





---

# ANALYSE DE LA PROTEINE DU PRION DU LIQUIDE CEREBRO-SPINAL DES BREBIS SAINES ET ATTEINTES DE TREMBLANTE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2004  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Chantal, Anne, Maryvonne IMBS**  
Née, le 23 juin 1980 à STRASBOURG (Bas-Rhin)

---

**Directeur de thèse : Madame le Docteur Véronique GAYRARD-TROY**

---

## JURY

PRESIDENT :

**Mme Marie-Bernadette DELISLE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEUR :

**Mme Véronique GAYRARD-TROY**  
**Mme Nicole HAGEN-PICARD**

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



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

Directeur	: M.	<b>P. DESNOYERS</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>
	M.	<b>A. CAZIEUX</b>
	Mme	<b>V. BURGAT</b>
	M.	<b>D. GRIESS</b>
	M.	<b>J. CHANTAL</b>
	M.	<b>J.-F. GUELF</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

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

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

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

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

**INGENIEUR DE RECHERCHES**

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

**MAITRE DE CONFERENCES HORS CLASSE**

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

**MAITRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
Mme **CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du bétail*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la reproduction*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS**

- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*  
N. **DESMAIZIERES Louis-Marie**, *Clinique équine*  
M. **LEON Olivier**, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

- M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique des animaux de rente*  
Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

# REMERCIEMENTS

## **A la présidente de thèse, Madame le Docteur Marie Bernadette Delisle**

Professeur des Universités

Praticienne hospitalière

Anatomie et cytologie pathologiques

Vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

## **A la directrice de thèse, Madame le Docteur Gayrard-Troy**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour l'accueil bienveillant que vous avez fait à chacune de mes visites et pour votre disponibilité, veuillez accepter mes sincères remerciements.

## **A Madame le Docteur Hagen-Picard**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Veuillez recevoir mes hommages respectueux.





## **DEDICACES**

### **A mes parents,**

Vous avez assumé mes années d'études avec bonté et amour, que ce travail soit la preuve de toute ma reconnaissance et de ma tendresse.

### **A Julien et Marjolaine,** mes frère et sœur adorés,

Vous m'êtes si chers.

### **A mes grands-parents,** Yvonne et Charles,

Pour leur gentillesse et leur soutien immuables.

### **A tous les autres membres de ma famille**

### **A tous mes amis, Alsaciens ou de l'ENVT,**

Vous vous reconnaîtrez. J'ai passé de très bons moments en votre présence et je compte bien continuer sur cette voie. Vous revoir me fera toujours plaisir.

### **A Guillaume**

Avec qui j'aurai grand plaisir à poursuivre ma route le plus loin possible.



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>11</b>
<b>II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
<b><u>A. La tremblante ovine.....</u></b>	<b>14</b>
1. Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST)..	14
2. Mécanismes physiopathologiques des ESST.....	15
2.1. Nature de l'agent infectieux : le prion.....	15
2.2. Transconformation de la PrPc.....	16
3. Transmission de la tremblante.....	17
3.1. Nécessité de la présence de la PrPc.....	17
3.2. Mécanismes de neuroinvasion chez la brebis.....	19
3.3. Modes de transmission de la tremblante.....	21
4. Diagnostic des ESST.....	24
<b><u>B. La protéine prion cellulaire ou PrPc.....</u></b>	<b>27</b>
1. Données structurales.....	27
1.1. Structure primaire de la PrP.....	27
1.2. Structure tridimensionnelle de la PrP.....	27
2. Métabolisme de la PrPc : cycle de vie.....	30
2.1. Du noyau à la membrane plasmique.....	30
2.2. De la membrane plasmique au cytoplasme.....	31
3. Origine de la PrPc.....	32
3.1. Synthèse de la PrPc par les non neuronales.....	32
3.2. Localisations intracellulaires de la PrPc.....	33
4. Rôles de la PrP .....	33
<b><u>C. Le liquide cérébro-spinal (LCS).....</u></b>	<b>35</b>
1. Données anatomiques.....	35
1.1. Le système ventriculaire.....	35
1.2. Les méninges et l'espace sous-arachnoïdien.....	37
1.3. Les barrières du Système Nerveux Central (SNC).....	37
1.4. La Barrière Hémato-Méningée (BHM).....	38
2. Elimination de molécules à partir du LCS.....	43
3. Circulation du LCS.....	46
4. Fonctions du LCS.....	47
5. Les protéines du LCS.....	48
5.1. Nature des protéines.....	48
5.2. Passage de protéines dans le LCS.....	50

6. LCS et affections neurologiques dues aux prions.....	52
6.1. Caractéristiques du LCS lors d'ESST.....	52
6.2. Modification du LCS de bovins atteints d'ESB.....	53
6.3. La protéine « 14-3-3 » .....	53
6.4. Détection de la PrPsc dans le LCS.....	54
<b>III. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>55</b>
<b><u>A. Prélèvements de LCS</u> .....</b>	<b>55</b>
1. Mise en place d'un cathéter et prélèvement de LCS dans l'espace sous-arachnoïdien lombo-sacré.....	55
2. Prélèvement de LCS dans la cisterna magna .....	55
<b><u>B. Dosage de la PrP par immunométrie.....</u></b>	<b>56</b>
1. Principe du dosage.....	56
2. Produits.....	56
3. « Coating » des plaques.....	57
4. Dosage.....	57
5. Analyse des résultats.....	58
<b><u>C. Dosage des protéines.....</u></b>	<b>58</b>
<b>IV. REALISATIONS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>59</b>
<b><u>A. Evaluation de la concentration en PrP dans le LCS de brebis saines et tremblantes.....</u></b>	<b>59</b>
1. Objectifs.....	59
2. Expérience 1 : Etude des variations inter-individuelles de la concentration en PrPc du LCS.....	60
2.1. Matériels et méthodes spécifiques à l'expérience 1.....	60
2.2. Résultats.....	60
3. Expérience 2 : Etude des variations intra-individuelles de la concentration en PrPc du LCS et test de sensibilité à la protéinase K.....	61
3.1. Matériels et méthodes spécifiques à l'expérience 2.....	61
3.2. Résultats.....	63
<b><u>B. Passage de la PrP à travers la Barrière Hémato-Méningée (BHM).....</u></b>	<b>67</b>
1. Objectifs.....	67
2. Matériels et méthodes.....	67
3. Résultats.....	69
<b>V. DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>76</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : A. digestion de la PrPc et de la PrPsc par la protéinase K.  
B. comparaison de la PrPc et de la PrPsc chez le hamster (Bendheim et al, 1988) (p.15).

Figure 2: Méthode de neurogreffes pour l'étude de la tremblante chez la souris (Aguzzi et al, 1997) (p.18).

Figure 3: Représentation schématique de l'innervation parasympathique (sur la gauche) et sympathique (sur la droite) du système nerveux entérique (Van Keulen et al, 2000) (p.20).

Figure 4 : Sensibilité ovine à la Tremblante liée aux variants alléliques de l'oPrP (p.24).

Figure 5 : Modifications neuropathologiques chez une souris après inoculation par l'agent de la tremblante (Prusiner, 1998) (p.26).

Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la PrP(23-230) (Garcia et al, 2000) (p.28).

Figure 7 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des PrPc et PrPsc (Fournier, 2001) (p.29).

Figure 8 : Variations structurales de la PrPsc humaine liées aux différents sites de clivage par la PK (Parchi et al, 2000) (p.30).

Figure 9 : Cycle cellulaire de la PrPc (Fournier, 2001) (p.31).

Figure 10 : Relation des méninges et de l'espace sous-arachnoïdien avec le système ventriculaire (De Lahunta, 1983) (p.36).

Figure 11 : Méninges cérébrales et villosités arachnoïdiennes (De Lahunta, 1983) (p.36).

Figure 12 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (blood-brain barrier), de la barrière entre le sang et le LCS ou BHM (blood-CSF barrier avec CSF = cerebrospinal fluid) et d'un capillaire sanguin (Kusuhara et Sugiyama, 2001) (p.39).

Figure 13 : Schéma comparatif de l'ultrastructure des capillaires systémiques et des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Behr, 2001) (p.39).

Figure 14 : Représentation schématique des cellules épithéliales transporteuses (Behr, 2001) (p.40).

Figure 15 : Représentation schématique des plexus choroïdes et de la formation du LCS (Behr, 2001) (p.42).

Figure 16 : Représentation schématique des villosités arachnoïdiennes (Behr, 2001) (p.44).

Figure 17 : Illustration schématique conventionnelle du transport de LCS (Johnston et Papaiconomou, 2002) (p.44).

Figure 18 : Illustration schématique du transport de LCS des compartiments sous-arachnoïdiens cérébral et spinal aux vaisseaux lymphatiques extra-crâniens (Johnston et Papaiconomou, 2002) (p.45).

Figure 19 : Les méninges de la moelle épinière (De Lahunta, 1983) (p.47).

Figure 20 : Epitopes de la protéine prion reconnus par l'anticorps SAF34 et le traceur 12F10 (p.56).

Figure 21 : Distribution de la concentration en PrPc du LCS des brebis saines prélevées à l'abattoir et à l'ENVT (p.61).

Figure 22 : Evolution au cours d'un nyctémère des concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante (brebis tremblantes), obtenu lors de la première série de prélèvements (p.63).

Figure 23 : Evolution au cours d'un nyctémère des concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis tremblantes, lors de la deuxième série de prélèvements (p.64).

Figure 24 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines (n=5) et des brebis atteintes de tremblante (n=4) en fonction de la concentration finale en PK (p.65).

Figure 25a : Evolution temporelle de la concentration en PrP du LCS de la brebis 3049 avant et après une injection intra-veineuse de variant VRQ (faite à t0) à la dose de 1.28  $\mu$ g/kg (p.70).

Figure 25b : Evolution temporelle de la concentration en PrP du LCS de la brebis 680 avant et après une injection intra-veineuse de variant VRQ (faite à t0) à la dose de 0.1 mg/kg (p.70).

Tableau 1 : Composition des barrières du cerveau (Bailey et al, 1997) (p.38).

Tableau 2 : Vitesse de formation du LCS chez diverses espèces (Bailey et al, 1997) (p.41).

Tableau 3 : Tableau 3 : Concentrations individuelles en protéines totales, en PrPc exprimées en ng/ml et en mg/mg protéines du LCS des brebis saines et atteintes de tremblantes en fonction de la concentration finale en PK.

## LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé  
AChE: Acétylcholine Estérase  
Apo :apolipoprotéine  
ARNm : ARN messenger  
BHM : Barrière Hémato-Méningée  
bPrPc : PrPc bovine  
DO : densité optique  
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine  
ESST : Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible  
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissues = tissus lymphoïdes associés au tube digestif  
GPI : GlycoPhosphatidylInositol  
hPrPc : PrPc humaine  
ID50 : quantité de protéine du prion pathologique qui cause la maladie chez 50% des receveurs  
Ig : immunoglobuline  
IHC : ImmunoHistoChimie  
io: intraoculaire  
iv: intraveineuse  
kDa : kilodalton  
KO : Knock Out  
LCR : Liquide CéphaloRachidien  
LCS : Liquide Cérébro-Spinal  
LT : Lymphocyte T  
MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob  
MCJnv : nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob  
mPrPc : PrPc murine  
oPrP : PrP ovine  
PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>  
PK : Protéinase K  
PrP 0/0 : souris KO pour le gène PrP  
PrP : Protéine du Prion  
PrPc : Protéine du Prion Cellulaire  
PrPrec : Protéine du Prion Recombinante  
PrPres : Protéine du Prion Résistante à la digestion enzymatique par la protéinase K  
PrPsc : Protéine du Prion «Scrapie», isoforme pathologique de la PrPc  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
SAF: Scrapie Associated Fibrils  
SNC : Système Nerveux Central  
SNP : Système Nerveux Périphérique  
tg20 : souris transgénique surexprimant la PrP  
PrnP : gène qui code pour la protéine du prion cellulaire  
Génotype ARR : génotype homozygote aux codons 136 (alanine), 154 (arginine) et 171 (arginine) du gène PrnP qui confère le caractère résistant à l'infection par l'agent de la tremblante  
Génotype VRQ : génotype homozygote aux codons 136 (alanine), 154 (arginine) et 171 (arginine) du gène PrnP qui confère le caractère très sensible à l'infection par l'agent de la tremblante





## I. INTRODUCTION GENERALE

La tremblante est une maladie neurodégénérative enzootique mortelle, connue depuis plus de 200 ans, qui affecte le mouton et la chèvre. Elle est la plus commune des formes naturelles d'Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST), maladies affectant à la fois les hommes et les animaux et regroupant notamment la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) chez l'homme et l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB). La tremblante est la première encéphalopathie spongiforme dont la transmissibilité fut démontrée, en 1938 par Cuillé et Chellé. La caractéristique biochimique de ces maladies est l'accumulation d'une isoforme anormale, protéase résistante d'une protéine naturellement exprimée chez tout individu par de nombreux types cellulaires, notamment dans le Système Nerveux Central (SNC) : la protéine du prion cellulaire ou PrPc. Selon Prusiner, l'isoforme pathologique de la protéine du prion cellulaire appelée PrPsc (PrP scrapie) pourrait induire la transconformation de molécules normales de PrPc en PrPsc, le processus étant facilité par une autre molécule appelée la protéine X (Prusiner, 1998). Cette théorie fait toujours l'objet de débats.

Actuellement, le diagnostic d'une ESST se fait via les signes cliniques (dépression, ataxie généralisée, l'hyperesthésie tactile, démarche hypermétrique) lorsque la maladie est déjà à un stade avancé. Le diagnostic de certitude n'est obtenu qu'après l'apparition des symptômes par des moyens invasifs : mise en évidence de l'accumulation de PrPres (forme résistante au traitement à la protéinase K de la protéine pathologique) dans le système nerveux, mise en évidence de marqueurs lésionnels comme l'hyperastrocytose, démonstration expérimentale de transmissibilité, etc. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes non invasives qui permettent de dépister une ESST au stade pré-clinique de la maladie.

L'analyse du Liquide Cérébro-Spinal (LCS) représente une approche diagnostique des maladies neurodégénératives. Le drainage interstitiel cérébral, participant à la formation du LCS, pourrait participer à l'élimination des protéines accumulées dans le milieu extracellulaire, dont la PrPsc, à partir du tissu nerveux. A ce titre, la PrPsc, ou des fragments de celle-ci, pourrait être détectée dans le LCS des brebis atteintes de tremblante, permettant l'établissement d'un diagnostic. Alternativement, les concentrations en PrPc du LCS des brebis atteintes de tremblante pourraient être

altérées en raison de la capture de la PrPc par les formes insolubles accumulées dans les réseaux de drainage interstitiel. A notre connaissance, aucune étude n'a mis en évidence la présence de PrPsc et/ou une altération des concentrations en PrPc du LCS chez les brebis atteintes de tremblante.

Les données expérimentales indiquent qu'une ESST peut être transmise par transfusion de sang total d'un ovin expérimentalement infecté avec l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) au stade pré-clinique de la maladie (Houston et al, 2000) et que la voie intraveineuse d'inoculation de l'agent de l'ESB est une voie particulièrement efficace chez les primates (Herzog et al, 2004).

Ces données expérimentales ont justifié les mesures restrictives concernant l'utilisation de sang total et de ses dérivés au Royaume-Uni et l'adoption de mesures de précaution comme la leucofiltration. L'apparition d'un cas de nouveau variant de la MCJ (MCJnv) chez un patient qui avait été transfusé avec du sang d'un donneur en phase d'incubation de MCJnv suggère que la nouvelle variante de la MCJ serait transmissible par la transfusion sanguine et que le sang serait infectieux au cours de la phase pré-symptomatique de la maladie (Llewelyn et al, 2004). En l'absence de barrière d'espèce, le sang pourrait constituer pour l'homme la même menace que furent les farines animales pour l'épidémie d'ESB.

Actuellement, le schéma de neuroinvasion couramment admis implique une phase de réplication de l'agent infectieux au niveau des tissus lymphoïdes suivie d'une phase de transport via le Système Nerveux Périphérique (SNP). A côté de cette voie de dissémination, il est légitime d'examiner l'hypothèse d'un passage direct de la PrP, administrée par voie sanguine, dans le LCS.

Ce travail avait deux principaux objectifs:

- Dans le cadre de la recherche d'un test diagnostique de la tremblante, comparer les concentrations et les caractéristiques de la PrPc du LCS des brebis tremblantes à celles des brebis saines.
- Evaluer l'occurrence d'un passage de la PrP du sang dans le LCS afin de documenter le risque transfusionnel et les mécanismes de neuro-invasion.

La première partie de ce travail est consacrée à une synthèse bibliographique des connaissances actuelles concernant la problématique prion.

Dans un premier temps, nous nous pencherons sur la tremblante ovine, ses mécanismes physiopathologiques, le mode de transmission et le diagnostic de la maladie. Nous étudierons ensuite plus en détail la protéine du prion cellulaire ou PrPc ; avec notamment les données structurales, le métabolisme, l'origine tissulaire et les rôles de la PrPc. Enfin, une troisième partie sera consacrée au liquide cérébro-spinal ou LCS ; après un rappel des données anatomiques, nous examinerons les mécanismes de formation et d'élimination du LCS, sa circulation, ses fonctions, les différentes protéines qu'il contient et enfin les modifications du LCS liées aux affections neurologiques dues aux prions.

Dans une deuxième partie, nous présenterons les réalisations expérimentales qui avaient respectivement pour objectif, d'analyser les variations inter-individuelles nyctémérales des concentrations en PrPc du LCS de brebis saines et de brebis atteintes de tremblante et, d'examiner l'occurrence d'un passage de PrP recombinante dans le LCS après son administration par voie intra-veineuse.



## **II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **A. La tremblante ovine**

#### **1. Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST)**

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) sont des affections neurodégénératives fatales qui touchent l'homme et l'animal. Elles sont dues à une nouvelle forme d'agents infectieux : le prion, acronyme de « proteinaceous infectious particle ». Ce groupe de maladies comprend, chez l'animal, la tremblante du mouton et de la chèvre (scrapie), les Encéphalopathies Spongiformes Bovine (ESB) et féline, l'encéphalopathie du vison et la maladie du dépérissement chronique des cervidés (chronic wasting disease) et chez les humains le kuru, la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), l'insomnie fatale familiale et le syndrome de Gerstmann-Sträussler. La MCJ présente plusieurs formes : héréditaire, sporadique, iatrogène et transmissible, la forme héréditaire présente un caractère autosomal dominant avec une forte pénétrance.

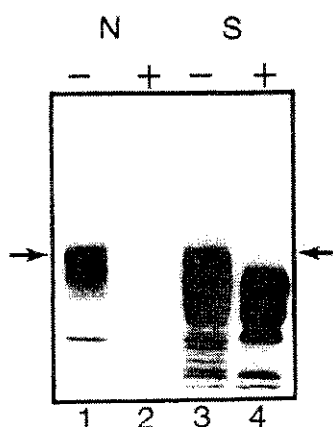
La tremblante du mouton est une maladie connue depuis 200 ans tandis que l'ESB a émergé dans les années 1980 à partir du Royaume Uni. Lors d'atteinte par la tremblante, on note des signes cliniques généraux comme des troubles du comportement, une perte de poids et de laine, de l'hyperthermie, de l'hyperpnée et un prurit qui se traduit par des plages d'excoriations réparties sur la tête, le dos et le thorax latéral. Des signes neurologiques peuvent également être observés comme de la dépression, une ataxie généralisée, de l'hyperesthésie tactile et une démarche hypermétrique (Tyler et al, 1999). L'ataxie est le symptôme majeur de la tremblante et de l'ESB.

## 2. Mécanismes physiopathologiques des ESST

### 2.1. Nature de l'agent infectieux : le prion

Le prion diffère des bactéries et des virus par sa structure et ses propriétés physicochimiques. Cet agent infectieux ne possède pas d'acide nucléique ce qui explique sa résistance aux différents procédés qui modifient ou détruisent les acides nucléiques (Stahl et Prusiner, 1991). L'agent infectieux défini comme un agent transmissible non conventionnel, est assimilé à la protéine du prion pathologique ou PrPsc qui est une isoforme anormale d'une protéine normalement exprimée dans les cellules : la PrP cellulaire ou PrPc (Figure 1). La PrPsc est une glycoprotéine de 33-37 kDa partiellement résistante aux protéases caractérisée après digestion totale de la PrPc et digestion partielle de la PrPsc qui est clivée par la protéinase K. Le fragment résistant à la protéinase K de la PrPsc appelé PrPres est identifié par Western Blot (Figure 1), ELISA ou immunohistochimie (IHC).

Dans le cerveau d'animaux sains, on retrouve uniquement la PrPc [environ 4 µg de PrPc/g de cerveau chez des brebis saines (Moudjou et al, 2001)] alors que dans le cerveau d'animaux atteints par la tremblante, on retrouve les deux isoformes avec une majorité de PrPsc (Stahl et Prusiner, 1991). La PrPsc insoluble s'accumule et forme des agrégats de fibrilles et de plaques amyloïdes (ce n'est pas le cas pour la PrPc).



Caractéristiques	PrPc	PrPsc
Cerveau normal	présente	absente
Cerveau atteint de tremblante	présente	présente
Lien avec la maladie	non	oui
Concentration (µg/g de cerveau)	20-40	60-160
Fibrilles <i>in vivo</i>	non	oui
Plaques amyloïdes	non	oui
Soluble dans du Sarkosyl	oui	non
Effet des protéases	dégradation totale	convertie en fragments résistants

A.

B.

Figure 1 : A. digestion de la PrPc et de la PrPsc par la protéinase K. Séparation par SDS-PAGE, détection par anticorps monoclonaux, N = normal, S = scrapie, - = sans protéinase K et + = avec protéinase K. Les flèches indiquent la position de la PrPc et de la PrPsc. B. comparaison de la PrPc et de la PrPsc chez le hamster (Bendheim et al, 1988).

## 2.2. Transconformation de la PrPc

### ❖ **Modèle catalytique versus modèle de nucléation-polymérisation**

Selon Prusiner, les prions agissent comme activateurs de la transconformation de molécules normales de PrPc en nouvelles molécules de PrP pathologiques ou PrPsc, le processus étant facilité par une autre molécule appelée la protéine X (Prusiner, 1998). Selon le modèle catalytique ou modèle de la matrice, hypothèse pouvant expliquer la modification de conformation d'une chaîne polypeptidique par une autre chaîne, les molécules de PrPsc exogènes interagissent avec les molécules PrPc endogènes, qui se transforment alors en PrPsc.

Selon le modèle de « l'ensemencement », également nommé « nucléation-polymérisation », la PrPc et la PrPsc coexistent dans un état d'équilibre thermodynamiquement réversible. C'est seulement lorsque plusieurs monomères de PrPsc se rassemblent sous la forme d'un centre de nucléation très organisé que de nouveaux monomères de PrPsc peuvent être recrutés et s'agréger en une structure amyloïde qui stabilise la protéine pathologique. La fragmentation de tels agrégats multiplie le nombre de centres de nucléation, ce qui permet le recrutement de nouvelles molécules et constitue un modèle de réplication de l'agent infectieux (Aguzzi et al, 1997).

### ❖ **Intervention de la protéine X**

La formation de prion au sein de l'organisme nécessiterait non seulement la présence du complexe PrPc-PrPsc mais aussi l'interaction de la PrPc avec une protéine appelée protéine X (Daggett, 1998; Prusiner, 1998), d'où un élément de spécificité d'espèce supplémentaire. En effet, la protéine X de souris par exemple, aurait une plus forte affinité pour la PrPc de souris (mPrPc) que pour la PrPc humaine (hPrPc) (Telling et al, 1995).

La protéine X ne se lierait pas à la PrPsc mais permettrait un profond changement de la structure protéique de la PrPc afin d'aboutir à la formation de PrPsc, via un processus de barrières d'activation. Telling a émis l'hypothèse selon laquelle la protéine X agirait comme une protéine de choc thermique c'est-à-dire comme une molécule chaperonne qui permettrait d'abaisser cette barrière d'activation. La

protéine X n'a pas encore été identifiée. On ne sait pas si c'est une protéine isolée ou un complexe protéique.

### **3. Transmission de la tremblante**

#### **3.1. Nécessité de la présence de la PrPc**

Les souris PrP 0/0 sont des souris knock out (KO) : elles ne possèdent pas le gène de la PrP et par conséquent n'expriment pas la PrPc dans quelque tissu que ce soit de leur organisme. Ces animaux sont résistants à l'infection par l'agent de la tremblante et ils ne propagent pas le prion. Du fait que ces souris n'expriment pas de développements ou de comportements anormaux, il a été émis l'hypothèse selon laquelle la pathologie de la tremblante provient plus d'un dépôt neurotoxique de PrPsc que d'une perte de fonction de la PrPc (Aguzzi et al, 1997).

Pour vérifier cette hypothèse, des cerveaux de souris KO (PrP 0/0) ont été exposés de manière continue à une source de PrPsc constituée par un greffon de tissu cérébral infecté par l'agent de la tremblante et provenant de souris surexprimant la PrPc (tg20, 5 à 8 fois plus qu'un individu normal) (Figure 2). Aucune souris n'a présenté de signe de tremblante pendant une période de 70 semaines minimum, soit une durée qui excède d'au moins sept fois le temps de survie d'une souris transgénique surexprimant la PrP (tg20). Par conséquent, la présence d'une source de production continue de PrPsc n'a exercé aucun effet délétère détectable sur les fonctions physiologiques d'une souris dépourvue de PrPc (PrP 0/0). L'analyse histologique des greffons tg20 avait révélé des lésions histopathologiques caractéristiques de la tremblante 70 et 160 jours respectivement après inoculation. La PrPsc serait donc pathogène seulement pour des cellules exprimant la PrPc.



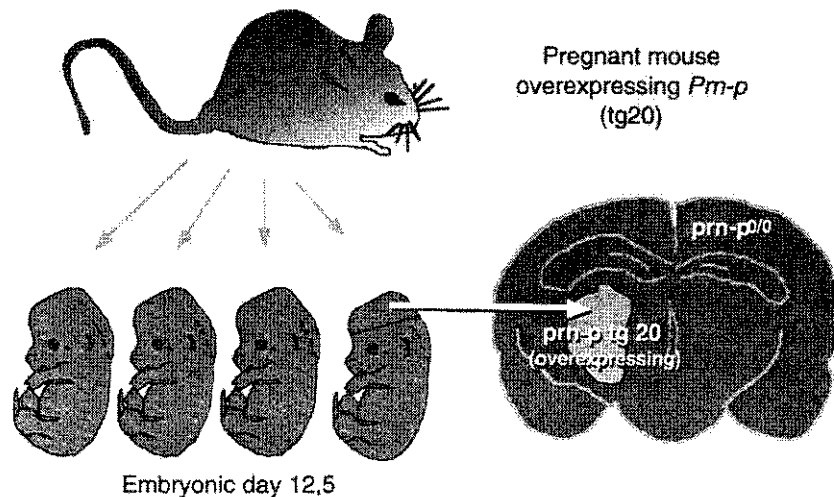


Figure 2 : Méthode de neurogreffes pour l'étude de la tremblante chez la souris (Aguzzi et al, 1997). Au sein du tissu cérébral PrP 0/0 d'embryons de souris KO de 12,5 jours, a été placé un greffon de tissu cérébral provenant de souris surexprimant la PrPc (tg20). Ce greffon (prn-p tg20) est par la suite inoculé avec l'agent de la tremblante.

L'injection intraoculaire (io) est une méthode particulièrement intéressante pour suivre la progression de l'agent infectieux au sein du tissu nerveux, étant donné que la rétine fait partie du SNC et qu'une injection intraoculaire ne perturbe en rien la Barrière Hémato-Méningée (BHM) et ne crée aucun traumatisme direct au sein du cerveau. Après une inoculation io de l'agent de la tremblante à des souris tg20, on observe une remontée progressive de la PrPsc, détectée par immunohistochimie, le long du nerf optique jusqu'à l'encéphale. Il s'ensuit une encéphalopathie généralisée et la mort. Après un protocole d'inoculation identique à des souris PrP 0/0 portant un greffon cérébral tg20 (Figure 2), aucune lésion de tremblante n'est constatée. Par conséquent, l'administration de l'agent infectieux io à des souris n'exprimant pas la PrPc n'induit pas de lésions caractéristiques de tremblante au sein d'un greffon intracérébral qui exprime la PrPc (Aguzzi et al, 1997).

L'absence de propagation du prion de l'œil jusqu'au greffon chez les souris KO ne serait pas due à la réponse immunitaire dirigée contre la PrP chez les souris greffées mais à l'absence de cette protéine au sein des tissus de l'animal. En effet, la neuro-invasion est également empêchée lorsqu'une manipulation de transgénèse spécifique rend impossible la production d'anticorps anti-PrP. La PrP est donc indispensable à la progression du prion à partir de l'œil le long de la projection rétinienne et dans le cerveau (Aguzzi et al, 1997).

La présence de la PrPc est nécessaire à la transmission de la maladie. Cependant, au sein des nombreuses cellules de l'organisme exprimant la PrPc, très peu sont capables de répliquer l'agent infectieux : cette propriété est l'apanage des cellules gliales, des cellules folliculaires dendritiques et des neurones du SNC qui sont les cibles spécifiques du processus lésionnel des ESST.

### **3.2. Mécanismes de neuroinvasion chez la brebis**

Dans cette partie, nous aborderons les mécanismes de neuroinvasion impliqués lorsque la contamination s'effectue dans les conditions naturelles (par voie orale) chez la brebis. Les études de la pathogénie de la tremblante distinguent 2 phases dans le processus de neuroinvasion : une phase de colonisation des organes lymphoïdes et une phase de transport axonal via le Système Nerveux Périphérique (SNP) (Baldauf et al, 1997).

Chez des agneaux issus d'un troupeau naturellement infecté, uniquement de génotype très sensible à la maladie (génotype VRQ/VRQ *cf infra*), la PrPsc est détectée dès l'âge de 2 mois au niveau des plaques de Peyer ainsi que dans le nœud lymphatique mésentérique (Andréoletti et al, 2000). Entre 3 et 6 mois, la PrPsc est détectée dans la plupart du GALT (gut-associated lymphoid tissues) ou tissus lymphoïdes associés au tube digestif ; dans une moindre mesure on retrouve la PrPsc au niveau de formations lymphoïdes plus systémiques telles que la rate ou le nœud lymphatique médiastinal. Une première réplication de l'agent infectieux se produit dans ces tissus puis l'agent infectieux est disséminé dans tout le système immunitaire via la voie lymphatique. A l'âge de 9 mois, tous les organes lymphoïdes secondaires sont infectés par la PrPsc (Andréoletti et al, 2000).

La maladie gagnerait le système nerveux central (SNC) par les fibres nerveuses innervant les tissus lymphoïdes ou par la voie sanguine (Van Keulen et al, 2000). Dès l'âge de 9 mois chez des agneaux naturellement infectés par la tremblante, la PrPsc est détectée au niveau du plexus nerveux myentérique autonome et dans le noyau parasympathique du nerf vague (X) (Andréoletti et al, 2000). Une deuxième réplication de l'agent de la tremblante a lieu dans la moelle épinière et dans le cerveau (Andréoletti et al, 2000). Le système nerveux intestinal serait une porte

d'entrée vers les tissus nerveux pour l'agent de la tremblante qui suivrait une dissémination centripète et rétrograde, via les fibres efférentes sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome, respectivement vers la moelle épinière et la moelle allongée (Figure 3). L'accumulation de PrPsc au niveau de ganglions sensitifs n'apparaît qu'après l'infection du SNC. Cela serait probablement dû à une dissémination centrifuge et antérograde, à partir du SNC, de l'agent de la tremblante via les fibres nerveuses afférentes (Van Keulen et al, 2000).

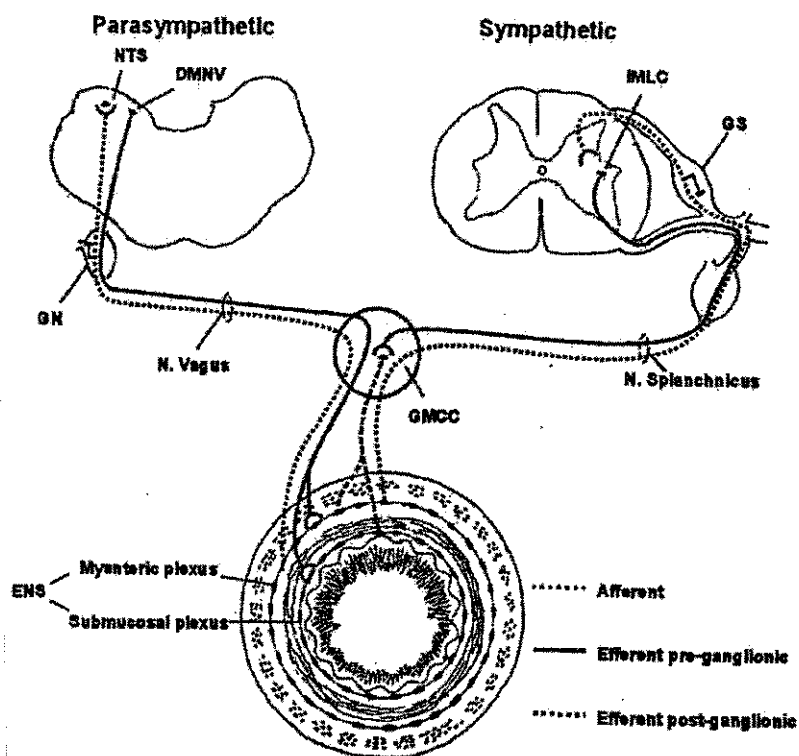


Figure 3: Représentation schématique de l'innervation parasympathique (sur la gauche) et sympathique (sur la droite) du système nerveux entérique (Van Keulen et al, 2000). Les corps cellulaires des fibres nerveuses efférentes parasympathiques sont situés dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMNV = dorsal motor nucleus of the vagus) dans la moelle allongée (portion pré-ganglionnaire) et dans le système nerveux entérique situé au niveau de la paroi intestinale (portion post-ganglionnaire) ; les corps cellulaires des fibres nerveuses efférentes sympathiques sont situés dans la colonne intermédiolatérale (IMLC = intermediolateral column) de la moelle épinière (portion pré-ganglionnaire) et dans le ganglion mésentérique crânial / coeliaque (GMCC + ganglion mesentericum cranialis/coeliacum) (portion post-ganglionnaire). Les fibres nerveuses afférentes parasympathiques ont leurs corps cellulaires dans le ganglion nodosum (GN) et se terminent dans le noyau du tractus solitaire (NTS). Les corps cellulaires des fibres nerveuses afférentes sympathiques sont situés dans les ganglions spinaux (GS).

Il existe cependant une différence notable entre les ovins à génotype très sensible à la tremblante (homozygotes VRQ/VRQ cf *infra*) qui accumulent de la PrPsc dans les tissus lymphoïdes dès les premiers stades de la maladie, puis plus tard dans le SNC ; et les moutons modérément sensibles à la tremblante (hétérozygotes ARR/VRQ cf *infra*) chez lesquels la PrPsc ne s'accumule qu'au niveau du SNC (Andréoletti et al, 2000).

Une autre voie pathogénique possible lors d'une infection naturelle par la tremblante serait la dissémination de l'infectiosité via le sang chez des ovins naturellement infectés. Van Keulen et al (2000) a mis en évidence des dépôts amyloïdes de PrPsc au niveau des cellules endothéliales des capillaires sanguins dans le thalamus à un stade où l'accumulation de PrPsc dans les neurones et les cellules gliales serait restreinte au noyau moteur dorsal du nerf vague au niveau de la moelle allongée. Une fois les cellules endothéliales infectées, l'agent de la tremblante pourrait être disséminé dans le tissu nerveux central en colonisant les neurones et les cellules gliales au voisinage des capillaires et des vaisseaux sanguins (Van Keulen et al, 2000).

### **3.3. Modes de transmission de la tremblante**

#### **❖ Conditions naturelles : voie orale**

Les ESST sont les seules maladies qui ont un caractère à la fois infectieux et héréditaire. En effet, la MCJ par exemple présente une forme familiale alors qu'une autre ESST humaine, l'épidémie de kuru, a été associée à un rituel cannibale (Prusiner, 1998).

L'expression de la PrPc est essentielle au processus pathologique des ESST et à la propagation au sein de l'organisme de l'infectiosité. La détection d'ARNm de la PrP dans le cerveau de mouton aux deux tiers de gestation et la présence d'ARNm de la PrP dans divers tissus de fœtus et de jeunes agneaux ainsi que dans le plasma témoigne d'un risque d'infection pré ou périnatale du fœtus ou d'un agneau nouveau-né d'une mère infectée (Goldmann et al, 1999). Selon Andréoletti et al (2002), la transmission de la tremblante de la mère à l'agneau s'effectuerait plutôt de manière horizontale très tôt en période post-natale.

Dans des conditions naturelles, la transmission de la tremblante se produit via une contamination périphérique : par voie orale (Andréoletti et al, 2000). La présence de placentas issus de mères contaminées par la tremblante augmenterait la contamination de l'environnement par l'agent pathogène (Andréoletti et al, 2002).

#### ❖ **Risque transfusionnel : voie intraveineuse**

Pour l'instant, les études épidémiologiques n'ont pas mis en évidence l'existence d'un risque de développement de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) suite à une transfusion sanguine (Wilson et al, 2000). L'identification récente d'un cas de nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJnv) chez un patient qui avait reçu du sang d'un donneur décédé à la suite d'une MCJnv suggère une possible contamination via la transfusion sanguine (Llewelyn et al, 2004). En effet, la MCJnv présente des différences avec la forme sporadique à la fois sur le plan épidémiologique, avec notamment l'existence de facteurs de risque environnementaux, et sur le plan de la pathogénie, comme en témoigne la présence de l'agent infectieux dans les formations lymphoïdes périphériques des patients atteints du nouveau variant de la maladie.

La question du risque transfusionnel peut être exprimée de la façon suivante : y-a-t-il suffisamment de PrPsc dans le sang périphérique d'un individu en période d'incubation de la maladie pour provoquer une infection ? L'infectiosité du prion est exprimée en ID<sub>50</sub> avec 1 ID<sub>50</sub> la quantité qui cause la maladie chez 50% des receveurs. Une ID<sub>50</sub> équivaudrait à 10<sup>5</sup> molécules de PrPsc, ce qui représenterait environ 5.10<sup>-15</sup>g de protéine (Foster, 2000). A partir de sang prélevé sur des humains atteints de la MCJ, la transfusion de sang total à des chimpanzés n'a pas démontré d'infectiosité (Dickmeiss et Gerstoft, 2002). L'infectiosité du sang dans le cas d'un processus physiopathologique spontané d'ESST a été cependant fortement suggérée par les travaux de Schmerr et al (1999) qui mettent en évidence la présence de PrPres dans le « buffy coat » des agneaux âgés d'un mois dont la mère était atteinte de tremblante naturelle. La transmission expérimentale de l'agent infectieux via le sang issu d'animaux infectés est possible et la voie intraveineuse d'inoculation de l'agent de l'ESB est une voie particulièrement efficace chez les primates (Herzog et al, 2004). Le sang total d'ovin infecté par l'agent de l'ESB s'est révélé infectieux aussi bien au stade clinique que pré-clinique (Hunter et al, 2002 ;

Houston et al, 2000). De plus, des études réalisées chez des rongeurs inoculés expérimentalement par voie intra-cérébrale indiquent que le sang peut contenir l'agent infectieux de la MCJ suggérant l'existence d'un risque transfusionnel potentiel (Foster, 2000).

Ainsi se justifient les mesures restrictives concernant l'utilisation de sang total et de ses dérivés au Royaume-Uni compte tenu du risque de transmission d'ESST par le biais d'une transfusion (Llewelyn et al, 2004). Des mesures de précaution comme la leucofiltration ont été adoptées pour limiter le risque transfusionnel mais des données scientifiques supplémentaires sont nécessaires pour définir ce risque. L'infectiosité la plus importante se situerait au niveau du « buffy coat » et plutôt au niveau des leucocytes que des plaquettes (Dickmeiss, 2002). En l'absence de barrière d'espèce, le sang pourrait constituer pour l'homme la même menace que furent les farines animales pour l'épidémie d'ESB.

Au niveau sanguin, on assiste à des tentatives de développement de méthodes de détection de la PrPsc. Chez des brebis atteintes de tremblantes la PrPsc n'a pas été détectée par immunohistochimie (IHC) sur les leucocytes issus du sang périphérique (Herrmann et al, 2002). Il y a plusieurs possibilités pouvant tenter d'expliquer cette non détection, (i) la sensibilité de l'IHC est inadéquate, (ii) les macrophages présents dans les nœuds lymphatiques accumulent de la PrPsc détectable par IHC contrairement aux leucocytes circulants, (iii) la PrPsc n'est pas associée à des cellules dans le sang périphérique ou (iiii) le moment de détection est inapproprié par rapport au moment où la PrPsc circulerait via les leucocytes (Herrmann et al, 2002). Selon Schmerr, l'immunoélectrophorèse par capillarité serait une méthode apte à détecter la présence de PrPsc dans le sang de brebis atteintes par la tremblante et chez les autres espèces animales (Schmerr et al, 1999).

#### ❖ Facteurs de susceptibilité

La période d'incubation d'une ESST est très longue et est fonction de facteurs génétiques et environnementaux (Manolakou et al, 2001, modèle murin expérimentalement infecté par l'agent de l'ESB). L'âge de la mère de l'animal atteint, l'âge de l'animal au moment de son infection par l'agent de l'ESST, le sexe et le génotype de l'animal influencent fortement la durée d'incubation (Manolakou et al, 2001).

Il y aurait une forte corrélation entre le polymorphisme du gène qui code pour la protéine du prion cellulaire appelé PrnP et l'occurrence d'ESST chez les ovins. Les codons du gène PrnP majoritairement associés à la tremblante du mouton sont en position 136 (A alanine ou V valine), 154 (R arginine ou H histidine) et 171 (Q glutamine ou R arginine) (Goldmann et al, 1999) (Figure 4). Les génotypes les plus sensibles à l'infection sont VRQ/VRQ (homozygote  $V^{136}R^{154}Q^{171}$ ) avec une incidence de la maladie de 80% et le génotype ARQ/ARQ avec une incidence de 45 %. Les animaux de génotype VRQ/ARR ont une sensibilité modérée face à la tremblante (une incidence de 5%) tandis que les brebis ARR/ARR sont résistantes (aucun cas de tremblante dans ce groupe d'animaux) (Andréoletti et al, 2000).

Chez les humains également, le polymorphisme de la séquence génique de la PrP est la source d'une plus ou moins grande résistance aux ESST. Toutes les victimes du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJnv), sont homozygotes pour la méthionine au codon 129 du gène de la PrP (Manolakou et al, 2001). La plupart des familles atteintes du syndrome de Gerstmann-Straüssler ont une substitution, au niveau du codon 102, de la proline par une leucine et il y a de nombreuses mutations du gène PrnP associées avec la MCJ familiale (Hunter et al, 1993) notamment sur le codon 200.

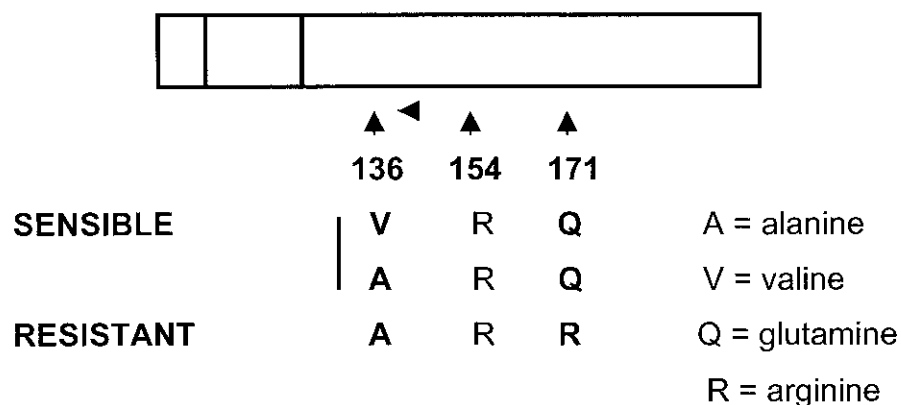


Figure 4 : Sensibilité ovine à la Tremblante liée aux variants alléliques de l'oPrP.

#### 4. Diagnostic des ESST

Le diagnostic clinique doit être conforté par un diagnostic de certitude qui repose sur trois méthodes :

- Démonstration expérimentale de la transmissibilité par inoculation à un animal de laboratoire.
- Mise en évidence des lésions histopathologiques.
- Mise en évidence de l'accumulation de PrPres (par Western Blot, immunohistochimie ou ELISA).

L'inoculation du matériel potentiellement infectieux par voie intracérébrale à un animal de laboratoire (souris, hamster) est la méthode de référence pour mettre en évidence l'infectiosité d'un prélèvement. Mais l'obtention des résultats est très longue.

L'apparition des lésions du SNC au cours des ESST répond au schéma suivant : l'agent, quelle que soit sa nature, se réplique dans les neurones, ce qui conduit à l'accumulation de la PrP sous forme de PrPsc. Celle-ci échappe au catabolisme cellulaire par les protéases et son accumulation serait toxique pour la cellule dans laquelle elle a lieu. En effet, l'absence de destruction de la protéine favorise, par un mécanisme inconnu, les fusions entre les lysosomes, vésicules cytoplasmiques riches en enzymes cytolitiques, ce qui génère de larges vacuoles dans le neurone (Figure 5 a), et le neurone meurt en libérant de la PrPres dans le microenvironnement cellulaire. La protéine pathologique libérée dans le milieu extracellulaire pourrait induire l'apoptose de neurones sains, participant ainsi à une dépopulation neuronale en dehors de toute infection directe. La voie d'induction de la mort neuronale par apoptose dépendrait de la présence de la PrPc à la surface du neurone. Par ailleurs, la PrPres libérée dans les espaces extracellulaires pourrait induire la production de cytokines par les cellules gliales qui serait impliquée dans les dommages neuronaux, notamment l'astrocytose (Figure 5 b) (Prusiner, 1998).

Les lésions tissulaires, restreintes au SNC, sont donc de 4 types : la spongiose, la mort neuronale, la gliose et les plaques amyloïdes (amas de PrPsc). Aucune lésion n'est détectable dans le tissu lymphoïde. Le diagnostic histopathologique de la tremblante repose sur la mise en évidence des lésions caractéristiques de la tremblante dans au moins 3 noyaux gris.



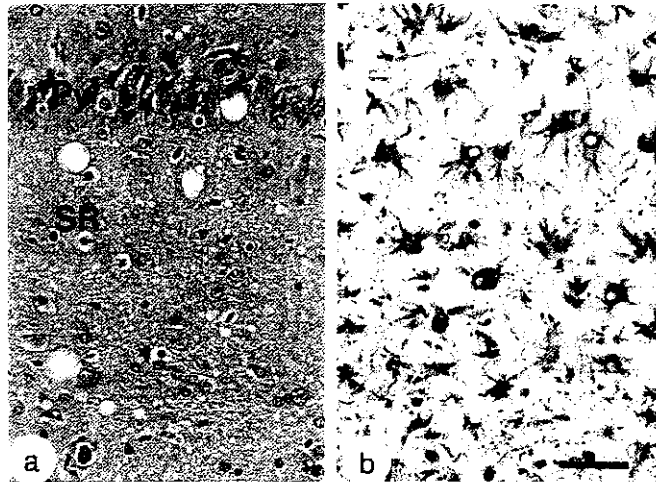


Figure 5 : Modifications neuropathologiques chez une souris après inoculation par l'agent de la tremblante (Prusiner, 1998). Coupes d'hippocampe (a) spongieuse, Py = couche de cellules pyramidales, SR = stratum radiatum (b) astrocytose.

Le diagnostic d'une ESST repose sur un principe fondamental : la mise en évidence de la PrPres chez un individu est considérée comme un marqueur de la maladie. Le diagnostic de certitude de la tremblante s'effectue par la mise en évidence de la PrPres, après digestion totale de la PrPc par un prétraitement à la protéinase K et une dénaturation de la PrPsc, sur des prélèvements de cerveau d'individus suspects par analyse immunohistochimique ou d'autres méthodes de détection des protéines (Schreuder et al, 1996). L'immunohistochimie (IHC) est une méthode très sensible mais également très lourde et elle prend beaucoup de temps. Elle serait 1000 fois plus sensible que le Western blot. Avant apparition de tout signe clinique, on peut diagnostiquer un stade pré-clinique de la tremblante du mouton à partir de prélèvements d'amygdales par biopsie (Jeffrey et al, 2001).

Enfin, la détection de la PrPres dans le tissu nerveux par Western Blot ou par ELISA donne des résultats en 8 heures environ. Ces tests rapides, qui nécessitent l'élimination préalable de la PrPc par digestion enzymatique et dénaturation de la PrPsc, sont notamment utilisés dans le dépistage systématique de tous les bovins de plus de 30 mois à l'abattoir dans le cadre de la surveillance de l'ESB (kits Prionics® et Biorad® qui utilisent respectivement le Western Blot et l'ELISA).

## **B. La protéine prion cellulaire ou PrPc**

### **1. Données structurales**

#### **1.1. Structure primaire de la PrP**

##### **❖ Chaîne polypeptidique de la PrP**

La longueur de la chaîne polypeptidique varie très peu (265 acides aminés (aa) chez la vache) et présente une importante homologie chez les Mammifères (85 à 95 %) (Fournier, 2001). Après digestion par la protéinase K de la PrPsc (PrPsc et PrPc ont une structure primaire identique), la région N terminal est clivée donnant ainsi la PrPres de 27-30 kDa.

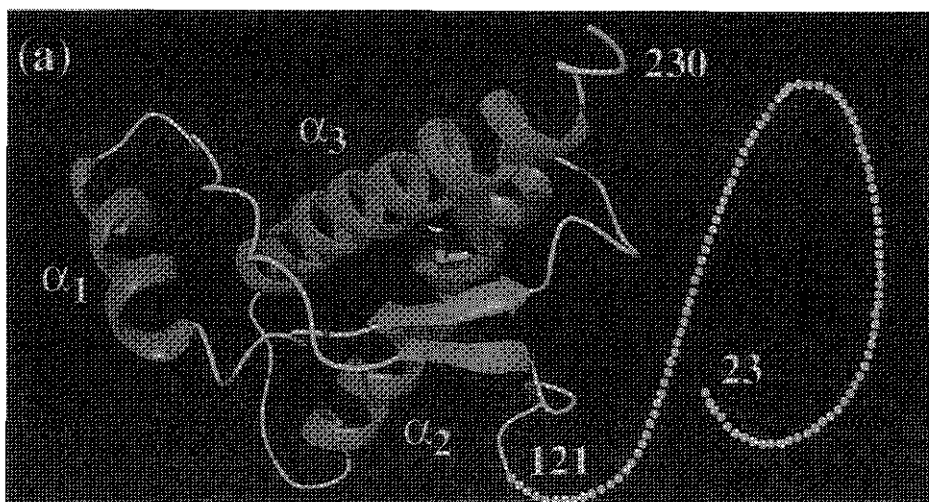
##### **❖ Modification post traductionnelle de la PrP**

Aux deux sites de N-glycosylation dans chaque espèce (aux codons 181 et 197), des oligosaccharides sont rattachés ce qui produit la PrP mature de 33-35 kDa. La PrP n'est pas O-glycosylée. Elle contient un pont disulfure intramoléculaire entre les aa 177 et 212 (chez le hamster), ce qui forme une courbe. L'extrémité C terminale est une région hydrophobe contenant une séquence de 23 aa qui est clivée lorsque l'ancre glycoposphatidylinositol (GPI) est rattachée (Stahl et al, 1992).

#### **1.2. Structure tridimensionnelle de la PrP**

##### **❖ Structure tridimensionnelle de la protéine prion bovine (bPrPc)**

La structure de la protéine prion bovine cellulaire ou bPrPc a été décrite par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Figure 6). Elle est constituée d'un domaine globulaire et de l'extrémité N-terminale, flexible et désordonnée. La partie globulaire contient trois hélices alpha ( $\alpha$ ), les hélices 2 et 3 étant reliées par un pont disulfure, et deux courts feuillets bêta ( $\beta$ ) antiparallèles (Garcia et al, 2000).



**Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la bPrP(23-230) (Garcia et al, 2000).** Les hélices  $\alpha$  sont en vert, les feuillets  $\beta$  en bleu, en jaune les segments sans structure secondaire stable au niveau du domaine C-terminal, et la « queue » flexueuse et désorganisée des aa 23-121 est représentée par 108 points jaunes.

#### ❖ Variations inter-spécifiques structurales et barrière d'espèces

Globalement, on peut affirmer que l'architecture de la bPrPc(23-230) est identique aux protéines recombinantes de souris, d'hamster et d'humain. Cependant, il existe des différences ou des similitudes de structures tridimensionnelles des protéines du prion en fonction de l'espèce, ce qui permettrait d'expliquer la difficulté ou la facilité de franchissement de la barrière d'espèce. La différence entre bPrPc et hPrPc se situe au niveau de la distribution des charges électrostatiques de surface, qui pourrait constituer l'élément essentiel de la barrière d'espèce entre les humains et les bovins (Garcia et al, 2000).

#### ❖ Sites potentiels de reconnaissance spécifique

A partir de la structure RMN du fragment infectieux de la mPrP, deux sites de liaisons protéiques ont été découverts sur la séquence en acides aminés de la PrP. Un de ces sites de liaison pourrait assurer la liaison avec une particule infectante de PrPsc. Le deuxième site, situé près de l'extrémité C terminale, permettrait

l'interaction avec la protéine X (Billeter et al, 1997). Des variations inter-spécifiques au niveau de ce dernier site pourrait contribuer à la barrière interspécifique (Telling et al, 1995).

#### ❖ Structure tridimensionnelle de la PrP<sup>c</sup>

Bien qu'ayant une même séquence polypeptidique, la PrP<sup>c</sup> et la PrP<sup>sc</sup> diffèrent par leur conformation spatiale (Figure 7). La PrP<sup>c</sup> a une structure protéique secondaire qui contient environ 43% d'hélices  $\alpha$  et très peu de feuillets  $\beta$  (3%), tandis que la PrP<sup>sc</sup> est formée de 43% de feuillets  $\beta$  et 30% d'hélices  $\alpha$  (Fournier, 2001).

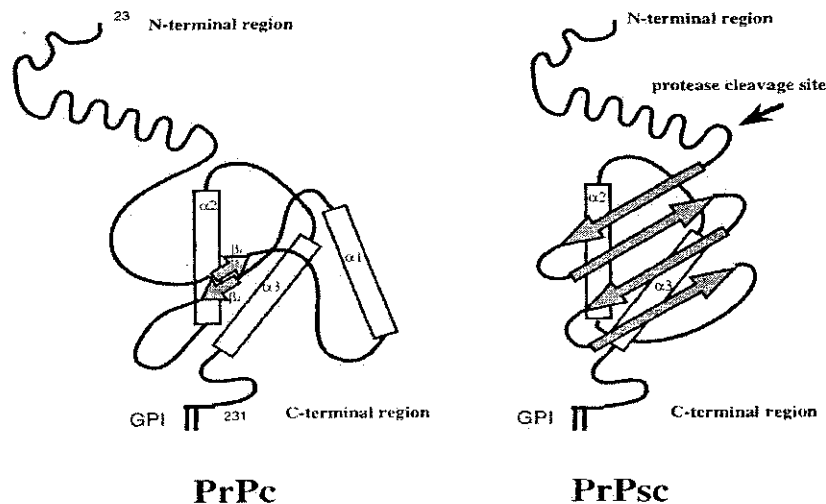


Figure 7 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>sc</sup> (Fournier, 2001). La PrP<sup>c</sup> a une structure protéique secondaire qui contient environ 43% d'hélices  $\alpha$  et très peu de feuillets  $\beta$  (3%), tandis que la PrP<sup>sc</sup> est formée de 43% de feuillets  $\beta$  et 30% d'hélices  $\alpha$ . La flèche indique un site de clivage par la PK.

Au niveau de la structure de la PrP<sup>sc</sup> liée à la MCJ, il y a trois domaines majeurs (Parchi et al, 2000) : la région N terminale qui est invariablement sensible à la protéinase K (PK), la région C terminale résistante à la PK qui contient de nombreux feuillets  $\beta$ , et une troisième région très variable où la conversion entre une structure inorganisée et une structure en feuillets  $\beta$  est fonction de la nature de l'aa présent en 129. Pour la PrP humaine, la méthionine et la valine présentes en 129 semblent réguler la taille de cette région variable et la présence ou non de feuillets  $\beta$ . Il y a deux sites primaires de clivage par la PK : au niveau des aa 82 et 97 (Figure 8); d'où

la formation de deux type de PrPres, l'une de 19 kDa (type 1) et l'autre de 21 kDa (type 2).

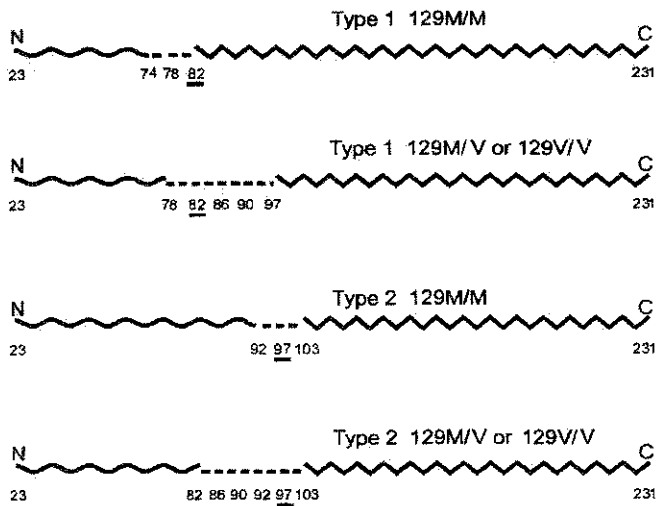


Figure 8 : Variations structurales de la PrPsc humaine liées aux différents sites de clivage par la PK (Parchi et al, 2000). Il y a trois régions distinctes : la région sensible à la PK (vagues), la région variable (pointillés) où se situent de nombreux sites de clivages primaires (soulignés) ou secondaires et la région résistante à la PK (zig-zag).

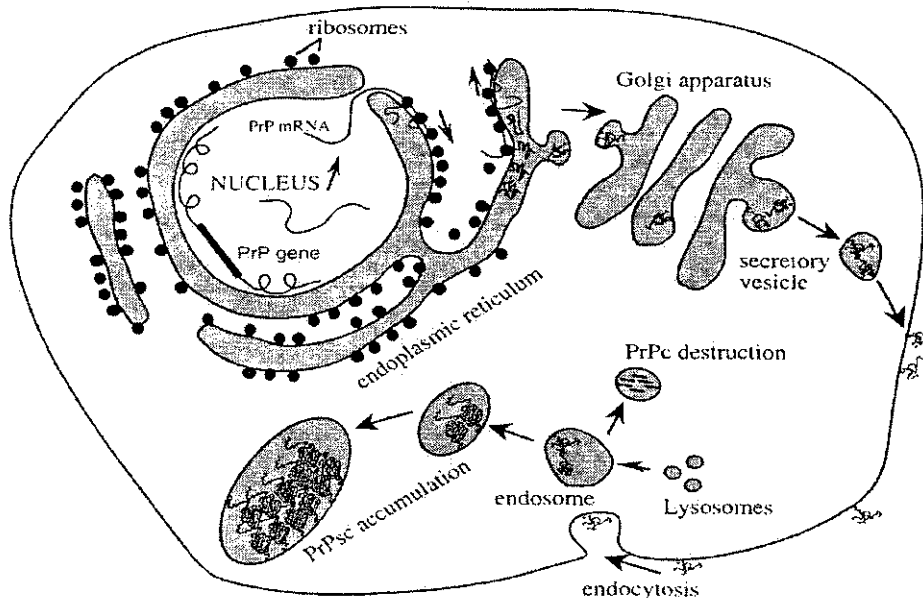
## 2. Métabolisme de la PrP : cycle de vie

### 2.1. Du noyau à la membrane plasmique

La PrPc est synthétisée puis dégradée rapidement. Moins d'une heure après le début de sa biosynthèse, la PrPc atteint la surface cellulaire. Le temps de demi vie de la PrPc est de 3 à 6 heures. Le processus de dégradation intracellulaire n'est pas encore totalement élucidé (Figure 9). Comme toute protéine membranaire, le cycle métabolique de la PrPc débute au niveau du réticulum endoplasmique. Au cours du transport dans l'appareil de Golgi, la protéine est glycosylée (Caughey et al, 1989). Au même moment, un pont disulfure est formé, lequel influence la glycosylation N terminale. Puis, via les vésicules de sécrétions, la PrPc est acheminée jusqu'à la membrane plasmique où elle se fixe par le groupement GPI. Fixée au niveau de la membrane plasmique, la PrPc subit deux clivages. D'un premier clivage sur le GPI résulte le largage de la PrPc dans l'espace extracellulaire (Harris, 1999).

## 2.2. De la membrane plasmique au cytoplasme

A la surface cellulaire, la PrPc subit un recyclage permanent entre la membrane plasmique et le compartiment d'endocytose. L'endocytose de la PrPc requiert la présence de récepteurs membranaires particuliers : les puits à clathrine (Shyng et al, 1994). Les vésicules d'endocytose sont formées par invagination de la membrane plasmique, elles fusionnent par la suite avec d'autres organites intracellulaires. La séquence N terminale de la PrPc est nécessaire au bon fonctionnement de cette internalisation. Un autre moyen d'endocytose adapté aux protéines portant un groupement GPI serait l'utilisation de récepteurs d'invagination particuliers : les cavéoles, puits d'invagination recouverts d'une protéine nommée cavéoline. Cette théorie est discutée (Shyng et al, 1994). La conversion de la PrPc en PrPsc pourrait avoir lieu à la surface de la cellule ou après internalisation de PrPc et de PrPsc et fusion avec les lysosomes où la PrPsc s'accumule.



**Figure 9 : Cycle cellulaire de la PrPc (Fournier, 2001).** Le cycle métabolique de la PrPc débute au niveau du réticulum endoplasmique où le groupement GPI et des glycanes riches en mannose sont rapidement rattachés à la protéine. Au cours du transport dans l'appareil de Golgi la protéine est glycosylée. Au même moment, le pont disulfure est formé, lequel influence la glycosylation N terminale. Puis, via les vésicules de sécrétions, la PrPc est acheminée jusqu'à la membrane plasmique où elle se fixe par le groupement GPI. Ce dernier peut être digéré, on retrouve alors de la PrPc détachée de la surface cellulaire. A la surface cellulaire, la PrPc subit un recyclage permanent entre la membrane plasmique et le compartiment d'endocytose. Les glycanes sulfatés favorisent l'endocytose, dirigeant certaines molécules de PrPc vers les endosomes et/ou les lysosomes. La conversion de la PrPc en PrPsc se fait probablement au cours du cheminement vers les lysosomes où la PrPsc s'accumule.

### **3. Origine de la PrPc**

#### **3.1. Synthèse de la PrPc par les cellules non neuronales**

##### **❖ Au niveau du tissu cérébral**

La synthèse de la PrPc et sa conversion en PrPsc peuvent être effectuées dans les cellules gliales, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les cellules épendymaires, l'épithélium des plexus choroïdes, les péricytes et les cellules des méninges (Fournier, 2001).

##### **❖ Dans les tissus extracérébraux**

La PrPc est une protéine ubiquitaire. Elle est présente notamment au niveau du système lymphoréticulaire qui joue un rôle clé dans la pathogenèse de la tremblante après infection périphérique. La rate et les nœuds lymphatiques synthétisent de la PrPc qui est convertie à la suite de l'infection en PrPsc (Kimberlin et al, 1989, modèle murin d'étude de la tremblante). Ce sont surtout les cellules dendritiques folliculaires qui synthétisent la PrPc au niveau de la rate, des nœuds lymphatiques et des plaques de Peyer de l'iléon (Fournier, 2001).

Au niveau des cellules de la circulation sanguine, la PrPc est exprimée sur la membrane des lymphocytes et des monocytes alors qu'elle n'est pas détectable à la surface des érythrocytes et des granulocytes (Cashman et al, 1990). Chez l'homme, la majorité de la PrPc retrouvée dans le sang se situe dans les plaquettes (26,5%) et dans le compartiment plasmatique suite à la desquamation des cellules endothéliales (68,5%) (Fournier, 2001). La PrPc se retrouve également dans les monocytes tissulaires différenciés, par exemple les cellules microgliales dans le cerveau. La concentration plasmatique en PrPc est plus élevée chez les individus atteints d'insuffisance rénale (Starke et al, 2002).

Au niveau de la peau, la PrPc est présente dans les cellules épithéliales chez l'homme (Fournier, 2001). Au niveau du tractus gastro-intestinal, la PrPc est retrouvée dans l'estomac, dans diverses cellules intestinales et dans le foie. Elle est également présente au niveau des poumons, des muscles, des cellules spermatiques matures et des cellules épидидymaires (Gatti et al, 2002). Enfin, on

retrouve la PrPc dans le pancréas, au niveau du cristallin, des surrénales, des glandes salivaires, des reins, du cœur (Bendheim et al, 1992), du placenta et pour finir au niveau du myomètre utérin (Moudjou, 2001 ; Fournier, 2001).

Les organes pour lesquels la présence de l'infectiosité a été démontrée (amygdales, thymus, intestins et rate) ne contiennent pas plus de PrPc que les tissus qui ne sont pas le support de l'infection (muscles squelettiques et cœur) (Moudjou et al, 2001).

### **3.2. Localisations intracellulaires de la PrPc**

La membrane plasmique est le lieu de destination final de la PrPc. La PrPc est exprimée à la surface des cellules rénales, gastriques et intestinales, et est également retrouvée dans les vésicules et les granules de sécrétion (Bendheim et al, 1992). Dans les cellules de Clara au niveau pulmonaire, l'expression de la PrPc se fait uniquement dans les vésicules de sécrétion. Au niveau de la jonction neuromusculaire, elle se trouve dans les vésicules du sarcoplasme subsynaptique. La PrPc peut également se retrouver au niveau de l'appareil de Golgi, dans les nucléoles et dans les mitochondries, plus particulièrement dans le mitoplasme (Aiken et al, 1989).

### **4. Rôles de la PrP**

La conservation phylogénétique de la PrPc suggère l'importance de ses fonctions physiologiques qui restent mal connues.

Chez des animaux déficients pour le gène de la PrP (KO), on assiste soit un développement totalement normal, soit à la manifestation d'anomalies neurologiques, de l'ataxie et des troubles des rythmes endogènes. Les troubles nerveux importants (type ataxie) ne concerneraient que des lignées présentant des altérations génétiques autres que celles du gène PrP. Aucune anomalie n'a jamais été constatée en dehors du SNC chez des animaux déficients pour le gène PrP. Par conséquent, bien que la PrPc soit très largement distribuée au sein de l'organisme, son rôle physiologique ne semble primordial qu'au niveau des cellules nerveuses.



La présence de la PrPc dans les cellules mucosécrétrices des glandes salivaires, dans les granules de sécrétions pulmonaires, stomacales et dans les cellules intestinales suggère un rôle de la PrPc dans le processus sécrétoire au cours duquel la PrPc pourrait constituer un produit de sécrétion.

La PrPc est une métalloprotéine qui possède une affinité importante pour le cuivre, lequel peut se fixer sur une région de la PrPc formant une structure hélicoïdale (Daggett, 1998). La PrPc pourrait servir de récepteur d'endocytose pour la pénétration cellulaire du cuivre à partir du milieu extracellulaire. La PrPc participe également à l'équilibre d'oxydoréduction ayant une activité de type superoxyde diosmutase (SOD) qui serait  $\text{Cu}^{2+}$  dépendante (Brown et al, 1998).

Il a été mis en évidence l'interaction de la PrPc avec un précurseur de récepteur à la laminine de 37 kDa, ce qui révèle la relation existant entre la PrPc et la matrice extracellulaire. Cette découverte ouvre des perspectives sur le rôle de la PrPc dans l'adhésion cellulaire et la transmission de signaux (Fournier, 2001).

## **C. Le Liquide Cérébro-Spinal (LCS)**

### **1. Données anatomiques**

Le Liquide Cérébro-Spinal (LCS), anciennement Liquide CéphaloRachidien (LCR), est clair, incolore et baigne entièrement le Système Nerveux Central (SNC) en occupant un compartiment central, constitué par le système ventriculaire, et un compartiment périphérique : l'espace sous-arachnoïdien.

#### **1.1. Le système ventriculaire**

Le système ventriculaire de l'encéphale se compose de plusieurs cavités, appelées ventricules. Ces cavités sont délimitées par l'épithélium épendymaire et contiennent le LCS (De Lahunta, 1983). Dans chaque hémisphère se trouve un ventricule latéral communiquant par des foramens interventriculaires avec une cavité étroite qui se trouve en position médiane dans le diencephale : le troisième ventricule. Le troisième ventricule est relié par un canal, l'aqueduc mésencéphalique, avec le quatrième ventricule, vaste et large cavité qui rejoint le canal central de la moelle épinière. Les foramens du quatrième ventricule permettent le passage du LCS du système ventriculaire vers l'espace sous-arachnoïdien.

Ces ventricules communiquent donc entre eux, avec le canal central de la moelle épinière et avec l'espace sous-arachnoïdien (Figure 10).

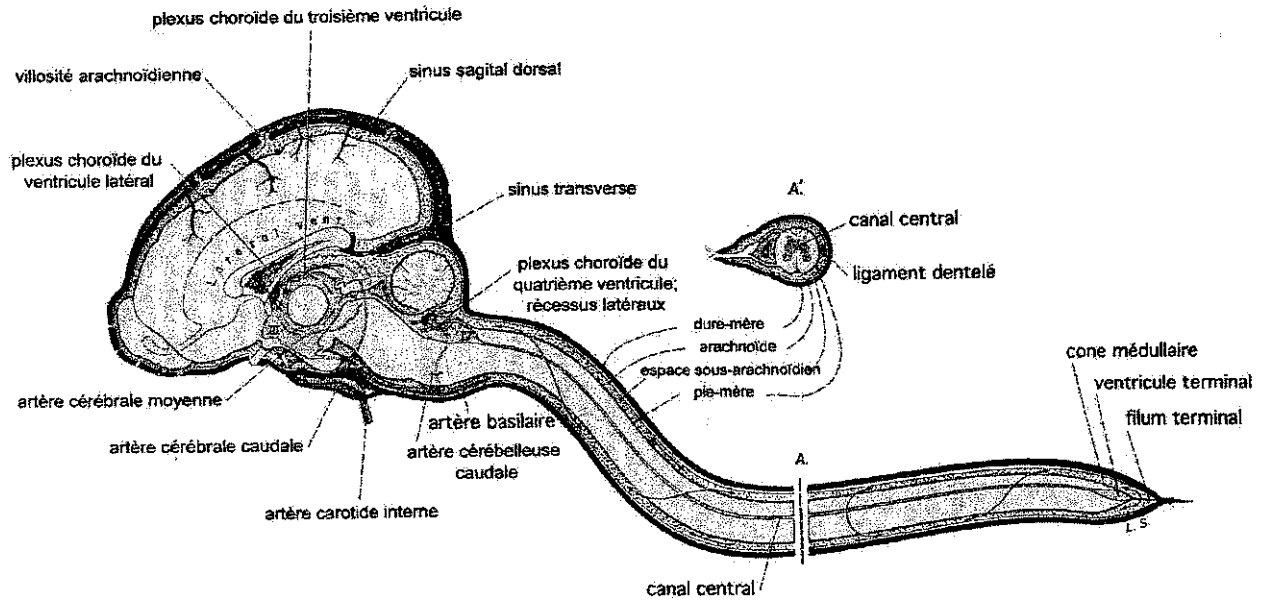


Figure 10 : Relation des méninges et de l'espace sous-arachnoïdien avec le système ventriculaire (De Lahunta, 1983).

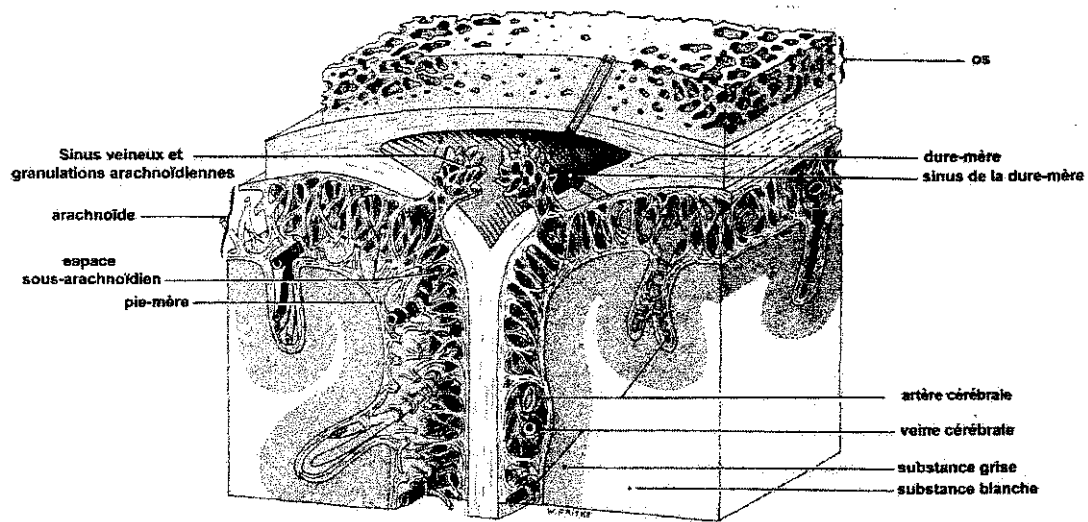


Figure 11 : Méninges cérébrales et villosités arachnoïdiennes (De Lahunta, 1983).

## 1.2. Les méninges et l'espace sous-arachnoïdien

Les méninges sont les enveloppes qui recouvrent le SNC et qui le protègent du milieu extérieur et de ses variations. Elles ménagent un espace, l'espace sous-arachnoïdien, dans lequel circule le LCS (Figure 11).

Ces enveloppes, au nombre de trois, sont de composition différente :

- **La dure-mère** (la plus externe) est une enveloppe fibreuse, épaisse et très résistante. Elle livre passage à des sinus veineux dans lesquels on retrouve des excroissances (ou villosités arachnoïdiennes). Sa face externe, plus ou moins rugueuse, est adhérente à la boîte crânienne.

- **L'arachnoïde** est associée à la pie-mère par de nombreux prolongements, les trabécules arachnoïdiennes. Elle ne s'enfonce pas dans les sillons du cerveau et ménage avec la pie-mère un grand nombre de petites cavités constituant l'espace sous-arachnoïdien. Le LCS qui circule dans cet espace s'accumule dans quatre grandes citernes dont la plus vaste est la citerne cérébello-médullaire, ou cisterna magna, qui se situe en arrière du cervelet, dorsalement à la moelle allongée. Cette citerne reçoit le LCS qui filtre par les trois foramens du quatrième ventricule.

- **La pie-mère** s'engage dans toutes les scissures et les sillons de la surface cérébrale dans lesquels elle ménage des espaces périvasculaires. Elle est assez fine et richement vascularisée. Au niveau des ventricules du cerveau, elle envoie des prolongements internes très richement vascularisés et recouverts par l'épendyme, les toiles choroïdiennes. Chacune de ces toiles porte un plexus choroïde.

## 1.3. Les barrières du Système Nerveux Central (SNC)

Le Tableau 1 nous indique les trois types de barrières du cerveau. Il existe (i) la barrière hémato-encéphalique qui sépare le sang de l'espace périvasculaire au niveau des capillaires cérébraux, (ii) la Barrière Hémato-Méningée (BHM) qui sépare le sang du LCS au niveau des plexus choroïdes et des villosités arachnoïdiennes et (iii) la barrière encéphalo-méningée au niveau de la pie-mère notamment (Bailey et al, 1997). Nous ne nous intéresserons qu'à la BHM.

Type de barrière	Type de cellule	Type de jonction
Hémato-encéphalique	Endothélium des capillaires cérébraux	Jonction serrée
Hémato-méningée	Epithélium des plexus choroïdes et villosités arachnoïdiennes	Jonction serrée
Encéphalo-méningée	Ependyme, astrocytes et pie-mère	Jonction « gap » (communicante)

Tableau 1 : Composition des barrières du cerveau (Bailey et al, 1997).

#### 1.4. La Barrière Hémato-Méningée (BHM)

La BHM est à l'origine d'une compartimentation du SNC par rapport à la circulation systématique. Son intégrité permet le maintien d'un microenvironnement nécessaire au fonctionnement correct du SNC.

La BHM est constituée par :

- les cellules endothéliales des capillaires du SNC,
- les cellules de l'épithélium choroïdien,
- les cellules de la membrane arachnoïdienne.

Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées (zonulae occludens). Ce type de jonctions leur confère une forte résistance électrique, une faible conductivité hydrique et une faible perméabilité ionique. Elles ont une faible perméabilité aux molécules non-électrolytes hydrophiles en l'absence d'un récepteur spécifique (Figure 12). Les protéines sériques doivent traverser la BHM pour arriver dans le LCS (sauf sites particuliers).

Les particularités des cellules qui forment la BHM (Barrière Hémato-Méningée) sont à l'origine de ses capacités d'exclusion partielle des protéines du LCS (Liquide Cérébro-Spinal).

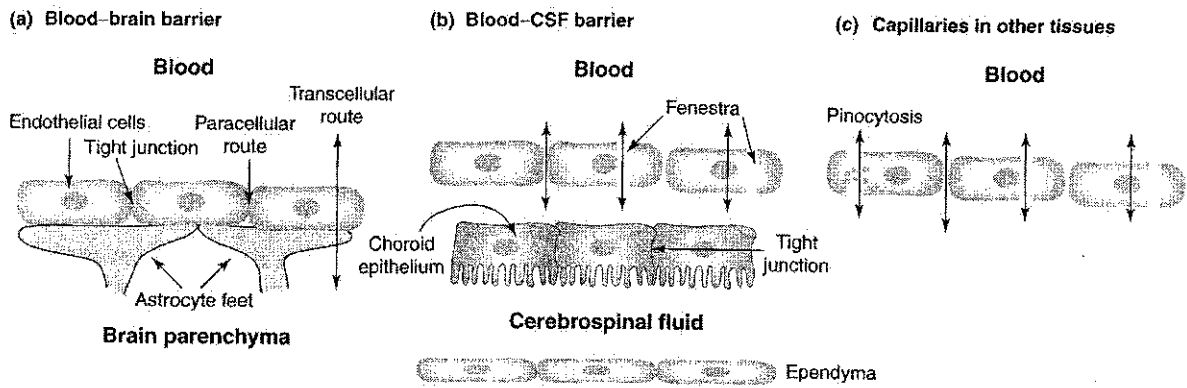


Figure 12 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (blood-brain barrier), de la barrière entre le sang et le LCS ou BHM (blood-CSF barrier avec CSF = cerebrospinal fluid) et d'un capillaire sanguin (Kusuhara et Sugiyama, 2001). Les jonctions serrées (tight junction) sont des éléments spécifiques des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et des cellules épithéliales choroïdes. Ces jonctions permettent de minimiser l'entrée de molécules, à partir de la circulation sanguine, dans le parenchyme cérébral et le LCS via la voie paracellulaire. Par conséquent, les molécules empruntent la voie transcellulaire. Ces barrières restreignent fortement la traversée de la bicouche lipidique par des molécules à haut poids moléculaire et/ou fortement hydrophiles. Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et les cellules épithéliales choroïdes protègent le SNC en agissant tel une barrière, c'est ce qui est appelé la barrière hémato-encéphalique et la barrière entre le sang et le LCS. Les transporteurs jouent un rôle important dans la pénétration restreinte de molécules dans le SNC en les relargant dans la circulation sanguine. (c) illustre les transports possibles au niveau des capillaires sanguins dans d'autres tissus où il n'y a pas de jonctions serrées.

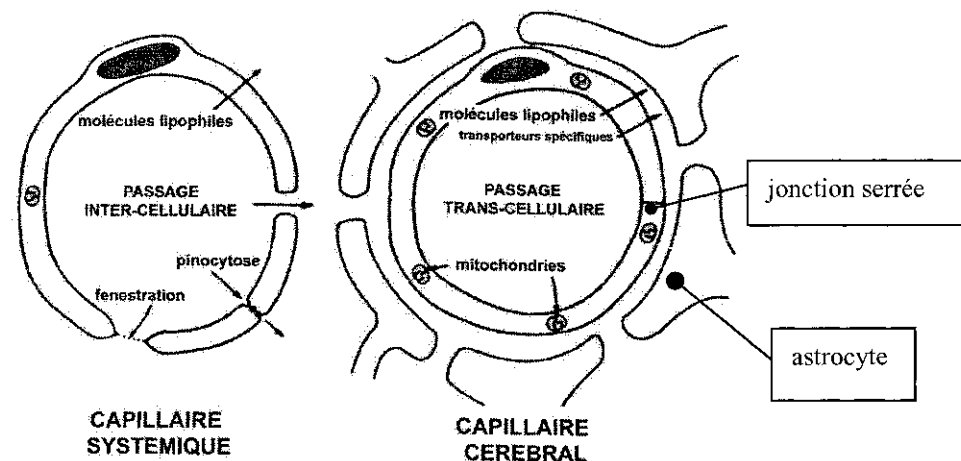


Figure 13 : Schéma comparatif de l'ultrastructure des capillaires systémiques et des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Behr, 2001). Les principales différences sont l'absence de vésicules de pinocytose, le nombre plus important de mitochondries et la présence de jonctions serrées et d'astrocytes dans les capillaires cérébraux. Les capillaires systémiques ont eux des pores, des fenestrations et de nombreuses vésicules de pinocytose.

## ❖ Rôle des cellules endothéliales des capillaires cérébraux

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux présentent plusieurs différences par rapport aux cellules endothéliales des capillaires systémiques (Figure 13). Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées et leur face luminale sont chargées négativement, ce qui limite le passage des protéines de grande taille et facilite le transfert des protéines cationiques. Le transfert des protéines est principalement transcellulaire et non pas paracellulaire (Figure 14), soit par un mécanisme majoritaire de diffusion passive transendothéliale, soit par le biais de récepteurs spécifiques qui augmentent le transfert de certaines protéines (transferrine, insuline). D'autre part, ces cellules ont un nombre élevé de mitochondries, reflet d'une forte consommation énergétique pouvant être reliée à une activité importante de transport ATP-dépendant. Les vésicules de pinocytose sont bien moins nombreuses dans les cellules endothéliales des capillaires du SNC que dans celles des capillaires systémiques. Ce mécanisme serait responsable de la faible concentration en protéine du LCS.

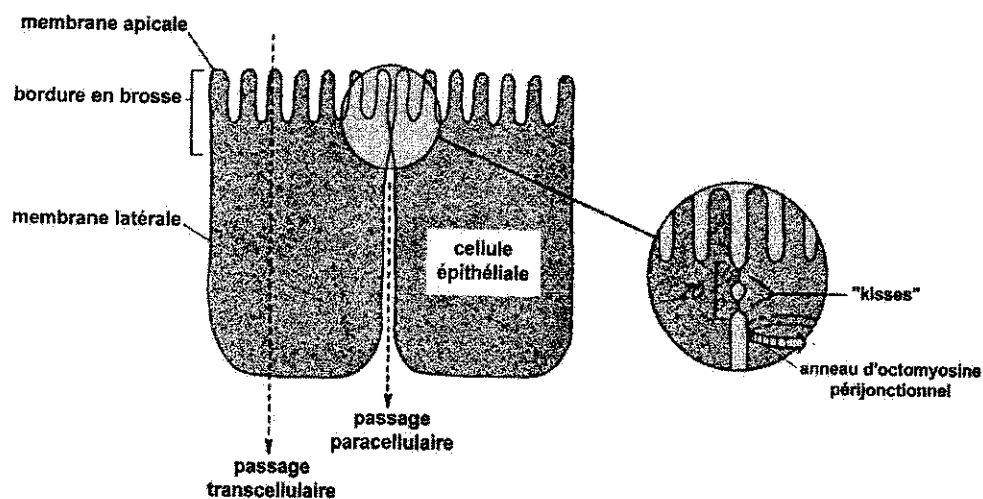


Figure 14 : Représentation schématique des cellules épithéliales transporteurs (Behr, 2001). Le flux de LCS est dirigé à travers la bordure en brosse vers les ventricules (face apicale).

Ces cellules endothéliales reposent sur une membrane basale d'une épaisseur importante. Ceci diminue leur déformabilité lors de variations brutales de la pression sanguine ou du débit sanguin cérébral. Associés aux cellules endothéliales, on trouve des péricytes et des astrocytes.

## ❖ Rôle des plexus choroïdes

Le LCS est en grande partie produit par les plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux latéraux, le troisième ventricule et le quatrième ventricule. Les protéines pénètrent dans le LCS lors de sa formation.

Le tableau 2 donne la vitesse de formation du LCS chez différentes espèces de mammifères qui semble suivre une relation allométrique avec le poids de l'espèce.

Espèce	Vitesse de formation ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
Souris	0,325
Rat	2,1 – 5,4
Cobaye	3,5
Lapin	10
Chat	20 – 22
Chien	47 – 66
Mouton	118
Chèvre	164
Veau	290
Singe	28,6 – 41
Homme	350 – 370

Tableau 2 : Vitesse de formation du LCS chez diverses espèces (Bailey et al, 1997).

Le débit de production du LCS est de 0,118 mL/min chez la brebis (De Lahunta, 1983) ; il varie en fonction de la pression osmotique sanguine.

Les mécanismes en jeu sont :

- l'ultrafiltration du plasma à travers la paroi des vaisseaux capillaires des plexus choroïdes
- la sécrétion active par l'épithélium choroïdien.

L'épithélium choroïdien est composé d'une couche de cellules ayant des villosités et des jonctions serrées en zone apicale (Figure 14 et 15). Les villosités sont le site de sécrétion active du LCS et donc du passage des protéines. La sécrétion est dépendante du transport des ions sodium par des NA-K-ATPases (Webb et al, 2000).



De plus, les plexus choroïdes sécrètent de manière active certaines protéines (dont la transferrine et la préalbumine) ; d'où leur concentration relativement importante dans le LCS par rapport au plasma.

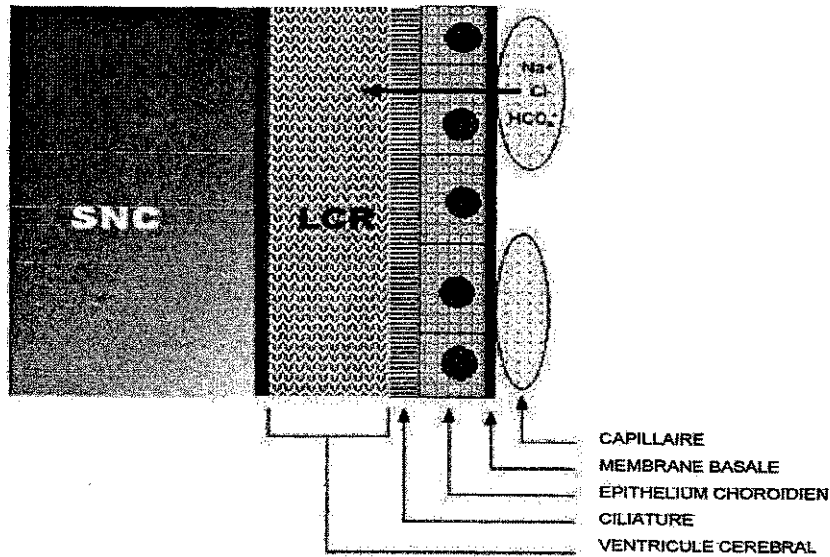


Figure 15 : Représentation schématique des plexus choroïdes et de la formation du LCS (Behr, 2001). L'épithélium choroïdien est constitué de cellules ciliées reliées par des jonctions serrées et repose sur une membrane basale. Les plexus choroïdes se retrouvent dans les ventricules latéraux, le plafond du troisième ventricule et dans le quatrième ventricule.

#### ❖ Rôle de la membrane arachnoïdienne

Les espaces sous-arachnoïdiens participent à la formation du LCS à partir des vaisseaux sanguins. La membrane arachnoïdienne, couche cellulaire des leptoméninges reliée par des jonctions serrées, est responsable de l'exclusion relative des protéines sériques. Le tableau 1 nous indique que la pie-mère et la dure-mère sont des membranes plus perméables. La pie-mère comporte des « gap junctions » et la dure-mère de larges espaces intercellulaires (Bailey et al, 1997).

Deux mécanismes entrent en jeu dans la production du LCS (i) l'ultrafiltration du plasma (à travers les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, les plexus choroïdes et les espaces sous-arachnoïdiens) et (ii) la sécrétion active par l'épithélium choroïdien.

## **2. Elimination de molécules à partir du LCS**

### **❖ Généralités**

La vitesse d'élimination de chaque protéine du LCS dépendrait de trois facteurs :

- le débit d'élimination du LCS qui est égal à son débit de formation dans les conditions d'équilibre,
- leur éventuel transport actif par les plexus choroïdes ou les cellules endothéliales des capillaires,
- leur diffusion et leur métabolisation dans le SNC.

Le mécanisme d'élimination du LCS est sujet à d'importantes variations interspécifiques. Les structures participant à son élimination font intervenir majoritairement les villosités arachnoïdiennes présentes dans les sinus veineux (Figures 11 et 16), auxquelles s'ajoutent les plexus choroïdes et les capillaires du SNC. Enfin, une partie du LCS est éliminée par diffusion dans le parenchyme cérébral (De Lahunta, 1983).

### **❖ Rôle des villosités arachnoïdiennes**

L'élimination du LCS s'effectue principalement par les granulations arachnoïdiennes (taille jusqu'à 1 cm) et les villosités arachnoïdiennes (microscopiques). Ce sont des évaginations de l'espace sous-arachnoïdien dans les sinus veineux ou les veines cérébrales (Figures 11 et 16). Il existe également des villosités arachnoïdiennes dans les veines et les vaisseaux lymphatiques à l'émergence des nerfs spinaux et des nerfs crâniens olfactif et optique.

Le débit d'élimination du LCS dépend de la pression hydrostatique dans l'espace sous-arachnoïdien (Johnston et Papaiconomou, 2002). Ce débit est unidirectionnel depuis l'espace sous-arachnoïdien vers le sang (De Lahunta, 1983). Le fonctionnement de type valve uni-sens résulte de la présence de vésicules de transport géantes dans la membrane des villosités arachnoïdiennes.

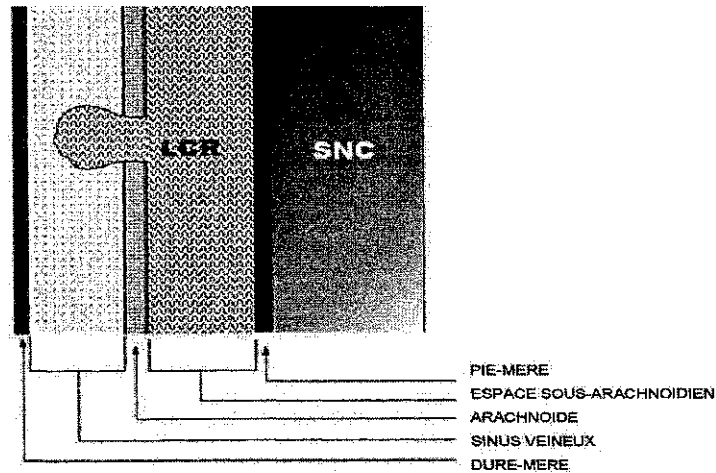


Figure 16 : Représentation schématique des villosités arachnoïdiennes (Behr, 2001).

De nombreuses observations, notamment anatomiques (Johnston et Papaiconomou, 2002) suggèrent l'existence d'autres moyens d'élimination que ceux qui font intervenir les projections arachnoïdiennes (Figures 17 et 18). Il pourrait exister un passage du LCS dans la lymphe. Une localisation possible de ce passage se situe au niveau de la lame cribreuse et de la sous-muqueuse nasale. Les canaux lymphatiques cervicaux permettent le retour du LCS au système veineux. Chez des moutons adultes, quasiment la moitié du LCS éliminé du compartiment cérébral est éliminée par voie lymphatique (Johnston et Papaiconomou, 2002). Par conséquent, les vaisseaux lymphatiques extra-crâniens jouent un rôle majeur au niveau de la clairance volumétrique de LCS dans cette espèce.

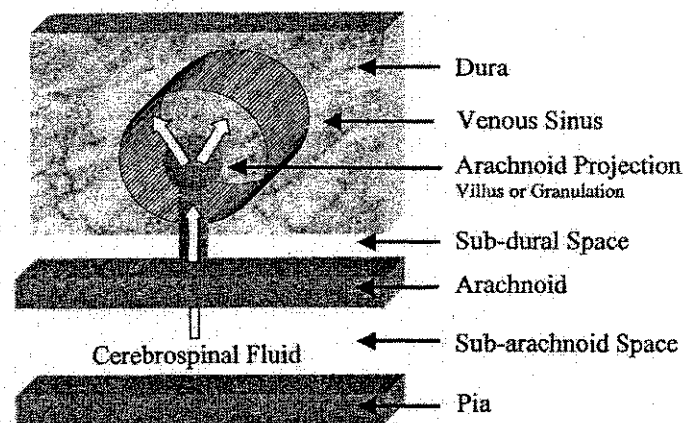


Figure 17 : Illustration schématique conventionnelle du transport de LCS (Johnston et Papaiconomou, 2002). Le LCS est éliminé du compartiment sous-arachnoïdien par les granulations ou les villosités arachnoïdiennes qui se projettent dans les sinus veineux de la dure-mère.

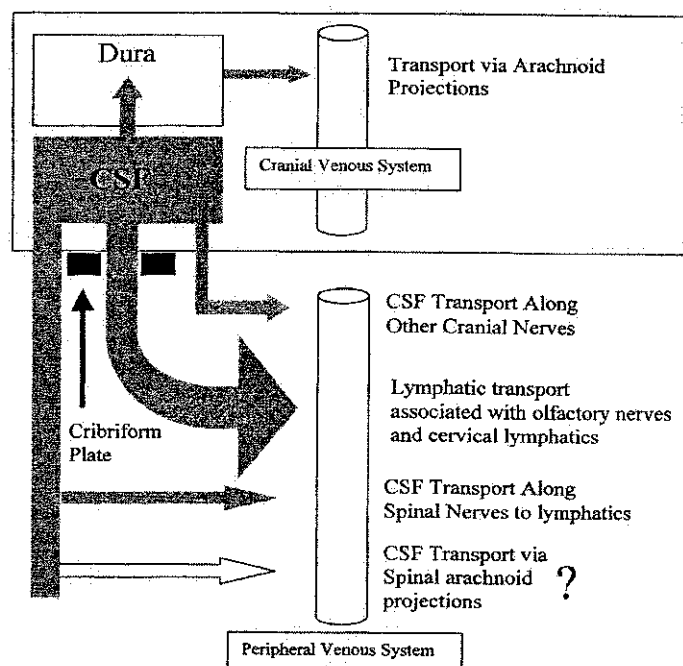


Figure 18 : Illustration schématique du transport de LCS (CSF) des compartiments sous-arachnoïdiens cérébral et spinal aux vaisseaux lymphatiques extra-crâniens (Johnston et Papaiconomou, 2002).

### ❖ Rôle des plexus choroïdes

Les plexus choroïdes jouent un rôle dans la clairance des protéines et des macromolécules du LCS ventriculaire (l'importance quantitative de cette réabsorption étant inconnue). Le rôle de transporteurs membranaires spécifiques a été mis en évidence *in vitro*. Ces derniers permettent l'accumulation de substrat dans les plexus choroïdes.

De plus, les plexus choroïdes réabsorbent des neurotransmetteurs et des métabolites présents dans le LCS et les véhiculent vers le sang. Ils participent par conséquent à une épuration du LCS. Parmi les transporteurs membranaires spécifiques, on peut notamment citer la glycoprotéine P, qui joue également le rôle d'une pompe à efflux au niveau de la BHM et limite le passage de nombreuses molécules (Karssen et al, 2001).

### ❖ Rôle du parenchyme cérébral

Une partie des protéines du LCS est éliminée par diffusion dans le parenchyme cérébral et rachidien. Une couche de cellules, les épendymocytes, recouvre les ventricules cérébraux. Cette couche sépare le LCS des ventricules du parenchyme cérébral et constitue une barrière perméable, dépourvue de jonctions serrées, aux protéines par passage transépendymal. Le milieu extracellulaire du SNC représente 15 à 20% de son volume.

L'élimination du LCS se fait en diverses localisations : au niveau des granulations et des villosités arachnoïdiennes, des plexus choroïdiens, des cellules endothéliales des capillaires, par voie lymphatique et par diffusion dans le parenchyme cérébral et rachidien.

### 3. Circulation du LCS

Le LCS produit dans les ventricules sort de part et d'autre du quatrième ventricule pour rejoindre l'espace sous-arachnoïdien par les foramens (De Lahunta, 1983). Une partie chemine dans le canal épendymaire et passe dans l'espace sous-arachnoïdien médullaire par une communication dorsale (Figure 14). La circulation se fait essentiellement dans le sens crânio-caudal.

La circulation du LCS depuis les ventricules vers l'espace sous-arachnoïdien puis le long de la moelle épinière (Figure 19) est principalement permise par les pulsations des vaisseaux sanguins, la ciliature des cellules épendymaires et les mouvements respiratoires.

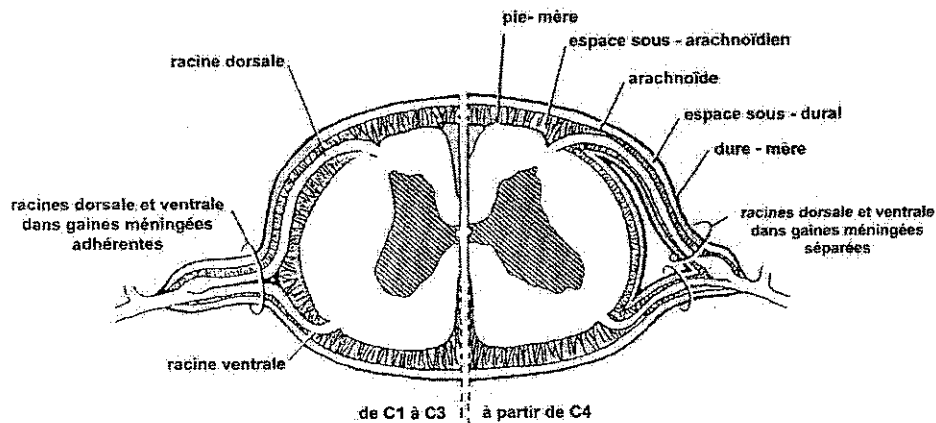


Figure 19 : Les méninges de la moelle épinière (De Lahunta, 1983).

#### 4. Fonctions du LCS

Le LCS a plusieurs fonctions majeures : c'est un support physique pour les structures nerveuses, il protège et fournit des nutriments au parenchyme cérébral et il permet le maintien de l'homéostasie. Le LCS aide à moduler les variations de pression au niveau de la cavité intra-crânienne, en association avec le flux sanguin cérébral.

Constituant un tampon chimique pour le SNC, le LCS aide au maintien d'un environnement ionique propre et adapté au parenchyme cérébral, plus stable et plus finement contrôlé que le plasma (De Lahunta, 1983). Le LCS a également une fonction métabolique dans le transport de métabolites et de nutriments entre le cerveau et le sang. Il peut également servir de transporteur de substances neuroendocriniennes ou de neurotransmetteurs (De Lahunta, 1983).

## 5. Les protéines du LCS

### 5.1. Nature des protéines

La concentration en protéines du LCS est faible chez les sujets sains (quelques dizaines de mg/dL) mais la variété est grande. La plupart des protéines (80%) ne sont pas spécifiques parce qu'elles proviennent du plasma. En revanche, d'autres sont spécifiques du LCS.

Les valeurs usuelles de la concentration en protéines du LCS prélevé en zone atlanto-occipitale, dans la cisterna magna, chez le mouton sont de 23 mg/dL (Scott, 1992). Le LCS subissant un recyclage permanent au cours du temps, la valeur de la concentration en protéines obtenue n'est représentative que de l'instant du prélèvement. Les prélèvements sériés sur plusieurs jours sont plus riches en informations. Cependant, il est difficile de multiplier les prélèvements de LCS à moins de poser un cathéter intra-ventriculaire ou au niveau de l'espace sous-arachnoïdien en région lombaire.

#### ❖ Les protéines plasmatiques (non spécifiques)

La concentration en protéines est environ 200 fois inférieure à celle du plasma mais la nature des protéines retrouvées est sensiblement la même.

- L'albumine représente la majeure partie des protéines du LCS (Sorjonen et al, 1987). C'est un bon marqueur des échanges hémato-méningés et hémato-encéphaliques. Son entrée dans le LCS est augmentée lors d'inflammation de la BHM.

- Les  $\alpha$ -globulines (24 à 30% des protéines du LCS).
- Les  $\beta$ -globulines (20 à 30% des protéines du LCS).
- Les  $\gamma$ -globulines (IgG, IgM, IgA), représentent moins de 10% des protéines du LCS (Sorjonen, 1987) et il y en a moins dans le LCS que dans le plasma. Lors de lésions inflammatoires du SNC leurs concentrations sont plus élevées dans le LCS, d'où l'intérêt clinique.

## ❖ Les protéines spécifiques du LCS

Ces protéines représentent potentiellement des marqueurs spécifiques du SNC (Van Engelen et al, 1992). Cependant, aucune relation certaine n'est établie entre la variation de la concentration d'une de ces protéines et une affection spécifique.

- La protéine S-100 : c'est un composant majeur du cytosol des astrocytes (Van Engelen et al, 1992) qui est libéré dans le LCS lors de mort des cellules du SNC (marqueur qui manque de spécificité).

- La protéine C-réactive

- L'énolase spécifique des neurones (ESN) : c'est une enzyme intracellulaire spécifique du SNC (Van Engelen et al, 1992). Sa concentration dans le LCS est augmentée dans certaines affections du SNC dont la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ).

- La protéine basique encéphalitogène (PBE) qui est notamment un marqueur de la démyélinisation (Van Engelen et al, 1992).

- La protéine gamma-trace ou cystatine C : elle est synthétisée dans le SNC.

- La protéine bêta-trace.

- La fraction tau : c'est une  $\beta$ 2-globuline. Elle est synthétisée au niveau des plexus choroïdes et son internalisation est permise via des récepteurs spécifiques.

- Les hormones type peptidiques et/ou protéiques : elles sont présentes en très grand nombre dans le LCS (hormones adénohypophysaires telles que GH, TSH, LH, FSH, ACTH et prolactine, hormones post-hypophysaires, hormones hypothalamiques telles que TRH, GnRH, CRH et somatostatine, et les peptides opiacés tels qu'endorphine, enképhalines) (Behr, 2001).

- L'acétylcholinestérase et la pseudocholinestérase.

- La lactate déshydrogénase (LDH) : elle est libérée dans le LCS lors de lyse cellulaire et permet de détecter une méningite bactérienne, une hypoxie cérébrale ou des métastases (Watson et Scott, 1995).

- La créatine kinase : c'est un marqueur de mort cellulaire des cellules du SNC.

- Le lysozyme.

- La ferritine.



## 5.2. Passage des protéines dans le LCS

### ❖ Généralités

La concentration des protéines dans le LCS dépend de:

- leur masse moléculaire relative (concentration inversement proportionnelle),
- leur charge (passage facilité des protéines cationiques),
- leur concentration plasmatique (variable en conditions pathologiques),
- la présence éventuelle de récepteurs spécifiques (transferrine, préalbumine, insuline),
- l'existence de synthèse locale (transferrine, Ig),
- la perméabilité de la BHM (augmentée lors de certains processus pathologiques).

De manière générale, plus la taille de la protéine est importante plus sa concentration dans le LCS est faible. Si la BHM est intacte, les protéines sériques de poids moléculaire supérieur à 160 kDa sont exclues. Cependant le passage des protéines sériques dans le LCS est mieux corrélé à leurs caractéristiques hydrodynamiques qu'à leur poids moléculaire (Bailey et al, 1997).

### ❖ Physiopathologie et altération de la perméabilité de la BHM

L'augmentation de la concentration en protéines totales du LCS serait l'indicateur le plus fiable pour le diagnostic de lésion et du changement de la composition biochimique du SNC.

L'augmentation de la concentration en protéines du LCS survient lors :

- d'augmentation de la perméabilité de la BHM,
- de production d'Ig dans le LCS,
- d'interruption de la réabsorption et/ou de la circulation du LCS,
- de cytolysse des cellules du SNC.

Il faut noter qu'un stress intense (dû à l'immobilisation de rats par exemple) augmente la perméabilité de la BHM au niveau du diencephale et du cervelet. Lors de stress intense, l'activation des mastocytes a des effets pro-inflammatoires (Esposito et al, 2001). Un stress oxydatif, dû à une ischémie cérébrale focale,

provoque également une rupture de la BHM et des dommages cérébraux secondaires via l'activation de métalloprotéases (Gasche et al, 2001).

Le passage de leucocytes à travers une BHM intacte est possible chez des individus sains ou malades. On peut retrouver des macrophages dans le SNC d'individus adultes et des monocytes dans le SNC des embryons. De plus, dans des modèles animaux, après une injection intra-veineuse de lymphocytes T (LT) activés, une partie de ces LT sera présente dans le SNC. Ces macrophages et LT ont traversé une BHM intacte (Perry et al, 1997). Cependant, on ne sait pas quelles molécules d'adhésion sont utilisées par les monocytes ou les LT activés au cours de leur migration dans le SNC non inflammé. On ne sait pas non plus si ces cellules traversent l'endothélium à travers les jonctions serrées ou par un autre moyen (Perry et al, 1997).

#### ❖ Variations biologiques

- Variations en fonction de l'âge

La concentration en protéines du LCS est notamment fonction de la perméabilité de la BHM. Or celle-ci évolue avec l'âge et elle est plus importante chez le nouveau-né par rapport à l'adulte. L'acquisition des propriétés de la BHM se fait en même temps que l'acquisition des jonctions serrées des cellules endothéliales, choroïdiennes et arachnoïdiennes et de la disparition des capillaires fenestrés petit à petit. Les astrocytes joueraient également un rôle important dans le développement des jonctions serrées des cellules de la BHM (Webb et al, 2000).

La diminution de la perméabilité avec l'âge concerne entre autres les protéines, l'urée, le potassium, les bicarbonates (Van Engelen, 1992) et explique les variations de concentrations en protéines en fonction de l'âge (plus élevée chez les nouveaux-nés que chez l'adulte). La diminution de la concentration en protéines totales du LCS par rapport au plasma est un marqueur de la maturité de la BHM.

- Variations en fonction du site de prélèvement

La concentration du LCS en protéines, chez certaines espèces, augmente depuis le système ventriculaire jusqu'à l'espace sous-arachnoïdien lombaire. L'explication de

ce gradient est sujette à controverse. Bien que son étiologie reste inconnue, la présence de ce gradient a des conséquences cliniques : le lieu de prélèvement du LCS influe sur l'interprétation de la concentration en protéines.

Chez le chien, la concentration en protéines du LCS augmente depuis les ventricules cérébraux jusqu'à l'espace sous-arachnoïdien lombaire; 29 mg/dL en région lombaire contre 14 mg/dL dans la cisterna magna (Cellio, 2001). Le gradient caudo-rostral de concentration en protéines du LCS a également été mis en évidence chez les chats, les humains (Bailey et al, 1985) et les macaques rhésus (125 mg/dL en région lombaire contre 242 mg/dL dans la cisterna magna) (Smith et al, 1993). Par contre, il n'y a pas de gradient de concentration en protéines du LCS chez les moutons (Scott, 1992), les chevaux (Bailey et al, 1985) ni chez les bovins (Guatteo, 2002).

L'intervalle des valeurs usuelles à prendre en considération lors de ponction lombaire est plus élevé que pour une ponction atlanto-occipitale, c'est-à-dire dans la cisterna magna. Un inconvénient majeur de la ponction lombaire est la contamination sanguine beaucoup plus courante que lors de ponction atlanto-occipitale (Bailey et al, 1985).

## **6. LCS et affections neurologiques dues aux prions**

### **6.1. Caractéristiques du LCS lors d'ESST**

Le LCS associé aux encéphalopathies neurodégénératives présente une protéinorachie normale et un profil électrophorétique normal chez les espèces animales. Ainsi, cette affection, bien qu'apparemment d'origine infectieuse, ne laisse apparaître aucune atteinte de la BHM (Bailey et al, 1997). Par conséquent, aucune modification n'est observée au niveau de la pression cisternale du LCS, de l'examen visuel (le LCS est clair et ne coagule pas), de la concentration en protéines (50-100 mg/dL, Pandy test négatif), de la concentration en sucres (60-110 mg/dL) ni au niveau d'une culture bactérienne (négative) (Parker, 1972).

Cependant, la concentration de prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produite par la cyclooxygénase, est six fois plus élevée dans le LCS d'individus atteints par la MCJ nouveau variant (MCJnv) par rapport aux LCS d'individus atteints d'une autre maladie neurologique non-inflammatoire. Cette concentration en PGE<sub>2</sub> est

comparable à celle obtenue chez des individus atteints d'une maladie à composante inflammatoire. Par conséquent, l'activité de la cyclooxygénase, aurait un rôle dans la pathogénicité du MCJnv comme cela a déjà été rapporté dans la MCJ sporadique (Minghetti et al, 2002).

## **6.2. Modification du LCS de bovins atteints d'ESB**

Dans le LCS de bovins atteints d'ESB on note des changements : la concentration en apolipoprotéine E (apo E) est augmentée ainsi qu'en apo J. La présence de deux autres protéines, non identifiées pour l'instant, de poids moléculaire de 35 et 36 kDa, est également détectée (Jones et al, 1996).

L'apo E est une protéine de 37 kDa associée au transport du cholestérol et c'est l'apolipoprotéine majeure du LCS. Le rôle de l'apolipoprotéine E semble être associé à la liaison des lipides libérés lors de la dégénérescence neuronale, laquelle est liée à l'hyperastrocytose. L'augmentation de concentration d'apo E dans le LCS de bovin atteints d'ESB serait cohérente avec l'hyperastrocytose et la libération de lipides qu'elle occasionne (une augmentation similaire est observée en cas de kuru ou de maladie d'Alzheimer).

L'expression d'apo J est considérablement augmentée dans le LCS lors de tremblante (ou de maladie d'Alzheimer). Ceci serait également compatible avec l'hyperastrocytose associée aux ESST (Jones et al, 1996).

## **6.3. La protéine « 14-3-3 »**

Une protéine (la protéine « 14-3-3 ») a été isolée dans le LCS de malades atteints de MCJ. Cette protéine, qui est le reflet d'un processus de mort neuronale, a été détectée dans 96% des LCS de patients humains atteints de cette maladie. La détection par méthode immunologique de la protéine 14-3-3 a permis de mettre au point un test diagnostique *ante mortem* à la fois sensible (96%) et spécifique (88%) en ce qui concerne la détection de la MCJ chez l'homme. Cependant, il existe des résultats faux positifs chez des patients atteints d'encéphalite à *herpes simplex*.

Contrairement à la MCJ, la tremblante est généralement envisagée comme une maladie de population ou de troupeau avec une composante contagieuse majeure. La sensibilité du test diagnostique basé sur la mise en évidence de la protéine 14-3-3

est inférieure pour la tremblante par rapport à la MCJ, car (i) il y a plus d'ovins testés que d'humains et (ii) cette méthode immunologique a été développée et standardisée pour une utilisation en humaine. On peut améliorer les résultats obtenus si on l'utilise chez des animaux qui ont des signes cliniques de maladie neurologique et une composition du LCS relativement normale (Tyler et al, 1999).

#### **6.4. Détection de la PrPsc dans le LCS**

A partir de LCS prélevé chez des patients atteints par la MCJ et celui de non malades, la forme de PrP détectée par ELISA (anticorps anti-PrP) est sensible aux protéases, ce qui correspond à la présence de PrPc. De plus, la conformation de la PrP détectée chez les malades est similaire à celle retrouvée chez les individus non atteints par la MCJ. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence la présence de PrPsc dans le LCS d'individus atteints par la MCJ (Wong et Green, 2001).

Une méthode ultra-sensible de détection quantitative a été développée : en utilisant une méthode de spectroscopie en fluorescence des agrégats de PrPsc ont pu être détectés à des concentrations fentomolaires (Bieschke et al, 2000) dans le LCS d'individus atteints par la MCJ.



### **III. MATERIELS ET METHODES**

#### **A. Prélèvements de LCS**

##### **1. Mise en place d'un cathéter et prélèvement de LCS dans l'espace sous-arachnoïdien lombo-sacré**

Les brebis sont tondues au niveau du dos. Cette région est nettoyée avec de la Vétédine savon<sup>®</sup> puis désinfectée avec de l'alcool à 70° suivi de Vétédine solution<sup>®</sup>. Le site de ponction, qui correspond à l'espace lombosacré, entre la dernière vertèbre lombaire (L6) et la première vertèbre sacrale est repérée. Une aiguille (18G) de ponction de LCS est placée dans le plan médian, avec une légère inclinaison pour être introduite dans l'espace sous-arachnoïdien. Le mouvement de l'aiguille est progressif et lent jusqu'à la remontée du LCS dans l'aiguille. Le cathéter est introduit dans le trocard qui est alors retiré. Le cathéter est enroulé en boucle et fermé avec une aiguille et bouchée. Le LCS est doucement aspiré dans une seringue de 1 mL et est réparti dans des fractions aliquots rapidement congelées à -20°C.

##### **2. Prélèvement de LCS dans la cisterna magna**

A l'abattoir de Castelnaudary, les prélèvements de LCS sont réalisés sur des moutons euthanasiés par saignée après étourdissement et suspendus par les postérieurs. Afin de faciliter le prélèvement, la tête est maintenue fléchie avec un angle de 90°. Le site de ponction correspond au centre du triangle formé par la partie caudale de l'os occipital et les ailes de l'atlas. Une aiguille de 1.2\*40 mm (18 gauge, 1.5 inch) montée sur une seringue de 20 mL est avancée dans un plan parallèle à la portion horizontale de la mandibule. Si on rencontre de l'os, il faut rediriger l'aiguille vers l'avant ou vers l'arrière de l'animal. Le biseau de l'aiguille étant placé dans la cisterna magna, le LCS est collecté à l'aide d'une seringue de 20 mL puis placé dans un tube de polypropylène de 50 mL, immédiatement placé dans de la glace et rapidement congelé à -20°C.

## B. Dosage de la PrP par immunométrie

### 1. Principe du dosage

Le dosage par immunométrie ou « sandwich » correspond à : un anticorps primaire anti-protéine prion est adsorbé (« coaté ») au fond des puits, le second anticorps anti-prion est couplé à l'acétylcholine estérase (AchE). La révélation est obtenue après adjonction du réactif de Ellman contenant un substrat de l'AchE qui change de couleur après dégradation enzymatique. La coloration obtenue est jaune et la densité optique est déterminée par spectrophotométrie à 414nm.

### 2. Produits

Les anticorps utilisés sont le SAF 34 (Spi Bio®) qui reconnaît la protéine prion de toutes les espèces est plus sensible que le BAR 210 (Spi Bio®) qui reconnaît plus spécifiquement la protéine prion du mouton (Figure 20).

Le traceur utilisé est un anticorps anti-prion couplé à l'acétylcholine estérase, le 12F10-AchE ou le 12F10-G4.

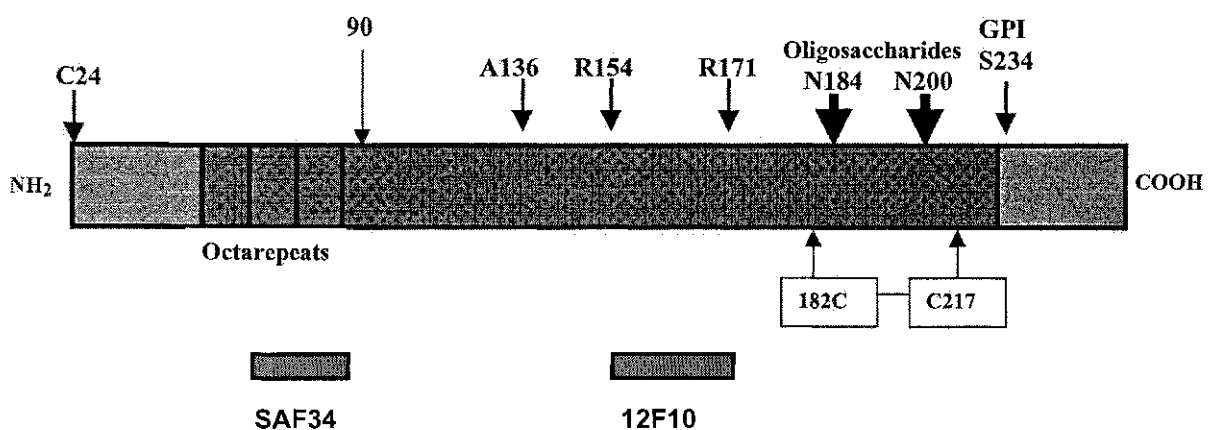


Figure 20 : Epitopes de la protéine prion reconnus par l'anticorps SAF34 et le traceur 12F10.



### 3. « Coating » des plaques

Il faut tout d'abord préparer une solution d'anticorps (SAF 34 ou BAR 210) à 10µg/ml dans le tampon phosphate (0.05M, pH=7,4) et déposer 150µl de la solution d'anticorps SAF 34 ou BAR 210 par puits, recouvrir d'un film plastique collant et laisser une nuit à température ambiante (au moins 6-7 heures). Les puits sont ensuite lavés 5 fois avec 300µl de tampon de lavage (tampon phosphate 0.01M, pH=7.4, 0.05% tween 20). Ensuite 300µl de tampon EIA de conditionnement / saturation (tampon phosphate 0.1M, pH=7.4, BSA : 1g/l (fraction V, Sigma, réf A7905), NaCl 0.15M, NaN<sub>3</sub> 0.01%) sont déposés. Les plaques recouvertes d'un film plastique sont conservées à +4°C pendant 8 à 12 mois.

### 4. Dosage

A partir d'une plaque « coatée », le tampon de conditionnement est aspiré, les puits sont lavés 3 fois avec 300µl par puits de tampon de lavage.

Les standards et les contrôle qualité sont des solutions du variant VRQ de la protéine recombinante préparés dans du tampon EIA aux concentrations respectives de 0, 0.5, 1, 2, 5, 7, 10, 15 et 20 ng/ml pour les standards et 3, 6 et 12 ng/ml pour les contrôle qualité et conservés à -20°C. Un volume de 100 µl des échantillons des standards et des contrôle qualité est déposé dans les puits et incubé pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Les puits sont lavés 5 fois avec 300µl par puits de tampon de lavage. Après 5 minutes de trempage à température ambiante, sous agitation lente, les puits sont à nouveau lavés 5 fois avec 300µl par puits de tampon de lavage.

Cent µl d'une solution de traceur ayant une activité enzymatique de 1.25 UE/ml pour le SAF34 et 5 UE/ml pour le BAR210 sont distribués dans chaque puit. Après 2 heures d'incubation à +4°C les puits sont lavés 5 fois avec 300µl par puits de tampon de lavage. Après 5 minutes à température ambiante, sous agitation lente ; les puits sont à nouveau lavés 5 fois avec 300µl par puits de tampon de lavage.

Deux cents µl de réactif de Ellman (8,5 g NaCl dans 200 ml de tampon phosphate 0.5M, pH=7.4, 1g DTNB, 2.2g acétylthiocholine) sont ajoutés et après 30 et 45 minutes d'incubation protégée de la lumière à température ambiante sous agitation, on procède à la lecture au spectrophotomètre à 414nm.

## 5. Analyse des résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type.

Interprétation de la densité optique (DO) du dosage : une courbe étalon est établie d'après la mesure de l'absorbance des standards. Pour le dosage de la protéine du prion, les valeurs de densité optique des standards ont été ajustées par régression non linéaire à une sigmoïde en utilisant le logiciel WinNonLin 4.0<sup>®</sup> (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

### C. Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales du LCS a été effectué à l'aide de la méthode de Bradford (*BioRad protein Assay*). Une solution standard de 1 mg/ml d'albumine bovine sérique (Biorad) a été préparée et 8 dilutions sériées (0 à 700  $\mu$ g/ml) ont été utilisées pour le tracé d'une courbe standard. La densité optique a été déterminée à 590 nm sur un spectrophotomètre. L'équation de la courbe des DO en fonction des concentrations a été établie par régression polynomiale en utilisant le logiciel WinNonLin 4.0<sup>®</sup>.

## **IV. REALISATIONS EXPERIMENTALES**

### **A. Evaluation de la concentration en PrP dans le LCS de brebis saines et tremblantes**

#### **1. Objectifs**

Cette réalisation expérimentale avait pour objectifs :

- 1) Evaluer et comparer les variations inter-individuelles des concentrations en PrPc des ovins sains et atteints de tremblante et déterminer une valeur de base de la concentration en PrPc du LCS d'ovins sains et du LCS d'ovins atteints par la tremblante (expérience 1).
- 2) Evaluer les variations nyctémérales ou variations intra-individuelles des concentrations en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante et comparer la sensibilité à la protéinase K de la PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante (expérience 2).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes non invasives qui permettent de dépister une ESST. L'analyse des concentrations du liquide cérébro-spinal (LCS) représente une approche diagnostique des maladies neurodégénératives. Le LCS, pourrait participer à l'élimination de la PrPsc, à partir du tissu nerveux. A ce titre, la PrPsc pourrait être détectée dans le LCS des brebis atteintes de tremblante. Alternativement, les concentrations en PrPc du LCS des brebis atteintes de tremblante pourraient être altérées en raison de la capture de la PrPc par les formes insolubles accumulées dans les réseaux de drainage du fluide interstitiel.

A notre connaissance, il n'y a pas de données de la littérature concernant les variations temporelles des concentrations de PrPc dans le LCS des brebis saines. La perturbation des rythmes circadiens des souris transgéniques (Tobler et al, 1996) qui n'expriment pas la protéine du prion suggère l'implication de cette protéine dans la genèse de ces rythmes. Il est donc légitime d'analyser l'éventuelle rythmicité nyctémérale des concentrations en protéine PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante. De plus, la connaissance des fluctuations de ces

concentrations est nécessaire à l'interprétation ultérieure des cinétiques des concentrations du LCS en PrPc ou en PrP recombinante après une administration intra-veineuse de la protéine.

## **2. Expérience 1 : Etude des variations inter-individuelles de la concentration en PrPc du LCS.**

### **2.1. Matériels et méthodes spécifiques à l'expérience 1**

- **Animaux :**

L'étude a été réalisée avec 28 ovins sains dont 19 prélevés à l'abattoir de Castelnaudary (mouton 1 à mouton 19) et 9 ovins prélevés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Des prélèvements de LCS ont été également obtenus chez 10 ovins atteints de tremblante.

- **Protocole expérimental :**

A l'abattoir de Castelnaudary, le LCS a été prélevé immédiatement *post-mortem*, au niveau de la cisterna magna. Pour les autres ovins de l'étude, la ponction de LCS a été réalisée sur l'animal vivant, au niveau de l'espace sous-arachnoïdien lombo-sacré.

- **Méthodes analytiques :**

La PrPc a été dosée sans digestion préalable par la protéinase K par ELISA dans tous les échantillons de LCS.

### **2.2. Résultats**

La concentration moyenne en PrPc ( $\pm$  écart-type) du LCS des ovins sains prélevés dans cette étude a été de **10.6  $\pm$  3.69 ng/mL** (5.4 - 20,5 ng/mL, n = 28).

La concentration moyenne en PrPc du LCS des brebis tremblantes a été de **12.6  $\pm$  1.81 ng/mL** (10.6 - 15.7 ng/mL, n = 9).

La figure 21 illustre la distribution de la concentration en PrPc du LCS des brebis saines de notre échantillon de population prélevées à l'abattoir et à l'ENVT. C'est une distribution normale.

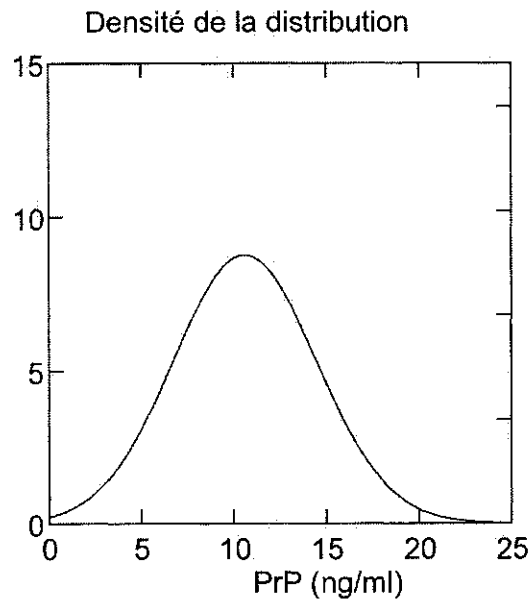


Figure 21: Distribution de la concentration en PrPc du LCS des ovins sains prélevées à l'abattoir et à l'ENVT.

### **3. Expérience 2 : Etude des variations intra-individuelles de la concentration en PrPc du LCS et test de sensibilité à la protéinase K.**

#### **3.1. Matériels et méthodes spécifiques à l'expérience 2**

- **Animaux :**

L'étude a été réalisée avec 9 brebis de race Romanov : 5 brebis saines de génotype AARRRR, âgées de 2 ans, de poids moyen 43.4 kg et 4 brebis atteintes de tremblante de génotype VVRRQQ, âgées de 18 mois, de poids moyen 38 kg.

- **Hébergement :**

Les animaux ont été placés dans des cages à métabolisme la veille des prélèvements après la mise en place d'un cathéter dans l'espace sous arachnoïdien

lombo-sacré. Les brebis ont été soumises aux variations photopériodiques naturelles, les prélèvements nocturnes étaient effectués à l'aide d'une lumière rouge.

- **Protocole expérimental :**

La veille des mesures, un cathéter a été mis en place dans l'espace sous arachnoïdien lombo-sacré pour les ponctions de LCS et un cathéter a été mis en place dans la veine jugulaire gauche. Le lendemain (à partir de 10 :00), des prélèvements de LCS ont été réalisés toutes les 2 heures pendant 24 h (période 1). Ces prélèvements ont été renouvelés au bout de 8 jours au cours d'une deuxième série de prélèvement de 24 h, après une nouvelle pose de cathéter, sur 4 brebis (2 brebis saines, 2 brebis atteintes de tremblante) afin d'évaluer la répétabilité des mesures.

- **Procédure expérimentale :**

**Méthodes analytiques :**

La PrP a été dosée sans digestion préalable par la protéinase K par ELISA dans tous les échantillons de LCS avec le couple d'anticorps (BAR210, 12F10).

**Test de sensibilité à la protéinase K (PK) des LCS des brebis saines et tremblantes:**

Pour chaque brebis, les 3 premiers échantillons de LCS ont été « poolés » et les concentrations en PrP de ce pool ont été déterminées avant et après digestion par la protéinase K aux concentrations finales de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 3 µg/ml, avec le couple d'anticorps (SAF34, 12F10).

**Digestion par la PK :**

Six solutions de PK aux concentrations respectives de 1.5 ; 3 ; 6 ; 9 ; 12 et 36 µg/ml dans du tampon phosphate (10 mM) ont été préparées à partir de la solution commerciale de PK (Sigma<sup>®</sup>, 23 mg/ml, 1.1 U/ml).

Dix µl de chacune des solutions de PK aux concentrations respectives de 1.5, 3, 6, 9, 12 ou 36 µg/ml ont été ajoutés à un volume de 100 µl de LCS pour obtenir une concentration finale de PK de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 ou 3 µg/ml respectivement.

Après une incubation à 37°C pendant 1 h, les échantillons ont été placés dans de la glace et 10 µl d'une solution de Péfablo<sup>®</sup>, un inhibiteur des protéases telles que la protéinase K (12 mg/mL dans de l'eau), ont été ajoutés. Les échantillons contrôles (sans PK) ont été dilués de la même façon que les échantillons traités.

Le dosage de PrP a été réalisé simultanément sur les échantillons, avant et après la digestion par la PK avec le couple d'anticorps (SAF34, 12F10).

### 3.2. Résultats

La figure 22 illustre l'évolution au cours d'un nyctémère des concentrations en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante. Pour la première série de prélèvements, la concentration moyenne globale en PrPc du LCS au cours du nyctémère des individus sains a été de **14.7 ± 0.73 ng/mL** (10.9 - 20.7 ng/mL). La concentration moyenne globale en PrPc du LCS des brebis saines durant la phase diurne a été de 14.1ng/mL (10.1 - 20.9 ng/mL) et de 15.3 ng/mL (11.8 - 20.5 ng/mL) au cours de la phase nocturne.

Pour la première série de prélèvements, la concentration moyenne globale en PrPc du LCS au cours du nyctémère des individus atteints de tremblante a été de **14.4 ± 1.73 ng/mL** (11.2 - 19.1 ng/mL). La concentration moyenne globale en PrPc du LCS des brebis tremblantes durant la phase diurne a été de 14.8 ng/mL (11.6 - 19.2 ng/mL) et de 13.9 ng/mL (10.8 - 19.0 ng/mL) durant la phase nocturne.

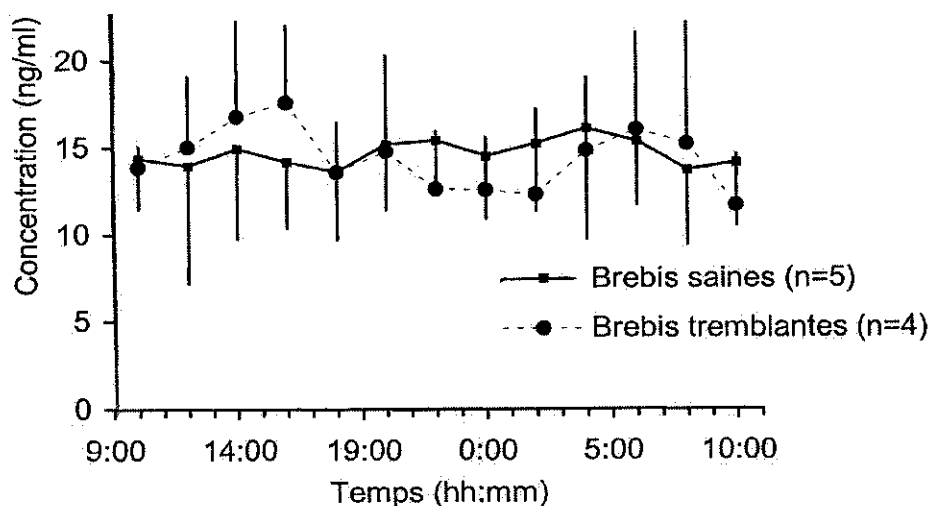


Figure 22 : Evolution au cours d'un nyctémère des concentrations moyennes (± écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante (brebis tremblantes), obtenu lors de la première série de prélèvements.

La figure 23 illustre l'évolution au cours d'un nyctémère des concentrations en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis tremblantes pour la deuxième série de prélèvements. Chez les individus sains, la concentration moyenne globale en PrPc du LCS au cours du nyctémère a été de **12.3 ± 2.19 ng/mL** (9.1 – 14.4 ng/mL). La concentration globale moyenne en PrPc du LCS des brebis saines durant la phase diurne a été de 13.2 ng/mL (8.7 – 15.6 ng/mL) et durant la phase nocturne de 11.2 ng/mL (9.5 – 13.0 ng/mL).

Pour la deuxième série de prélèvements, chez les individus atteints de tremblante la concentration moyenne globale en PrPc du LCS au cours du nyctémère a été de **12.4 ± 2.83 ng/mL**. La concentration moyenne globale en PrPc du LCS des brebis tremblantes durant la phase diurne a été de 11.3 ng/mL (10.6 – 11.3 ng/mL) et durant la phase nocturne de 13.8 ng/mL (seule valeur disponible).

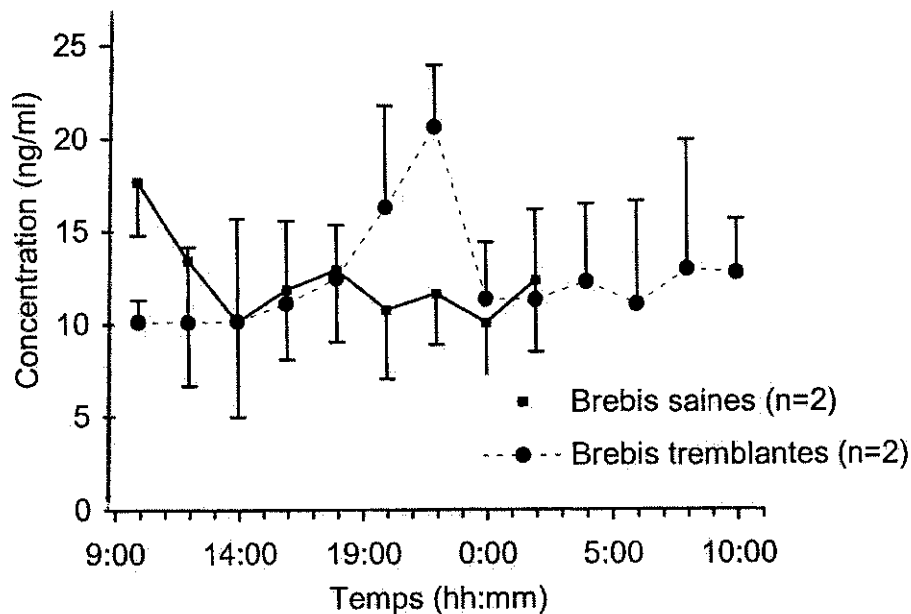


Figure 23 : Evolution au cours d'un nyctémère des concentrations moyennes (± écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis tremblantes, lors de la deuxième série de prélèvements.

La figure 24 montre l'évolution des concentrations en PrPc du LCS des brebis saines ou atteintes par la tremblante en fonction de la concentration en PK. Le tableau 3 donne les concentrations individuelles en protéines, et en PrPc exprimées en ng/ml et en mg/mg protéines du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de



tremblantes en fonction de la concentration finale en PK. Pour une concentration finale en PK de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , la PrPc est détectée dans les prélèvements issus des brebis saines et atteintes de tremblante ; alors qu'à la concentration finale de PK de 1  $\mu\text{g/ml}$ , la PrPc est détectée uniquement chez les brebis atteintes de tremblante et une brebis saine. Enfin, pour une concentration de PK de 3  $\mu\text{g/ml}$ , la PrPc n'est détectée dans aucun des échantillons (Tableau 3). La concentration moyenne en protéines du LCS a été de 674.8  $\mu\text{g/ml}$  (413.8 – 1132.99  $\mu\text{g/ml}$ ).

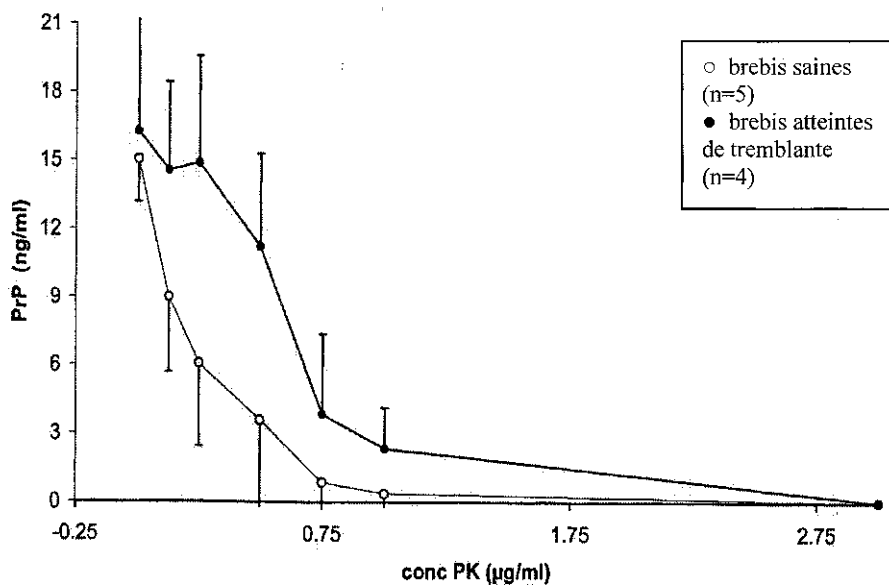


Figure 24 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en PrPc du LCS des brebis saines (n=5) et des brebis atteintes de tremblante (n=4) en fonction de la concentration finale en PK.

<b>BREBIS SAINES</b>						<b>BREBIS ATTEINTES DE TREMBLANTE</b>			
<b>Concentrations en PrP en ng/ml</b>									
<b>PK</b>									
<b>(µg/ml)</b>	<b>B000267</b>	<b>B000527</b>	<b>B000266</b>	<b>B000278</b>	<b>B000248</b>	<b>B010617</b>	<b>B010778</b>	<b>B010533</b>	<b>B010527</b>
0.00	14.45	12.60	15.43	17.77	15.02	28.02	19.44	15.42	15.73
0.13	8.65	6.21	6.17	14.26	9.74	20.12	14.23	12.54	11.31
0.25	5.37	2.36	3.34	11.35	7.96	21.43	12.53	14.90	10.72
0.5	2.45	0.58	0.65	11.40	2.74	17.23	9.66	9.80	8.13
0.75	0.28			3.59	0.33	9.00	2.63	2.77	0.93
1.00				1.63		4.92	1.83	1.78	0.74
3.00									
<b>Prot</b>									
<b>(µg/ml)</b>	413.84	413.84	463.81	1132.99	527.97	1068.80	587.67	582.66	881.65
<b>Prp ng/mg prot</b>									
<b>PK</b>									
<b>(µg/ml)</b>	<b>B000267</b>	<b>B000527</b>	<b>B000266</b>	<b>B000278</b>	<b>B000248</b>	<b>B010617</b>	<b>B010778</b>	<b>B010533</b>	<b>B010527</b>
0.00	34.92	30.44	33.28	15.68	28.44	26.22	33.08	26.46	17.84
0.13	20.91	15.02	13.30	12.59	18.46	18.82	24.21	21.53	12.83
0.25	12.97	5.71	7.20	10.02	15.08	20.05	21.32	25.58	12.16
0.5	5.93	1.4	1.41	10.06	5.18	16.12	16.44	16.82	9.22
0.75	0.68			3.17	0.62	8.42	4.47	4.76	1.06
1.00				1.44		4.61	3.11	3.06	0.84
3.00									

Tableau 3 : Concentrations individuelles en protéines totales, en PrPc exprimées en ng/ml et en mg/mg protéines du LCS des brebis saines et atteintes de tremblantes en fonction de la concentration finale en PK.

## **B. Passage de la PrP à travers la barrière hémato-méningée (BHM)**

### **1. Objectifs**

Cette étude avait pour objectif principal d'évaluer l'effet d'une administration intraveineuse (iv) de la PrP recombinante chez la brebis, sur la concentration en PrPc du LCS.

Les données expérimentales et la nouvelle donnée épidémiologique concernant la MCJnv (Llewelyn et al, 2004) suggèrent que le sang peut contenir l'agent infectieux au stade pré-symptomatique de la maladie. Ces observations soulèvent la question de l'infectiosité du sang et par conséquent de possibles contaminations par voie hématogène.

Dans le contexte des études développées au laboratoire (UMR 181 de Physiopathologie et toxicologie expérimentales de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT)) pour étudier *in vivo* la disposition de la protéine du prion recombinante administrée par voie iv chez la brebis, nous avons réalisé un essai pilote au cours duquel nous avons évalué la cinétique temporelle des concentrations en PrPc du LCS après une administration iv de PrP recombinante.

### **2. Matériels et méthodes**

- **Animaux :**

L'étude a été réalisée avec 2 brebis saines, une de race Lacaune, pesant 68 Kg, née en 1993 et une brebis de race Manech, pesant 44 Kg et née en janvier 1994.

- **Hébergement :**

Les animaux ont été placés dans des cages à métabolisme, au service de physiologie. Ils ont reçu du foin et de l'eau *ad libitum* et du concentré à heure fixe, (200g le matin (08 :00) et 200g le soir (16 :00)).

- **Protocole expérimental :**

La veille des mesures, un cathéter a été mis en place dans l'espace sous arachnoïdien lombo-sacré pour les ponctions de LCS. Les animaux ont été systématiquement pesés la veille de l'administration afin d'ajuster la dose au poids vif. La PrP recombinante (PrPrec) a été utilisée comme modèle de la protéine du prion pathogène.

Une brebis (n° 3049) a reçu une administration iv du variant VRQ de la PrPrec à la dose de 1.28 µg/kg. Des prélèvements de LCS ont été réalisés 10 minutes avant l'administration de PrPrec et aux temps 3, 8, 10, 13, 16, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 et 360 minutes post-administration.

Une deuxième brebis (n° 680) a reçu une administration iv du variant VRQ de la PrPrec à la dose de 0.1 mg/kg, soit cent fois environ supérieure à la dose précédente. Des prélèvements de LCS ont été réalisés dans l'heure et demi (4 prélèvements à 30 minutes d'intervalle) avant l'administration de PrPrec (variant VRQ) et aux temps 30 minutes, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 22 et 32 heures.

- **Procédure expérimentale :**

**Préparation des solutions de PrPrec :**

Le variant VRQ de la PrP recombinante a été fourni par l'unité (INRA, Jouy en Josas) en solution dans du tampon MOPS 0.1 M à la concentration de 1.1 mg/ml.

Pour l'ensemble des administrations, une solution de variant a été préparée à la concentration de 1.1 mg/ml dans un pool de plasma EDTA. La solution préparée a été aliquotée et conservée à -20°C.

Deux fractions aliquotes de 200 µL ont été prélevées et conservées à -20°C pour permettre de déterminer avec précision la dose administrée.

**Administration :**

La solution de protéine a été administrée à l'aide d'une seringue de 5 mL (le volume a été ajusté au poids des individus). La dose exacte de solution administrée a été vérifiée en pesant la seringue avant et après administration.

Les administrations ont été effectuées à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire droite la veille de l'expérimentation. Après administration, le cathéter est rincé avec 5 mL de sérum physiologique hépariné.

### **Méthodes analytiques :**

La PrP a été dosée sans digestion préalable par la protéinase K par ELISA avec le couple d'anticorps (BAR210, 12F10).

### **3. Résultats :**

Les figures 25a et 25b illustrent respectivement l'évolution temporelle des concentrations en PrP du LCS des brebis 3049 et 680 qui ont reçu une injection iv du variant VRQ de la PrPrec aux doses respectives de 1.28 µg/kg et 0.1 mg/kg.

L'observation visuelle de la figure 25a suggère une légère augmentation des concentrations en PrP du LCS après l'administration de PrP recombinante. Cependant, les concentrations en PrP du LCS qui fluctuent entre 23 et 33 ng/mL avant l'administration de PrPrec tendent à diminuer après l'administration de la forte dose de PrPrec.

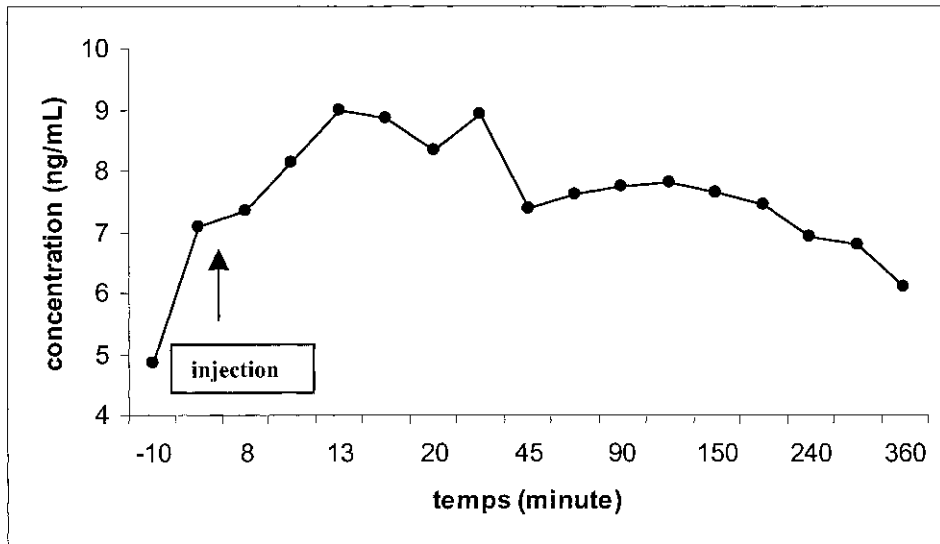


Figure 25a : Evolution temporelle de la concentration en PrP du LCS de la brebis 3049 avant et après une injection intra-veineuse de variant VRQ (faite à t0) à la dose de 1.28 µg/kg.

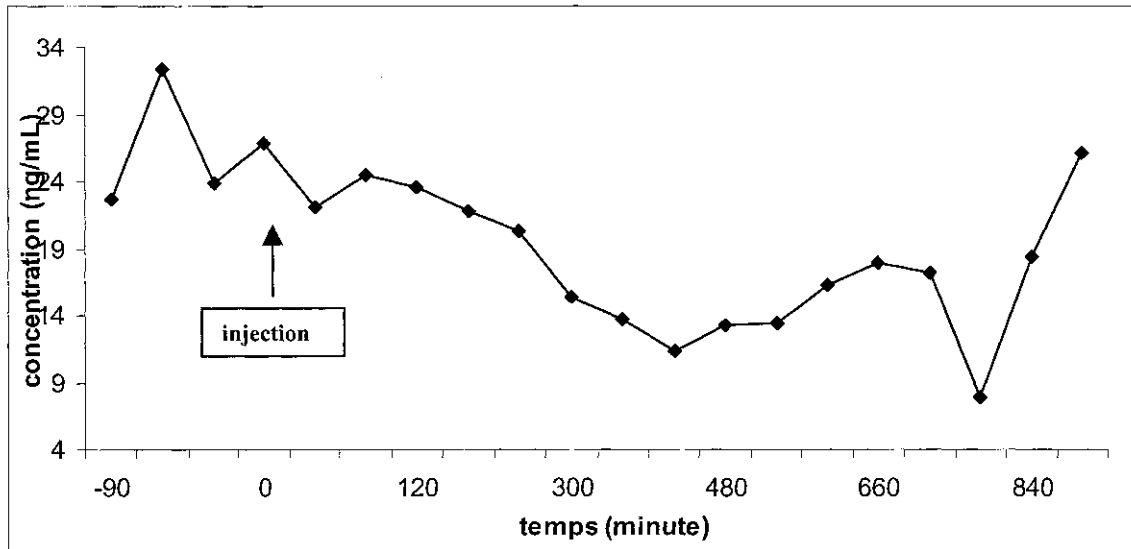


Figure 25b : Evolution temporelle de la concentration en PrP du LCS de la brebis 680 avant et après une injection intra-veineuse de variant VRQ (faite à t0) à la dose de 0.1 mg/kg.

## IV. DISCUSSION GENERALE

Les résultats de ces études suggèrent l'absence de variation nyctémérale ou variation intra-individuelle significative de concentration en PrP (protéine du prion) dans le LCS (liquide cérébro-spinal) chez les individus sains. Nous avons ainsi montré que les concentrations en PrP du LCS ont une valeur moyenne de 12 ng/ml, soit environ 10 fois supérieure à celle du plasma (données non publiées). Il y aurait une répétabilité des mesures de concentration en PrP du LCS des brebis par la méthode utilisée. De plus, l'étude de population regroupant 28 ovins révèle que l'amplitude des variations inter-individuelles de la concentration en PrP du LCS est faible. Les ovins présentent une concentration moyenne en PrP du LCS de  $11 \pm 4$  ng/ml avec une distribution normale. La mesure de cette concentration pourrait par conséquent servir de support à un nouvel outil diagnostique qui ne serait pas influencé par une quelconque variation inter ou intra-individuelle.

De plus, il a été montré qu'il n'y aurait pas de modifications de la composition du liquide cérébro-spinal (LCS) immédiatement *post-mortem* chez la vache (Jones et al, 1996). En conséquence, les valeurs de concentrations en PrP du LCS obtenues chez les animaux vivants peuvent être comparées à celles des animaux prélevés à l'abattoir *en post-mortem* immédiat (partant du principe qu'il n'y aurait pas non plus de modification post-mortem de la composition du LCS chez la brebis). D'autre part, selon une étude réalisée chez la brebis, il n'y a pas de différence de concentration en protéines du LCS entre une ponction de LCS haute (dans la cisterna magna) et une ponction basse (dans l'espace sous arachnoïdien lombo-sacré) (Scott, 1992). C'est également le cas chez la vache et le cheval alors que chez l'homme, le chien et le chat il existe une différence de concentration en protéines du LCS selon le site de ponction (Guatteo, 2002 ; Bailey et al, 1985). Les valeurs de concentrations en PrP du LCS obtenues à partir d'une ponction haute, chez les ovins, peuvent donc être comparées à celles obtenues à partir d'une ponction de LCS basse.

La concentration moyenne globale en PrPc (protéine du prion cellulaire) du LCS des brebis atteintes de la tremblante n'a pas été différente de celle des brebis saines. La seule mesure des concentrations en PrP du LCS ne permet donc pas de discriminer les ovins atteints de tremblante des ovins sains. Par contre, il existerait une différence de sensibilité à la protéinase K (PK) selon l'état pathologique des animaux

et/ou du variant génétique de la protéine exprimée. La PrP du LCS des brebis à génotype sensible (VRQ) atteintes de tremblante apparaît moins sensible à la digestion enzymatique par la PK que la PrP du LCS des brebis à génotype résistant (ARR) saines. Ainsi, pour une concentration finale en PK de 0.5 µg/ml, la PrPc est détectée dans les prélèvements issus des brebis saines et atteintes de tremblante, alors qu'à la concentration finale de PK de 1 µg/ml, la PrPc est détectée uniquement dans le LCS des brebis atteintes de tremblante et dans celui d'une brebis saine. Enfin, pour une concentration de PK de 3 µg/ml, la PrPc n'est détectée dans aucun des échantillons. La PrP présente dans le LCS des ovins atteints de tremblante est donc sensible à la PK comme cela avait été montré chez l'homme atteint de MCJ (Wong et Green, 2001).

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure en l'absence de PrPsc dans le LCS des brebis atteintes de tremblante. En effet, la PrPsc pourrait être présente dans le LCS sous la forme d'agrégats ou de SAF (scrapie-associated fibrils) dans lesquels les sites antigéniques de la PrP sont masqués. Pour détecter la PrPsc, il faudrait la dénaturer et dissocier ces agrégats avant de réaliser le dosage. De plus, le couple d'anticorps utilisé dans nos essais (SAF34 -12F10) ne permet de détecter que des formes relativement intactes de la PrPsc et ne permet pas de détecter la forme clivée ou PrPres qui est infectieuse. A notre connaissance, une seule étude expérimentale a mis en évidence la présence de PrPsc dans le LCS de patients atteints de MCJ (Bieschke et al, 2000).

L'action enzymatique de la PK dépend de la quantité de protéines présentes dans le LCS. Nous avons observé que les concentrations en protéines totales du LCS sont élevées 674.8 µg/ml et variables (413.8 – 1132.99 µg/ml) à la fois chez les brebis saines et chez les brebis atteintes de tremblante. Ces concentrations sont supérieures à celles décrites dans la littérature (environ 200 µg/ml ; Scott, 1992). Cette différence peut s'expliquer par une réaction inflammatoire locale liée à l'effet traumatisant du cathéter placé dans l'espace sous-arachnoïdien, ou par une contamination sanguine du LCS lorsque le cathéter a été posé. Si l'on ramène les concentrations en PrP à la quantité de PrP par mg de protéines, on montre que la différence de sensibilité de la PrP à la PK n'est pas artéfactuellement due à une différence de concentration en protéines totales car lorsque l'on rapporte les concentrations en PrPc du LCS à la concentration en protéines, on retrouve des



concentrations quantifiables en PrPc uniquement chez les brebis atteintes de tremblante et chez une brebis saine pour une concentration de PK de 1 µg/ml.

La différence de sensibilité de la PrPc à la PK peut avoir deux origines :

- la différence de génotype des animaux (VRQ *versus* ARR)
- l'état pathologique des animaux.

Pour différencier l'origine de cette différence de sensibilité à la PK, il serait intéressant de refaire ce test à partir de LCS prélevé chez des animaux sains à génotype sensible (VRQ). Si la différence de sensibilité est due à la maladie, nos résultats suggèrent que les populations saine et tremblante pourraient être différenciées en évaluant les concentrations en PrP du LCS en présence de PK. Si cette différence est due au génotype, la résistance accrue à la digestion enzymatique du variant VRQ de la PrPc de l'hôte pourrait participer aux mécanismes génétiques de sensibilité à la maladie.

L'origine de la PrP du LCS n'est pas identifiée ; la PrPc du LCS pourrait provenir du plasma ou bien du tissu nerveux. Dans le cadre de l'évaluation du risque de transmission d'une ESST par la transfusion sanguine, nous avons examiné l'hypothèse d'une origine plasmatique, *i.e.* d'un passage direct de la PrP du sang vers le LCS. Nous avons ainsi réalisé un essai pilote au cours duquel nous avons évalué la cinétique temporelle des concentrations en PrPc du LCS de 2 brebis après une administration intra-veineuse (iv) du variant VRQ de PrP recombinante, aux doses respectives de 1.28 µg/kg et 0.1 mg/kg. Nous n'avons pas observé une tendance significative de l'évolution au cours du temps de la concentration en PrP du LCS des brebis suite aux administrations. Ce résultat ne nous a pas permis de mettre en évidence un passage direct de la PrP issue d'une injection intra-veineuse vers le LCS.

Il serait intéressant de pouvoir distinguer la PrP endogène de celle administrée. La disponibilité d'anticorps spécifiques des variants V136Q171 et A136R171 de la protéine recombinante pourrait nous permettre d'examiner l'occurrence d'un passage d'un variant de la protéine du sang vers le LCS d'une brebis au génotype alternatif.

Nous pourrions également évaluer l'effet de substances augmentant la perméabilité de la BHM (barrière hémato-méningée), sur le passage de la protéine PrP du sang vers le LCS.

Nous n'avons pas mis en évidence de rythmicité nycthémérale de la concentration en PrPc du LCS des brebis saines et des brebis atteintes de tremblante. Il n'y a pas non plus de différence de concentration en PrPc du LCS entre une brebis saine et une brebis atteinte de tremblante. Un diagnostic ne peut donc être établi à partir de la seule mesure de la concentration en PrP du LCS. Nos résultats suggèrent que la PrP du LCS des brebis VRQ atteintes de tremblante est moins sensible à la PK que son équivalent chez les brebis ARR saines. Il serait intéressant d'évaluer et de comparer la sensibilité à la PK du LCS d'un plus grand nombre d'ovins sains et atteints de tremblante. Ce test de sensibilité à la PK pourrait également être évalué sur le plasma de ces mêmes ovins. Enfin, nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'existence d'un passage direct de la PrP<sup>rec</sup> du sang vers le LCS. Il serait intéressant de reproduire cet essai avec la protéine pathologique.

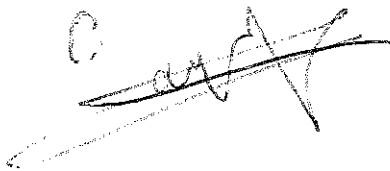
**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, P. DESNOYERS, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**Mlle IMBS Chantal, Anne, Maryvonne**  
a été admis(e) sur concours en : 1999  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11 mars 2004  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, V. GAYRARD-TROY, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
autorise la soutenance de la thèse de :  
**Mlle IMBS Chantal, Anne, Maryvonne**  
intitulée :  
« Analyse de la protéine du prion du liquide cérébro-spinal des brebis saines et atteintes de tremblante »

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Véronique GAYRARD-TROY**



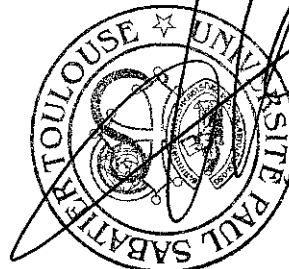
**Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Pierre DESNOYERS**



**Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Marie-Bernadette DELISLE**



**Vu le : 02 AVR. 2004  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Jean-François SAUTEREAU**





## BIBLIOGRAPHIE

1. AGUZZI A., BLATTLER T., KLEIN M.A. et al. Tracking prions : the neurografting approach. *Cell. Mol. Life Sci.* (1997), **53**, 485-495
2. AIKEN J.M., WILLIAMSON J.L. et MARSH R.F. Evidence of mitochondrial involvement in scrapie infection. *J. Virol.* (1989), **63**, 1686-1694
3. ANDREOLETTI O., BERTHON P., MARC D. et al. Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* (2000), **81**, 3115-3126
4. ANDREOLETTI O., LACROUX C., CHABERT A. et al. PrPsc 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. BAILEY C.S. et HIGGINS R.J. Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* (1985), **46**, 1162-1164
6. BAILEY C.S. et VERNAU W. Cerebrospinal fluid. Clinical biochemistry of domestic animals Kaneko J.J., Harvey J.W. et Burrs M.L. (eds), Fifth edition, Academic Press, San Diego, (1997), 785-827
7. BALDAUF E., BEEKES M. et 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**, 1187-1197
8. BENDHEIM P.E., BROWN H.R., RUDELLI R.D. et al. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* (1992), **42**, 149-156
9. BENDHEIM P.E. et POTEPSKA A. Purification and partial characterization of normal cellular homologue of the scrapie agent protein. *J. Inf. Disease* (1988), **158**, 1198-1207
10. BEHR S. Les proteines du liquide céphalorachidien. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse (2001)
11. BIESCHKE J., GIESE A., SCHULZ-SCHAEFFER W. et al. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), **97**, 5468-5473
12. BILLETER M., RIEK R., WIDER G et al. Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), **94**, 7281-7285
13. BROWN D.R. et BESINGER A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem* (1998), **334**, 423-429

14. CASHMAN N., LORTSCHER R., NALBANTOGLU J. et al. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* (1990), **61**, 185-192
15. CELLIO B.C. Collecting, processing and preparing CSF in dogs and cats. *Comp. Cont. Educ.* (2001), **23**(9), 786-794
16. CAUGHEY B., RACE R., ERNST D. et al. Prion protein (PrP) biosynthesis in scrapie infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* (1989), **63**, 175-181
17. DAGGETT V. Structure-function aspects of prion proteins *Curr. Opinion in Biotech.* (1998), **9**, 359-365
18. DE LAHUNTA A. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. DeLahunta A. Second edition. Philadelphia : W.B. Saunders Compagny (1983), 31-52
19. DICKMEISS E. et GERSTOFT J. Blood infectivity in transmissible spongiform encephalopathies *APMIS* (2002), **110**, 99-103
20. ESPOSITO P., GHEORGHE D., KANDERE K. et al. Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* (2001), **888**, 117-127
21. FOSTER P. Prions and blood products *Ann. Med.* (2000), **32**, 501-513
22. FOURNIER J.G. Nonneuronal cellular prion protein. *Intern. Rev Cyto.* (2001), **208**, 121-160
23. GARCIA F.L., ZAHN R., RIEK R. et al. NMR structure of the bovine prion protéin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), **97**, 8334-8339
24. GASCHÉ Y., COPIN J.-C., SUGAWARA T. et al. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab* (2001), **21**, 1393-1400
25. GATTI J.-L., METAYER S., MOUDJOU M. et al. Prion protein is secreted in soluble forms in the epididymal fluid and proteolytically processed and transported in seminal plasma. *Biol. Reprod.* (2002), **67**, 393-400
26. GOLDMANN W., O'NEIL G., CHEUNG F. et al. PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J. Gen. Virol.* (1999), **80**, 2275-2283
27. GUATTEO R. La ponction atlanto-occipitale chez le jeune bovin. *Point Vet.* (2002), **230**, 62-63
28. HARRIS D. Cellular biology of prion disease. *Clin. Microbiol. Rev.* (1999), **12**, 429-444

29. HERZOG C., SALES N., ETCHEGARAY N. et al. Tissues distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or orale infection. *Lancet* (2004), **363** (9407), 411-412
30. HOUSTON F., FOSTER J., CHONG A. et al. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* (2000), **356**, 999-1000
31. HUNTER N., GOLDMANN W., BENSON G. et al. Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *J. Gen. Virol.* (1993), **74**, 1025-1031
32. HUNTER N., FOSTER J., CHONG A. et al. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* (2002), **83**, 2897-2905
33. JEFFREY M., RYDER S., MARTIN S. et al. Oral inoculation of sheep with agent of bovine spongiform encephalopathy. I. Onset and distribution of disease specific PrP accumulation in brain and viscera. *J. Comp. Pathol.* (2001), **124**, 280-289.
34. JOHNSTON M. et PAPAICONOMOU C. Cerebrospinal fluid transport : a lymphatic perspective *News Physiol. Sci.* (2002), **17**, 227-230
35. JONES V., MARTIN T.C., KEYES P. et al. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet. Rec.* (1996), **139**, 360-363
36. KARSSSEN A., MEIJER O., VAN DER SANDT I. et al. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology.* (2001), **142**, 2686-2694
37. KIMBERLIN R. et WALKER C; The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res.* (1989), **12**, 201-211
38. KUSUHARA H. et SUGIYAMA Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrie rand blood-cerebrospinal fluid barrier (part 1) *Drug Discov. Today* (2001) Feb 3, **6**, 150-156
39. LLEWELYN C.A., HEWITT P.E., KNIGHT R.S.G. et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* (2004), **363**, 417-421
40. MANOLAKOU K., BEATON J., McCONNELL I. et al. Genetic and environmental factors modify bovine spongiforme encephalopathy incubation period in mice. *Proc. Natl. Acad Sci USA* (2001), **98**, 7402-7407
41. MINGHETTI L., CARDONE F., GRECO A. et al. Increased CSF levels of prostaglandin E<sub>2</sub> in variant Creutzfeld-Jakob disease. *Neurology* (2002), **58**, 127-129
42. MOUDJOU M., FROBERT Y., GRASSI J. et al. Cellular prion protein status in sheep : tissue-specific biochemical signatures *J. Gen. Virol.* (2001), **82**, 2017-2024

43. PARCHI P., ZOU W., WANG W. et al. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc. Natl. Acad Sci USA* (2000), **97**, 10168-10172
44. PARKER A.J. The diagnostic uses of cerebro-spinal fluid. *J. Small Anim. Pract.* (1972), **13**, 607-611
45. PERRY V.H., ANTHONY D.C., BOLTON S.J. et al. The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Mol Medecine Today* (1997), Aug, 335-341
46. PRUSINER S. Prions *Proc. Natl. Acad Sci USA* (1998), **95**, 13363-13383
47. SCHMERR M., JENNY A., BULGIN M.n et al. Use of capillary electrophoresis and fluorescent labelled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J. of Chromatography A* (1999) **853**, 207-214
48. SCHREUDER B.E.C., VAN KEULEN L.M.J., VROMANS M.E.W. et al. Preclinical test for prion diseases. *Nature* (1996), **381**, p 563
49. SCOTT P.R. Analysis of cerebrospinal fluid from field cases of some common ovine neurological diseases. *Br. Vet. J.* (1992), **148**, 15-22
50. SHYUNG S., HEUSER J. et HARRIS D ; A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clatherin-coated pits. *J. Cell Biol.* (1994), **125**, 1239-1250
51. SMITH M.O. et LACKNER A.A. Effects of sex, age, puncture site, and blood contamination on the clinical chemistry of cerebrospinal fluid in rhesus macaques (*Macaca mulatto*). *Am. J. Vet. Res.*(1993), **54** (11), 1845-1850
52. SORJONEN D.C. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. *Am. J. Vet. Res.* (1987), **48**, 301-305
53. STAHL N., BALDWIN M., HECKER R. et al. Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochem* (1992), **31**, 5043-5053
54. STAHL N. et PRUSINER S.B. Prions and Prions proteins *FASEB J.* (1991), **5**, 2799-2806
55. STARKE R., DRUMMOND O., MACGREGOR I. et al. The expression of prion protein by endothelial cells : a source of plasma form of prion protein? *Br. J. Haematology* (2002), **119**, 863-873
56. TELLING G.C., SCOTT M., MASTRIANNI J. et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* (1995), **83**, 79-90



57. TOBLER I., GAU S.E., DEBOER T. et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* (1996), **380**, 639-642
58. TYLER J.W., WEAVER D.M., TURK J.R. et al. Naturally occurring scrapie in Southdown sheep. *J. Vet. Intern. Med.* (1999), **13**, 213-216
59. VAN ENGELEN B.G., LAMERS K.J., GABREELS F.J. et al. Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentration in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* (1992), **38**, 813-816
60. VAN KEULEN L., SCHREUDER B., VROMANS M. et al. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch. Virol.* (2000), **16**, 57-71
61. WATSON M.A. et SCOTT M.G. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* (1995), **41**, 343-360
62. WILSON K., CODE C. et RICKETTS M.N. Risk of acquiring Creutzfeldt-Jakob disease from blood transfusions : systemic review of case-control studies. *BMJ* (2000), **321** (7252), 17-19
63. WEBB A.A. et MUIR G.D. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *J.Vet. Intern. Med* (2000), **14**, 399-411
64. WONG B.-S., GREEN A., LI R. et al. Absence of protease-resistant prion protein in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Path.* (2001), **194**, 9-14

