

Le point sur l'épidémiologie et la physiopathologie des encéphalopathies spongiformes des ruminants

Pierre SARRADIN, Patricia BERTHON, Frédéric LANTIER

Pathologie Infectieuse et immunologie, INRA, 37380 Nouzilly

Résumé

L'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) résulte de la consommation par les bovins de farines de viandes et d'os contaminées. En recyclant l'agent infectieux, ces farines ont permis d'amplifier la dissémination d'une maladie dont l'origine et l'agent responsable demeurent inconnus. Les hypothèses sur la nature protéique ou/et virale de l'agent sont évoquées, ainsi que l'éventualité d'une transmission à l'homme. Une grande partie de nos connaissances des encéphalopathies spongiformes résulte des études réalisées de longue date sur la Tremblante des ovins. En particulier, l'idée que l'on peut se faire de la physiopathologie de l'infection des bovins est en grande partie extrapolée à partir du résultat d'infections expérimentales réalisées chez le mouton. Toutefois, la contamination des tissus lymphoïdes périphériques qui est la règle au cours de la phase de dissémination dans l'organisme de l'agent de la Tremblante, semble absente dans le cas de la maladie bovine. Il est donc possible que ce type de tissus, considéré comme infectieux en matière de Tremblante, le soit peu au cours de la phase préclinique dans le cas de l'ESB. L'atteinte du système nerveux central des bovins pourrait alors résulter d'une dissémination empruntant les voies nerveuses.

Les mécanismes conduisant à la mort neuronale responsable des symptômes observés restent mal connus. La protéine PrP, protéine normale de la membrane de nombreux types cellulaires, et qui s'accumule sous sa forme pathologique PrP^{SC} au niveau des lésions est indispensable au processus pathologique. Son polymorphisme influence considérablement le devenir de l'infection, mais elle ne peut être tenue pour seule responsable de la transmission de la maladie.

Introduction

L'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en Grande Bretagne, puis l'hypothèse de sa transmission à l'homme ont relancé l'intérêt du grand public, du monde politique, et des scientifiques pour les encéphalopathies spongiformes en général, et pour celle des ruminants en particulier. Quelques laboratoires, dont celui de D. Dormont en France, de Prusiner en Californie, et les équipes de Compton, Weybridge et Edinburgh au Royaume-Uni, avaient pourtant entrepris de longue date un effort de recherche particulier dans ce domaine étant donné l'intérêt médical, vétérinaire et scientifique de ces maladies.

La tremblante du mouton (Scrapie en anglais) a été décrite en France il y a plus de deux siècles et demi. C'est une maladie naturelle des ovins et des caprins. Comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) chez l'homme, ou l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), elle appartient au groupe des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST).

Année 3R 1996

331-344
~~331-344~~
~~331-344~~

I. Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles

Un ensemble de maladies aux caractères communs

Cette dénomination regroupe un ensemble de maladies touchant l'homme et l'animal et ayant en commun un certain nombre de caractères : longueur de la période d'incubation, lésions spongiformes de l'encéphale se traduisant par des symptômes nerveux (troubles de la mémoire et du sommeil, ataxie, démence), caractère fatal inéluctable une fois les signes cliniques apparus (Kimberlin, 1990 ; Dormont, 1995). Mais c'est la possibilité de transmission d'une espèce à l'autre, au moins expérimentalement, qui distinguent les ESST des autres encéphalopathies, et en particulier chez l'homme, de la maladie d'Alzheimer.

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) des animaux comprennent la Tremblante des ovins et des caprins (ou Scrapie, de *to scrap*, gratter), et les encéphalopathies spongiformes des bovins (ESB), des ruminants sauvages (daim, cervidés), du vison et des félins (chat, tigre).

La nature de l'agent (ou des agents) responsable des ESST n'a pas été élucidée, d'où l'emploi fréquent du terme ATNC (pour agent transmissible non conventionnel). Dans les tissus infectés, il est remarquablement résistant à la chaleur, aux agents classiques de décontamination chimique ou physique, ainsi qu'aux radiations. Une glycoprotéine présente à la surface des neurones, mais aussi de nombreux autres types cellulaires (Cashman et al, 1990) , la PrP^C (pour Cellulaire) est impliquée dans le développement des ESST (Prusiner , 1982 ; Caughey et al, 1988). En effet, une forme anormale de cette protéine, la PrP^{SC} (pour Scrapie), également notée PrPres (pour résistante aux protéases) s'accumule dans le cerveau des individus affectés.

Les agents transmissibles non conventionnels (ATNC)

L'hypothèse du Prion, développée par Stanley Prusiner, suppose que la protéine PrP^{SC} est elle même infectieuse (Prusiner et al, 1982). La recherche d'arguments en faveur de cette hypothèse s'est avérée extrêmement fructueuse. En particulier, la mise au point de souris dont le gène PRNP (codant pour la protéine PrP) a été invalidé (souris "knock out"), puis de souris transgéniques dans lesquelles ont été introduits soit le gène d'origine (souris "reconstituées"), soit le gène PrP d'une autre espèce (gène de hamster, humain ou bovin), a permis de caractériser le phénomène de "barrière d'espèce" : la transmission expérimentale de la maladie est d'autant plus aisée qu'il y a compatibilité entre l'espèce d'origine de l'agent infectieux et le gène PRNP de l'hôte (Dormont, 1995). Ainsi des souris dont le gène PRNP a été invalidé, puis "remplacé" par transgénèse par le gène du hamster sont beaucoup plus facilement infectées par une souche adaptée au hamster qu'elles ne le sont par une souche de souris.

Mais ces travaux n'ont pas à l'heure actuelle permis de démontrer que la protéine PrP est à elle seule responsable de la transmission de l'infection. Un second élément moléculaire est indispensable pour expliquer plusieurs aspects de la physiologie cellulaire de la protéine PrP. Ce deuxième élément pourrait être également de nature protéique, mais il pourrait aussi s'agir d'un acide nucléique comme le suggère de longue date l'hypothèse britannique du *virino* (Dickinson et al, 1988), c'est à dire d'un acide nucléique de petite taille associé à une protéine qui pourrait être la PrP. Les hypothèses

faisant appel à un virus plus classique, ou à un rétrovirus, ne sont néanmoins pas exclues. Quelle que soit l'hypothèse retenue, elle devra expliquer le phénomène des "souches".

Le concept de "souche"

Une variabilité des signes cliniques, des lésions induites, et de la durée d'incubation et d'expression des encéphalopathies spongiformes a en effet été décrite dès les premières observations publiées. Cette variabilité peut avoir deux origines, l'agent pathogène et l'hôte. Un effet de la "souche" de l'agent de la Tremblante sur tous ces critères a été reconnu il y a plus de trente ans et largement démontré depuis (Bruce et Fraser, 1991 ; Bruce et al, 1994).

En l'absence d'agent pathogène identifié, le résultat de l'inoculation à des souris selon un protocole bien codifié d'un broyât de tissu infecté permet de différencier les isolats de tremblante les uns des autres en utilisant comme critères :

- 1) le délai d'apparition des signes cliniques (durée d'incubation)
- 2) le siège et la nature des lésions du système nerveux central (profil lésionnel).

Une équipe d'Edinburgh a montré que ces deux critères appliqués à plusieurs lignées de souris de laboratoire à " durée d'incubation courte ou longue " permettent de constituer une véritable carte d'identité des souches de Tremblante ou d'autres ESST. Lorsque ce typage "in vivo" a été appliqué à des isolats d'ESB (ou à des isolats provenant de chats, d'antilope des zoos de Londres ou d'animaux domestiques infectés expérimentalement par l'agent de l'ESB), un seul "biotype" a pour l'instant pu être mis en évidence, conduisant à émettre l'hypothèse qu'une seule souche est sans doute responsable de l'épidémie d'ESB à laquelle nous assistons.

Le typage sur souris des souches d'ESST, est le meilleur outil dont on dispose aujourd'hui pour différencier des isolats les uns des autres. A condition de réaliser au préalable 3 à 4 passages sur souris, afin d'adapter la souche à l'animal de laboratoire, les résultats de ces expérimentations sont extrêmement reproductibles. Ce système est probablement utilisé à présent, en particulier par les laboratoires britanniques, pour typer les souches des cas atypiques des maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'homme (voir ci-dessous). Etant donné la durée d'incubation de la maladie de la souris, de 100 jours à 2 ans, la totalité du processus demande 2 à 3 ans puisqu'il comporte 3-4 passages et le typage proprement dit. Les résultats concernant les cas atypiques de maladie de Creutzfeld-Jakob de l'homme ne seront donc probablement pas disponibles avant 1997. Et, en ce qui nous concerne à l'INRA, les résultats des typages de souches ovines que nous avons entrepris ne seront pas connus avant 1998.

II. La Tremblante des ovins

Symptômes

Les noms " Tremblante " et " Scrapie " (de l'anglais *to scrape* : gratter), font allusion aux symptômes dominants rencontrés dans cette maladie neurodégénérative : troubles moteurs et prurit. La phase clinique de la maladie survient après une durée d'incubation longue pouvant varier de 1 à 3 ans ou plus. Les manifestations cliniques peuvent durer de 1 mois à 1 an (en moyenne 6 mois). De nature neurologique, les symptômes varient en nombre et en intensité selon l'animal et la " souche " de l'agent

infectieux en cause. Discrets au début, ils s'aggravent progressivement. On distingue classiquement, associés ou non :

- 1) des troubles du comportement (perte de l'instinct grégaire, hyperexcitabilité, anxiété, agressivité),
- 2) un prurit localisé d'abord à la tête, puis au dos, puis au corps entier et qui entraîne des pertes de laine et des lésions cutanées parfois sévères sur les zones de grattage,
- 3) des troubles moteurs (tremblements de la tête puis du corps entier, défaut de posture, troubles de la miction, incoordination locomotrice, et finalement impossibilité pour l'animal de se relever). L'animal en phase terminale est maigre, sale, présente une toison délabrée, des lésions de grattage et ne peut se tenir debout.

Il peut exister des formes moins typiques, telles que la forme "léthargique" (drowsy en anglais) décrite chez la chèvre et transmissible au mouton, qui se résume à une paralysie sans prurit ni tremblement.

Lésions

Macroscopiques

Elles sont essentiellement dues au grattage (perte de laine, lésions cutanées) et aux troubles moteurs (amaigrissement, lésions de décubitus) et sont peu spécifiques. Des formes d'obésité ont été décrites. L'autopsie ne permet pas la détection de lésions spécifiques de la maladie.

Microscopiques

• Les lésions microscopiques rencontrées au niveau du système nerveux central (SNC), encéphale et moelle épinière, sont caractéristiques des ESST. Ce sont essentiellement :

- 1) une vacuolisation des neurones à l'origine de la spongiose (d'où le qualificatif "spongiforme" donné à ces affections),
- 2) une perte neuronale plus ou moins marquée,
- 3) la présence, assez rare comparée à d'autres ESST, de "plaques amyloïdes" (colorables au rouge Congo) correspondant à l'accumulation de PrP^{SC} sous forme agrégée,
- 4) une multiplication des astrocytes (astrocytose), cellules du cerveau à fonction immunitaire et nourricière vis-à-vis des neurones, dont la signification reste à déterminer.

Ces lésions se répartissent de façon variable dans diverses zones de l'encéphale (bulbe, protubérance, cervelet, mésencéphale principalement chez le mouton). L'intensité et la répartition des lésions de vacuolisation constituent un profil lésionnel qui dépend à la fois de la souche et de l'espèce hôte concernée.

Des dépôts de protéine PrP^{SC} peuvent également être mis en évidence dans un certain nombre d'organes du système immunitaire (amygdales, rate, ganglions lymphatiques), avant l'apparition de ces dépôts dans le cerveau et avant la manifestation des signes cliniques.

• Des lésions d'organes autres que le système nerveux central (organes lymphoïdes secondaires, glandes surrénales, glande pituitaire, rétine, muscle...) ont également été

décrites ; elles ne s'accompagnent pas nécessairement d'une accumulation de protéines PrP^{Sc} (Bosanquet et al, 1956 ; Hulland, 1958 ; Westaway et al, 1994)

Epidémiologie

La Tremblante est une maladie évoluant habituellement sur le mode sporadique avec une incidence clinique faible. Elle peut parfois prendre une allure épidémique caractérisée par une incidence clinique élevée et par une diminution de la durée d'incubation et de l'âge des animaux atteints.

Bien que ces formes épidémiologiques de la maladie aient été décrites dès les années 1960, elles obligent à se poser la question de la nature des souches impliquées et de leur lien éventuel avec la souche responsable de l'ESB. Le typage de ces souches tel que mis en oeuvre à l'INRA au moyen du "modèle souris" développé par les chercheurs écossais, devrait pouvoir apporter une réponse. De même, la comparaison des profils lésionnels des cerveaux de ces animaux avec ceux des moutons infectés expérimentalement par l'ESB en Grande-Bretagne pourrait apporter une première indication.

L'incidence globale de la tremblante est très mal connue, en France comme dans les autres pays considérés comme infectés. Une des causes de ce manque d'information réside dans la difficulté et la lourdeur du diagnostic. C'est pourquoi le réseau d'épidémiosurveillance de la Tremblante, en cours d'établissement en France, est considéré comme une priorité, y compris par de nombreux acteurs de la filière ovine.

Transmission intra-espèce

Transmission horizontale : Il semble que la contamination des animaux se fasse plutôt par voie orale. L'infection par consommation de placentas de brebis infectées a été démontrée, de même que la contamination des pâtures – par ces mêmes placentas ? – qui pourraient rester infectées au moins trois ans, en raison de l'extrême résistance de l'agent pathogène dans le milieu extérieur. En revanche les fèces ainsi que le lait et le colostrum, au moins dans le cas où ils ne proviennent pas d'animaux atteints de mammites, ne sont pas infectieux .

La transmission de l'infection à la souris a récemment été réussie par une équipe islandaise, à partir de broyats d'acariens du foin, ce qui laisse supposer que les fourrages pourraient servir de réservoirs. Un rôle vecteur ou "inoculateur" des parasites gastro-intestinaux des ruminants a également été suspecté. L'INRA a prévu un certain nombre d'expériences pour tenter de confirmer ou d'infirmer un tel rôle du parasitisme.

On sait également que la plupart des ruminants domestiques ou sauvages sont sensibles à l'ESB et peuvent être infectés par ingestion de cerveaux de bovins ou de farines de viande et d'os (FVO) contaminés. Il semble aujourd'hui difficile d'écarter une possibilité de contamination de certains troupeaux ovins par les FVO ou d'autres produits alimentaires contaminés, notamment en Grande-Bretagne.

Transmission verticale : la possibilité d'une transmission de la Tremblante de la mère au jeune est très controversée. Deux expériences importantes de transfert d'embryon, une écossaise et une américaine, ont produit des résultats opposés quant à la possibilité d'une transmission verticale. La différence de traitement des embryons dans les deux expériences résidait essentiellement dans le lavage des embryons avant

transfert, qui semble réduire les risques d'infection de l'agneau. Ces résultats ont conduit à proposer l'hypothèse d'une transmission plutôt "latérale", c'est-à-dire contamination de l'agneau, au moment de la naissance, par les annexes fœtales et les sécrétions génitales.

Inter-espèces

Comme la plupart des ESST, la Tremblante est transmissible expérimentalement à de nombreuses espèces de mammifères (souris, hamster, cobaye, bovins, caprins, vison, singes), par voies intra-cérébrale, intra-péritonéale ou orale.

Jusqu'à ce jour, les seules espèces ayant pu être contaminées, dans les conditions naturelles, à partir du mouton sont la chèvre et le vison d'élevage. Aucune enquête épidémiologique n'a pu montrer un lien significatif entre la présence de tremblante ou la consommation de produits d'origine ovine et une incidence particulière de la MCJ. En particulier la MCJ a la même incidence (environ 1 cas par million d'habitants et par an) dans les pays d'élevage ovin atteints ou non de Tremblante (Nouvelle Zélande, par exemple), et dans les pays qui consomment peu ou pas de mouton.

III. L'épidémie britannique d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

Origine de la maladie

Les premiers cas d'ESB datent de 1985. Il a fallu environ un an pour comprendre la nature de la maladie. Les études épidémiologiques menées par les chercheurs britanniques ont rapidement permis de mettre en relation l'épidémie d'ESB avec la consommation, en particulier par les veaux et les vaches laitières, de farines de viande et d'os (FVO) issues de déchets d'abattoirs (à 80%) et d'équarrissage, et incorporées comme suppléments protéiques et calciques dans les rations de concentrés distribuées aux animaux. La crise pétrolière et l'augmentation du cours du soja avaient en effet conduit les fabricants d'aliments à diminuer à partir de 1978 les températures de fabrication des farines, et à supprimer la phase d'extraction des graisses par des solvants (hexanes) qu'ils utilisaient auparavant (Anderson et al, 1996). Si l'origine de la contamination des FVO n'est pas connue avec certitude, celles-ci ont en tous cas permis la dissémination de la maladie et son amplification, l'agent de l'ESB étant recyclé par l'utilisation des déchets contaminés. Des ruminants ou des carnivores sauvages maintenus en captivité, ainsi que des chats ont également été contaminés.

La maladie a également été identifiée et déclarée dans de nombreux autres pays, mais elle y sévit de manière sporadique. Ainsi une vingtaine de cas ont à l'heure actuelle été confirmés en France par le réseau d'épidémiosurveillance mis en place dès 1990.

Prophylaxie

Plusieurs interdictions visant à empêcher le recyclage de tissus contaminés ont été mises en place en Grande-Bretagne à partir de 1988, dès que les chercheurs britanniques ont compris le rôle joué par les FVO, jusqu'à l'interdiction complète en 1996 de la consommation de farines de viande et d'os par les ruminants. Ces interdictions successives de la consommation des FVO par les ruminants s'expliquent par la découverte de contaminations entre les circuits de fabrication ou de distribution

des farines de viande. Les premières mesures ont néanmoins permis d'assiter à une stabilisation du nombre de cas en 1992 et 1993, puis à leur diminution rapide depuis 1995.

Perspectives

La persistance de la maladie en Grande Bretagne dépendra de l'existence ou non d'une transmission horizontale et/ou verticale de la maladie. Aucun argument épidémiologique ou expérimental en faveur d'une transmission horizontale de l'infection n'a pour l'instant été rapporté, bien qu'elle ne puisse être totalement écartée. En revanche, l'existence d'une transmission verticale fait l'objet de controverses. Elle paraît théoriquement possible sinon probable, mais ne semble pas avoir une incidence élevée. Selon une récente étude épidémiologique (Anderson et al, 1996), elle ne devrait pas influencer de façon notable la diminution du nombre des cas. On peut en revanche estimer qu'elle pourrait permettre la persistance à un niveau très faible de la maladie dans les troupeaux. Un test diagnostic spécifique et sensible, capable de mettre en évidence les quelques animaux qui resteraient porteurs de l'infection, sera probablement indispensable pour éradiquer totalement la maladie.

Risques de transmission à l'homme

La maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) constitue actuellement la plus fréquente des ESST affectant l'homme (Goodbrand et al, 1995). Son incidence annuelle, remarquablement constante dans tous les pays industrialisés, est d'environ un cas par million d'habitants. On distingue, en fonction de leur mode de transmission, des formes sporadiques, génétiques, et iatrogènes. La forme sporadique est de loin la plus fréquente (80% des cas). Elle touche généralement des individus de plus de 60 ans (75% des patients). Le risque potentiel pour la santé humaine que représente l'épidémie d'ESB en Grande-Bretagne s'est concrétisé depuis 1994 par l'apparition de cas atypiques de maladie de Creutzfeldt-Jakob (V-MCJ, pour variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob) touchant de jeunes adultes. Les quinze cas confirmés aujourd'hui (14 en GB, un cas en France) sont caractérisés au niveau des lésions cérébrales par la présence de dépôts amyloïdes en forme de "plaques florides". La relation temporelle entre l'épidémie bovine et l'apparition de ces cas, et l'observation de plaques similaires chez le macaque expérimentalement infecté par l'agent de l'ESB, ont conduit à émettre l'hypothèse d'une possible transmission de l'agent bovin à l'homme

Tissus infectieux

Le caractère infectieux des divers organes a été quantifié (Hadlow et al, 1982) par inoculation intra-cérébrale à la souris de broyats de tissus de moutons atteints de Tremblante. Sont considérés comme ayant une infectivité :

- 1) élevée : le cerveau et la moelle épinière,
- 2) moyenne : les amygdales, la rate, l'iléon distal, le colon proximal, le placenta,
- 3) faible : l'hypophyse, le liquide céphalo-rachidien, le nerf sciatique, les ganglions lymphatiques, les surrénales, le colon distal, la muqueuse nasale,
- 4) très faible ou exceptionnelle : le thymus, le pancréas, le foie, la moelle osseuse,
- 5) non détectable : le caillot sanguin, la salive et les glandes salivaires, la thyroïde, le cœur, les poumons, les reins, les testicules, la vésicule séminale, les ovaires, l'utérus, le fœtus, la glande mammaire, les muscles squelettiques.

A titre de comparaison, et en l'état actuel des connaissances, chez les bovins adultes atteints d'ESB, seuls le cerveau et la moelle épinière présenteraient une infectiosité détectable chez la souris. Toutefois, chez le veau infecté expérimentalement par voie orale à l'âge de 4 mois, une infectiosité a été mise en évidence dans l'iléon distal entre 6 et 10 mois après inoculation (cette expérimentation se poursuit actuellement en Grande-Bretagne).

IV. Le diagnostic des encéphalopathies spongiformes

Epidémiologique

Chez les ovins, l'apparition de signes neurologiques chez des animaux vivant dans ou à proximité de troupeaux infectés par la Tremblante doit faire suspecter la maladie. Chez les bovins, l'apparition de la maladie est liée à la consommation de FVO contaminées.

Clinique et différentiel

Les éléments cliniques peuvent permettre de suspecter la Tremblante, lorsqu'elle est "classique" (troubles moteurs associés au prurit). Mais elle peut être confondue avec la listériose, courante dans les élevages ovins et qui constitue le diagnostic différentiel principal, avec certains troubles métaboliques (tétanies, toxémie de gestation, nécrose du cortex...), avec certaines intoxications ou encore avec d'autres maladies infectieuses à tropisme nerveux, mais beaucoup plus rares, comme la rage. La forme léthargique peut être confondue avec des maladies cachectisantes comme la paratuberculose ou le parasitisme. Chez les bovins, la maladie se traduit d'abord par des troubles du comportement (anxiété) puis par l'apparition de troubles moteurs. Dans tous les cas, les seuls éléments cliniques ne permettent pas un diagnostic de certitude.

De laboratoire

1. Ante-mortem

Sérologique - En l'absence de toute réaction immunitaire "classique" détectable, la possibilité d'un diagnostic de type sérologique sur l'animal vivant n'existe pas.

Microbiologique - De même, la nature de l'agent pathogène étant inconnue, il n'est actuellement pas possible de réaliser son isolement et son identification comme c'est le cas pour d'autres maladies infectieuses.

Biochimique - La détection, dans le liquide céphalo rachidien (LCR) des individus atteints, d'un marqueur spécifique des ESST, est en cours d'étude chez l'homme et les bovins (un brevet a été déposé aux USA). Sa sensibilité serait de 95% et sa spécificité de 98%. Ce test pourrait probablement être mis au point chez les ovins. Sans préjuger de son éventuelle efficacité chez le mouton, la technique sera difficile à utiliser en routine pour une espèce chez laquelle la ponction rachidienne est difficile. Par ailleurs, une équipe de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort a mis au point une méthode de détection électrochimique d'un marqueur urinaire présent chez l'homme atteint de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez les bovins atteints d'ESB et les ovins atteints de Tremblante ; elle est actuellement en cours d'évaluation. Ce test serait également positif lors d'autres atteintes du système nerveux (maladie d'Alzheimer, encéphalopathies à virus herpès).

Immunochimique - Une équipe hollandaise a montré que la PrP^{SC} peut être détectée à partir de biopsies d'amygdales (van Keulen et al, 1996 ; Ikegami et al, 1991). Cette méthode permettrait un diagnostic relativement précoce (à mi-incubation), mais paraît également bien difficile à envisager en routine et à grande échelle.

2. Post-mortem

Histologique - Le diagnostic histologique, sur coupes de cerveau ou de moelle épinière, (mise en évidence des lésions caractéristiques de spongiose et d'éventuelles plaques amyloïdes) permet le diagnostic de certitude de la Tremblante.

Immunologique - De même, l'immunodétection de la PrP^{SC}, si elle est en concentration suffisante, peut être effectuée à partir d'échantillons de système nerveux ou du système lymphoïde périphérique (Miller et al, 1993). La limite inférieure de détection de la PrP^{SC} par ces techniques reste élevée et elles sont surtout utilisées comme un complément d'information par rapport à l'histologie classique (Hayward et al, 1994).

Par inoculation à l'animal de laboratoire - Le caractère infectieux des tissus et organes d'un mouton atteint de tremblante peut être mis en évidence par l'inoculation d'un broyat de ces organes à un animal " sensible " : la souris (ou le hamster) en général et, plus rarement, pour des raisons de coût et de durée d'incubation, le mouton lui-même. La technique est lourde, relativement lente (de 100 à 750 jours d'incubation chez la souris) et pas toujours assez sensible (barrière d'espèce). L'utilisation de souris transgéniques ayant incorporé le gène PrP ovin, -supprimant ainsi la barrière d'espèce-, devrait permettre d'abaisser le seuil de détection de l'agent pathogène et de réduire les durées d'incubation.

Par l'infection in vitro de cellules permissives - La disponibilité de modèles *in vitro* de cultures cellulaires pour la mise en évidence du caractère infectieux d'un échantillon permettrait à la fois de s'affranchir de l'animal de laboratoire, de réduire les durées d'incubation, et d'envisager des études approfondies du rôle des différents allèles de résistance du gène ovin en combinaison avec différentes souches d'agent pathogène (Kristensson et al, 1993 ; Butler et al, 1988 ; Mc Kinley, 1991).

V. **Physiopathologie des encéphalopathies spongiformes**

Modes de contamination et dissémination dans l'organisme

La voie de contamination la plus probable de la Tremblante naturelle est la voie orale (Hadlow et al, 1982). En phase précoce du processus infectieux, des sites primaires de réplication de l'agent infectieux ont été localisés au niveau de l'oropharynx et/ou de l'intestin, puis au niveau des ganglions lymphatiques drainant ces sites d'entrée (amygdales, ganglions rétropharyngiens et mésentériques). A un stade plus avancé de l'infection, la détection de titres infectieux à partir de ganglions périphériques, tels que les ganglions préscapulaires et médiastinal, ainsi qu'à partir de la rate a laissé supposer l'existence d'une étape de dissémination de l'agent pathogène par voie lymphatique à l'ensemble des organes lymphoïdes de type secondaire (McBride et al, 1992). La longue phase d'incubation précédant l'apparition des symptômes cliniques correspondrait à une phase de réplication silencieuse de l'agent, pendant plusieurs mois ou années, dans ces organes lymphoïdes et l'intestin.

Durant cette phase d'incubation, l'agent de la Tremblante atteindrait le système nerveux central (Dormont, 1995), son organe cible, vraisemblablement par l'intermédiaire des fibres nerveuses innervant les organes lymphoïdes (Kimberlin, 1990 ; Ader et al, 1995). Dans la phase terminale de la maladie, au cours de laquelle les animaux expriment les symptômes cliniques, des sites secondaires de réplication ont été définis au niveau de la moelle épinière et de certaines régions du cerveau.

L'ensemble de ces données bibliographiques met donc en évidence le rôle éventuel :

- des ganglions lymphatiques comme sites de réplication de l'agent de la Tremblante (Race, 1992, 1994),
- des fibres nerveuses innervant les organes lymphoïdes secondaires comme voie possible de dissémination de l'agent pathogène vers le système nerveux central.

Rôle de la protéine PrP

La protéine PrP (pour Protease resistant protein, devenue Prion protein à la suite de l'hypothèse de Prusiner, 1982) joue sans aucun doute un rôle essentiel dans le déroulement de la maladie, comme le démontre les expérimentations évoquées plus haut à l'aide de souris transgéniques. L'hypothèse la plus courante est que l'accumulation intracellulaire d'une forme anormale agrégée de la protéine PrP, la PrP^{SC}, provoquerait la mort des neurones concernés (Forloni et al, 1993). Le relarguage dans l'espace extra-cellulaire de la PrP^{SC} aurait pour conséquences (i) une activation des cellules gliales qui amplifierait le phénomène de mort neuronale par l'intermédiaire de signaux d'apoptose (Meda et al, 1995 ; Fairbairn et al, 1994), c'est à dire de mort cellulaire programmée, (ii) la multiplication des astrocytes aux sites des lésions et la synthèse accrue par ces cellules de protéine gliale fibrillaire acide (GFAP), et enfin (iii) une inflammation locale liée à la synthèse d'un certain nombre de cytokines proinflammatoires (TNF et IL-1 en particulier).

Les modifications de conformation de la PrP^C sont responsables de l'acquisition par la protéine PrP^{SC} de ses propriétés de résistance aux protéases et probablement de son rôle pathologique. Mais le mécanisme post-transcriptionnel de changement de conformation reste inconnu, et les structures des protéines normales ou pathologiques n'ont pas encore pu être totalement élucidées, étant donné les difficultés considérables qu'entraînent la localisation membranaire de la PrP^C et l'insolubilité de la PrP^{SC} pour leur isolement et leur purification.

Contrôle génétique de la résistance de l'hôte

L'existence d'un contrôle génétique de la sensibilité à la Tremblante est bien établie (Dickinson et al, 1968 ; Dickinson, 1976 ; Hunter et al, 1989 ; Hunter, 1993). Une sélection expérimentale entreprise en Grande-Bretagne dans les années 70 a montré en race Cheviot le rôle d'un gène à effet majeur autosomal, SIP (Scrapie Incubation Period), avec deux allèles sA et pA. Les animaux de génotype pApA sont plus résistants à cette pathologie, expérimentalement et naturellement, ce qui se traduit par une durée d'incubation de la maladie plus longue. Une forte liaison génétique a été montrée entre les loci de SIP et de PrP, qui constituent probablement un seul et même gène. Le locus PrP est polymorphe avec une variabilité connue : les polymorphismes aux codons 136, 154 et 171 sont liés à des différences de sensibilité à la Tremblante

expérimentale et naturelle (Belt et al, 1995 ; Goldmann et al, 1990, 1991 ; Laplanche et al, 1993)). Il se confirme, avec des observations relatives à plusieurs races élevées dans des milieux différents que les allèles Alanine en 136 et Arginine en 171 sont associés à une moindre sensibilité tandis que les allèles Valine en 136 et Glutamine en 171 sont associés à une sensibilité plus grande (Cloucard et al, 1995). L'universalité de ce phénomène reste à confirmer : une équipe écossaise a en effet montré, en race Cheviot, une inversion de résistance à la Tremblante en fonction de la souche administrée (Foster et al, 1988). Il n'est pas non plus établi que le polymorphisme en ces codons du gène PrP explique toute la variabilité génétique existante pour la susceptibilité à la Tremblante, d'autres mutations en ce locus, ou d'autres polymorphismes en des locus différents pouvant également intervenir.

Ces résultats sont présentés en détail dans la communication à ces Journées 3R de JM Elsen et collaborateurs. La possibilité qu'une résistance génétique à la majorité des souches de Tremblante sévissant actuellement puisse être sélectionnée, ce qui constituerait un moyen de lutte efficace contre cette maladie, est discutée par ces auteurs . La restriction essentielle à la généralisation de ce procédé de lutte contre la Tremblante réside dans la nécessité de vérifier que les animaux à durée d'incubation longue ("résistants") ne soient pas porteurs et excréteurs de prions, donc potentiellement contaminants.

Aucune relation entre le génotype des bovins au locus PrP et le développement de l'ESB n'a pour l'instant été décrite.

Conclusions

L'étude des interactions hôte-agent pathogène a essentiellement été effectuée dans le cadre de l'étude de la Tremblante qui représente à la fois une maladie importante pour l'avenir des productions ovines et un excellent modèle d'étude des ESST des ruminants. Entrepris dès la fin des années 1950 par les chercheurs britanniques de Compton, puis d'Edinburgh, ce travail a permis d'améliorer notre connaissance de la physiopathologie de l'infection, et de démontrer l'influence profonde du génome de l'hôte sur le devenir de la maladie naturelle et expérimentale (Dickinson et Outram, 1988 ; Hunter, 1993 ; Cloucard et al, 1996).

Mais notre connaissance des interactions hôte-agent pathogène demeure insuffisante. Non seulement, nous ne connaissons pas la nature de l'agent pathogène, mais nous ignorons également les conditions de transmission de la maladie naturelle et les mécanismes qui conduisent ou non à l'expression de la maladie chez les animaux sensibles ou résistants. En outre, l'absence de diagnostic précoce, pendant la longue période d'incubation de la maladie, rend difficile l'étude de cette phase puisque nous ignorons quels sont les animaux atteints et en quelle mesure ils peuvent transmettre l'infection au cours de cette période.

Références

- Anderson RM, Donnelly CA, Fergusson NM, Woolhouse MEJ et al, 1996, Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382, 779-788.
- Ader R., Cohen N., Felten D., 1995, Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system., *Lancet*, 345: 99-103.

- Belt P.B.G.M., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Bos de Ruijter J., Gielkens A.L.J., Smits M.A., 1995, Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie., *J. Gen. Virol.*, 76: 509-518.
- Bosanquet F., Daniel P.M., Parry H.B., 1956, Myopathy in sheep; its relationship to scrapie and to dermatomyositis and muscular dystrophy., *Lancet*, 271: 737-746.
- Bruce M., Chree A., McConnell I., Foster J., Pearson G., Fraser H., 1994, Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 343: 405-411.
- Bruce M.E., Fraser H., 1991, Scrapie strain variation and its implications., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 172: 125-138.
- Butler D. A., Scott M.R., Bockman J.M., Borchelt D.R., Taraboulos, A., Hsiao K.K., Kingsbury D.T., Prusiner S.B., 1988, Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins., *J. Virol.*, 62: 1558-1564.
- Cashman N.R., Loertscher R., Nalbantoglu J., Shaw I., Kascsak R.J., Bolton D.C., Bendheim P.E., 1990, Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation., *Cell*, 61: 185-192.
- Caughey B., Race R.E., Chesebro B., 1988, Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines., *J. Gen. Virol.*, 69: 711-716.
- Clouscard C, Beaudry P., Elsen J.M., Milan D., Dussaucy M., Bounneau C., Schelcher F., Chatelain J., Launay J.M., Laplanche J.L., 1995, Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie., *J. Gen. Virol.*, 76: 2097-2101.
- Dickinson A. G., 1976, Scrapie in sheep and goats. *In* Slow virus diseases of animals and man (ed R.H. Kimberlin) Amsterdam, North Holland., pp 209-241.
- Dickinson A.G., Outram G.W., 1988, Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis., *In* Novel Infectious Agents and the Central Nervous System., CIBA Symposium n°135, ed. by G. Bock and J. Marsh, Wiley, Chichester, pp.63-83.
- Dickinson A.G., Stamp J.T., Renwick C.C., Rennie J.C., 1968, Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep infected with a cheviot-passaged scrapie agent., *J. Comp. Pathol.*, 78: 313-321.
- Dormont D., 1995, La nature et les propriétés physico-chimiques et biologiques des agents transmissibles non conventionnels ou prions: conséquences pour la santé publique., *Path. Biol.*, 43: 124-136.
- Fairbairn D.W., Carnahan K.G., Thwaites R.N., Grigsby R.V., Reed Holyoak G., O'Neill K.L., 1994, Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain., *FEMS Microbiol. Lett.*, 115: 341-346.
- Forloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F., 1993, Neurotoxicity of a prion protein fragment., *Nature*, 362: 543-546.
- Foster J.D., Dickinson A.G., 1988, The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie., *Vet. Rec.*, 123: 5-8.
- Goldmann W., Hunter N., Benson G., Foster J.D., Hope J., 1991, Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene., *J. Gen. Virol.*, 72: 2411-2417.
- Goldmann W., Hunter N., Foster J.D., Salbaum J.M., Beyreuther K., Hope J., 1990, Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2476-2480.

- Goodbrand I.A., Ironside J.W., Nicolson D., Bell J.E., 1995, Prion protein accumulation in the spinal cords of patients with sporadic and growth hormone associated Creutzfeldt-Jakob disease., *Neurosci. Lett.*, 183: 127-130.
- Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E., 1982, Natural infection of Suffolk sheep with Scrapie virus., *J. Infec. Dis.*, 146: 657-664.
- Hayward P.A.R., Bell J.E., Ironside J.W., 1994, Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20: 375-383.
- Hulland T.J., 1958, The skeletal muscle of sheep affected with scrapie., *J. Comp. Pathol.*, 68: 264-274.
- Hunter N., 1993, Genetic control of scrapie. Incidence in sheep and its relevance for bovine spongiform encephalopathy in cattle., *Rev. Med. Virol.*, 3: 195-200.
- Hunter N., Foster J.D., Dickinson A.J., Hope J., 1989, Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep., *Vet. Rec.*, 124: 364-366.
- Ikegami Y., Ito M., Isomura E., Momotani E., Sasaki K., Muramatsu Y., Ishiguro N., Shinagawa M., 1991, Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep., *Vet. Rec.*, 128: 271-275.
- Kimberlin R.H., 1990, Transmissible Encephalopathies in Animals., *Can. J. Vet. Res.*, 54: 30-37.
- Kristensson K., Feuerstein B., Taraboulos A., Hyun W.C., Prusiner S.B., DeArmond S.J., 1993, Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells., *Neurology*, 43: 2335-2341.
- Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M., 1993, PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis., *Genomics*, 15: 30-37.
- McBride P.A., Eikelenboom P., Kraal G., Fraser H., Bruce M.E., 1992, PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleen and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice., *J. Pathol.*, 168: 413-418.
- McKinley M.P., Taraboulos A., Kenaga L., Serban D., Stieber A., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Gonatas N., 1991, Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells., *Lab. Invest.*, 65: 622-630.
- Meda L., Cassatella M.A., Szendrei G.I., Otvos L., Baron P., Villalba M., Ferrari D., Rossi F., 1995, Activation of microglial cells by b-amyloid protein and interferon-g., *Nature*, 374: 647-650.
- Miller J.M., Jenny A.L., Taylor W.D., Marsh R.F., Rubenstein R., Race R.E., 1993, Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie., *J. Vet. Diagn. Investig.*, 5: 309-316.
- Prusiner S.B., 1982, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie., *Science*, 216: 136-144.
- Race R., Ernst D., Jenny A., Taylor W., Sutton D., Caughey B., 1992, Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep., *Am. J. Vet. Res.*, 1992, 53: 883-889
- Race R.E., Ernst D., Sutton D., 1994, Severe autolysis does not prevent scrapie diagnosis in sheep., *J. Vet. Diagn. Investig.*, 6: 486-489.
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Meloen, RH, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld JPM, 1996, Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural Scrapie. *J Clin Microbiol*, 34: 1228-1231.

- Westaway D., DeArmond S.J., Cayetano-Canlas J., Groth D., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Carlson G.A., Prusiner S.B., 1994a, Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins., Cell, 76: 117-129.