aucun cas d'ESB ovine n'est à craindre dans la population ovine. Toutefois, une telle conclusion se doit d'être nuancée. En effet, l'ensemble de l'évaluation repose sur l'application aux cas d'EST détectés d'une méthodologie censée permettre de discriminer les cas causés soit par un agent responsable de la tremblante classique, soit par l'agent de l'ESB.

Outre la sensibilité limitée du dispositif de criblage, estimée comme inférieure à 50%, la capacité des tests dits discriminants à identifier des animaux porteurs ou atteints d'ESB demeure incertaine. En effet, le développement de ces tests a été réalisé à partir d'un nombre limité de cas d'ESB expérimentaux [228, 229]. Si les propriétés biochimiques de la PrPSc associée à l'agent de l'ESB dans ces conditions de transmission demeurent stables, il demeure impossible d'affirmer que la sensibilité et la spécificité de ces tests est de 100%.

L'étude des isolats de terrains conduite sur les modèles de souris conventionnelles par le NPU [40, 41, 43] a notamment permis de démontrer qu'une large part des isolats contiennent en réalité plusieurs agents distincts (souches). Dans l'hypothèse où l'ESB serait une composante de l'un de ces mélanges de souche circulant dans la population ovine, la capacité des tests discriminants à l'identifier reste à déterminer.

Toutefois, au-delà de ces considérations, en considérant l'ampleur de l'épidémie d'ESB chez les bovins (en Europe et au Royaume-Uni en particulier) liée selon toute probabilité au recyclage de carcasses contaminées en farine de viande et d'os, l'absence d'augmentation apparente du nombre de cas d'EST détectée chez les petits ruminants ne plaide pas pour un

développement significatif de cet agent chez les ovins. Il n'en demeure pas moins que la présence et la circulation de l'agent responsable de l'ESB chez les ovins ne peut être exclue.

## **4. Pathogénèse et transmission de la tremblante classique et de l'ESB**

### **4.1. Schéma général de dissémination de l'agent infectieux dans l'organisme**

Lors de tremblante naturelle, il semble établi que la voie majeure de contamination est digestive [121 ][3].

#### ***4.1.1. Contamination initiale***

Après exposition à l'agent, une accumulation de PrPSc est rapidement détectable dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif, les plaques de Peyer [121 ] [2, 3]. Dans ces structures, les cellules épithéliales membranaires, appelées cellules M ('microfold') sont des sites clefs du micro-échantillonnage antigénique à partir de la lumière digestive [158]. Les cellules M sont connues comme porte d'entrée de nombreuses bactéries telles que *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* ou encore *Vibrio cholerae*. Des travaux menés *in vitro* indiquent que la présence de cellules M différenciées au sein d'un épithélium serait suffisante à un transport trans-épithélial du prion [20, 122]. Ces cellules internalisent donc des particules endo-luminales par micro-pinocytose, puis les transfèrent aux cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques (DC), véritables cellules nomades largement présentes dans l'organisme [13] expriment la PrPc à un niveau élevé [47]. Elles transportent donc les antigènes aux centres germinatifs folliculaires où ils sont présentés aux lymphocytes B.

#### ***4.1.2. Cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et dissémination vers les centres germinatifs***

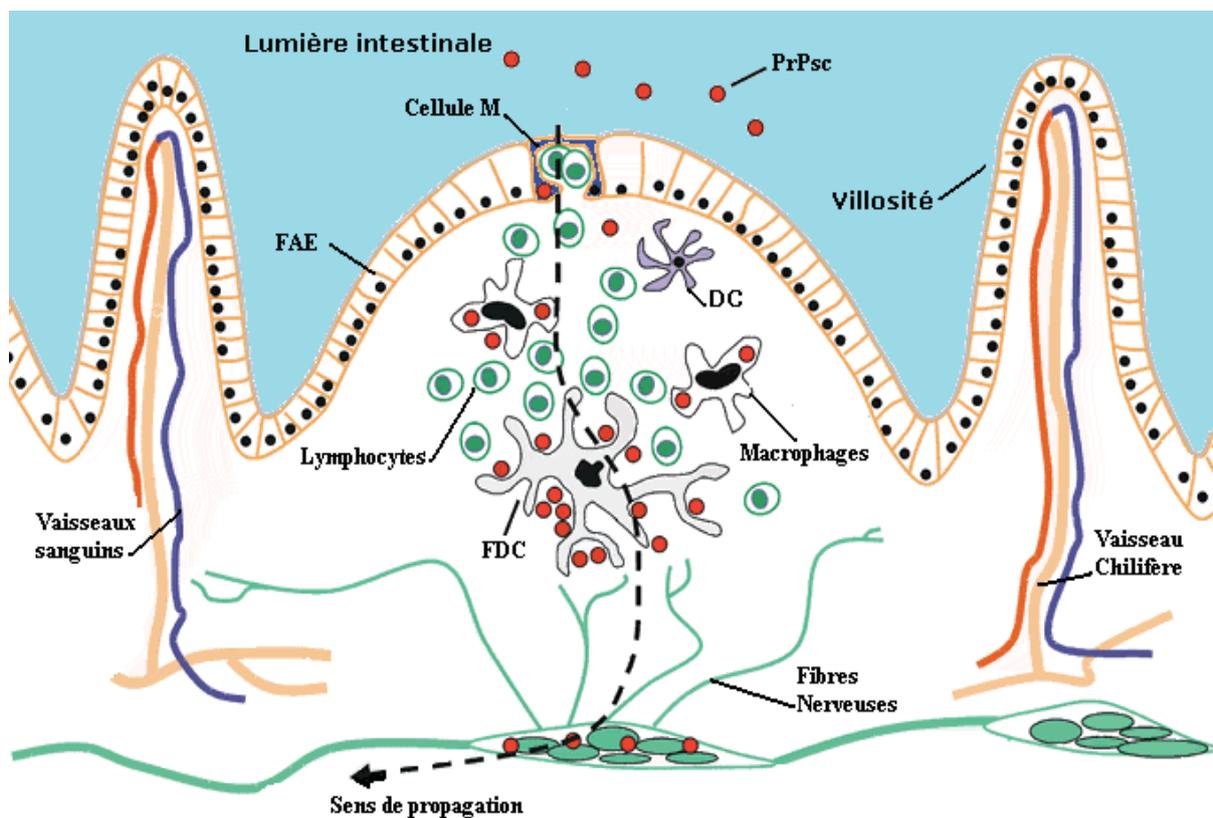
Chez les ovins, des cellules de phénotype CD68+, situées dans les micro-poches adjacentes aux cellules M, sont capables d'accumuler très précocement de la PrPSc [2, 3]. Dans l'espèce ovine, l'antigène CD68 est exprimé à la fois par les macrophages et les cellules dendritiques.

Ces deux types cellulaires sont spécialisés dans l'échantillonnage du microenvironnement, la dégradation et la présentation d'antigènes.

Différentes expérimentations, *in vitro* et *ex vivo*, ont mis en évidence le rôle potentiel des phagocytes mononucléés résidents dans la capture et le transport de la PrP<sup>Sc</sup> vers les centres germinatifs locaux et les autres lymphocentres [9, 132].

Une déplétion, même transitoire et partielle, de ces populations cellulaires semble augmenter sensiblement l'efficacité de la contamination lors d'inoculation orale chez la souris [29]. Par ailleurs, le titre infectieux d'un homogénat de cerveau diminue au contact de macrophages péritonéaux de souris [53].

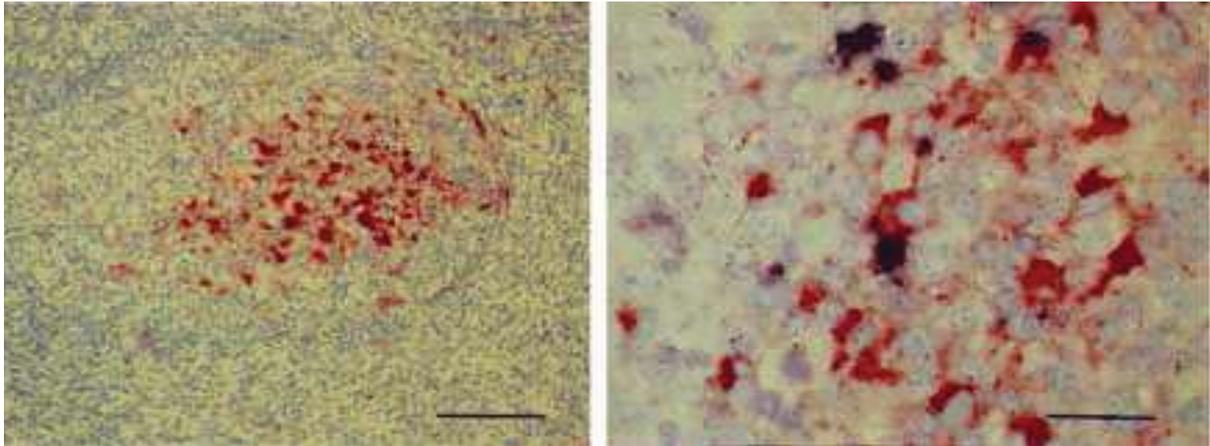
L'ensemble de ces données suggère une dualité des CPA vis à vis du prion, pouvant être à la fois vecteurs de la dissémination de l'agent et capables de le dégrader *in vivo*.



*Figure n°4 : Représentation schématique du trajet du prion à travers la barrière intestinale jusqu'au SNP et de la localisation des différents acteurs cellulaires. [176]  
(Légende : FAE : Entérocytes associés aux follicules ; FDC : Cellule dendritique folliculaire)*

#### ***4.1.3. Le rôle central des cellules dendritiques folliculaires (FDC).***

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



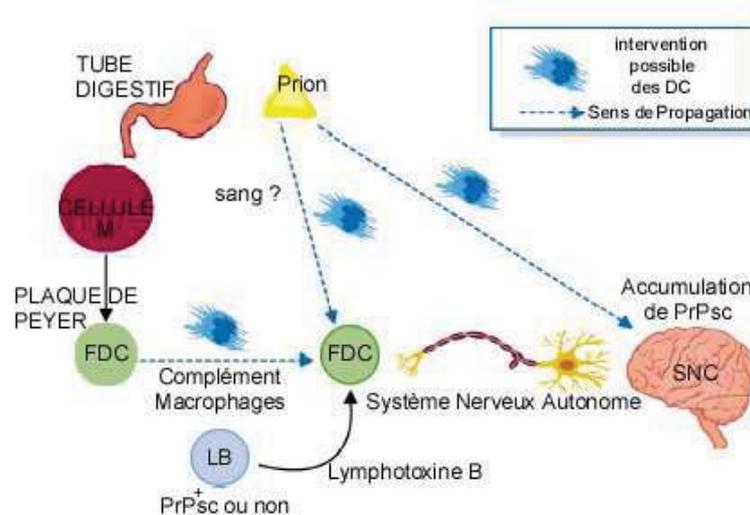
*Figure n°5 : Identification des cellules folliculaires dendritiques dans le centre germinatif d'un nœud lymphatique par utilisation d'un anticorps de souris (échelle 25µm, photo de gauche) et double marquage de la PrPSc (dépôts sombres) dans des FDC d'un nœud lymphatique mésentérique (échelle 5µm, photo de droite).*

L'origine des FDC demeure incertaine [81, 146, 234]. Les FDC ne subissent pas de mitose, sont résistantes aux rayonnements  $\gamma$  et leur longévité est élevée. Elles sont spécialisées dans la capture et la rétention d'antigènes à leur surface, sous la forme de complexes immuns antigène/anticorps, et/ou du facteur C3 du complément. Les FDC expriment fortement la PrPc, et des quantités importantes de PrPSc semblent s'accumuler dans cette population cellulaire très tôt au cours de la phase de contamination du système immunitaire [37, 183].

L'importance des FDC dans la pathogenèse des infections à Prion a été démontrée par différentes expérimentations. Sur des souris RAG-1, dépourvues de FDC matures, inoculées par voie périphérique, aucune infectiosité et aucune accumulation de PrPSc n'a été détectée dans la rate. Par ailleurs, ces souris s'avèrent moins sensibles à la maladie (mortalité faible) lors d'inoculation par voie périphérique, alors que leur mortalité est équivalente à celle observée chez les souris de phénotype sauvage lorsqu'elles sont infectées par voie-intracérébrale [37, 177].

Sur le plan cellulaire, il semble que le système du complément intervienne dans la localisation et la rétention du prion à la surface des FDC dans les premiers jours suivant l'infection.

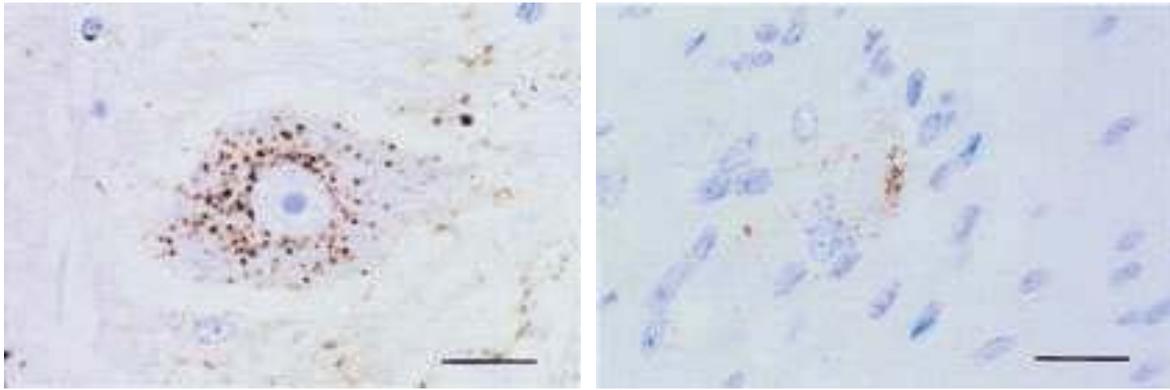
D'ailleurs, chez les souris, un déficit permanent [152] ou temporaire [176] de la fraction C3 du complément diminue l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans la rate et prolonge de façon significative la période d'incubation après inoculation de la tremblante par voie périphérique. Certains résultats semblent mettre en doute, au moins partiellement, le statut de partenaire obligatoire des FDC matures. En effet, des souris transgéniques, sans FDC matures ni centres germinatifs, inoculées par voie intra-péritonéale avec une souche de tremblante, peuvent développer la maladie avec des titres élevés en Prion dans les nœuds lymphatiques [207]. Au total, le rôle des FDC pourrait varier selon les souches et/ou la dose contaminante initiale. D'autres cellules pourraient alors entrer en jeu (figure n°6) [178].



*Figure n°6 : Quelques aspects cellulaires et moléculaires de la propagation du prion. D'après [1].*

#### **4.1.4. Atteinte du Système Nerveux Autonome (SNA) digestif**

La motilité digestive est assurée par la musculature lisse de la paroi du tube digestif. Ces muscles sont sous le contrôle d'un réseau dense de fibres nerveuses interconnectées et contrôlées par des neurones disséminés dans la paroi du tube digestif. Ces neurones sont organisés en plexus, eux-mêmes contrôlés par des centres de régulation neuronaux situés dans le SNC : les centres nerveux sympathiques et parasympathiques.



*Figure n°7 : Détection immunohistochimique des dépôts de PrPSc dans différents tissus : système nerveux central (photo de gauche) et neurones d'un plexus myentérique d'un ovin VRQ/VRQ de 10 mois (photo de droite) (échelle 5µm).*

Les organes lymphoïdes sont largement innervés par des fibres de type sympathique [88], et l'hypothèse d'une contamination de ces fibres au contact des organes lymphoïdes infectés a été très tôt proposée [149]. En outre, le réseau du SNA digestif comporte de très nombreuses fibres nerveuses amyéliniques dont certaines innervent la zone superficielle des follicules lymphoïdes [151]. Dans cette zone, les FDC sont donc très proches des terminaisons axonales [105]. L'hypothèse est donc celle d'une contamination directe des fibres nerveuses à partir des FDC.

Cette hypothèse est soutenue par la présence précoce chez les ovins atteints de tremblante [3, 119] de PrPSc dans les neurones des plexus myentériques, situés immédiatement à proximité des plaques de Peyer (figure n°7).

La contamination du SNA ne semble pas s'opérer par un seul site mais bien par l'ensemble des sites d'interface du tissu lymphoïde annexé au tube digestif et du SNA [3]. Par ailleurs, la présence de PrPSc dans les neurones du SNA des différents segments du tube digestif (de l'œsophage au rectum), dans les phases tardives d'incubation de la maladie suggère une redistribution rapide de l'agent entre les différents groupes de neurones digestifs [240].

#### ***4.1.5. Dissémination au Système Nerveux Central (SNC)***

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

- les fibres nerveuses sympathiques (nerfs splanchniques) qui innervent les organes digestifs et leurs formations lymphoïdes (figure n°8), comme le suggère l'atteinte précoce de la colonne intermedio-latérale dans la moelle épinière [3, 120, 241],

- les fibres parasympathiques et notamment celles du nerf vague, comme en témoigne la présence précoce de PrPSc dans le noyau dorsal du nerf vague [218] [12, 19, 21].

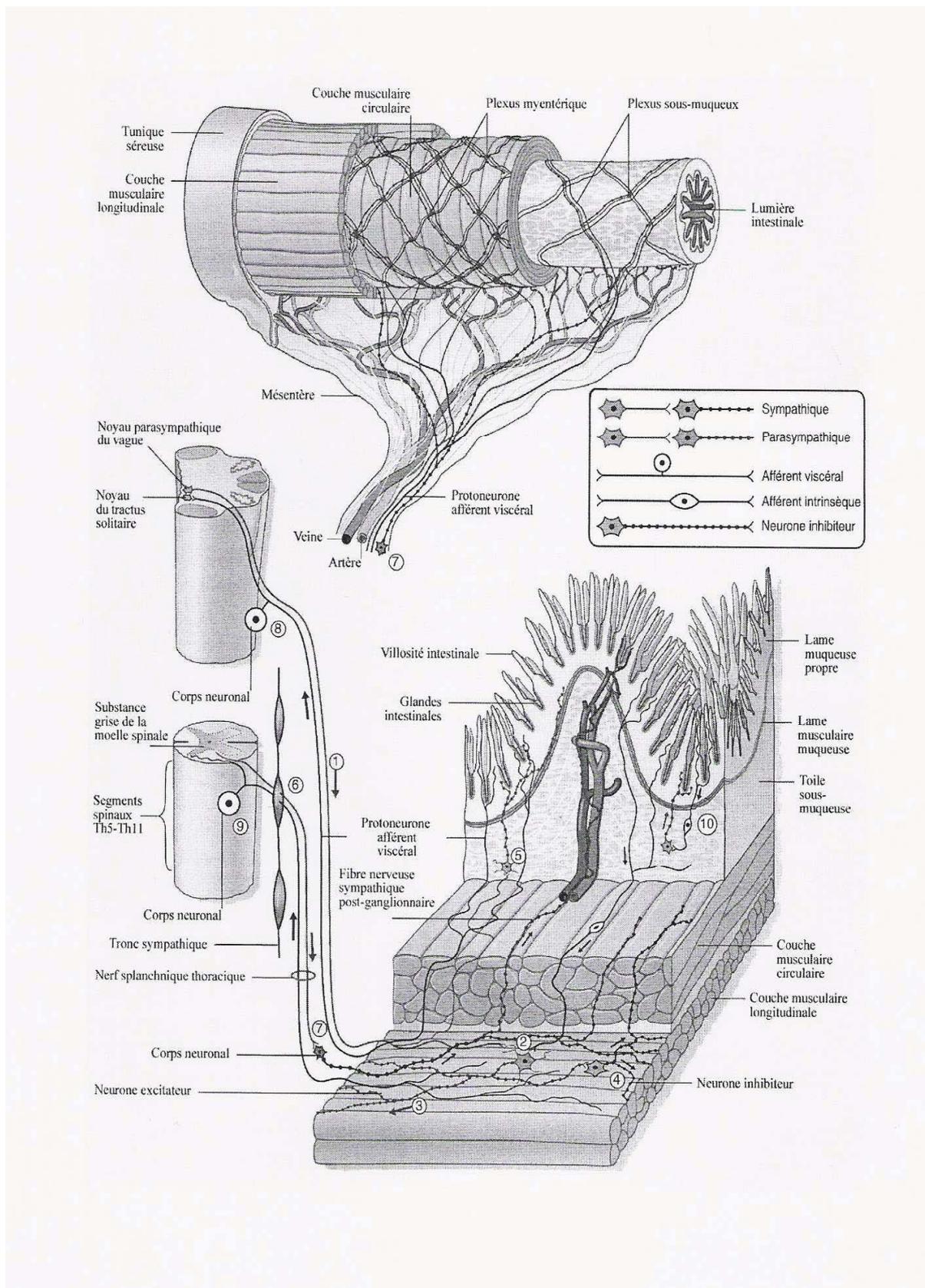


Figure n°8 : Organisation anatomo-fonctionnelle schématique du système nerveux entérique (SNE) chez l'homme.

#### ***4.1.6. Dissémination centrifuge***

Après avoir atteint le SNC, la protéine prion semble pouvoir disséminer par voie nerveuse dans l'organisme de manière centrifuge. Ainsi de la PrPSc a été détectée dans les muscles des rongeurs, souris et hamster, ainsi que chez des patients atteints de Creutzfeldt-Jakob sporadique [35, 232]. Sa présence a également été rapportée chez le mouton en incubation de tremblante, plusieurs mois avant l'apparition des signes cliniques. Toutefois, les quantités de PrPSc détectables dans ce tissu demeurent 5000 fois inférieures à celles détectées dans l'encéphale ou les nœuds lymphatiques d'ovins en phase clinique. Dans ce modèle, l'accumulation de PrPSc semble confinée aux fuseaux neuro-musculaires [6]. Ces observations sont d'une importance majeure sur le plan sanitaire, même si dans les conditions d'exposition naturelle, la tremblante ne semble pas transmissible à l'homme. La présence de PrPSc reste à établir dans le muscle de bovins atteints d'ESB.

### **4.2. Dynamique de dissémination dans l'organisme**

#### ***4.2.1. Tremblante classique***

En matière de tremblante classique, l'essentiel des données disponibles provient d'études menées sur des cohortes d'animaux de génotype très sensibles (VRQ/VRQ) issues de deux troupeaux (l'un français, l'autre néerlandais) naturellement atteints sous une forte incidence. Les résultats de ces différentes études sont comparables et concordent pour l'essentiel avec les données issues d'autres troupeaux différents ou menées sur des animaux de génotype différents.

Il ressort de ces travaux que :

- de la PrP anormale est détectable dans les formations lymphoïdes secondaires annexées à l'iléon dès l'âge de 21 jours [4].
- la PrPSc dissémine et s'accumule dans les formations lymphoïdes de l'intestin et les nœuds lymphatiques mésentériques au cours des 2 premiers mois de la vie [3, 4, 241]
- chez les animaux de plus de 2 mois, on observe une dissémination de la PrPSc dans toutes les structures lymphoïdes secondaires de l'organisme, [3, 4, 241].

- l'accumulation de PrPSc dans les organes lymphoïdes secondaires se poursuit avec l'âge, pour atteindre un plateau au delà de 6 mois [3]
- le système nerveux central (encéphale et moelle épinière) deviennent positifs (PrPSc et infectiosité) entre 7 et 10 mois [3, 142, 243].
- la présence de PrPSc dans le muscle squelettique est décelable dès l'âge de 13 mois [6].
- la présence d'infectiosité dans le lait est décelable dès la première lactation [159].
- la présence d'infectiosité dans le sang a également été rapportée ; cette prionémie apparemment précoce persiste tout au long de l'existence des animaux [133].

#### **4.2.2. ESB ovine**

Les données relatives à la distribution de l'agent responsable de l'ESB dans les tissus des ovins demeurent assez limitées. L'essentiel des résultats disponibles concerne les ovins de génotype ARQ/ARQ, considérés comme très sensibles à l'ESB, inoculés par voie orale (5g d'encéphale de bovin atteint d'ESB) [22, 23, 91, 143, 242].

Chez ces animaux, la présence de PrPSc, et/ou d'infectiosité a été observée :

- dans l'ensemble des formations lymphoïdes annexées à l'intestin (GALT), la rate et les ganglions mésentériques dès l'âge de 4 mois,
- dans les autres formations lymphoïdes secondaires des animaux âgés de plus de 4 mois et de moins de 10 mois,
- dans le système nerveux central des animaux âgés de plus de 10 mois.

Comme en tremblante classique, de l'infectiosité a pu être mise en évidence par bio-essais à partir d'échantillons de muscle squelettique, de lait et de sang, sans que les niveaux d'infectiosité ou la cinétique d'apparition de l'infectiosité dans ces tissus puissent à ce stade être clairement précisées.

### **4.3. Impact des interactions génotype / souche sur la cinétique de dissémination**

Les données générées dans les modèles oraux d'inoculation par l'ESB ou d'infection naturelle par la tremblante classique fournissent un modèle cohérent de la dissémination des agents des EST dans l'organisme des ovins de génotype sensible.

Toutefois, la cinétique de dissémination dans l'agent dans l'organisme est clairement dépendante à la fois du type d'agent des EST considéré et du génotype de l'hôte.

Par exemple dans une étude récente, la cinétique de dissémination de la PrP anormale dans les tissus de deux groupes d'animaux (l'un VRQ/VRQ et l'autre ARQ/VRQ) exposés à la même pression naturelle infectieuse ont été étudiées. Il ressort de cette expérience que la simple présence d'un allèle ARQ, ralentit sensiblement la dissémination de la PrP dans l'organisme et aboutit à un allongement de près de 8 mois (32 mois chez les ARQ/VRQ contre 24 mois chez les VRQ/VRQ) de la durée d'incubation [159].

A l'inverse lorsque des animaux VRQ/VRQ et ARQ/ARQ sont inoculés par voie orale avec de l'ESB d'origine bovine, la dissémination dans l'organisme de la PrP anormale semble plus lente et la durée d'incubation sensiblement plus longue chez les animaux VRQ/VRQ que chez les animaux ARQ/ARQ [22, 23, 91, 143, 242].

### **4.4. Un schéma alterne de dissémination dans l'organisme ?**

Lors de la contamination, la réplication et l'accumulation précoce de la PrP<sup>Sc</sup> dans les tissus lymphoïdes secondaire est une caractéristique assez marquante du schéma de dissémination des agents des EST dans l'organisme des ovins de génotypes sensibles.

En conditions naturelles d'exposition, les cas de tremblante sont rares chez les animaux hétérozygotes ARR [80, 137]. Toutefois, chez ces animaux plusieurs auteurs rapportent l'absence d'accumulation (détectable) de PrP anormale dans les tissus lymphoïdes [2, 239], ce qui suggère le caractère facultatif de la lympho-invasion dans le schéma de dissémination de l'agent dans l'organisme. De la même façon, plusieurs cas de tremblante clinique ont été rapportés chez des animaux de génotype ARQ/ARQ et ARQ/VRQ chez lesquels aucun dépôt de PrP anormale n'a été mis en évidence dans les tissus lymphoïdes. D'une manière intéressante chez des animaux des mêmes génotypes issus des mêmes troupeaux, une accumulation de PrP dans les tissus lymphoïdes a pu être mise en évidence [140] [171].

Ces observations suggèrent qu'une accumulation proéminente de PrP anormale dans les tissus lymphoïdes des animaux atteints n'est pas requise pour obtenir une dissémination efficace de l'agent de la tremblante classique dans l'organisme des individus atteints.

## **5. Transmission de la tremblante classique et de l'ESB**

Le caractère contagieux de la tremblante classique est depuis longtemps établi [204, 205]. Dans les troupeaux atteints de tremblante classique, jusqu'à 40% des individus peuvent être affectés [171]. L'existence d'une transmission inter-individuelle de l'ESB a également été établie. Toutefois, l'efficacité d'une telle transmission et sa capacité à permettre à l'agent de l'ESB de se maintenir à moyen et long terme dans la population ovine demeure inconnue [22].

Il est communément admis, qu'en conditions naturelles d'exposition, la contamination se produit principalement durant la période périnatale [4, 72, 159, 212, 236]. Toutefois, la contamination d'animaux de génotype sensible issus de troupeaux sains après leur introduction à l'âge adulte dans des troupeaux affectés a été rapportée. La contamination d'animaux adultes semble toutefois d'une faible efficacité [129, 130] [72].

La nature exacte des modes de transmission et de leur efficacité relative reste débattue [72]. En particulier, l'existence d'une contamination verticale (*in utero*) reste discutée [90], même s'il est admis que cette voie ne représente sans doute pas le principal mode de transmission entre la mère et l'agneau.

En effet, le rôle du placenta et des annexes placentaires dans la contamination périnatale et la contamination environnementale est aujourd'hui largement documenté [4, 236]. Plus récemment, la présence de prion dans le colostrum et le lait des brebis en incubation et leur efficacité à transmettre la maladie à des agneaux de génotype sensible ont été établis [157, 159].

Parallèlement à ces contaminations inter-individuelles, l'existence d'une contamination d'origine environnementale a longtemps été soupçonnée. Ce mode de contamination a été avancé comme explication à la contamination d'animaux sains réintroduits sur des fermes après abatage total de troupeaux infectés dans un nombre substantiel de cas [97]. Ce n'est toutefois que récemment que l'existence d'une contamination par les pâtures sur lesquelles des animaux infectés avaient séjourné a été démontrée [73] et que la forte rémanence des

prions dans certains types de sols a été découverte [38, 59, 63, 95, 144, 145, 172, 175, 211, 214, 216, 221, 250]

## **6. Contrôle et éradication de la tremblante classique et de l'ESB**

### **6.1. L'échec des mesures sanitaires classiques**

Les programmes de lutte contre la tremblante sont restés fondés pendant près de 50 ans sur une politique d'abattage total ou partiel des cheptels reconnus comme atteints [72]. A l'exception de l'Australie et de la Nouvelle Zélande qui semblent avoir pu enrayer le développement de la maladie suite à l'importation d'animaux en incubation de la maladie grâce à une politique de quarantaine drastique, les autres exemples de tentative d'éradication de la maladie par ce type d'approche sont des échecs patents.

Aux USA, les campagnes d'éradication menées à partir de 1952 n'ont pas permis de maîtriser la maladie qui a continué à diffuser dans le cheptel national [71]. L'Islande demeure sans doute l'exemple le plus frappant des difficultés, sinon de l'impossibilité, d'assurer le contrôle et l'éradication de la tremblante ovine par les approches traditionnelles prophylactiques. L'approche Islandaise développée à partir de 1947, repose sur la division du pays en zones saines/atteintes, l'abattage total des troupeaux atteints avec destruction du matériel d'élevage, élimination de la terre autour des locaux d'élevage, et l'interdiction de reprendre l'élevage pendant au moins trois ans. Les animaux utilisés pour le repeuplement proviennent évidemment de secteurs indemnes. Malgré ces mesures drastiques le taux de récurrence de la maladie sur les fermes atteintes dépasse les 15% [97].

En France, la tremblante ovine est devenue une maladie à déclaration obligatoire en 1996. A partir de cette période, les troupeaux atteints ont été soumis à des mesures d'assainissement reposant principalement sur l'élimination des cohortes d'animaux où un cas clinique avait été identifié. Compte tenu des durées d'incubation de la maladie et du caractère contagieux des animaux en phase préclinique, cette approche peut être considérée comme peu rationnelle et s'est avérée totalement inefficace.

Face à l'inefficacité des méthodes traditionnelles prophylactiques et face au risque que faisait planer la possible survenue d'une épidémie d'ESB sur la filière ovine, l'utilisation d'une approche génétique pour assurer (i) le contrôle et l'éradication des EST dans les troupeaux

affectés et (ii) prévenir l'extension des EST dans la population ovine générale a été proposée. Trois pays Européens ont dès 2000-2001 mis en place des mesures de sélection génétique dans les cheptels ovins : le Royaume Uni, Les Pays Bas et la France. Ces mesures ont été développées et appliquées dans un contexte d'urgence (seconde crise de l'ESB), alors que les données relatives à la résistance de l'allèle ARR face aux différentes formes d'EST demeuraient partielles.

En France, le programme national génétique officiel a été officiellement lancé en 2002 (Arrêté du 30 août 2002 fixant les mesures techniques et financières relatives au programme national d'amélioration génétique pour la résistance à la tremblante. J O. Numéro 212 du 11 Sept 2002 page 15051).

Ce programme s'adresse à deux populations distinctes :

- (i) les troupeaux reconnus comme atteints d'EST (hors ESB),
- (ii) la population ovine générale (considérée par race).

Le but de cette double politique et d'assurer :

- (i) la maîtrise et le contrôle des EST dans la population ovine,
- (ii) de garantir à moyen terme une réduction de l'exposition des populations animales et des consommateurs aux agents des EST ovines.

En 2003, des mesures similaires ont été promulguées à l'échelle Européenne (règlement 99/2001) faisant des EST ovines la première maladie pour laquelle un plan de lutte génétique était officiellement appliqué à l'échelle de l'union Européenne.

## **6.2. Eradication de la tremblante par l'outil génétique dans les troupeaux atteints**

Lorsqu'un diagnostic d'EST est confirmé dans un troupeau ovin, l'éleveur se voit proposer deux possibilités (i) l'abattage total ou (ii) la mise en œuvre de mesures de sélection génétique. Notons que le texte réglementaire prévoit, en cas d'ESB, des mesures d'abattage total.

Les principales mesures prises lors de l'assainissement génétique des troupeaux atteints sont :

- (i) le génotypage de l'ensemble des animaux aux codons 136-154-171
- (ii) la destruction dans les deux mois de tous les porteurs d'un allèle VRQ
- (iii) la destruction dans une période maximale de deux ans de tous les animaux du troupeau non porteurs d'un allèle ARR

- (iv) l'utilisation exclusive de mâles ou de semence issue de béliers ARR/ARR
- (v) l'interdiction de livrer à la consommation des animaux non porteurs d'un allèle ARR
- (vi) l'interdiction de vendre ou d'échanger des animaux avec d'autres élevages durant la période d'assainissement.

Lorsque l'ensemble des animaux du troupeau sont porteurs d'au moins un allèle ARR, les mesures de restrictions sont levées. Dans les troupeaux atteints, cette politique d'assainissement basée sur la sélection de l'allèle ARR s'est avérée très efficace. Il semble toutefois qu'afin d'éviter une réapparition de la maladie, la sélection sur l'allèle ARR (utilisation de mâles ARR) doive se poursuivre au-delà de la simple période d'assainissement [67].

### **6.3. Politique de sélection appliquée à la population ovine générale**

#### ***6.3.1. Organisations en charge et mise en œuvre de la sélection génétique animale***

L'organisation de l'amélioration génétique en France est régie par la loi d'orientation agricole de 2006, qui a succédé à la loi sur l'Élevage de 1966. Les plans de sélection sont mis en œuvre par des organismes et entreprises de sélection (OS, ES) qui rassemblent de manière coopérative des éleveurs sélectionneurs. Les OS ont en charge des missions réglementées telles que la définition des objectifs de sélection et des caractéristiques raciales, ainsi que la tenue des livres généalogiques, ou l'orientation de l'organisation du plan de sélection. Il existe donc autant de plans de sélection que de races ovines.

La sélection fait appel à plusieurs « outils » :

- l'insémination artificielle qui est opérée essentiellement par les centres de collecte et les centres de mise en place (9 en ovins) ; elle est réglementée et concerne uniquement des reproducteurs agréés,
- les laboratoires qui réalisent les contrôles de filiation et certains génotypages, tels que celui du gène PRNP,

- l'identification du cheptel, obligatoire pour tous les ovins et caprins du territoire, qui est régie par des textes réglementaires européens et français. La maîtrise d'œuvre est confiée aux EDE,
- la certification des parentés et le contrôle des performances en ferme, réalisés par 7 organismes agréés avec des exclusivités géographiques temporaires. Ils portent sur 300 000 brebis laitières (parmi 1.6 millions) et 300 000 brebis allaitantes (parmi 4.3 millions). Plusieurs protocoles sont proposés (production laitière complète ou simplifiée, reproduction, élevage, croissance),
- les centres d'élevage de jeunes mâles, qui permettent la gestion collective des béliers des élevages sélectionneurs,
- les stations de contrôle de performances individuelles ou sur descendance, qui assurent une homogénéisation des conditions de mesures, complètent le dispositif en ferme pour les aptitudes bouchères,
- les Systèmes nationaux d'information génétique (SNIG) collectent, conservent, traitent, mettent à jour et distribuent les informations nécessaires aux acteurs de la sélection (notamment OS, CIA, laboratoires d'analyses). Ils reposent sur l'articulation entre les organismes de contrôles de performance, les Centres régionaux de traitement de l'information et le Centre national de traitement de l'information (CTG implanté à l'INRA) qui travaille en étroite collaboration avec l'Institut de l'Élevage.

Les principes de base des schémas de sélection sont :

- l'identification, parmi la jeune génération, de futurs reproducteurs conformes aux standards raciaux, fertiles et issus des meilleurs reproducteurs de la race ;
- leur mise à l'épreuve en ferme ou dans des stations de contrôle sur des caractères d'intérêt zootechnique décidés par l'organisme de sélection ;
- l'évaluation de leur valeur génétique, sous le contrôle de l'INRA, à l'aide de modèles statistiques scientifiquement reconnus par la communauté scientifique internationale et d'applications logicielles exécutées au CTIG ;
- la classification des candidats sur la base de ces informations objectives ;
- la mise à la reproduction, avec des plans d'accouplements spécifiés, des candidats retenus.

### **6.3.2. Objectifs du PNAGRT**

Le Plan National d'Amélioration Génétique et de Résistance à la Tremblante (PNAGRT) vise quatre objectifs opérationnels :

- (i) éliminer l'allèle de sensibilité (VRQ),
- (ii) fournir des animaux ou de la semence d'animaux résistants aux élevages atteints par la tremblante,
- (iii) augmenter la fréquence de l'allèle de résistance (ARR) tout en maintenant variabilité et niveau génétique,
- (iv) fournir des béliers ou de la semence de béliers résistants (ARR/ARR) aux élevages de production.

Le plan a été au départ programmé pour la période 2002-2006. Il a été prolongé de 2007 à 2009. Il a été reconduit pour trois ans en octobre 2009. Il fait l'objet chaque année d'un rapport évaluant les progrès réalisés pour chaque race.

Le PNAGRT s'appuie sur deux éléments clés :

- (1) le tri des animaux est fait sur la base de leur génotype au locus PrP identifié dans un laboratoire de référence (LABOGENA) ou un des laboratoires agréés par la DGAI ;
- (2) les organismes de sélection (anciennement Unités de promotion des races) qui, pour chaque race, regroupent les éleveurs sélectionneurs adhérents des systèmes collectifs de contrôle des parentés et des performances. L'ensemble des données (PrP, Pedigree, performances) de ces « bases de sélection » est géré au sein de la base de données nationale du Centre de Traitement de l'Information Génétique.

### **6.3.3. Effet du PNAGRT dans les élevages de sélection**

Dans les élevages sélectionneurs (ceux fournissant les jeunes béliers placés ensuite en centre de testage), le plan de sélection a rapidement entraîné une diminution spectaculaire de la fréquence de l'allèle de sensibilité (figures n°9 et n°10). Toutefois, l'allèle VRQ, même s'il ne représente plus que quelques pourcents des effectifs totaux, n'est pas totalement éliminé des bases de sélection.

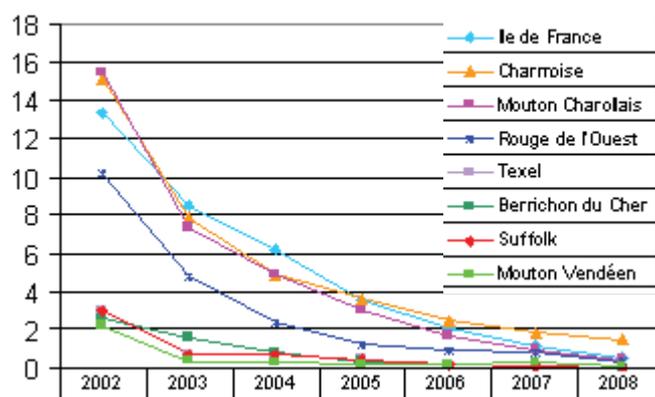


Figure n°9 : Evolution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les races bouchères

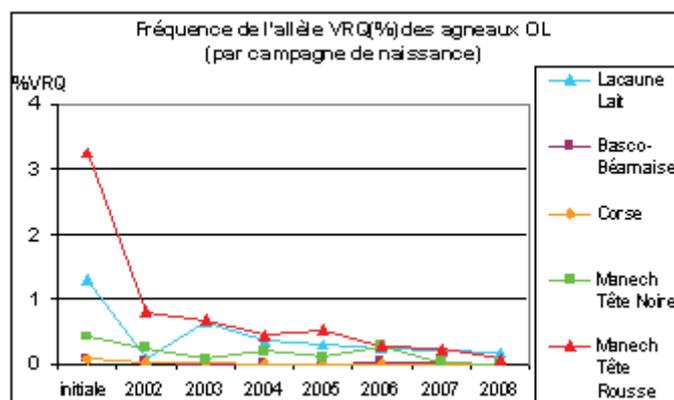


Figure n°10 : Evolution de la fréquence de l'allèle VRQ chez les races laitières

Dans le même temps, la fréquence de l'allèle ARR a spectaculairement augmenté dans les noyaux de sélection des différentes races ovines (figures n°11, n°12 et n°13). Il dépasse aujourd'hui, dans toutes ces races dont l'effectif est significatif, les 50% et, dans certaines races, il approche les 100% (Ile de France – Lacaune rameau lait). Les différences de fréquence de cet allèle observées aujourd'hui entre les différentes races s'expliquent par la combinaison de trois paramètres cruciaux :

- la fréquence de l'allèle ARR dans la population initiale,
- le souci de préserver la diversité génétique sur les loci autres que le gène PRNP,
- les effectifs (parfois très réduits) des animaux constituant le noyau de sélection dans certaines races.

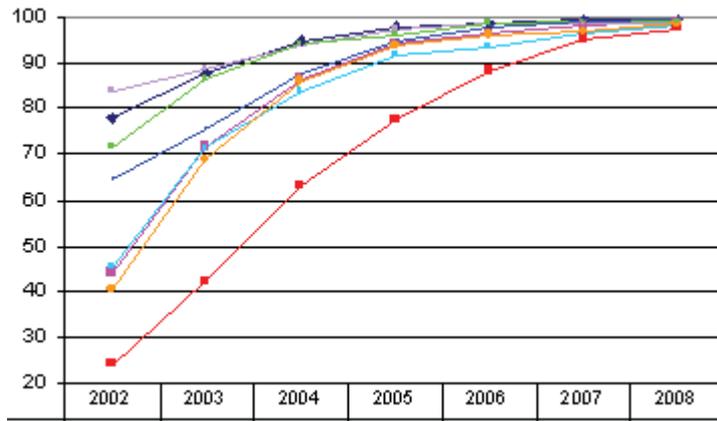


Figure n°11 : Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races bouchères

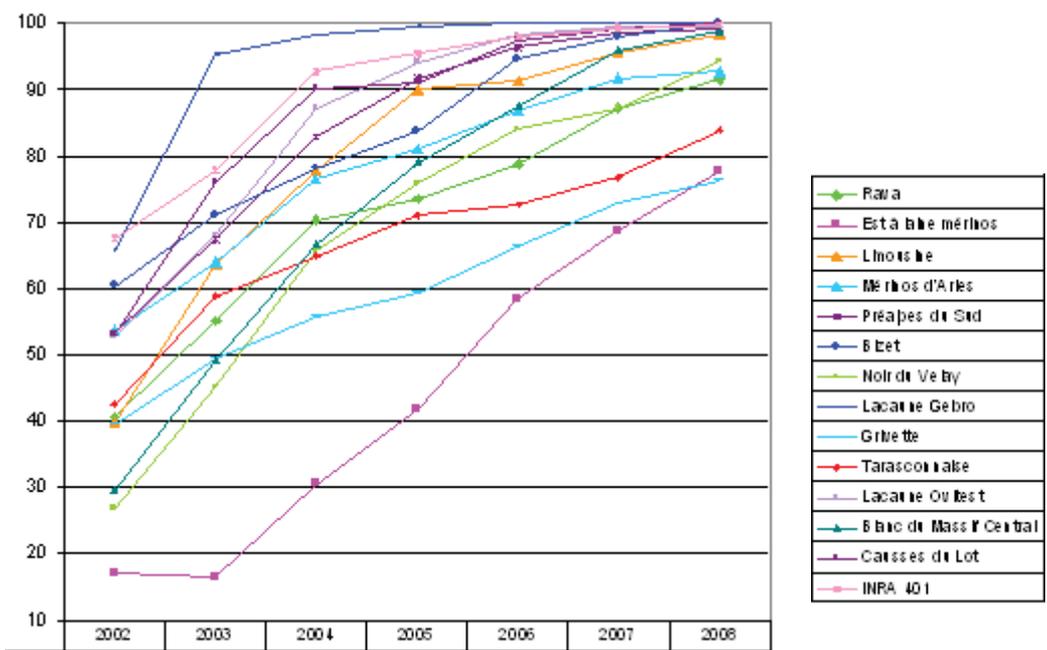
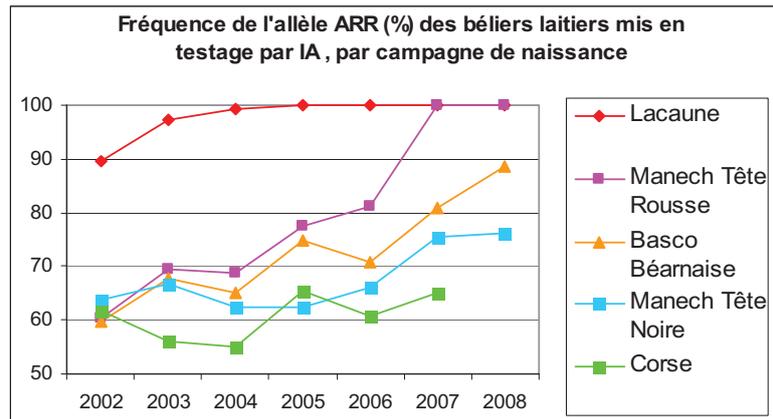


Figure n°12 : Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races allaitantes



*Figure n°13 : Evolution de la fréquence de l'allèle ARR chez les races laitières*

#### **6.3.4. Effet du PNAGRT dans les élevages commerciaux**

Il est difficile aujourd'hui d'estimer les effets réels que la politique de sélection appliquée ont eu sur les troupeaux dits de 'production' dans les différentes races. En effet, la politique choisie consiste à augmenter la fréquence de l'allèle d'intérêt (ARR) tout en éliminant l'allèle VRQ dans les élevages générant les mâles élites (améliorateurs de performances- 5% à 10% de la population) qui seront ensuite soit directement (insémination artificielle) soit via leur descendance utilisés dans les élevages commerciaux.

On estime à l'heure actuelle que le progrès génétique généré dans les noyaux de sélection des races diffuse progressivement sur une période de 5 à 10 ans dans la population générale.

Dans ces conditions, on ne peut pas considérer que les effets du PNAGRT se soient encore manifestés dans la population ovine générale.

Au Royaume-Uni, une politique similaire dans ses objectifs à la politique Française a été mise en place [67]. Le 'National Scrapie Plan' s'appuie comme en France sur la voie mâle (sélection puis diffusion des béliers ARR) [66, 68]. Il a été mis en place dès 2001 et depuis 2006 une évaluation de la fréquence de l'allèle ARR est menée chaque année chez les béliers des différentes races ovines Anglaises. Chez ces béliers, une augmentation significative l'allèle ARR a été enregistrée, tout comme une diminution de la fréquence de l'allèle VRQ [77, 248].

Toutefois, compte tenu de l'organisation de la sélection génétique ovine au Royaume-Uni et du faible recours qui est fait à l'insémination artificielle, il est difficile d'estimer l'impact que

ce plan, jugé très couteux par la filière, a eu sur la structure génétique PRP de la population ovine générale.

#### **6.4. Effet à long terme de la politique de sélection**

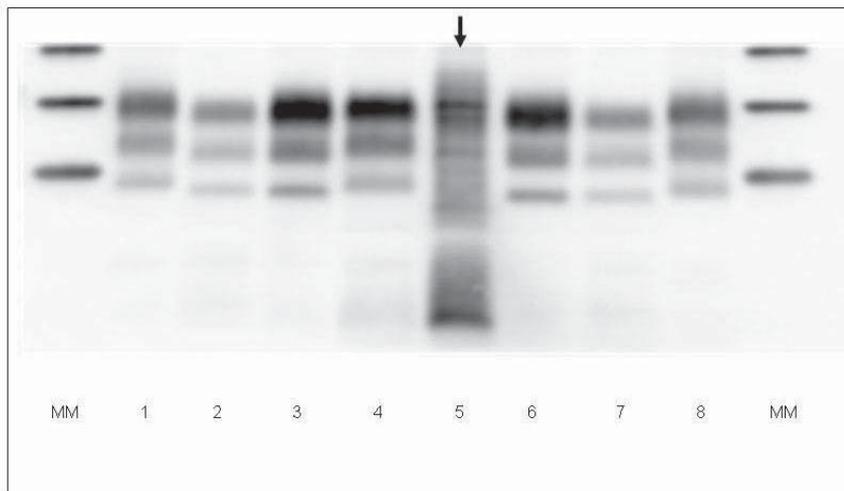
Lors du développement et de la mise en place de la politique de sélection de l'allèle ARR, différents auteurs se sont intéressés aux possibles effets indésirables qui pourraient être associés à cette sélection. Des études portant sur des populations significatives ont été menées afin de déterminer si certains traits de production liés à la santé des animaux pouvaient être affectés par cette sélection. Il ressort de ces études qu'aucun effet délétère direct ne semble lié à cette sélection [230].

Toutefois au-delà de ces aspects, il paraît légitime de s'interroger sur les conséquences potentielles de la politique de sélection actuellement mise en œuvre dans le PNAGRT. En effet, si ce plan se poursuit selon les modalités actuelles, il va conduire à la fixation (100% d'animaux homozygotes) de l'allèle ARR dans les noyaux de sélection des différentes races (certaines races comme l'Ile de France étant déjà presque parvenues à ce stade). Un tel phénomène aura bien entendu l'avantage de rendre la diffusion de l'allèle ARR vers les populations des troupeaux de production efficace sans qu'il ne soit plus nécessaire d'intervenir (maintien des génotypes). Toutefois, si d'aventure un problème lié à l'allèle ARR devait dans l'avenir émerger (apparition ou développement d'une souche d'EST à laquelle les animaux de ce génotype seraient sensibles), l'absence d'une diversité génétique sur les allèles du gène PRNP dans les populations de sélectionneurs pourrait s'avérer un problème difficile à résoudre [67].

**TROISIEME PARTIE : LA TREMBLANTE  
ATYPIQUE : UNE MALADIE EMERGENTE ?**

## 1. Identification de la tremblante atypique

Sur un plan biochimique, la PrP<sup>Sc</sup> des isolats de tremblante classique apparaissent après migration en conditions dénaturantes et Western Blot (WB) sous la forme de trois bandes (une bande biglycosylée, une bande monoglycosylée et une bande non glycosylée). Le poids moléculaire de la bande non glycosylée varie généralement en 21KDa et 19KDa (figure n°14).



*Figure n°14 : Western Blot mettant en évidence plusieurs souches de tremblante classique (pistes 1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8) et une souche de tremblante atypique (piste 5). Anticorps Sha-31, révélation ECL (MM : marqueur de poids moléculaire).*

Toutefois à côté de ces isolats dits classiques de tremblante, des cas dits atypiques ont été identifiés en 1998 en Norvège [26, 194].

Après traitement à la protéinase K d'un homogénat de tissu cérébral, le Western Blot révèle un pattern multi-bandes (figure n°14), avec notamment des bandes de faible poids moléculaire aux alentours de 11-12 kDa [7].

Par ailleurs, la résistance à la dégradation par la protéinase K de la PrP anormale apparaît dans les cas atypiques extrêmement limitée par comparaison aux cas de tremblante classique [48].

Ces propriétés biochimiques 'atypiques' de la PrP ont, pendant plusieurs années, amené certains experts à douter du fait que les individus ayant une telle signature biochimique étaient affectés par une EST. La présence de PrP partiellement résistante à la PK étant alors considérée comme un simple artéfact biochimique. L'identification d'animaux présentant des symptômes neurologiques (ainsi que des lésions neuro-dégénératives) d'évolution subaiguë

associés à la présence de cette signature PrP anormale dans le système nerveux central a rapidement discrédité l'hypothèse d'un simple artéfact biochimique [26, 194].

## **2. La tremblante atypique : une authentique EST**

La preuve que la signature biochimique PrP atypique observée était associée à un authentique agent des EST a été apportée par la transmission de la maladie à différents modèles animaux.

Alors que la maladie ne semble pas transmissible aux souris conventionnelles (C57Bl6, RIII et VM) ou au campagnol [44], l'inoculation d'un homogénat de cerveaux issus de cas biochimiquement positifs à des souris transgéniques exprimant l'allèle VRQ de la protéine PrP ovine [246] permet la propagation d'une maladie neurodégénérative avec des durées d'incubation de l'ordre de 200 à 230 jours [168].

L'examen microscopique en histologie conventionnelle de l'encéphale de ces animaux a permis d'observer des lésions de vacuolisation typiques des EST alors que les techniques de visualisation de la PrPSc sur coupes d'encéphale (Histoblot et Pet Blot) révèlent la présence de dépôts de protéine pathologique. Enfin le profil WB de la PrPSc obtenu à partir du cerveau des souris atteintes est identique à celui des isolats utilisés comme inoculums.

Plus récemment, la preuve de la transmissibilité de la tremblante atypique a été apportée par inoculation intracérébrale à des ovins [226, 227].

### **2.1. Un agent infectieux unique ?**

Les premières études conduites sur des isolats de terrain classés comme atypiques ont suggéré, sur la base de la diversité des profils WB observés, l'existence d'une potentielle diversité biologique des prions impliqués dans la tremblante atypique [48]. Bien que cette hypothèse ait été reprise par différents auteurs ayant mené des études en biochimie analytique sur un nombre limité de cas [109, 153], l'existence d'une diversité biologique au sein des isolats de tremblante atypique semble peu probable.

La caractérisation biochimique, par 'mapping épitopique' de la PrP anormale (utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes différents de la PrP) d'un large panel d'isolats Français et Norvégiens a permis de démontrer que la signature WB associée à ce type d'agent était constituée de 7 bandes apparentes contenant elles-mêmes différents fragments de PrP. Ces fragments correspondent à des clivages consécutifs à l'action combinée du catabolisme protéique endogène et du traitement par la protéinase K (utilisé pour éliminer la PrPc).

Certains des fragments PrP sont représentés faiblement alors que d'autres, notamment ceux constitutifs des bandes 27kDa et 11-12kDa, sont généralement plus abondants. La combinaison de la sensibilité relative du WB (effet seuil de la détection) et de la capacité restreinte de certains anticorps à reconnaître certains des fragments PrP (motifs épitopiques) explique l'apparente diversité des profils WB observés sans que cette diversité puisse être associée à une quelconque diversité biologique des prions présents dans ces isolats [7].

Dans une étude portant sur la transmission de 11 isolats Français et Norvégiens (collectés sur une période de 5 ans) de tremblante atypique à des souris transgéniques pour le gène PrP ovin, Ledur *et al.* a identifié un phénotype unique (profils lésionnels – durée d'incubation et profil WB de la PrP anormale) [168]. Plus récemment, l'étude de 24 isolats Anglais de tremblante atypique dans le même modèle expérimental a abouti aux mêmes résultats [111].

Malgré ces résultats, il demeure impossible en l'état actuel des connaissances de rejeter formellement l'existence d'une possible diversité biologique de Prions associés à une signature biochimique de type tremblante atypique.

## **2.2. Une maladie de répartition mondiale**

La tremblante atypique a été détectée pour la première fois en Norvège en 1998 et a tout d'abord été considérée comme un problème local. Toutefois, dans la crainte d'une éventuelle épidémie d'ESB chez les petits ruminants, un dispositif de surveillance active des EST a été mis en place à l'échelle européenne dès 2002. Ce dispositif est basé sur la réalisation de tests de détection biochimique de la PrP anormale sur un échantillon de tronc cérébral (obex) d'un nombre prédéfini d'animaux, prélevés de façon aléatoire en abattoir ou à l'équarrissage. Il a rapidement permis d'identifier des cas de tremblante atypique dans le cheptel des différents états membres de l'UE. La mise en place de dispositifs similaires de surveillance dans certains pays comme les Etats-Unis, le Canada, le Japon ou les îles Falklands, a permis d'identifier des cas dans des pays où aucune suspicion de tremblante atypique n'avait été jusqu'alors avancée [48] [94, 200, 201].

Plus récemment, deux cas de tremblante atypique ont été rapportés dans des pays jusqu'alors considérés par l'OIE comme indemnes de toute forme d'EST : l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Le cas néo-zélandais a été identifié sur un échantillon issu d'un ovin né, élevé et abattu en Nouvelle-Zélande dont l'encéphale avait été prélevé afin de servir de contrôle négatif (dans un panel de 1000 échantillons) pour la validation des performances des lots de

tests rapides par les autorités sanitaires Européennes. Le cas australien, très récemment confirmé, fait suite à une suspicion clinique posée sur le territoire australien.

Ces deux cas de tremblante atypique suggèrent fortement que cette forme d'EST est présente dans tous les pays détenant une population significative de petits ruminants. Au-delà de ces aspects la découverte de cas d'EST dans des pays jusqu'alors considérés comme indemnes de tremblante renverse définitivement le 'mythe' du statut « indemne d'EST » délivré par l'OIE, qui jusque là servait d'argument commercial à ces pays gros exportateurs d'ovins et de produits dérivés des ovins.

### **2.3. Prévalence de la tremblante atypique**

Sur la base des données communiquées par les états membres à la Commission Européenne, dix-huit pays européens ont à ce jour enregistré des cas de tremblante atypique ovine.

Il apparaît toutefois que la détection des cas de tremblante atypique est éminemment dépendante du type de test de criblage rapide utilisé pour la détection. En effet, certains des tests actuellement utilisés n'ont qu'une très faible sensibilité pour détecter les cas atypiques, ce qui induit des biais évidents dans la détection de ces cas sur le terrain [87]. Depuis 2007, dans les 27 états membres, seuls 12 cas atypiques ont été détectés pour 393 014 tests réalisés avec des tests (Prionics® et Enfer®) connus pour avoir une sensibilité limitée vis-à-vis de la tremblante atypique. Dans le même temps, 680 cas sur 1.030.545 animaux prélevés étaient rapportés chez les animaux testés par les tests les plus sensibles vis à vis de la tremblante atypique (BioRad®, IDEXX®) (Chi-square, p-value <0.0001).

A ce jour, la prévalence de la tremblante atypique est estimée en Europe entre 0.5 et 1 animal positif pour 1 000 animaux testés. Les données actuellement disponibles semblent par ailleurs indiquer qu'il n'y a pas de différence significative de prévalence entre les différents pays Européens [87].

Certains biais relatifs à ces estimations sont à considérer. Tout d'abord, le système d'épidémiologie-surveillance appliqué actuellement présente de nombreux biais en termes d'échantillonnage de population (âge, sur ou sous-représentation de certaines zones géographiques, etc...).

Ensuite et de manière plus spécifique, l'âge moyen des animaux détectés comme positifs en tremblante atypique en 2004 et 2006 était de 76 mois et plus de 50% des cas détectés avaient un âge compris entre 49 et 98 mois [25]. Compte tenu des structures démographiques en élevage ovin (taux de réforme), la part de la population atteignant un tel âge est faible. En l'absence de données fiables sur la structure démographique des populations ovines, il demeure toutefois impossible d'évaluer l'impact de ce biais sur les estimations de prévalence [87].

Malgré la probable sous-estimation de la prévalence réelle des cas atypiques, l'étude rétrospective des données disponibles depuis 2002 semble indiquer l'absence de différence significative de la prévalence sur la période 2002-2007 [70, 184].

#### **2.4. Une maladie émergente?**

La découverte de la tremblante atypique et de son incidence relative dans la population de petits ruminants a suscité de très nombreuses questions. En effet, au fur et à mesure que le dispositif d'épidémiologie-surveillance active était déployé en Europe, la prévalence apparente de cette forme d'EST est passée de zéro à 6 animaux pour 10 000 testés. Devant ce phénomène, la crainte d'assister à l'émergence d'une nouvelle épidémie d'EST s'est installée. Aujourd'hui, il est établi que la fréquence relative des cas de tremblante atypique détectés dans la population est demeurée stable en Europe entre 2002 et 2007 [87, 184]. Ces données apportent une première indication sur le fait que nous ne sommes probablement pas en train d'assister au développement d'une épidémie mais que l'accroissement apparent de la fréquence des cas atypiques détectés résulte d'une identification plus performante de ces cas par le système de surveillance.

Il n'en demeure pas moins que la poursuite d'un programme d'épidémiologie-surveillance d'ampleur suffisante est le seul outil susceptible de révéler de manière précoce, par la mise en évidence des variations de prévalence, une modification de la dynamique de cette forme d'EST (passage d'un mode sporadique à un mode épizootique).

L'existence de cas de tremblante atypique dans les populations de petits ruminants antérieure à la mise en place des mesures de surveillance spécifiques des EST chez les petits ruminants est longtemps demeurée une question en suspens. L'examen rétrospectif de banques de tissus a permis de mettre en évidence des cas de tremblante atypique, jusqu'alors non diagnostiqués,

remontant aux années 1980 [44]. Cette observation, même si elle demeure isolée et ne permet de proposer aucune estimation de la prévalence passée des cas de tremblante atypique, permet d'indiquer que la tremblante atypique est sans doute présente depuis très longtemps chez les petits ruminants. En conséquence, il est très probable que les populations humaines et animales aient été exposées, par voie alimentaire notamment, à cet agent des EST.

### **3. La tremblante atypique : désordre spontané ou maladie contagieuse ?**

#### **3.1. Age relatif des cas de tremblante classique et atypique**

En matière de tremblante classique, l'âge des cas cliniques décrits est très variable. Toutefois chez les animaux de génotype sensible VRQ/VRQ, ARQ/VRQ ou ARQ/ARQ naturellement exposés à la maladie, les cas cliniques décrits surviennent généralement chez des animaux âgés de 24 à 40 mois [79, 114, 162, 171, 191].

Comme décrit plus haut, les cas de tremblante atypique détectés principalement par les tests rapides concernent des animaux généralement âgés. L'étude rétrospective de 84 cas conduite dans 9 pays a permis notamment d'établir que l'âge moyen des cas détectés était de 6.5 ans et que le cas le plus jeune concernait un animal de 3.5 ans [25]. Une étude similaire conduite en Allemagne et incluant 60 cas a révélé que 60% de cas étaient âgés de plus de 5 ans et que 25% d'entre eux avaient plus de 10 ans [50].

#### **3.2. Facteurs de risque associés à la tremblante atypique**

Différentes études épidémiologiques visant à identifier des facteurs de risque potentiels associés au développement de la tremblante atypique ont été menées.

La première de ces études a été réalisée en Norvège dans 28 troupeaux atteints de tremblante atypique. Ce travail rétrospectif n'a pas permis de mettre en évidence une relation entre le développement de la tremblante atypique et les facteurs de risque traditionnellement retrouvés dans les cas de troupeaux atteints de tremblante classique dans ce pays (contact entre troupeaux et échange d'animaux) [127]. Cette même étude a par ailleurs révélé l'absence de lien significatif entre les cas de tremblante atypique, pourtant situés dans une même région géographique [126].

Une étude similaire a été menée en France à partir de 95 troupeaux atteints et 220 témoins géographiquement appariés. Les facteurs de risques analysés incluaient notamment l'existence de contacts entre les animaux du troupeau déclarant et d'autres animaux, les pratiques d'agnelage (récolte des placentas) et d'alimentation (utilisation de concentrés ou de lait reconstitué) et l'exposition à des toxiques. Dans cette étude, il est apparu que les élevages laitiers semblaient avoir un risque supérieur d'être atteints de tremblante atypique (odds ratio 15.1, 95% intervalle de confiance à 95% : 3.3-69.7) par rapport aux élevages allaitants. Un risque moindre semblait par ailleurs associé aux élevages ayant obtenu le label Agriculture Biologique (OR 0.15, intervalle de confiance à 95% : 0.02-1.26), ou distribuant des compléments alimentaires vitaminés et minéraux (OR 0.6, intervalle de confiance à 95% : 0.32-1.14). Aucun des facteurs de risque traditionnellement associés à la transmission de la tremblante classique (contact entre troupeaux, échange d'animaux, récolte des placentas à l'agnelage) n'est ressorti comme facteur de risque au développement de cas de tremblante atypique [86].

### **3.3. Pathogenèse de la tremblante atypique**

Les connaissances en matière de pathogenèse et de distribution de l'agent infectieux dans les tissus des animaux atteints demeurent insuffisantes pour proposer un schéma pathogénique de la tremblante atypique chez son hôte naturel.

Des inoculations expérimentales avec des isolats naturels de tremblante atypique ont été réalisées chez des ovins AHQ/AHQ, mais uniquement par voie intracérébrale [226, 227]. Bien que le phénotype observé de la maladie soit similaire à celui observé chez des animaux naturellement atteints [155, 156], il est impossible en l'état actuel des connaissances d'affirmer que cette voie d'inoculation est pertinente pour l'étude de la maladie.

Par conséquent et dans l'attente de résultats issus d'autres transmissions expérimentales (inoculation orale notamment), les éléments dont nous disposons sont ceux issus de cas naturels, soit cliniques, soit identifiés par le réseau actif d'épidémiologie-surveillance (cas précliniques), pour lesquels peu d'échantillons biologiques ont malheureusement été collectés en dehors du système nerveux central.

D'une manière frappante, aucun dépôt de PrP anormale n'a été mis en évidence dans les tissus lymphoïdes disponibles [26, 51] [196, 245]. Par ailleurs, alors que le tronc cérébral et en particulier la région de l'obex constitue un site privilégié d'accumulation de la PrP anormale dans le système nerveux central des animaux atteints d'ESB ou de tremblante classique (en

particulier le noyau dorsal du nerf vague) [251], dans les cas de tremblante atypique le tronc cérébral postérieur ne montre que des dépôts marginaux de PrPSc qui, lorsqu'ils sont présents, épargnent apparemment le noyau dorsal du nerf vague [190]. Dans les cas de tremblante atypique, une certaine diversité interindividuelle de la distribution des lésions vacuolaires peut être observée [196]. Toutefois, l'essentiel des lésions et des dépôts de PrP anormale sont retrouvés dans les couches grises du cortex cérébral et dans le cortex cérébelleux [190]. Ces deux régions sont généralement peu lésées [251] et n'accumulent que peu d'agent infectieux [114] dans les cas de tremblante classique ou d'ESB [141, 143].

Ces données pourraient suggérer que la neuro-invasion dans les cas de tremblante atypique pourrait s'effectuer par des voies ou selon des modalités différentes que celles établies pour la tremblante classique et l'ESB.

### **3.4. Prévalence dans les troupeaux atteints**

Seul un nombre limité d'études prospectives a pu être mené à la faveur d'un abattage total ou partiel dans des troupeaux où un cas de tremblante atypique avait été identifié. D'une façon extrêmement frappante, le nombre de cas secondaires détectés dans ces troupeaux est nul ou très faible. [86, 87]. Dans une étude rétrospective menée sur un élevage expérimental au Royaume Uni (animaux importés de Nouvelle-Zélande), deux cas ont pu être identifiés sur une période couvrant 5 années et un effectif de 650 animaux étudiés [225].

En Allemagne, des cas secondaires ont été détectés dans 7 troupeaux atteints de tremblante atypique ; toutefois, deux de ces troupeaux étaient constitués de plus de 500 animaux et les 5 autres de plus de 1500 animaux, ce qui suggère une très faible prévalence de ces cas secondaires [173]. Le seul cas de troupeau de taille réduite (<200 animaux) où plusieurs cas de tremblante atypique ont été identifiés est celui d'un troupeau Irlandais [200].

Récemment, une étude visant à comparer la prévalence de la tremblante atypique dans (i) les troupeaux où un cas index avait déjà été identifié et dans (ii) la population générale a été menée en France [85]. Les données utilisées provenaient du programme National Français d'épidémio-surveillance. Sur la base de ces analyses, les auteurs sont parvenus à la conclusion que la prévalence apparente de la tremblante atypique dans les troupeaux atteints ne semblait pas différente de celle observée dans la population générale. A partir de ces éléments ainsi que des observations précédemment évoquées, l'hypothèse selon laquelle la tremblante atypique pourrait être une maladie non contagieuse ou très faiblement contagieuse et d'origine spontanée s'est développée [25, 85].

### 3.5. Le concept de trouble spontané : une explication plausible ?

Cinq à 10 % des maladies humaines à Prions sont liées à des mutations du gène PRNP codant pour la protéine prion [164]. Ces maladies héréditaires peuvent revêtir différentes formes (manifestations cliniques et lésionnelles) et concernent quelques dizaines de familles dans le monde. Historiquement, la première à avoir été identifiée est le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) [98, 99]. Ce syndrome est une maladie autosomale dominante, associée à des lésions d'EST, dont il fut établi au début des années 90 qu'elle était liée à des mutations en position 102 ou 117 du gène PRNP.

Au total, 24 formes d'altérations différentes du gène ont pu être corrélées à la survenue d'EST cliniques chez l'homme, notamment aux codons 102, 117, 178, 200, 203, 210 et 211 du gène PRNP. Ces altérations peuvent être soit des mutations ponctuelles (résultant d'une substitution d'un acide aminé), ou insertionnelles (addition d'un octapeptide) [181]. L'insomnie fatale familiale (IFF) est un variant clinique particulier des EST humaines. La maladie semble liée à une mutation du résidu acide aspartique en asparagine au codon 178 [185], et d'une méthionine au codon 129 (génotype Met 129 Asn 178) [115]. La mutation en 178, lorsqu'elle est associée à une valine en 129, ne produit pas le phénotype IFF (génotype Val 129 Asn 178) [206].

La plus fréquente de ces maladies chez l'homme demeure la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) : environ 1 cas par an pour 1 million d'individus [182]. Les MCJ sporadiques représentent 90% des cas d'EST humaines et surviennent chez des individus généralement âgés de plus de 50 à 60 ans. Un polymorphisme majeur au codon 129 (Met, M ou Val, V) semble influencer sur la sensibilité à la maladie. La moitié de la population caucasienne (51 %) est hétérozygote (M/V) au codon 129, alors que les homozygotes V/V et M/M représentent respectivement 12 et 37% de cette population. Les cas les plus fréquents apparaissent chez des individus homozygotes M/M (71 % des cas) au codon 129 [202]. L'origine de ces cas demeure inexplicée et à ce jour aucun facteur de risque géographique ou lié aux habitudes de vie n'a été clairement identifié [57, 182, 238].

Le développement d'EST (avec une forte pénétrance) chez des individus porteurs de mutations du gène PRNP a rapidement amené à considérer l'hypothèse d'une origine spontanée de ces pathologies. Dans cette hypothèse, les mutations favoriseraient une trans-

conformation spontanée de la PrPc en PrPSc, selon une dynamique ne permettant pas au système catabolique protéique (chaperonne et protéasome) d'éliminer de manière efficace les espèces mal conformées. A terme, ces protéines mal conformées joueraient un rôle de nucléateur, entraînant une conversion auto-catalytique de protéines de conformation normale en protéines anormales. Cette hypothèse, très séduisante, permet de concilier le caractère héréditaire de ces formes d'EST et le concept Prion.

Devant l'absence apparente de facteurs de risque associés aux formes dites sporadiques de MCJ, à la faible fréquence de ces cas et à l'âge relativement avancé des patients au moment du diagnostic, il a également été avancé qu'une explication plausible à la survenue de ces maladies pourrait également être celle d'un processus 'spontané' consécutif à l'incapacité des systèmes du catabolisme protéique à dégrader des formes mal conformées de PrP.

Bien que très élégante, cette l'hypothèse d'une origine spontanée, sans intervention d'un agent infectieux externe, survenant de manière aléatoire et favorisée par des mutations du gène PRNP est longtemps demeurée du domaine de la pure spéculation.

En effet, l'insertion de la mutation humaine P102L dans le gène PRNP de souris, si elle entraîne l'accumulation d'une forme légèrement PK résistante de PrP, ne permet pas de générer un agent transmissible [16, 17].

Ce n'est que récemment que quelques données expérimentales soutenant l'hypothèse d'une apparition 'spontanée' d'un agent authentique des EST (transmissible) ont été obtenues, soit chez des souris Tga20 qui sur-expriment 10 fois les niveaux physiologiques de PrP [224] ou dans un modèle de mutation ponctuelle FFI (sur le gène murin de la PrP) [139]. Ces données restent toutefois très fragiles et demandent à être confirmées avant de pouvoir considérer que l'apparition spontanée de prion est possible chez un hôte naturel.

### **3.6. Des arguments d'une extrême fragilité**

L'hypothèse selon laquelle la tremblante atypique pourrait être une maladie non contagieuse ou très faiblement contagieuse et d'origine spontanée [25, 85] repose principalement sur trois éléments :

- l'âge relativement avancé des cas identifiés,

- la nature des tissus accumulant de l'agent infectieux (accumulation dans l'encéphale avec absence apparente d'accumulation dans les tissus périphériques)
- le caractère apparemment non contagieux de la maladie.

La prévalence relativement élevée de la tremblante atypique (1 individu pour 10 000 testés) est un premier élément qui amène à s'interroger sur la réalité d'un phénomène spontané, surtout lorsqu'on considère que ce phénomène n'est pas restreint à certains génotypes PrP particuliers.

Par ailleurs, chacun des arguments avancés pour soutenir l'hypothèse d'une origine spontanée de la maladie demeurent fragiles.

L'âge des animaux atteints est certes plus élevé que l'âge des animaux atteints de tremblante classique. Toutefois, les ovins ont une espérance de vie naturelle supérieure à 12-15 ans et un animal âgé de 3.5 ans (cas clinique le plus jeune de tremblante atypique rapporté ce jour) ne peut pas être considéré comme âgé.

Les connaissances actuelles relatives à la distribution de l'agent de la tremblante atypique reposent toutes sur des études biochimiques (absence de PrP anormale détectable dans les tissus considérés). Compte tenu de la faible sensibilité des méthodes de détection de la PrP anormale associé à la tremblante atypique, la présence de niveaux non négligeables d'infectiosité dans les tissus périphériques des animaux atteints en l'absence de PrP anormale détectable est parfaitement plausible.

Enfin, l'idée que la tremblante atypique n'est pas une maladie contagieuse ne repose que sur l'analyse statistique des cas détectés par les tests de dépistage dans les populations atteintes par rapport à la population générale. Compte tenu là encore de la sensibilité relative des tests de dépistage, la capacité d'identifier, au travers du dispositif d'épidémio-surveillance, des cas secondaires dans les troupeaux atteints paraît très discutable.

Compte tenu des incertitudes actuelles sur l'origine, la pathogénie et notre capacité à détecter les animaux atteints de tremblante atypique, il est impossible d'écarter à ce stade l'hypothèse d'une origine infectieuse de cette maladie et de privilégier celle d'une maladie spontanée non contagieuse. Les travaux actuellement en cours dans différents pays, visant à clarifier le caractère contagieux des animaux en incubation (présence et dissémination d'infectiosité par le lait, les annexes fœtales, les urines et/ou les fèces) et la permissivité des ovins à une

infection orale, apporteront dans un futur proche des éléments essentiels pour répondre à ces interrogations.

Toutefois, on ne peut que constater que malgré toutes ces interrogations, les législateurs (Français et Européen) ont d'ores et déjà admis que la tremblante atypique n'était pas un maladie contagieuse et ont adopté une législation spécifique pour les troupeaux atteints par ce type d'agent.

**QUATRIEME PARTIE : RISQUES SANITAIRES  
ASSOCIES A LA TREMBLANTE ATYPIQUE**

# **1. Une remise en question de la politique de lutte génétique contre les EST**

## **1.1. Tremblante atypique et polymorphismes du gène PRNP**

Près d'une décennie après son identification, il reste beaucoup d'incertitudes sur la sensibilité génétique (allèles du gène PRNP) à la tremblante atypique.

La difficulté à identifier les cas et l'absence ou le faible nombre apparent de cas secondaires dans les troupeaux atteints représentent des écueils majeurs à la conduite des études cas-témoins qui sont généralement utilisées pour identifier et mesurer l'impact des polymorphismes du gène PRNP sur le risque de développer une EST.

Les premiers éléments pertinents portant sur l'association entre développement de la tremblante atypique et polymorphismes du gène PRNP proviennent de l'étude d'un nombre de cas limités (n=49) menée en Norvège [194]. Cette étude permis d'identifier que les animaux atteints étaient tous A136A et ce malgré la présence dans les troupeaux atteints d'un nombre significatif de porteurs de l'allèle VRQ. Cette observation suggère que l'allèle VRQ ne représenterait pas un facteur de risque pour le développement de la maladie. Cette même étude a permis par ailleurs d'identifier que les animaux porteurs d'une phénylalanine en position 141 ou d'une histidine en position 154, y compris à l'état hétérozygote semblaient surreprésentés dans le groupe des 49 cas par rapport à la population générale (tableau n°4).

Génotype	Nor98 positif	Nor98 négatif	OR	Inf 95	Sup 95
AFRQ/AFRQ	6	13	<b>102.9</b>	<b>18.94</b>	<b>559.29</b>
AFRQ/AHQ	7	27	<b>57.8</b>	<b>11.46</b>	<b>291.79</b>
AFRQ/ARQ	3	67	<b>10.0</b>	<b>1.64</b>	<b>60.86</b>
AFRQ/ARR	8	90	<b>19.8</b>	<b>4.14</b>	<b>94.90</b>
AFRQ/VRQ		45			
AFRQ/ARH		9			
AHQ/AHQ	11	67	<b>36.6</b>	<b>7.94</b>	<b>168.81</b>
AHQ/ARQ	4	298	3.0	0.54	16.45
AHQ/ARR	6	144	<b>9.3</b>	<b>1.85</b>	<b>46.55</b>
AHQ/VRQ		91			
AHQ/ARH	1	21	10.6	0.93	121.84
ARQ/ARQ	2	446	1.0	0.14	7.13
ARQ/ARR		380			
ARQ/VRQ		167			
ARQ/ARH		48			
ARR/ARR	1	210	1.1	0.10	11.78
VRQ/ARH		16			
VRQ/ARR		155			
VRQ/VRQ		62			
ARR/ARH		37			
ARH/ARH		3			
Total	<b>49</b>	<b>2396</b>			

*Tableau n°4 : Données sur les troupeaux ayant des cas atypiques et les troupeaux sains en Norvège entre 1998 et 2006. Un odds ratio (OR) de 1 indique que le risque de tremblante atypique dans un génotype donné est égal au risque de base (dans cet exemple, ALRQ/ALRQ, soit ARQ/ARQ). Le risque de tremblante atypique dans un génotype donné est significativement augmenté lorsque la borne inférieure de son intervalle de confiance 95% est supérieure à la borne supérieure de l'intervalle de confiance observé pour le génotype ARQ-ARQ.*

Des études similaires ont depuis été conduites en France, en Allemagne et au Royaume Uni [7, 173, 174, 192, 219] Toutes indiquent que les allèles AF141RQ et AHQ sont associés à un fort sur-risque de développer une tremblante atypique. Elles indiquent par ailleurs que les animaux porteurs de l'allèle ARR à l'état hétérozygote ou homozygote ne semblent pas présenter de résistance particulière à la maladie, par rapport aux animaux de génotype sauvage ARQ/ARQ [7, 173, 174, 192, 219]. Enfin, il semble que les animaux porteurs de l'allèle VRQ présentent un risque diminué (mais non nul) de développer la tremblante atypique. Ce point demeure toutefois relativement débattu dans la mesure où le modèle animal qui semble le plus efficace pour propager la tremblante atypique est une souris transgénique sur-exprimant l'allèle VRQ du gène PRNP ovin [168].

L'ensemble de ces éléments indique clairement que la sensibilité/résistance à la tremblante atypique obéit à un tout autre déterminisme que celui gouvernant la sensibilité à la tremblante classique et l'ESB (tableau n°5).

Genotype	Cas de tremblante		
	Atypique (n=53)	Classique (n=74)	
A <sub>f141</sub> RQ/	ARR	n=16	-
	ARQ	n=9	n=5
	A <sub>f141</sub> RQ	n=6	-
	VRQ	n=3	n=4
AHQ/	ARR	n=2	-
	AHQ	n=2	-
	ARQ	n=1	-
	ARH	n=1	-
ARR/	ARR	n=6	-
ARQ/	ARR	n=2	-
	ARQ	-	n=29
	ARH	-	n=13
ARH/	ARH	n=1	n=3
VRQ/	ARQ	-	n=10
	VRQ	-	n=9
	ARH	-	n=1

*Tableau n°5 : Génotype des cas index de tremblante atypique (n=53) et classique (n=74) provenant de foyers identifiés en France entre 2003 et 2007.*

Il demeure toutefois difficile d'estimer le risque relatif de développer une tremblante atypique pour les animaux des différents génotypes. En effet, l'absence de cas secondaires dans les troupeaux atteints amène à considérer le risque relatif de développer de la tremblante atypique d'animaux provenant d'environnements (en termes de pression d'infection potentielle, de structure génétique de la population) et de classes d'âges différents, ce qui représente des biais potentiellement importants pour le calcul des risques relatifs.

Dans ce contexte, les expérimentations menées actuellement chez les ovins [226] ou dans des modèles de souris transgéniques pour différents allèles du gène PRNP ovin devraient apporter des éléments pertinents pour l'évaluation de la sensibilité génétique à la tremblante atypique.

## 1.2. Conséquences des choix passés

Lorsque les premières études cas-témoins visant à confirmer l'effet des différents allèles du gène PRNP ont été menées sur des effectifs significatifs d'individus, la question des méthodes de typage et des coûts engendrés s'est rapidement imposée. En effet, au début des années 90 les techniques de génotypage demeuraient lourdes (RFLP PCR et DDGI) et leur débit réduit [164]. Dans ces conditions, la plupart des travaux se sont focalisés sur les codons 136-154 et 171 du gène PRNP décrits comme étant associés aux effets les plus marqués sur la sensibilité apparente à la maladie [136, 137].

Ces choix très rationnels ont amené à négliger pendant près de 15 ans l'effet des autres polymorphismes du gène PRNP sur la sensibilité aux infections par les Prions.

Récemment, l'effet des polymorphismes M112T et P168L ont par exemple été décrits. Ces deux polymorphismes semblent associés à un effet dominant négatif plus fort que celui de l'allèle ARR sur l'infection (par voie orale ou intracérébrale) par l'agent de l'ESB [106, 220]. De manière similaire, plusieurs polymorphismes (codons 137 et 176) ont été décrits comme conférant un niveau de résistance marqué à l'infection naturelle par la tremblante classique [237].

En matière de tremblante atypique, l'identification du polymorphisme F141 sur la sensibilité à la maladie illustre là encore l'importance que peuvent avoir les polymorphismes autres que ceux situés en positions 136, 154 et 171 de la PrP [192, 194]. Il ne saurait être exclu en l'état actuel des connaissances que certains de ces polymorphismes jusqu'alors non explorés soient associés à un risque diminué (voire nul) de développer la tremblante atypique. Toutefois et compte tenu de l'absence quasi-totale de données (polymorphismes autres que ceux situés en 136, 141, 154 et 171, dans les populations témoins (non atteintes de tremblante atypique), il paraît difficile d'envisager à court ou moyen terme d'identifier de tels allèles s'ils existent.

Tous ces éléments illustrent la complexité de l'effet des polymorphismes du gène PRNP sur la sensibilité à l'infection. Ils indiquent également que le concept de résistance/sensibilité associé aux polymorphismes du gène PRNP développé dans les années 90 s'est construit sur une vision partielle et potentiellement tronquée de ces interrelations. Cette erreur stratégique a aujourd'hui comme conséquence une méconnaissance relative de l'effet de la plupart des polymorphismes sur l'infection par les différents agents des EST capables de se développer chez les ovins et nous prive de potentiels outils alternatifs à l'allèle ARR pour la lutte génétique contre les EST.

### **1.3. Impact sur la politique de lutte génétique contre les EST**

Des cas de tremblante atypique ayant été identifiés chez un certain nombre d'animaux ARR/ARR, il est aujourd'hui acquis que l'allèle ARR ne peut être considéré comme protecteur vis à vis de cet agent des EST [48] [219].

Dès l'identification des premiers cas de tremblante atypique associés à ce génotype en 2004, la politique de diffusion de l'allèle ARR dans les populations ovines en Europe, rendue obligatoire en 2002 par un règlement Européen, a été remise en question.

L'effet conjugué de la découverte de ces cas de tremblante et de l'annonce de la capacité de l'agent de l'ESB à se propager chez des animaux ARR/ARR [131], présentés jusque là comme 'absolument' résistants a conduit à des interrogations majeures sur le bien fondé de la politique de diffusion de l'allèle ARR dans les populations ovines. Au regard de cette situation, différentes agences d'évaluation du risque comme l'AFSSA en France ou l'EFSA au niveau Européen ont été saisies pour évaluer les bénéfices et les dangers qu'une telle politique de sélection pouvait avoir à moyen et long terme.

Ces évaluations ont clairement indiqué le bien fondé de la politique de sélection génétique ovine pour la prévention des risques d'exposition des consommateurs aux agents de la tremblante classique et de l'ESB ainsi que pour lutter efficacement contre la propagation de ces formes d'EST dans les populations ovines, même en l'absence d'effet positif sur la prévalence de la tremblante atypique.

Dans le même temps les experts ont exprimé des réserves quant aux effets de la diffusion massive de l'allèle ARR dans la population ovine générale à long terme. En effet, une telle politique de sélection pourrait mener, en l'absence d'un pilotage raisonné, à la disparition de certains allèles qui ne semblent pas présenter d'intérêt particulier à ce jour en matière de lutte contre les EST mais pourraient s'avérer des ressources cruciales dans le futur. Par ailleurs, le risque de voir émerger (au-delà des quelques cas rapportés jusque là) un agent des EST capable de se développer et de diffuser efficacement sur les animaux porteurs de l'allèle ARR ne pouvait pas être totalement écarté (document de l'EFSA-Q-2005-291 : <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/382.htm>).

Bien qu'équilibrés, ces avis issus des agences d'évaluation scientifique des risques ont conduit, sous la pression des pays du nord de l'Europe, à une inflexion sensible de la politique de sélection génétique ovine en matière d'EST. D'obligatoire cette sélection est devenue, en 2006, optionnelle ; c'est-à-dire que libre choix est laissé à chaque état membre de l'UE de l'appliquer à sa population.

Dans ce contexte, certains des pays, pourtant pionniers en la matière comme le Royaume Uni, ont renoncé à leurs objectifs en matière de diffusion de l'allèle ARR dans leur population générale tout en maintenant le principe d'un assainissement des troupeaux atteints de tremblante classique par l'utilisation de l'outil génétique.

## **2. Tremblante atypique et Sécurité Sanitaire des Aliments : le poids des incertitudes**

### **2.1. ESB et nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob**

A ce jour, l'ESB classique (ESB-C) est la seule EST animale pour laquelle le caractère zoonotique soit définitivement établi. L'exposition alimentaire massive à cet agent des EST a été responsable à partir de 1995 de l'émergence du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ) chez l'homme. Si une relation entre l'émergence des cas de v-MCJ et l'épidémie d'ESB a rapidement été évoquée et suspectée, la démonstration formelle de cette causalité s'est avérée longue (près d'une décennie) et complexe.

La transmission expérimentale d'isolats bovins d'ESB-C et de cas de v-MCJ à un panel de souris conventionnelles a permis d'identifier des signatures biologiques similaires (durée d'incubation dans chaque lignée, distribution des lésions de spongiose dans différents sites cérébraux), indiquant une probable identité des agents impliqués[45]. D'autres données épidémiologiques et des arguments issus d'autres études expérimentales, notamment la transmission au macaque [166]et aux souris transgéniques exprimant la PrP bovine [223] ou humaine [8], sont venus confirmer l'identité des agents responsables de l'ESB et du v-CJD.

Les difficultés rencontrées pour confirmer que l'ESB classique était bien responsable d'une forme humaine d'EST amène à s'interroger sur notre capacité à suspecter et identifier un risque zoonotique qui pourrait être associé à une forme endémique ou bien émergente d'EST dans les populations animales.

## 2.2. Potentiel zoonotique des agents animaux des EST autres que l'ESB classique

Dans leur forme la plus fréquente, les EST humaines (MCJ dite sporadique, s-MCJ) surviennent principalement chez des individus âgés (de 50 à 60 ans) avec une fréquence de l'ordre de 1,5 cas par million et par an [160]. Ces maladies demeurent jusqu'à présent sans causes spécifiques identifiées et, compte tenu de leur durée d'incubation (plusieurs décennies), il demeure extrêmement difficile d'impliquer ou de rejeter des facteurs d'exposition à des produits d'origine animale (vecteur d'exposition à des agents des EST) [58, 182, 238].

Toutefois, le fait que la prévalence apparente des s-MCJ ne soit pas différente dans des pays où les EST animales sont endémiques de ceux considérés par l'OIE comme indemnes a conduit à considérer pendant des décennies que tout lien entre la survenue des cas d'EST humaines et les prions animaux pouvait être rejeté [160]. La démonstration récente que, malgré leur statut indemne, la Nouvelle Zélande et l'Australie étaient toutes deux atteintes par la tremblante atypique indique clairement les limites de ce type d'argument.

Au-delà de ces aspects épidémiologiques, la capacité des agents animaux des EST autres que l'ESB classique à se transmettre à l'homme a été explorée dans différents systèmes expérimentaux jugés comme des modèles pertinents de la barrière d'espèce humaine. Bien que les données disponibles restent extrêmement parcellaires, certains des résultats obtenus présentent un intérêt certain dans le débat relatif à l'existence d'un risque zoonotique associé aux Prions circulants dans les populations animales.

Historiquement, les primates ont apporté la preuve du caractère transmissible des EST humaines. Après de nombreuses tentatives infructueuses de transmission à divers modèles animaux, la transmissibilité du Kuru a été démontrée par l'équipe de Gajdusek suite à l'inoculation d'homogénats de cerveaux issus de patients atteints à différentes espèces de primates [93, 101].

Les premiers éléments ayant permis de démontrer le caractère zoonotique de l'ESB classique proviennent des expériences de transmission de cas d'ESB au macaque *Cynomolgus* [166]. Depuis, le modèle primate est utilisé comme modèle de v-MCJ dans les études visant à évaluer la barrière de transmission humaine vis-à-vis de l'ESB [123, 165, 167].

La susceptibilité des primates à un nombre limité d'isolats de tremblante a été testée, par inoculation soit (i) de matériel cérébral provenant directement de petits ruminants, soit (ii) par inoculation d'isolats de tremblante préalablement propagés itérativement à un ou plusieurs hôtes intermédiaires. Ainsi, l'isolat Compton (isolat de tremblante passé itérativement 9 fois chez la chèvre puis 8 fois chez la souris) induit une maladie clinique chez le macaque *Cynomolgus* après 5 ans d'incubation [100, 102, 161]. D'autres espèces de singes incluses dans la même étude (macaque Rhésus, singe vert, chimpanzé) semblent moins permissifs. Ces expériences sont toutefois difficiles à interpréter dans la mesure où la propagation de l'agent infectieux à la souris pourrait avoir altéré ses propriétés. Au moment de la publication de cette étude, deux macaques (*Cynomolgus*, Rhésus) et un chimpanzé infectés par l'isolat Compton passé chez la chèvre ou par un isolat de tremblante ovine provenant des USA n'avaient pas développé de maladie clinique 4 ans après injection intracérébrale. Le singe-écureuil est permissif par voie intracérébrale (transmission en 14 mois) [102, 161], et par voie orale [100] en 25-32 mois à l'isolat Compton, ayant subi 3 passages intermédiaires supplémentaires chez le hamster. Dans ce modèle, l'inoculation de cas humains de MCJ sporadiques induisent des périodes d'incubation similaires (11-48 mois par voie intracérébrale, 23-27 mois par voie orale). Plus récemment, un isolat de tremblante ovine (PG 85/02) a pu être transmis par voie intracérébrale chez le marmouset, avec une période d'incubation plus courte que l'ESB [10, 11].

Parallèlement au modèle primate, des modèles transgéniques exprimant la PrP humaine (présentant soit une méthionine, soit une valine au codon 129 du gène PRNP) sur un fond génétique PrP KO (invalidation du gène PRNP murin ; dénommées ci-après TgHu) ont été développés. Alors que les cas de MCJ sporadiques ou familiales sont difficilement transmissibles aux lignées de souris conventionnelles [197] [103], ils se propagent sans barrière d'espèce apparente sur les souris TgHu [8, 27, 28, 154]. Ces lignées « humanisées » constituent des modèles intéressants pour évaluer le potentiel zoonotique relatif des isolats d'EST animaux et/ou caractériser d'éventuelles similitudes entre ces isolats et des cas humains d'EST. Chez la souris TgHu, l'ESB classique, dont le caractère zoonotique est avéré, peut être utilisée comme « étalon » afin d'évaluer le potentiel zoonotique d'autres EST animales.

Récemment, la transmission d'isolats bovins « atypiques » de type L a été rapportée sur différents modèles de souris TgHu exprimant l'allèle Met129 [154] [30]. Les durées

d'incubation et les taux d'attaque observés avec l'ESB de type L suggèrent une meilleure transmissibilité de ce type d'agent que de l'ESB classique. L'absence de réduction des durées d'incubation et la stabilité des caractères phénotypiques observés au cours des passages itératifs suggèrent une propagation de l'ESB de type L sans barrière d'espèce apparente sur la séquence PrP humaine.

L'ensemble de ces travaux indique qu'il n'existe pas d'argument permettant d'écarter l'existence d'un risque zoonotique associé à certains agents des EST animales autres que l'ESB classique. Certaines données expérimentales, malgré leurs limites (notamment en termes de pertinence par rapport à une exposition alimentaire notamment), suggèrent que certains agents, circulant actuellement dans les populations d'animaux de rente, possèdent un potentiel à franchir la barrière d'espèce humaine supérieur à celui de l'ESB classique.

Ces considérations, en association avec la volonté politique affichée par les autorités sanitaires Européennes de lever progressivement les mesures mises en place lors de la crise de l'ESB pour protéger les consommateurs d'une exposition aux agents des EST et éradiquer les EST des animaux de rente, amènent à émettre des avis soulignant les incertitudes relatives aux risques sanitaires associés aux agents des EST animales (EFSA-Q-2007-039 : <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/466.htm>).

### **2.3. La maîtrise des risques d'exposition humaine aux agents des EST**

Depuis la crise de l'ESB, la prévention des risques d'exposition aux produits d'origine animale susceptibles de représenter un risque pour la santé humaine est devenue l'une des priorités majeures des autorités sanitaires françaises et Européennes. Par extension, des mesures visant à limiter les risques de propagation et favorisant le contrôle et l'éradication des EST animales ont été mises en place.

La protection de la chaîne alimentaire humaine et, dans une moindre mesure, animale contre les risques d'exposition aux agents des EST repose principalement au plan opérationnel sur

- (i) l'identification des individus et des troupeaux positifs (soit par l'identification des cas cliniques ou l'utilisation des tests rapides),
- (ii) le retrait systématique des matériels dits à risque spécifié (MRS).

Les matériels à risque spécifiés se définissent comme une liste de tissus ou produits animaux considérés par les autorités sanitaires comme vecteurs potentiels d'exposition aux agents des EST. En clair, il s'agit d'écartier de la consommation humaine et animale l'ensemble des tissus ou produits animaux susceptibles de contenir des niveaux significatifs d'infectiosité.

Au titre de la prévention et de la précaution, ils sont donc retirés de la chaîne alimentaire humaine, et ne font l'objet d'aucun recyclage dans l'alimentation animale à travers les farines ou les graisses animales. En France depuis 1996, les MRS sont systématiquement retirés à l'abattoir et détruits par incinération. Seule la colonne vertébrale peut être retirée au stade de l'atelier de découpe ou du boucher. La liste des MRS évolue depuis 1996, afin d'adapter ces mesures aux connaissances les plus récentes (tableau n°6).

MRS bovins (septembre 2006)	Amygdales
	Intestins, y compris le mésentère
	Le crâne, dont la cervelle pour les animaux de plus de 12 mois
	La moelle épinière
	La colonne vertébrale, y compris les ganglions rachidiens, mais à l'exclusion des vertèbres caudales, des apophyses épineuses et transverses des vertèbres cervicales, thoraciques et lombaires, et de la crête sacrée médiane et des ailes du sacrum, mais comprenant les ganglions rachidiens
	Les viandes et tous les sous-produits, y compris le cuir, provenant d'animaux de l'espèce bovine devant être soumis à un test de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine, mais pour lesquels le test de dépistage n'a pas donné lieu à un résultat négatif ou n'a pas été réalisé
MRS ovins et caprins	Le crâne, y compris les yeux, mais à l'exclusion de l'encéphale, des ovins et caprins de moins de 6 mois
	Le crâne, y compris les yeux et l'encéphale, des ovins et caprins âgés de 6 mois et plus
	Les amygdales des ovins et caprins de tout âge

*Tableau n°6 : Matériels à risque spécifiés chez les bovins, les ovins et les caprins.*

Comme tenu de la distribution et de la cinétique de circulation de l'agent de l'ESB dans l'organisme des bovins [249], ces mesures lorsqu'elles sont appliquées aux bovins peuvent

être considérées comme efficaces. Toutefois, la mise en évidence de niveaux significatifs d'infectiosité dans les nerfs périphériques [84] [125] ou de plus faibles niveaux d'infectiosité dans un échantillon de tissu musculaire strié chez un bovin atteint d'ESB classique [49] souligne les limites de ce système.

Chez les petits ruminants, les mesures MRS ont d'abord été appliquées comme mesures de prévention des risques d'exposition qui pourraient être associés au développement d'une épidémie d'ESB dans cette espèce. En effet, les données obtenues dès le début des années 1990 indiquaient que les petits ruminants exposés par voie orale à l'ESB bovine pouvaient développer cette maladie. Toutefois, contrairement aux bovins, l'agent de l'ESB chez les ovins diffuse largement dans les tissus périphériques des animaux en incubation de la maladie [242]. L'agent de l'ESB chez les ovins partage le même schéma pathogénique que celui décrit pour la tremblante classique pour laquelle il a été démontré une présence d'infectiosité dans les nerfs, le muscle squelettique [6] ainsi que dans le lait [159].

L'ensemble de ces données indique donc clairement que les mesures MRS appliquées actuellement ne permettent pas de prévenir de façon efficace les risques d'exposition à la tremblante classique ou à l'ESB des petits ruminants.

Alors que les mesures MRS ont été initialement instaurées afin de limiter (avec succès pour l'ESB bovine) l'entrée dans la chaîne alimentaire de l'agent de l'ESB, leur application a été considérée, par les experts en charge de l'évaluation des risques sanitaires et leurs interlocuteurs directs en matière de gestion des risques, comme un moyen de limiter les risques d'exposition aux agents des EST en général. L'application de ces mesures permettant, sans faire état de la question du potentiel zoonotique des agents des EST autres que l'ESB, d'agir au titre de la prévention contre l'ESB sur l'exposition au risque EST.

Toutefois, les mesures de retrait et de destruction des MRS représentent un coût économique élevé et, avec le déclin de l'épidémie d'ESB, les restrictions appliquées à ce type de matériel apparaissent de plus en plus critiquées et remises en question.

#### **2.4. Exposition à la tremblante atypique**

Très peu de données relatives à la distribution de l'agent responsable de la tremblante atypique dans l'organisme des ovins atteints sont actuellement disponibles.

Sur la base des méthodes de détection de la PrPSc (biochimie et immunohistochimie), l'agent de la tremblante atypique semble confiné au système nerveux central ; aucune accumulation de PrPSc n'a été mise en évidence dans les tissus lymphoïdes des quelques cas de tremblante atypique qui ont pu être explorés [26, 51, 196, 245].

L'absence apparente d'agent infectieux dans les tissus périphériques est considérée comme un argument fort permettant de penser, qu'en matière de tremblante atypique, les mesures de retrait des MRS permettent d'assurer une prévention efficace (sinon absolue) des risques d'exposition alimentaire de l'homme à ce type d'agent.

Toutefois, de nombreuses incertitudes demeurent. En effet, en matière de tremblante atypique, il apparaît clairement que les méthodes de détection biochimique de la PrPSc ont une sensibilité limitée. En effet, les isolats de tremblante atypique ont un titre infectieux extrêmement élevé [168] par comparaison à ceux observés dans le même modèle (souris transgéniques pour le variant PrP VRQ ovin) en tremblante classique [159]. En conséquence, il demeure légitime de s'interroger sur la pertinence des résultats biochimiques disponibles utilisés comme argument pour écarter la présence d'agent pathogène dans les organes lymphoïdes des animaux atteints.

De plus, les nerfs périphériques, les muscles ou bien encore le lait des animaux atteints de tremblante classique ou d'ESB contiennent des niveaux non négligeables d'infectiosité [6, 159]. A ce jour, aucune donnée n'est disponible quant à la présence d'infectiosité dans ces tissus et produits chez les animaux atteints ou en incubation de tremblante atypique.

Il semble aujourd'hui clairement établi que la présence de tremblante atypique dans les populations ovines intéresse également les pays jusqu'alors considérés comme indemnes d'EST (Australie et Nouvelle-Zélande). En raison de leur statut indemne, les mesures MRS ne sont pas appliquées aux animaux importés de ces pays. Considérant les volumes d'importation, le risque d'exposition à la tremblante atypique par le biais de ces animaux ne saurait être simplement écarté même s'il demeure difficile à évaluer (âge des animaux importés et prévalence estimée de la tremblante atypique dans ces pays).

Considérant enfin que la tremblante atypique est présente dans les populations ovines depuis au moins plusieurs décennies, il semble également pertinent de discuter des risques passés d'exposition. En effet, les mesures de retrait des matériels à risque spécifié n'ont été appliquées à l'échelle communautaire qu'à partir de 2001. En conséquence, des tissus

contenant des titres élevés d'infectiosité issus d'animaux atteints de tremblante atypique sont très probablement entrés dans les chaînes alimentaires humaine et animale durant la période précédant l'instauration de ces mesures.

## **2.5. Tremblante atypique et barrière de transmission**

Dans la mesure où les populations animales et humaines ont probablement été soumises par le passé (et très probablement encore aujourd'hui) à une exposition alimentaire à la tremblante atypique, la capacité de cet agent à franchir les barrières de transmission est une question cruciale. De plus, compte tenu de l'identification relativement récente de la tremblante atypique, les éléments relatifs aux capacités de ce type d'agent à franchir les barrières de transmission demeurent très limités.

Très récemment, la capacité d'un isolat de tremblante atypique de franchir cette barrière a été rapportée sur un modèle de souris transgénique exprimant la PrP porcine. Le premier passage de cet isolat dans ce modèle animal est d'une efficacité limitée (12% après inoculation intracérébrale); toutefois, après adaptation, l'agent obtenu apparaît comme extrêmement virulent. Par ailleurs, le phénotype du prion obtenu chez ce nouvel hôte est indifférenciable (durée d'incubation, profil lésionnel, propriétés biochimiques de la PrP<sup>Sc</sup>) de celui de l'ESB adaptée à ce même modèle de souris [83].

Ces observations suggèrent que l'agent de l'ESB pourrait émerger d'un isolat de tremblante atypique lors du passage sur un hôte exprimant la PrP porcine. Bien entendu ces résultats demeurent très parcellaires et doivent être confirmés, notamment par inoculation de ce type d'agent chez l'hôte naturel (porcin). Ils indiquent toutefois la nécessité de documenter et d'explorer avec la plus grande attention la capacité des prions animaux à franchir non seulement les barrières de transmission limitant leur propagation à l'homme, mais également aux différentes espèces animales d'intérêt agronomique.

## CONCLUSION

Les EST sont des maladies neurodégénératives transmissibles touchant un large spectre de mammifères. Parmi les agents des EST, certains ont la capacité à franchir les barrières de transmission qui limitent naturellement leur propagation entre individus d'espèces différentes. Lors du franchissement des barrières de transmission, un agent des EST peut voir ses propriétés biologiques intrinsèques se modifier.

Inconnue jusqu'en 1998, la tremblante atypique représente aujourd'hui plus de la moitié des cas d'EST détectés chaque année chez les petits ruminants en Europe. Il est aujourd'hui admis que cette forme d'EST circule dans l'ensemble des pays ayant une population significative de petit ruminants et que les mesures visant à limiter l'exposition alimentaire des animaux d'élevage et des consommateurs ne permettent sans doute qu'une prévention partielle des risques d'exposition à cet agent des EST.

Les propriétés de ces agents atypiques à se propager au sein des populations de petits ruminants ou à franchir les barrières d'espèces, qui limitent naturellement la propagation des prions d'une espèce à une autre, demeurent largement inconnues. Il semble toutefois que les mesures d'éradication et de contrôle mises en place afin de lutter contre les formes classiques de tremblante et l'ESB dans les populations ovines soient inadaptées à cet agent. De plus, un faisceau convergent d'éléments semble indiquer que les outils actuels de surveillance des EST animales ont une sensibilité extrêmement limitée vis-à-vis de la tremblante atypique.

En conséquence, vingt ans après la crise de l'ESB, et même si aucune donnée disponible ne permet aujourd'hui d'en suspecter le caractère zoonotique, la tremblante atypique incarne les incertitudes qui demeurent en termes de compréhension et de maîtrise des risques sanitaires associés aux maladies à Prions. Les agents responsables des formes atypiques d'EST identifiés au cours de la décennie écoulée ont créé pour les gestionnaires du risque une situation sans précédent depuis la fin des années 90 et la crise médiatique et sanitaire de l'ESB. Alors que l'épidémie d'ESB est à présent maîtrisée et que les pressions économiques pour la levée des coûteuses mesures de lutte mise en place pour lutter contre cette maladie s'amplifient, les incertitudes scientifiques quant aux risques qu'un autre agent des EST pourrait représenter pour les filières d'élevage et les populations animales et humaines sont de plus en plus affirmées.

A un moment où principe de précaution et compétitivité économique, bien qu'antithétiques, ont été élevées au rang de dogmes, les décisions (ou l'absence de décision) des autorités sanitaires et politiques en la matière seront sans nul doute un intéressant reflet de la 'schizophrénie' de notre société.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. -AGUZZI A.: Peripheral prion pursuit. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 661-2.
2. -ANDREOLETTI O., BERTHON P., LEVAVASSEUR E., MARC D., LANTIER F., MONKS E., ELSEN J.-M. and SCHELCHER F.: Phenotyping of Protein-Prion (PrP<sup>Sc</sup>)-accumulating Cells in Lymphoid and Neural Tissues of Naturally Scrapie-affected Sheep by Double-labeling Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 2002, **50**: 1357-1370.
3. -ANDREOLETTI O., BERTHON P., MARC D., SARRADIN P., GROSCLAUDE J., VAN KEULEN L., SCHELCHER F., ELSEN J.M. and LANTIER F.: Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol*, 2000, **81 Pt 12**: 3115-26.
4. -ANDREOLETTI O., LACROUX C., CHABERT A., MONNEREAU L., TABOURET G., LANTIER F., BERTHON P., EYCHENNE F., LAFOND-BENESTAD S., ELSEN J.M. and SCHELCHER F.: 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**: 2607-2616.
5. -ANDREOLETTI O., MOREL N., LACROUX C., ROUILLON V., BARC C., TABOURET G., SARRADIN P., BERTHON P., BERNARDET P., MATHEY J., LUGAN S., COSTES P., CORBIERE F., ESPINOSA J.C., TORRES J.M., GRASSI J., SCHELCHER F. and LANTIER F.: Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 1043-6.
6. -ANDREOLETTI O., SIMON S., LACROUX C., MOREL N., TABOURET G., CHABERT A., LUGAN S., CORBIERE F., FERRE P., FOUCRAS G., LAUDE H., EYCHENNE F., GRASSI J. and SCHELCHER F.: PrP<sup>Sc</sup> accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, 2004, **10**: 591-3.
7. -ARSAC J.N., ANDREOLETTI O., BILHEUDE J.M., LACROUX C., BENESTAD S.L. and BARON T.: Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*, 2007, **13**: 58-65.
8. -ASANTE E.A., LINEHAN J.M., DESBRUSLAIS M., JOINER S., GOWLAND I., WOOD A.L., WELCH J., HILL A.F., LLOYD S.E., WADSWORTH J.D. and COLLINGE J.: BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *Embo J*, 2002, **21**: 6358-6366.
9. -AUCOUTURIER P., GEISSMANN F., DAMOTTE D., SABORIO G.P., MEEKER H.C., KASCSAK R., CARP R.I. and WISNIEWSKI T.: Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 703-8.
10. -BAKER H.F., RIDLEY R.M. and WELLS G.A.: Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec*, 1993, **132**: 403-6.
11. -BAKER H.F., RIDLEY R.M., WELLS G.A. and IRONSIDE J.W.: Prion protein immunohistochemical staining in the brains of monkeys with transmissible spongiform encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1998, **24**: 476-86.
12. -BALDAUF E., BEEKES M. and DIRINGER H.: Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, 1997, **78**: 1187-97.

13. -BANCHEREAU J. and STEINMAN R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, **392**: 245-52.
14. -BARON T.G., MADEC J.Y. and CALAVAS D.: Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy-linked diseases. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**: 3701-4.
15. -BARON T.G., MADEC J.Y., CALAVAS D., RICHARD Y. and BARILLET F.: Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci Lett*, 2000, **284**: 175-8.
16. -BARRON R.M. and MANSON J.C.: A gene-targeted mouse model of P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Clin Lab Med*, 2003, **23**: 161-73.
17. -BARRON R.M., THOMSON V., KING D., SHAW J., MELTON D.W. and MANSON J.C.: Transmission of murine scrapie to P101L transgenic mice. *J Gen Virol*, 2003, **84**: 3165-72.
18. -BASLER K., OESCH B., SCOTT M., WESTAWAY D., WALCHLI M., GROTH D.F., MCKINLEY M.P., PRUSINER S.B. and WEISSMANN C.: Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 1986, **46**: 417-28.
19. -BEEKES M., BALDAUF E. and DIRINGER H.: Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol*, 1996, **77**: 1925-34.
20. -BEEKES M. and MCBRIDE P.A.: Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, 2000, **278**: 181-4.
21. -BEEKES M., MCBRIDE P.A. and BALDAUF E.: Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, 1998, **79**: 601-7.
22. -BELLWORTHY S.J., DEXTER G., STACK M., CHAPLIN M., HAWKINS S.A., SIMMONS M.M., JEFFREY M., MARTIN S., GONZALEZ L. and HILL P.: Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet Rec*, 2005, **157**: 206.
23. -BELLWORTHY S.J., HAWKINS S.A., GREEN R.B., BLAMIRE I., DEXTER G., DEXTER I., LOCKEY R., JEFFREY M., RYDER S., BERTHELIN-BAKER C. and SIMMONS M.M.: Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec*, 2005, **156**: 197-202.
24. -BELT P.B., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E., BOS-DE RUIJTER J., GIELKENS A.L. and SMITS M.A.: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 1995, **76**: 509-17.
25. -BENESTAD S.L., ARSAC J.N., GOLDMANN W. and NOREMARK M.: Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, 2008, **39**: 19.
26. -BENESTAD S.L., SARRADIN P., THU B., SCHONHEIT J., TRANULIS M.A. and BRATBERG B.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, 2003, **153**: 202-8.
27. -BERINGUE V., ANDREOLETTI O., LE DUR A., ESSALMANI R., VILOTTE J.L., LACROUX C., REINE F., HERZOG L., BIACABE A.G., BARON T., CARAMELLI M., CASALONE C. and LAUDE H.: A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci*, 2007, **27**: 6965-71.
28. -BERINGUE V., BENCSIK A., LE DUR A., REINE F., LAI T.L., CHENAIS N., TILLY G., BIACABE A.G., BARON T., VILOTTE J.L. and LAUDE H.: Isolation from

- cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog*, 2006, **2**: e112.
29. -BERINGUE V., DEMOY M., LASMEZAS C.I., GOURITIN B., WEINGARTEN C., DESLYS J.P., ANDREUX J.P., COUVREUR P. and DORMONT D.: Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, 2000, **190**: 495-502.
  30. -BERINGUE V., VILOTTE J.L. and LAUDE H.: Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*, 2008, **39**: 47.
  31. -BESSEN R.A., KOCISKO D.A., RAYMOND G.J., NANDAN S., LANSBURY P.T. and CAUGHEY B.: Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature*, 1995, **375**: 698-700.
  32. -BESSEN R.A. and MARSH R.F.: Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 1992, **66**: 2096-101.
  33. -BESSEN R.A. and MARSH R.F.: Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, 1994, **68**: 7859-68.
  34. -BILLINIS C., PANAGIOTIDIS C.H., PSYCHAS V., ARGYROUDIS S., NICOLAOU A., LEONTIDES S., PAPAPOPOULOS O. and SKLAVIADIS T.: Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 713-21.
  35. -BOSQUE P.J., RYOU C., TELLING G., PERETZ D., LEGNAME G., DEARMOND S.J. and PRUSINER S.B.: Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**: 3812-7.
  36. -BOSSERS A., SCHREUDER B.E., MUILEMAN I.H., BELT P.B. and SMITS M.A.: PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 1996, **77**: 2669-73.
  37. -BROWN K.L., STEWART K., RITCHIE D.L., MABBOTT N.A., WILLIAMS A., FRASER H., MORRISON W.I. and BRUCE M.E.: Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein- expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, 1999, **5**: 1308-12.
  38. -BROWN P. and GAJDUSEK D.C.: Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet*, 1991, **337**: 269-70.
  39. -BRUCE, *Biological stability of different classes of scrapie agent*, in *Slow transmissible diseases of the nervous system*, PRUDSINER SJ H.W., Editor. 1979, Academic: New York. p. 71-86.
  40. -BRUCE, *Strain typing studies of Scrapie and BSE*, in *Prion diseases*, BAKER H.F R.R.M., Editor. 1992, Humana: Totowa. p. 223-236.
  41. -BRUCE M.E., BOYLE A., COUSENS S., MCCONNELL I., FOSTER J., GOLDMANN W. and FRASER H.: Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 695-704.
  42. -BRUCE M.E. and FRASER H.: Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, **172**: 125-38.
  43. -BRUCE M.E., MCCONNELL I., FRASER H. and DICKINSON A.G.: The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 595-603.
  44. -BRUCE M.E., NONNO R., FOSTER J., GOLDMANN W., DI BARI M., ESPOSITO E., BENESTAD S.L., HUNTER N. and AGRIMI U.: Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Vet Rec*, 2007, **160**: 665-6.
  45. -BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S.,

- FRASER H. and BOSTOCK C.J.: Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature*, 1997, **389**: 498-501.
46. -BUELER H., FISCHER M., LANG Y., BLUETHMANN H., LIPP H.P., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B., AGUET M. and WEISSMANN C.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*, 1992, **356**: 577-82.
  47. -BURTHEM J., URBAN B., PAIN A. and ROBERTS D.J.: The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood*, 2001, **98**: 3733-8.
  48. -BUSCHMANN A., BIACABE A.G., ZIEGLER U., BENCSIK A., MADEC J.Y., ERHARDT G., LUHKEN G., BARON T. and GROSCHUP M.H.: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*, 2004, **117**: 27-36.
  49. -BUSCHMANN A. and GROSCHUP M.H.: Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis*, 2005, **192**: 934-42.
  50. -BUSCHMANN A. and GROSCHUP M.H.: TSE eradication in small ruminants--quo vadis? *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2005, **118**: 365-71.
  51. -BUSCHMANN A., LUHKEN G., SCHULTZ J., ERHARDT G. and GROSCHUP M.H.: Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol*, 2004, **85**: 2727-33.
  52. -CAPLAZI P.A., O'ROURKE K.I. and BASZLER T.V.: Resistance to scrapie in PrP ARR/ARQ heterozygous sheep is not caused by preferential allelic use. *J Clin Pathol*, 2004, **57**: 647-50.
  53. -CARP R.I. and CALLAHAN S.M.: Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*, 1982, **17**: 201-7.
  54. -CARP R.I., CALLAHAN S.M., SERSEN E.A. and MORETZ R.C.: Preclinical changes in weight of scrapie-infected mice as a function of scrapie agent-mouse strain combination. *Intervirology*, 1984, **21**: 61-9.
  55. -CASTILLA J., GUTIERREZ-ADAN A., BRUN A., DOYLE D., PINTADO B., RAMIREZ M.A., SALGUERO F.J., PARRA B., SEGUNDO F.D., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., ROGERS M. and TORRES J.M.: Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J Neurosci*, 2004, **24**: 5063-9.
  56. -CASTILLA J., GUTIERREZ ADAN A., BRUN A., PINTADO B., RAMIREZ M.A., PARRA B., DOYLE D., ROGERS M., SALGUERO F.J., SANCHEZ C., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. and TORRES J.M.: Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol*, 2003, **148**: 677-91.
  57. -CATHALA F., BROWN P., CHATELAIN J., CASTAIGNE P. and GAJDUSEK C.: Maladie de Creutzfeldt-Jakob en France. Intérêt des formes familiales. Existe-t-il un gène gouvernant la durée de l'incubation ? *Presse Méd*, 1986, **15**: 379-382.
  58. -CHATELAIN J., CATHALA F., BROWN P., RAHARISON S., COURT L. and GAJDUSEK D.C.: Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. *J Neurol Sci*, 1981, **51**: 329-37.
  59. -CHIHOTA C.M., GRAVENOR M.B. and BAYLIS M.: Investigation of trace elements in soil as risk factors in the epidemiology of scrapie. *Vet Rec*, 2004, **154**: 809-13.
  60. -CLOUSCARD C., BEAUDRY P., ELSEN J.M., MILAN D., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., SCHELCHER F., CHATELAIN J., LAUNAY J.M. and LAPLANCHE J.L.: Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 1995, **76**: 2097-101.

61. -COLLINGE J., SIDLE K.C., MEADS J., IRONSIDE J. and HILL A.F.: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 1996, **383**: 685-90.
62. -COLLINGE J., SIDLE K.C., MEADS J., IRONSIDE J. and HILL A.F.: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]. *Nature*, 1996, **383**: 685-90.
63. -COOKE C.M., RODGER J., SMITH A., FERNIE K., SHAW G. and SOMERVILLE R.A.: Fate of prions in soil: detergent extraction of PrP from soils. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**: 811-7.
64. -CUILLÉ J. and CHELLE P.L.: La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 1936, **203**: 1552-54.
65. -DABAGHIAN R.H., MORTIMER P.P. and CLEWLEY J.P.: Prospects for the development of pre-mortem laboratory diagnostic tests for Creutzfeldt-Jakob disease. *Rev Med Virol*, 2004, **14**: 345-61.
66. -DAWSON M., HOINVILLE L.J., HOSIE B.D. and HUNTER N.: Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec*, 1998, **142**: 623-5.
67. -DAWSON M., MOORE R.C. and BISHOP S.C.: Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet Res*, 2008, **39**: 25.
68. -DAWSON M., WARNER R., NOLAN A., MCKEOWN B. and THOMSON J.: 'Complex' PrP genotypes identified by the National Scrapie Plan. *Vet Rec*, 2003, **152**: 754-5.
69. -DEARMOND S.J. and PRUSINER S.B.: Transgenetics and neuropathology of prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, **207**: 125-46.
70. -DEL RIO VILAS V.J., BOHNING D. and KUHNERT R.: A comparison of the active surveillance of scrapie in the European Union. *Vet Res*, 2008, **39**: 37.
71. -DETWILER L.A.: Sourcing pharmaceutical, biological and medical components from livestock in the United States. *Dev Biol Stand*, 1996, **88**: 243-5.
72. -DETWILER L.A. and BAYLIS M.: The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, 2003, **22**: 121-43.
73. -DEXTER G., TONGUE S.C., HEASMAN L., BELLWORTHY S.J., DAVIS A., MOORE S.J., SIMMONS M.M., SAYERS A.R., SIMMONS H.A. and MATTHEWS D.: The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock. *BMC Vet Res*, 2009, **5**: 38.
74. -DICKINSON A.G.: Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, 1976, **44**: 209-41.
75. -DICKINSON A.G. and TAYLOR D.M.: Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med*, 1978, **299**: 1413-4.
76. -DIRINGER H., RAHN H.C. and BODE L.: Antibodies to protein of scrapie-associated fibrils. *Lancet*, 1984, **2**: 345.
77. -EGLIN R.D., WARNER R., GUBBINS S., SIVAM S.K. and DAWSON M.: Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. *Vet Rec*, 2005, **156**: 433-7.
78. -ELOIT M., ADJOU K., COULPIER M., FONTAINE J.J., HAMEL R., LILIN T., MESSIAEN S., ANDREOLETTI O., BARON T., BENCSIK A., BIACABE A.G., BERINGUE V., LAUDE H., LE DUR A., VILOTTE J.L., COMOY E., DESLYS J.P., GRASSI J., SIMON S., LANTIER F. and SARRADIN P.: BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 2005, **156**: 523-4.
79. -ELSEN J.M., AMIGUES Y., SCHELCHER F., DUCROCQ V., ANDREOLETTI O., EYCHENNE F., KHANG J.V., POIVEY J.P., LANTIER F. and LAPLANCHE J.L.:

- Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol*, 1999, **144**: 431-45.
80. -ELSEN J.M., BARILLET, F., VU TIEN KHANG, J., SCHELCHER, F., AMIGUES, J.L., POIVEY, J.P., EYCHENNE, F., *Génétique de la sensibilité à la tremblante ovine : recherches en cours et perspectives*. 1996.
  81. -ENDRES R., ALIMZHANOV M.B., PLITZ T., FUTTERER A., KOSCO-VILBOIS M.H., NEDOSPASOV S.A., RAJEWSKY K. and PFEFFER K.: Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med*, 1999, **189**: 159-68.
  82. -ERSDAL C., ULVUND M.J., BENESTAD S.L. and TRANULIS M.A.: Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol*, 2003, **40**: 164-74.
  83. -ESPINOSA J.C., HERVA M.E., ANDREOLETTI O., PADILLA D., LACROUX C., CASSARD H., LANTIER I., CASTILLA J. and TORRES J.M.: Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. *Emerg Infect Dis*, 2009, **15**: 1214-21.
  84. -ESPINOSA J.C., MORALES M., CASTILLA J., ROGERS M. and TORRES J.M.: Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J Gen Virol*, 2007, **88**: 1379-83.
  85. -FEDIAEVSKY A., MAURELLA C., NOREMARK M., INGRAVALLE F., THORGEIRSDOTTIR S., ORGE L., POIZAT R., HAUTANIEMI M., LIAM B., CALAVAS D., RU G. and HOPP P.: The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res*, **6**: 9.
  86. -FEDIAEVSKY A., MORIGNAT E., DUCROT C. and CALAVAS D.: A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerg Infect Dis*, 2009, **15**: 710-8.
  87. -FEDIAEVSKY A., TONGUE S.C., NOREMARK M., CALAVAS D., RU G. and HOPP P.: A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res*, 2008, **4**: 19.
  88. -FELTEN D.L. and FELTEN S.Y.: Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun*, 1988, **2**: 293-300.
  89. -FOSTER J.D. and DICKINSON A.G.: The unusual properties of CH 1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec*, 1988, **123**: 5-8.
  90. -FOSTER J.D., HUNTER N., WILLIAMS A., MYLNE M.J., MCKELVEY W.A., HOPE J., FRASER H. and BOSTOCK C.: Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec*, 1996, **138**: 559-62.
  91. -FOSTER J.D., PARNHAM D.W., HUNTER N. and BRUCE M.: Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, 2001, **82**: 2319-26.
  92. -FRASER H. and DICKINSON A.G.: Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, 1973, **83**: 29-40.
  93. -GAJDUSEK D.C. and GIBBS C.J., JR.: Transmission of two subacute spongiform encephalopathies of man (Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to new world monkeys. *Nature*, 1971, **230**: 588-91.
  94. -GAVIER-WIDEN D., NOREMARK M., BENESTAD S., SIMMONS M., RENSTROM L., BRATBERG B., ELVANDER M. and AF SEGERSTAD C.H.: Recognition of the

- Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest*, 2004, **16**: 562-7.
95. -GENOVESI S., LEITA L., SEQUI P., ANDRIGHETTO I., SORGATO M.C. and BERTOLI A.: Direct detection of soil-bound prions. *PLoS One*, 2007, **2**: e1069.
  96. -GEORGSSON G., OLAFSSON E. and GUDMUNDSSON G.: [Scrapie of sheep and Creutzfeldt-Jakob disease in Iceland]. *Laeknabladid*, 2008, **94**: 541-8.
  97. -GEORGSSON G., SIGURDARSON S. and BROWN P.: Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 3737-40.
  98. -GERSTMANN J.: Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wien Med. Wochenschr.*, 1928, **78**: 906-08.
  99. -GERSTMANN J., STRÄUSSLER, E., SCHEINKER, I.: Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Neurol.*, 1936, **154**: 736-62.
  100. -GIBBS C.J., JR., AMYX H.L., BACOTE A., MASTERS C.L. and GAJDUSEK D.C.: Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis*, 1980, **142**: 205-8.
  101. -GIBBS C.J., JR. and GAJDUSEK D.C.: Transmission and characterization of the agents of spongiform virus encephalopathies: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, scrapie and mink encephalopathy. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 1971, **49**: 383-410.
  102. -GIBBS C.J., JR. and GAJDUSEK D.C.: Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Nature*, 1972, **236**: 73-4.
  103. -GIBBS C.J., JR. and GAJDUSEK D.C.: Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science*, 1973, **182**: 67-8.
  104. -GIESE A., BROWN D.R., GROSCHUP M.H., FELDMANN C., HAIST I. and KRETZSCHMAR H.A.: Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol*, 1998, **8**: 449-57.
  105. -GLATZEL M. and AGUZZI A.: PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol*, 2000, **81**: 2813-21.
  106. -GOLDMANN W., HOUSTON F., STEWART P., PERUCCHINI M., FOSTER J. and HUNTER N.: Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 3741-5.
  107. -GOLDMANN W., HUNTER N., FOSTER J.D., SALBAUM J.M., BEYREUTHER K. and HOPE J.: Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, **87**: 2476-80.
  108. -GOLDMANN W., HUNTER N., MARTIN T., DAWSON M. and HOPE J.: Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 201-204.
  109. -GRETZSCHEL A., BUSCHMANN A., LANGEVELD J. and GROSCHUP M.H.: Immunological characterization of abnormal prion protein from atypical scrapie cases in sheep using a panel of monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 3715-22.
  110. -GRIFFITH J.S.: Self-replication and scrapie. *Nature*, 1967, **215**: 1043-4.
  111. -GRIFFITHS P.C., SPIROPOULOS J., LOCKEY R., TOUT A.C., JAYASENA D., PLATER J.M., CHAVE A., GREEN R.B., SIMONINI S., THORNE L., DEXTER I., BALKEMA-BUSCHMANN A., GROSCHUP M.H., BERINGUE V., LE DUR A., LAUDE H. and HOPE J.: Characterisation of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol*.
  112. -GROSCHUP M.H., LACROUX C., BUSCHMANN A., LUHKEN G., MATHEY J., EIDEN M., LUGAN S., HOFFMANN C., ESPINOSA J.C., BARON T., TORRES

- J.M., ERHARDT G. and ANDREOLETTI O.: Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect Dis*, 2007, **13**: 1201-7.
113. -GUO X., KUPFER D.M., FITCH G.Q., ROE B.A. and DESILVA U.: Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP ) gene. *Anim Genet*, 2003, **34**: 303-5.
114. -HADLOW W.J., KENNEDY R.C. and RACE R.E.: Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis*, 1982, **146**: 657-64.
115. -HARDER A., JENDROSKA K., KREUZ F., WIRTH T., SCHAFRANKA C., KARNATZ N., THEALLIER-JANKO A., DREIER J., LOHAN K., EMMERICH D., CERVOS-NAVARRO J., WINDL O., KRETZSCHMAR H.A., NURNBERG P. and WITKOWSKI R.: Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet*, 1999, **87**: 311-6.
116. -HARRIS D.A.: Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1999, **12**: 429-44.
117. -HARRIS D.A., HUBER M.T., VAN DIJKEN P., SHYNG S.L., CHAIT B.T. and WANG R.: Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C- terminal cleavage sites. *Biochemistry*, 1993, **32**: 1009-16.
118. -HARRIS D.A., LELE P. and SNIDER W.D.: Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**: 4309-13.
119. -HEGGEBO R., GONZALEZ L., PRESS C.M., GUNNES G., ESPENES A. and JEFFREY M.: Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 2003, **84**: 1327-38.
120. -HEGGEBO R., PRESS C.M., GUNNES G., GONZALEZ L. and JEFFREY M.: Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 479-89.
121. -HEGGEBO R., PRESS C.M., GUNNES G., LIE K.I., TRANULIS M.A., ULVUND M., GROSCHUP M.H. and LANDSVERK T.: Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, 2000, **81 Pt 9**: 2327-37.
122. -HEPPNER F.L., CHRIST A.D., KLEIN M.A., PRINZ M., FRIED M., KRAEHNBUHL J.P. and AGUZZI A.: Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, 2001, **7**: 976-7.
123. -HERZOG C., RIVIERE J., LESCOUTRA-ETCHEGARAY N., CHARBONNIER A., LEBLANC V., SALES N., DESLYS J.P. and LASMEZAS C.I.: PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 2005, **79**: 14339-45.
124. -HILL A.F., DESBRUSLAIS M., JOINER S., SIDLE K.C., GOWLAND I., COLLINGE J., DOEY L.J. and LANTOS P.: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389**: 448-50, 526.
125. -HOFFMANN C., ZIEGLER U., BUSCHMANN A., WEBER A., KUPFER L., OELSCHLEGEL A., HAMMERSCHMIDT B. and GROSCHUP M.H.: Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 2007, **88**: 1048-55.
126. -HOPP P., OMER M.K. and HEIER B.T.: A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 3729-36.
127. -HOPP P., ULVUND M.J. and JARP J.: A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Prev Vet Med*, 2001, **51**: 183-98.

128. -HORNSHAW M.P., MCDERMOTT J.R. and CANDY J.M.: Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **207**: 621-9.
129. -HOURRIGAN J.L.: The scrapie control program in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 1990, **196**: 1679.
130. -HOURRIGAN J.L., KLINGSPORN A.L., MCDANIEL H.A. and RIEMENSCHNEIDER M.N.: Natural scrapie in a goat. *J Am Vet Med Assoc*, 1969, **154**: 538-9.
131. -HOUSTON F., GOLDMANN W., CHONG A., JEFFREY M., GONZALEZ L., FOSTER J., PARNHAM D. and HUNTER N.: Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 2003, **423**: 498.
132. -HUANG F.P., FARQUHAR C.F., MABBOTT N.A., BRUCE M.E. and MACPHERSON G.G.: Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 267-71.
133. -HUNTER N., FOSTER J., CHONG A., MCCUTCHEON S., PARNHAM D., EATON S., MACKENZIE C. and HOUSTON F.: Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, 2002, **83**: 2897-905.
134. -HUNTER N., FOSTER J.D., BENSON G. and HOPE J.: Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep. *J Gen Virol*, 1991, **72**: 1287-92.
135. -HUNTER N., FOSTER J.D., DICKINSON A.G. and HOPE J.: Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Vet Rec*, 1989, **124**: 364-6.
136. -HUNTER N., FOSTER J.D., GOLDMANN W., STEAR M.J., HOPE J. and BOSTOCK C.: Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, 1996, **141**: 809-24.
137. -HUNTER N., GOLDMANN W., FOSTER J.D., CAIRNS D. and SMITH G.: Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet Rec*, 1997, **141**: 137-40.
138. -IKEDA T., HORIUCHI M., ISHIGURO N., MURAMATSU Y., KAI-UWE G.D. and SHINAGAWA M.: Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J Gen Virol*, 1995, **76**: 2577-81.
139. -JACKSON W.S., BORKOWSKI A.W., FAAS H., STEELE A.D., KING O.D., WATSON N., JASANOFF A. and LINDQUIST S.: Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron*, 2009, **63**: 438-50.
140. -JEFFREY M., BEGARA-MCGORUM I., CLARK S., MARTIN S., CLARK J., CHAPLIN M. and GONZALEZ L.: Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol*, 2002, **127**: 264-73.
141. -JEFFREY M., HALLIDAY W.G. and GOODSIR C.M.: A morphometric and immunohistochemical study of the vestibular nuclear complex in bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathol*, 1992, **84**: 651-7.
142. -JEFFREY M., MARTIN S., THOMSON J.R., DINGWALL W.S., BEGARA-MCGORUM I. and GONZALEZ L.: Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, 2001, **125**: 48-57.
143. -JEFFREY M., RYDER S., MARTIN S., HAWKINS S.A., TERRY L., BERTHELIN-BAKER C. and BELLWORTHY S.J.: Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol*, 2001, **124**: 280-9.

144. -JOHNSON C.J., PEDERSEN J.A., CHAPPELL R.J., MCKENZIE D. and AIKEN J.M.: Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles. *PLoS Pathog*, 2007, **3**: e93.
145. -JOHNSON C.J., PHILLIPS K.E., SCHRAMM P.T., MCKENZIE D., AIKEN J.M. and PEDERSEN J.A.: Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog*, 2006, **2**: e32.
146. -KAPASI Z.F., QIN D., KERR W.G., KOSCO-VILBOIS M.H., SHULTZ L.D., TEW J.G. and SZAKAL A.K.: Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol*, 1998, **160**: 1078-84.
147. -KIMBERLIN R.H., COLE S. and WALKER C.A.: Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*, 1987, **68**: 1875-81.
148. -KIMBERLIN R.H. and WALKER C.A.: Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol*, 1978, **39**: 487-96.
149. -KIMBERLIN R.H. and WALKER C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol*, 1980, **51**: 183-7.
150. -KIMBERLIN R.H., WALKER C.A. and FRASER H.: The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, 1989, **70**: 2017-25.
151. -KIMBERLIN R.H., WALKER C.A., MILLSON G.C., TAYLOR D.M., ROBERTSON P.A., TOMLINSON A.H. and DICKINSON A.G.: Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci*, 1983, **59**: 355-69.
152. -KLEIN M.A., KAESER P.S., SCHWARZ P., WEYD H., XENARIOS I., ZINKERNAGEL R.M., CARROLL M.C., VERBEEK J.S., BOTTO M., WALPORT M.J., MOLINA H., KALINKE U., ACHA-ORBEA H. and AGUZZI A.: Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, 2001, **7**: 488-92.
153. -KLINGEBORN M., WIK L., SIMONSSON M., RENSTROM L.H., OTTINGER T. and LINNE T.: Characterization of proteinase K-resistant N- and C-terminally truncated PrP in Nor98 atypical scrapie. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 1751-60.
154. -KONG Q., ZHENG M., CASALONE C., QING L., HUANG S., CHAKRABORTY B., WANG P., CHEN F., CALI I., CORONA C., MARTUCCI F., IULINI B., ACUTIS P., WANG L., LIANG J., WANG M., LI X., MONACO S., ZANUSSO G., ZOU W.Q., CAMELLI M. and GAMBETTI P.: Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virol*, 2008, **82**: 3697-701.
155. -KONOLD T., DAVIS A., BONE G., BRACEGIRDLE J., EVERITT S., CHAPLIN M., SAUNDERS G.C., CAWTHRAW S. and SIMMONS M.M.: Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res*, 2007, **3**: 2.
156. -KONOLD T., DAVIS A., BONE G.E., SIMMONS M.M., KAHN J., BLAKE-DYKE M.C., BRACEGIRDLE J. and SHIMWELL C.J.: Atypical scrapie cases in the UK. *Vet Rec*, 2006, **158**: 280.
157. -KONOLD T., MOORE S.J., BELLWORTHY S.J. and SIMMONS H.A.: Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res*, 2008, **4**: 14.
158. -KRAEHENBUHL J.P. and NEUTRA M.R.: Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, **16**: 301-32.
159. -LACROUX C., SIMON S., BENESTAD S.L., MAILLET S., MATHEY J., LUGAN S., CORBIERE F., CASSARD H., COSTES P., BERGONIER D., WEISBECKER J.L., MOLDAL T., SIMMONS H., LANTIER F., FERAUDET-TARISSE C., MOREL N.,

- SCHELCHER F., GRASSI J. and ANDREOLETTI O.: Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, 2008, **4**: e1000238.
160. -LADOGANA A., PUOPOLO M., CROES E.A., BUDKA H., JARIUS C., COLLINS S., KLUG G.M., SUTCLIFFE T., GIULIVI A., ALPEROVITCH A., DELASNERIE-LAUPRETRE N., BRANDEL J.P., POSER S., KRETZSCHMAR H., RIETVELD I., MITROVA E., CUESTA JDE P., MARTINEZ-MARTIN P., GLATZEL M., AGUZZI A., KNIGHT R., WARD H., POCCHIARI M., VAN DUIJN C.M., WILL R.G. and ZERR I.: Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, 2005, **64**: 1586-91.
161. -LAMPERT P.W., GAJDUSEK D.C. and GIBBS C.J., JR.: Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. *Am J Pathol*, 1972, **68**: 626-52.
162. -LANGEVELD J.P., JACOBS J.G., ERKENS J.H., BOSSERS A., VAN ZIJDERVELD F.G. and VAN KEULEN L.J.: Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*, 2006, **2**: 19.
163. -LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., LAUNAY J.M., BRANDEL J.P. and DELASNERIE-LAUPRETRE N.: Inherited prion disease. *Bmj*, 1993, **306**: 794-5.
164. -LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., WESTAWAY D., THOMAS S., DUSSAUCY M., BRUGERE-PICOUX J. and LAUNAY J.M.: PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 1993, **15**: 30-7.
165. -LASMEZAS C.I., COMOY E., HAWKINS S., HERZOG C., MOUTHON F., KONOLD T., AUVRE F., CORREIA E., LESCOUTRA-ETCHEGARAY N., SALES N., WELLS G., BROWN P. and DESLYS J.P.: Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet*, 2005, **365**: 781-3.
166. -LASMEZAS C.I., DESLYS J.P., DEMAIMAY R., ADJOU K.T., LAMOURY F., DORMONT D., ROBAIN O., IRONSIDE J. and HAUW J.J.: BSE transmission to macaques. *Nature*, 1996, **381**: 743-4.
167. -LASMEZAS C.I., FOURNIER J.G., NOUVEL V., BOE H., MARCE D., LAMOURY F., KOPP N., HAUW J.J., IRONSIDE J., BRUCE M., DORMONT D. and DESLYS J.P.: Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-- Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 4142-7.
168. -LE DUR A., BERINGUE V., ANDREOLETTI O., REINE F., LAI T.L., BARON T., BRATBERG B., VILOTTE J.L., SARRADIN P., BENESTAD S.L. and LAUDE H.: A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**: 16031-6.
169. -LIBERSKI P.P., BROWN P., XIAO S.Y. and GAJDUSEK D.C.: The ultrastructural diversity of scrapie-associated fibrils isolated from experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Comp Pathol*, 1991, **105**: 377-86.
170. -LIBERSKI P.P., PLUCIENNICZAK A., HRABEC E. and BOGUCKI A.: Isolation and purification of scrapie-associated fibrils and prion protein from scrapie-infected hamster brain. *J Comp Pathol*, 1989, **100**: 177-85.
171. -LIGIOS C., CANCEDDA M.G., MADAU L., SANTUCCIU C., MAESTRALE C., AGRIMI U., RU G. and DI GUARDO G.: 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**: 2007-20.
172. -LUBICK N.: Prions in soil. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**: 669-70.

173. -LUHKEN G., BUSCHMANN A., BRANDT H., EIDEN M., GROSCHUP M.H. and ERHARDT G.: Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*, 2007, **38**: 65-80.
174. -LUHKEN G., BUSCHMANN A., GROSCHUP M.H. and ERHARDT G.: Prion protein allele A136 H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch Virol*, 2004, **149**: 1571-80.
175. -MA X., BENSON C.H., MCKENZIE D., AIKEN J.M. and PEDERSEN J.A.: Adsorption of pathogenic prion protein to quartz sand. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**: 2324-30.
176. -MABBOTT N.A., BRUCE M.E., BOTTO M., WALPORT M.J. and PEPYS M.B.: Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, 2001, **7**: 485-7.
177. -MABBOTT N.A., MACKAY F., MINNS F. and BRUCE M.E.: Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, 2000, **6**: 719-20.
178. -MABBOTT N.A., MCGOVERN G., JEFFREY M. and BRUCE M.E.: Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol*, 2002, **76**: 5131-9.
179. -MAKARAVA N., KOVACS G.G., BOCHAROVA O., SAVTCHENKO R., ALEXEEVA I., BUDKA H., ROHWER R.G. and BASKAKOV I.V.: Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol*, **119**: 177-87.
180. -MANSON J.C., CLARKE A.R., HOOPER M.L., AITCHISON L., MCCONNELL I. and HOPE J.: 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, 1994, **8**: 121-7.
181. -MASTERS C.L., GAJDUSEK D.C. and GIBBS C.J., JR.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann- Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, 1981, **104**: 559-88.
182. -MASTERS C.L., HARRIS J.O., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J., JR., BERNOULLI C. and ASHER D.M.: Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol*, 1979, **5**: 177-88.
183. -MCBRIDE P.A., EIKELBOOM P., KRAAL G., FRASER H. and BRUCE M.E.: PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, 1992, **168**: 413-8.
184. -MCINTYRE K.M., DEL RIO VILAS V.J. and GUBBINS S.: No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. *BMC Vet Res*, 2008, **4**: 13.
185. -MEDORI R., TRITSCHLER H.J., LEBLANC A., VILLARE F., MANETTO V., CHEN H.Y., XUE R., LEAL S., MONTAGNA P., CORTELLI P. and ET AL.: Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 1992, **326**: 444-9.
186. -MERZ P.A., KASCSAK R.J., RUBENSTEIN R., CARP R.I. and WISNIEWSKI H.M.: Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils. *J Virol*, 1987, **61**: 42-9.
187. -MERZ P.A., ROHWER R.G., KASCSAK R., WISNIEWSKI H.M., SOMERVILLE R.A., GIBBS C.J., JR. and GAJDUSEK D.C.: Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science*, 1984, **225**: 437-40.
188. -MERZ P.A., SOMERVILLE R.A., WISNIEWSKI H.M. and IQBAL K.: Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1981, **54**: 63-74.

189. -MEYER R.K., MCKINLEY M.P., BOWMAN K.A., BRAUNFELD M.B., BARRY R.A. and PRUSINER S.B.: Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**: 2310-4.
190. -MOORE S.J., SIMMONS M., CHAPLIN M. and SPIROPOULOS J.: Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathol*, 2008, **116**: 547-59.
191. -MORENO C.R., LANTIER F., LANTIER I., SARRADIN P. and ELSESEN J.M.: Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, 2003, **165**: 2085-91.
192. -MORENO C.R., MOAZAMI-GOUDARZI K., LAURENT P., CAZEAU G., ANDREOLETTI O., CHADI S., ELSESEN J.M. and CALAVAS D.: Which PrP haplotypes in a French sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Arch Virol*, 2007, **152**: 1229-32.
193. -MOUDJOU M., FROBERT Y., GRASSI J. and LA BONNARDIERE C.: Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol*, 2001, **82**: 2017-24.
194. -MOUM T., OLSAKER I., HOPP P., MOLDAL T., VALHEIM M., MOUM T. and BENESTAD S.L.: Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*, 2005, **86**: 231-5.
195. -MURAMOTO T., M. SCOTT, F. E. COHEN, AND S. B. PRUSINER: Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**: 15457-15462.
196. -NENTWIG A., OEVERMANN A., HEIM D., BOTTERON C., ZELLWEGER K., DROGEMULLER C., ZURBRIGGEN A. and SEUBERLICH T.: Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog*, 2007, **3**: e82.
197. -NONNO R., DI BARI M.A., CARDONE F., VACCARI G., FAZZI P., DELL'OMO G., CARTONI C., INGROSSO L., BOYLE A., GALENO R., SBRICCOLI M., LIPP H.P., BRUCE M., POCCHIARI M. and AGRIMI U.: Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog*, 2006, **2**: e12.
198. -O'ROURKE K.I., BASZLER T.V., BESSER T.E., MILLER J.M., CUTLIP R.C., WELLS G.A., RYDER S.J., PARISH S.M., HAMIR A.N., COCKETT N.E., JENNY A. and KNOWLES D.P.: Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**: 3254-9.
199. -OESCH B., WESTAWAY D., WALCHLI M., MCKINLEY M.P., KENT S.B., AEBERSOLD R., BARRY R.A., TEMPST P., TEPLow D.B., HOOD L.E. and ET AL.: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 1985, **40**: 735-46.
200. -ONNASCH H., GUNN H.M., BRADSHAW B.J., BENESTAD S.L. and BASSETT H.F.: Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec*, 2004, **155**: 636-7.
201. -ORGE L., GALO A., MACHADO C., LIMA C., OCHOA C., SILVA J., RAMOS M. and SIMAS J.P.: Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol*, 2004, **85**: 3487-91.
202. -PALMER M.S., DRYDEN A.J., HUGHES J.T. and COLLINGE J.: Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt- Jakob disease. *Nature*, 1991, **352**: 340-2.
203. -PAN K.M., BALDWIN M., NGUYEN J., GASSET M., SERBAN A., GROTH D., MEHLHORN I., HUANG Z., FLETTERICK R.J., COHEN F.E. and ET AL.: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**: 10962-6.

204. -PATTISON I.H.: Transmission of scrapie to the goat. *Lancet*, 1957, **272**: 104-5.
205. -PATTISON I.H.: Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec*, 1965, **77**: 1388-90.
206. -PETERSEN R.B., GOLDFARB L.G., TABATON M., BROWN P., MONARI L., CORTELLI P., MONTAGNA P., AUTILIO-GAMBETTI L., GAJDUSEK D.C., LUGARESI E. and ET AL.: A novel mechanism of phenotypic heterogeneity demonstrated by the effect of a polymorphism on a pathogenic mutation in the PRNP (prion protein gene). *Mol Neurobiol*, 1994, **8**: 99-103.
207. -PRINZ M., MONTRASIO F., KLEIN M.A., SCHWARZ P., PRILLER J., ODERMATT B., PFEFFER K. and AGUZZI A.: Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **15**: 15.
208. -PRUSINER S.B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216**: 136-44.
209. -PRUSINER S.B. and DEARMOND S.J.: Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans. *Brain Pathol*, 1991, **1**: 297-310.
210. -PRUSINER S.B., MCKINLEY M.P., BOWMAN K.A., BOLTON D.C., BENDHEIM P.E., GROTH D.F. and GLENNER G.G.: Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 1983, **35**: 349-58.
211. -PUCCI A., D'ACQUI L.P. and CALAMAI L.: Fate of prions in soil: interactions of RecPrP with organic matter of soil aggregates as revealed by LTA-PAS. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**: 728-33.
212. -RACE R., JENNY A. and SUTTON D.: Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis*, 1998, **178**: 949-53.
213. -RECKZEH C., HOFFMANN C., BUSCHMANN A., BUDA S., BUDRAS K.D., RECKLING K.F., BELLMANN S., KNOBLOCH H., ERHARDT G., FRIES R. and GROSCHUP M.H.: Rapid testing leads to the underestimation of the scrapie prevalence in an affected sheep and goat flock. *Vet Microbiol*, 2007, **123**: 320-7.
214. -REVAULT M., QUIQUAMPOIX H., BARON M.H. and NOINVILLE S.: Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1724**: 367-74.
215. -RICHT J.A., KASINATHAN P., HAMIR A.N., CASTILLA J., SATHIYASEELAN T., VARGAS F., SATHIYASEELAN J., WU H., MATSUSHITA H., KOSTER J., KATO S., ISHIDA I., SOTO C., ROBL J.M. and KUROIWA Y.: Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**: 132-8.
216. -RIGOU P., REZAEI H., GROSCLAUDE J., STAUNTON S. and QUIQUAMPOIX H.: Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**: 1497-503.
217. -ROELS S., VANOPDENBOSCH E., LANGEVELD J.P. and SCHREUDER B.E.: Immunohistochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. *Vet Rec*, 1999, **145**: 524-5.
218. -RYDER S.J., SPENCER Y.I., BELLERBY P.J. and MARCH S.A.: Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec*, 2001, **148**: 7-13.
219. -SAUNDERS G.C., CAWTHRAW S., MOUNTJOY S.J., HOPE J. and WINDL O.: PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 3141-9.
220. -SAUNDERS G.C., LANTIER I., CAWTHRAW S., BERTHON P., MOORE S.J., ARNOLD M.E., WINDL O., SIMMONS M.M., ANDREOLETTI O.,

- BELLWORTHY S. and LANTIER F.: Protective effect of the T112 PrP variant in sheep challenged with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 2009, **90**: 2569-74.
221. -SAUNDERS S.E., BARTZ J.C., TELLING G.C. and BARTELT-HUNT S.L.: Environmentally-relevant forms of the prion protein. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**: 6573-9.
222. -SCOTT M., FOSTER D., MIRENDA C., SERBAN D., COUFAL F., WALCHLI M., TORCHIA M., GROTH D., CARLSON G., DEARMOND S.J. and ET AL.: Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species- specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, 1989, **59**: 847-57.
223. -SCOTT M., WILL R., IRONSIDE J., NGUYEN H., TREMBLAY P., DEARMOND S. and PRUSINER S.: Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**: 15137-42.
224. -SIGURDSON C.J., NILSSON K.P., HORNEMANN S., HEIKENWALDER M., MANCO G., SCHWARZ P., OTT D., RULICKE T., LIBERSKI P.P., JULIUS C., FALSIG J., STITZ L., WUTHRICH K. and AGUZZI A.: De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**: 304-9.
225. -SIMMONS H.A., SIMMONS M.M., SPENCER Y.I., CHAPLIN M.J., POVEY G., DAVIS A., ORTIZ-PELAEZ A., HUNTER N., MATTHEWS D. and WRATHALL A.E.: Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie. *BMC Vet Res*, 2009, **5**: 8.
226. -SIMMONS M.M., KONOLD T., SIMMONS H.A., SPENCER Y.I., LOCKEY R., SPIROPOULOS J., EVERITT S. and CLIFFORD D.: Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res*, 2007, **3**: 20.
227. -SIMMONS M.M., KONOLD T., THURSTON L., BELLWORTHY S.J., CHAPLIN M.J. and MOORE S.J.: The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res*, **6**: 14.
228. -STACK M., GONZALEZ L., JEFFREY M., MARTIN S., MACALDOWIE C., CHAPLIN M., THORNE J., SAYERS R., DAVIS L., BRAMWELL J., GRIMMER S. and BELLWORTHY S.: Three serial passages of bovine spongiform encephalopathy in sheep do not significantly affect discriminatory test results. *J Gen Virol*, 2009, **90**: 764-8.
229. -STACK M., JEFFREY M., GUBBINS S., GRIMMER S., GONZALEZ L., MARTIN S., CHAPLIN M., WEBB P., SIMMONS M., SPENCER Y., BELLERBY P., HOPE J., WILESMITH J. and MATTHEWS D.: Monitoring for bovine spongiform encephalopathy in sheep in Great Britain, 1998-2004. *J Gen Virol*, 2006, **87**: 2099-107.
230. -SWEENEY T. and HANRAHAN J.P.: The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. *Vet Res*, 2008, **39**: 28.
231. -TELLING G.C., SCOTT M., MASTRIANNI J., GABIZON R., TORCHIA M., COHEN F.E., DEARMOND S.J. and PRUSINER S.B.: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995, **83**: 79-90.
232. -THOMZIG A., KRATZEL C., LENZ G., KRUGER D. and BEEKES M.: Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep*, 2003, **4**: 530-3.

233. -THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., THORISSON H.M., GEORGSSON G. and PALSDOTTIR A.: PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol*, 1999, **80**: 2527-34.
234. -TKACHUK M., BOLLIGER S., RYFFEL B., PLUSCHKE G., BANKS T.A., HERREN S., GISLER R.H. and KOSCO-VILBOIS M.H.: Crucial role of tumor necrosis factor receptor 1 expression on nonhematopoietic cells for B cell localization within the splenic white pulp. *J Exp Med*, 1998, **187**: 469-77.
235. -TRANULIS M.A.: Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. *Apmis*, 2002, **110**: 33-43.
236. -TUO W., O'ROURKE K.I., ZHUANG D., CHEEVERS W.P., SPRAKER T.R. and KNOWLES D.P.: Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**: 6310-5.
237. -VACCARI G., SCAVIA G., SALA M., COSSEDDU G., CHIAPPINI B., CONTE M., ESPOSITO E., LORENZETTI R., PERFETTI G., MARCONI P., SCHOLL F., BARBARO K., BELLA A., NONNO R. and AGRIMI U.: Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP allele against classical scrapie in Sarda breed sheep. *Vet Res*, 2009, **40**: 19.
238. -VAN DUIJN C.M., DELASNERIE-LAUPRETRE N., MASULLO C., ZERR I., DE SILVA R., WIENTJENS D.P., BRANDEL J.P., WEBER T., BONAVITA V., ZEIDLER M., ALPEROVITCH A., POSER S., GRANIERI E., HOFMAN A. and WILL R.G.: Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet*, 1998, **351**: 1081-5.
239. -VAN KEULEN L.J., SCHREUDER B.E., MELOEN R.H., MOOIJ-HARKES G., VROMANS M.E. and LANGEVELD J.P.: Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, 1996, **34**: 1228-31.
240. -VAN KEULEN L.J., SCHREUDER B.E., VROMANS M.E., LANGEVELD J.P. and SMITS M.A.: Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol*, 1999, **121**: 55-63.
241. -VAN KEULEN L.J., SCHREUDER B.E., VROMANS M.E., LANGEVELD J.P. and SMITS M.A.: Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*, 2000, **16**: 57-71.
242. -VAN KEULEN L.J., VROMANS M.E., DOLSTRA C.H., BOSSERS A. and VAN ZIJDERVELD F.G.: Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol*, 2008, **153**: 445-53.
243. -VAN KEULEN L.J., VROMANS M.E. and VAN ZIJDERVELD F.G.: Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis*, 2002, **110**: 23-32.
244. -VASCELLARI M., AUFIERO G.M., NONNO R., AGRIMI U., VACCARI G., BASILICATA L., FALCARO C., MANCIN M., MARCON S. and MUTINELLI F.: Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. *Arch Virol*, 2005, **150**: 1959-76.
245. -VIDAL E., TORTOSA R., COSTA C., BENAVIDES J., FRANCINO O., SANCHEZ-ROBERT E., PEREZ V. and PUMAROLA M.: Lack of PrP(sc) immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: a case report. *Vet J*, 2008, **177**: 283-8.
246. -VILOTTE J.L., SOULIER S., ESSALMANI R., STINNAKRE M.G., VAIMAN D., LEPOURRY L., DA SILVA J.C., BESNARD N., DAWSON M., BUSCHMANN A.,

- GROSCUP M., PETIT S., MADELAINE M.F., RAKATOBE S., LE DUR A., VILETTE D. and LAUDE H.: Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol*, 2001, **75**: 5977-84.
247. -VORBERG I. and PRIOLA S.A.: Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J Biol Chem*, 2002, **23**: 23.
248. -WARNER R.G., MORRIS D. and DAWSON M.: PrP genotype progression in flocks participating in the National Scrapie Plan for Great Britain. *Vet Rec*, 2006, **159**: 473-9.
249. -WELLS G.A., KONOLD T., ARNOLD M.E., AUSTIN A.R., HAWKINS S.A., STACK M., SIMMONS M.M., LEE Y.H., GAVIER-WIDEN D., DAWSON M. and WILESMITH J.W.: Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J Gen Virol*, 2007, **88**: 1363-73.
250. -WIGGINS R.C.: Prion stability and infectivity in the environment. *Neurochem Res*, 2009, **34**: 158-68.
251. -WOOD J.L. and DONE S.H.: Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec*, 1992, **131**: 93-6.

Toulouse, 2010

NOM : MERCIER

Prénom : Sébastien

TITRE : EMERGENCE ET RISQUES SANITAIRES ASSOCIES A LA TREMBLANTE ATYPIQUE OVINE

RESUME :

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST ou « maladies à prions ») sont des maladies neurodégénératives affectant de nombreuses espèces de Mammifères, dont l'archétype est la tremblante des ovins. Ces maladies sont dues à la transconformation d'une protéine cellulaire (PrPc), codée par le gène PRNP, en une isoforme anormale (PrPSc) s'accumulant dans les tissus des individus atteints (système nerveux central notamment). Il est désormais admis que cette protéine anormale représente l'agent responsable de ces maladies. Décrite en 1998 en Norvège, la tremblante « atypique » des ovins constitue une nouvelle forme d'EST dont de nombreuses caractéristiques restent encore méconnues. Elle semble affecter préférentiellement des animaux de génotypes considérés jusqu'alors comme résistants aux EST. Cette caractéristique pourrait remettre en question la politique actuelle de sélection génétique mise en place à l'échelle européenne pour contrôler et éradiquer les maladies à prions dans l'espèce ovine. La question du risque que représente l'exposition à ce nouvel agent pour l'homme et les autres espèces animales demeure entière.

MOTS-CLES : tremblante atypique, ovins, encéphalopathies spongiformes transmissibles, risques sanitaires, lutte génétique

---

ENGLISH TITLE: EMERGENCE AND SANITARY RISKS OF THE OVINE ATYPICAL SCRAPIE

ABSTRACT:

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE or prion diseases) are neurodegenerative diseases reported in a large panel of mammal species, including sheep (scrapie). TSE are caused by the conversion of a cellular protein (PrPc), encoded by the PRNP gene, into an abnormal isoform (PrPSc), which accumulates in the tissues of the affected hosts (central nervous system in particular). It is now widely recognized that PrPSc is the causal agent of TSE.

The ovine atypical scrapie was first described in 1998 in Norway. Its characteristics, including pathogenesis and host tropism, remain mostly undocumented. Atypical scrapie can affect individuals bearing genotypes that were considered to be resistant to TSE. This feature could jeopardize the current European breeding for resistance policy that aims at controlling and eradicating prion diseases in sheep. Moreover, the risk for human and animal species that dietary exposure to atypical scrapie may represent is unknown.

KEYWORDS: atypical scrapie, sheep, transmissible spongiform encephalopathies, sanitary risks, genetic control