

**ANALYSE DE LA DISPOSITION DE LA PROTEINE DU  
PRION RECOMBINANTE OVINE ADMINISTREE PAR VOIE  
INTRAVEINEUSE CHEZ LA BREBIS**

# **TABLE DES MATIERES**

**INTRODUCTION.....5**

## **1<sup>ère</sup> partie :**

### **LES ENCEPHALOPATHIES SUBAIGUËS SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES AU CŒUR DE L'ACTUALITE**

**I. LES DIFFERENTES FORMES D'ESST.....9**

I.1. La tremblante des petits ruminants .....9

I.2. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB).....11

I.3. Des ESST humaines : la Maladie de Creutzfeldt-Jacob (MCJ) et le Kuru.....13

**II. LA PROTEINE PRION (PrP), L'AGENT RESPONSABLE DES ESST ?.....15**

II.1. Nature de l'agent infectieux .....15

II.2. La dynamique du prion .....18

**III. DIAGNOSTIC DES ESST .....19**

**IV. ASPECTS GENETIQUES DE LA SENSIBILITE AUX ESST. ....21**

**V. LA TRANSMISSION PAR TRANSFUSION SANGUINE : OU EN  
EST-ON DES RISQUES ?.....23**

## **2<sup>ème</sup> partie : REALISATIONS EXPERIMENTALES**

### **CONTRIBUTION A L'ESTIMATION DU RISQUE**

#### **TRANSFUSIONNEL :**

### **ANALYSE DE LA DISPOSITION DE LA PrP ADMINISTREE PAR VOIE SANGUINE CHEZ LA BREBIS**

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>27</b>
<b>II. OBJECTIFS.....</b>	<b>30</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>30</b>
III.1. Analyse de la disposition de la PrP recombinante <i>in vivo</i> . ....	30
III.1.1. Expérience 1 : Analyse de la disposition de la PrP recombinante administrée par voie intraveineuse. ....	30
III.1.2. Expérience 2 : Evaluation de l'élimination pulmonaire et hépatique de la PrP recombinante. ....	33
III.1.3. Procédure expérimentale .....	34
III.2. Analyse de la stabilité de la PrP recombinante <i>in vitro</i> .....	39
III.2.1. Objectifs.....	39
III.2.2. Protocole expérimental .....	39
III.2.3. Procédure expérimentale.....	39

<b>IV. ANALYSES.....</b>	<b>40</b>
IV.1. Analyse pharmacocinétique des données plasmatiques.....	40
IV.2. Analyse statistique.....	42
<b>V. RESULTATS.....</b>	<b>43</b>
V.1. Analyse pharmacocinétique de la PrP recombinante <i>in vivo</i> . ....	43
V.1.1. Expérience 1 : Analyse de la disposition de la PrP recombinante administrée par voie intraveineuse.....	43
V.1.2. Expérience 2 : Evaluation de l'élimination pulmonaire et hépatique de la PrP recombinante . ....	46
V.2. Analyse de la stabilité de la PrP recombinante <i>in vitro</i> . ....	49
<b>VI. DISCUSSION.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>53</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>56</b>

# INTRODUCTION

Les maladies à prion, dont la dénomination précise est « Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles » ou ESST, constituent aujourd'hui encore une énigme biologique et le seul exemple de maladie transmissible dont l'origine reste encore inconnue.

Selon l'hypothèse majoritairement retenue à l'heure actuelle, l'agent responsable des ces maladies serait une protéine appelée protéine du prion ou PrP, qui pourrait se transformer en protéine à caractère infectieux : la PrPsc.

Depuis quelques années, ces maladies suscitent un grand intérêt scientifique, en particulier depuis l'apparition de la crise de « la vache folle », en 1986 au Royaume Uni, et l'émergence d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jacob.

En effet, les ESST, maladies dégénératives du système nerveux central, regroupent principalement, chez l'homme, la Maladie de Creutzfeldt-Jacob (MCJ) et chez l'animal, la tremblante du mouton et l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB). La mise en évidence du passage d'une de ces maladies, l'ESB, d'évolution constamment mortelle, à travers la barrière d'espèce et de la contamination de l'homme via la consommation de viande bovine a renforcé le sentiment d'insécurité et modifié la perception du risque pour l'homme.

Plus récemment, la démonstration expérimentale de la possibilité de transmettre une ESST à une brebis par la transfusion du sang total d'une brebis infectée expérimentalement avec l'agent de l'ESB soulève la question du risque de transmission iatrogène de l'agent du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jacob par transfusion sanguine.

En l'absence de barrière d'espèce, il est en effet à craindre que le sang puisse représenter pour l'homme l'équivalent de ce qu'ont été les farines animales pour la crise de « la vache folle ». Ce risque, actuellement hypothétique, a tout de même conduit à de nombreuses mesures de précautions en ce que concerne le don du sang dans plusieurs pays.

Le risque de transmission d'une ESST lors d'une transfusion sanguine n'a jamais été établi jusqu'à aujourd'hui. Mais des données scientifiques supplémentaires sont nécessaires pour caractériser ce danger transfusionnel.

Le risque de transmission par la transfusion sanguine dépend, d'une part, de l'exposition de l'organisme à l'agent infectieux introduit par voie intraveineuse et d'autre part, de l'effet de cette exposition sur l'occurrence des processus pathologiques.

Nous nous proposons de déterminer l'exposition de l'organisme à l'agent infectieux, la protéine du prion, après son introduction par voie sanguine en vue d'identifier d'éventuels facteurs de risque (génétiques) et physiopathologiques.

L'étude de l'exposition consiste à documenter le sort de la protéine, c'est à dire, sa distribution corporelle, son métabolisme et son élimination après une administration directe par voie intraveineuse. Cette exposition dépend du titre infectieux du sang des donneurs et de la capacité de l'organisme à éliminer plus ou moins rapidement la protéine, c'est à dire, de sa clairance et de son volume de distribution.

Ainsi, la clairance plasmatique de l'agent infectieux apparaît comme une donnée fondamentale mais encore inconnue pour évaluer une exposition systémique et un risque transfusionnel.

Dans une première partie, après avoir présenté les principales ESST animales et humaines, nous proposerons une synthèse bibliographique des connaissances sur ces maladies : nature de l'agent responsable, méthodes de diagnostic, aspects génétiques de la sensibilité aux ESST. Nous dresserons également le bilan des acquis actuels sur les risques de transmission des ESST par transfusion sanguine.

La deuxième partie sera consacrée aux réalisations expérimentales visant à analyser la disposition de la protéine du prion administrée par voie sanguine chez la brebis et à évaluer sa clairance. La protéine du prion recombinante ovine sera utilisée comme modèle de la protéine pathologique. L'influence des facteurs génétiques sur la disposition de la protéine du prion sera examinée par l'étude de l'effet du polymorphisme du gène qui code pour la protéine du prion sur la clairance de la protéine, ainsi que par la comparaison des paramètres pharmacocinétiques des variants génétiques de la protéine. Finalement, l'étude des

mécanismes de clairance de la protéine du prion nous permettra d'identifier certains facteurs de susceptibilité à l'agent infectieux.

**1<sup>ère</sup> partie :**

**LES ESST AU CŒUR DE L'ACTUALITE**



# **I. LES DIFFERENTES FORMES D'ESST.**

## **I.1. La tremblante des petits ruminants**

Si l'attention portée à la tremblante est aujourd'hui décuplée par l'hypothèse d'un risque de transmission à l'homme, cette maladie endémique et ancestrale des petits ruminants fait partie intégrante de la culture des éleveurs dans de nombreuses régions du monde, dans sa gestion et son contrôle.

Décrite dès 1732 en Grande Bretagne, elle suscite un intérêt scientifique, notamment en France et en Angleterre où elle représente un poids économique important : 30% des cheptels sont aujourd'hui infectés en Grande-Bretagne. En 1936, J.Cuillé et P.L. Chelle, deux vétérinaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, démontrent la transmissibilité de la tremblante après une longue durée d'incubation, et donc, le caractère infectieux de la maladie (Cuillé et Chelle, 1936). Un peu plus tard, ils décrivent l'aspect spongieux du cerveau comme les lésions anatomopathologiques typiques de la tremblante, faisant de celle-ci l'archétype des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles ou ESST, caractérisées par des lésions neurodégénératives, une période d'incubation longue et une issue toujours fatale.

On distingue deux formes de la maladie atteignant les animaux âgés de 2 à 5 ans: une forme prurigineuse provoquant l'apparition de lésions de grattage (d'où le nom de « scrapie » ou prurit en anglais), d'une toison dépenaillée, et une forme paralytique, commençant par une parésie de l'arrière-train et s'aggravant progressivement (voir figure 1). Dans tous les cas, les troubles du comportement, une hyperesthésie et des tremblements sont observés, l'état général est progressivement altéré, l'animal maigrit et la mort survient en un ou deux mois en moyenne, sans phase de rémission.



**Figure 1:** Brebis manech tête rousse atteinte de tremblante et à la toison dépenaillée.  
(photo pathologie du bétail, ENVT)

Dans l'espèce ovine, à la différence des autres ESST, la transmission interindividuelle de l'agent infectieux ne fait aucun doute, même si les modalités restent largement imprécises. Si l'infectiosité du placenta, des glandes salivaires, des muqueuses nasales et des intestins des animaux malades et en incubation est démontrée (Race *et al*, 1998), celle de la salive, du jetage et des fèces n'est que suspectée (Hadlow *et al*, 1982 ; Pattison *et al*, 1962).

Aussi existe-t-il une transmission naturelle horizontale entre les animaux au sein d'un troupeau, liée à la placentophagie et à la contamination du milieu extérieur lors de la mise bas. De plus, les pâturages contaminés semblent pouvoir transmettre l'infection pendant de nombreuses années (Sigurdarson *et al*, 1998), jouant un rôle majeur dans la transmission aux animaux achetés ou aux troupeaux voisins en période d'estive. Enfin, la présence de l'agent infectieux dans les acariens du fourrage a été rapportée (Wisniewski *et al*, 1996).

Quant à la transmission verticale, elle semble possible puisque certains embryons prélevés sur une brebis infectée et transférés sur une mère porteuse saine développent la maladie, mais les risques de transmission transplacentaire ne sont pas clairement établis (Foster *et al*, 1992, 1996)

Ainsi, la voie orale semble être la voie de contamination majeure dans les conditions naturelles. La voie transcutanée ou conjonctivale sont toutefois décrites et des contaminations

iatrogènes ont déjà eu lieu : en 1939, en Grande-Bretagne, une tremblante expérimentale s'est développée chez près de 7% des 18000 moutons traité quatre ans auparavant avec un vaccin contre le louping-ill, préparé à partir de cerveaux de moutons malheureusement contaminés par une souche de tremblante (Greig, 1950). De même, en 1997-98, un vaccin contre *Mycoplasma agalactiae* lui aussi contaminé fut utilisé en Italie.

La barrière d'espèce ne semble donc pas franchie par l'agent de la tremblante dans les conditions naturelles, mais la question reste posée depuis qu'il a été incriminé dans le développement de foyers d'ESST dans des élevages de bisons nourris avec des abats de moutons contaminés (Encéphalopathie Transmissible du Bison). La tremblante n'est tout de même pas considérée comme une zoonose.

Toutefois, le risque représenté par les ESST des petits ruminants pour l'homme a été reconsidéré suite à l'apparition de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) et suite à la preuve, en 1993 par Foster, de la transmissibilité expérimentale de l'ESB aux petits ruminants par voie orale. Enfin, la mise en évidence à partir de 1996 d'une relation entre l'ESB et le nouveau variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jacob (MCJ) a mis en lumière un risque potentiel pour l'homme et attiré l'attention sur ces maladies. Des mesures de prophylaxie ont donc été prises, comme l'interdiction de l'utilisation des farines d'os et de viandes dans la fabrication d'aliments destinés aux ruminants depuis 1996 et le retrait systématique de la chaîne alimentaire humaine, en France, depuis 1990, des tissus ovins susceptibles d'être infectieux. Enfin, en 1996, la tremblante fut déclarée maladie à déclaration obligatoire et un réseau de surveillance épidémiologique national fut mis en place.

## **I.2. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)**

L'ESB est une autre maladie dégénérative du système nerveux central, touchant les bovins adultes (âgés de 3 à 6 ans) et entraînant, après une incubation longue, des troubles nerveux sensitifs et moteurs, évoluant lentement vers une dégradation de l'état général et la mort.

Les chats et les félidés sauvages sont également sensibles à l'ESB et la transmission naturelle aux autres ruminants est possible.

Identifiée pour la première fois en Grande Bretagne en 1986, l'ESB se répand dans tout le cheptel du Royaume Uni, avec un nombre croissant de cas jusqu'en 1993, date à laquelle se font sentir les mesures de lutte mises en place dès 1988 . Au total et à titre d'exemple, entre 1974 et 1995, 900 000 bovins auraient été infectés, dont 75 000 bêtes seraient entrées dans la chaîne alimentaire humaine (Anderson *et al*, 1996). Hormis la Grande Bretagne, les pays les plus touchés furent l'Irlande, la France et le Portugal (OIE, 2004).

L'origine de l'épidémie est encore incertaine, mais deux hypothèses majeures sont énoncées : ou l'ESB, issue de la tremblante, s'est propagée avec l'entrée de carcasses ovines contaminées dans le processus de fabrication des farines animales destinées à l'alimentation du bétail, ou la maladie est apparue spontanément chez une ou plusieurs vaches atteintes alors d'une forme d'ESST bovine. Dans ce deuxième cas, le ou les animaux recyclés dans les farines animales pourraient être à l'origine de l'épidémie.

Aucune preuve scientifique n'a encore vérifié l'une ou l'autre de ces hypothèses, mais quoi qu'il en soit, les farines animales furent incriminées, et l'adoption dans les années 70-80 de procédés moins draconiens (comme des températures de préparation moins élevées), par souci de rentabilité, a été mise en cause, permettant aux agents infectieux de persister dans les produits destinés aux animaux qui, à leur tour, ont pu être recyclés dans les farines.

Quant à la transmission verticale de l'ESB, elle semble peu fréquente et aucune preuve de transmission horizontale directe ou au pâturage entre individus n'a été rapportée.

Dès lors, la mesure la plus importante pour contrôler la diffusion de l'ESB et pour en prévenir une éventuelle résurgence fut donc l'interdiction de l'utilisation des protéines de mammifères dans l'alimentation des animaux d'élevage dès 1988 en Grande Bretagne, suivie de l'interdiction des farines animales en France en 1990. Enfin, sont exclus de la chaîne alimentaire humaine tous les tissus ayant montré des titres d'infectivité élevés, ainsi que la viande connectée aux os des bovins.

### **I.3. Des ESST humaines : la Maladie de Creutzfeldt-Jacob (MCJ) et le Kuru.**

Si l'épidémie d'ESB a suscité autant d'émoi, en dehors de tout contexte économique, c'est en raison de la capacité de l'agent infectieux à franchir la barrière d'espèce dans les conditions naturelles, contrairement à la tremblante qui ne touche que les petits ruminants. Aussi des craintes pour la santé humaine ont-elles été éveillées, après l'identification en 1990 d'une nouvelle ESST transmissible chez le chat domestique.

Une unité de surveillance de la maladie de Creutzfeldt-Jacob fut alors créée au Royaume Uni, puis étendue à divers pays européens. En 1970, une enquête épidémiologique montrait que 0,4 à 1 personne par million d'habitants et par an était touché en France et en Grande Bretagne. Mais c'est en 1995 que deux cas inhabituels de MJC sont détectés au Royaume Uni. Un an après, R.G.Will décrivait une nouvelle variante de la MCJ (Will *et al*, 1996). Jusqu'alors, on connaissait trois formes de cette maladie décrite par Creutzfeldt et Jacob en 1920 et 1921 :

- la MCJ sporadique, la plus fréquente, représente 80% des cas d'ESST chez l'homme : elle survient avec une fréquence annuelle de 1,4 cas par million d'habitants, soit 80 cas par an en France. D'origine indéterminée, elle est caractérisée par un syndrome démentiel d'évolution rapide, diversement associé à des signes neurologiques, tels que des troubles de l'équilibre et de la coordination des mouvements, une atteinte visuelle. En phase terminale, le patient, prostré dans son mutisme ne communique plus avec l'extérieur. L'évolution est fatale en quelques mois et le diagnostic clinique est confirmé par l'examen histologique du cerveau.
- La forme familiale de la maladie représente 10 à 15% des cas : c'est une forme génétique à transmission autosomale dominante.
- La forme la plus rare est la MCJ iatrogène : s'il ne semble pas exister de transmission naturelle interhumaine, la maladie a pu être transmise accidentellement lors d'actes médicaux, comme lors d'injections d'hormone de croissance hypophysaire contaminée (dans les années 80 en France), ou lors de greffe de dure mère, d'implantations d'électrodes au niveau du système nerveux.

Or, la nouvelle variante de la MCJ ( nvMCJ ) présente des différences avec les formes habituelles de cette maladie, sur les plans épidémiologiques et histopathologiques : les patients atteints de la nvMCJ sont beaucoup plus jeunes que ceux touchés par la forme classique (27 ans *versus* 64 ans en moyenne) et les signes cliniques s'étendent sur une durée particulièrement longue, soit plus de 2 ans. De plus, on note l'absence d'un électroencéphalogramme typique de MCJ et un profil neuropathologique nouveau, avec une atteinte du thalamus postérieur et des structures lymphoïdes.

Si la concomitance de la crise de « la vache folle » et de l'apparition du nouveau variant de la MCJ peut laisser penser que l'émergence de la nvMCJ résulte d'un passage de l'ESB à l'homme, les données expérimentales le suggèrent fortement . En effet, les lésions observées chez les patients atteints de cette nouvelle forme sont comparables à celles causées par l'ESB inoculée expérimentalement à des rongeurs (Bruce *et al*, 1997). De plus, en 1996, D.Dormont et JJ.Haww ont inoculé des extraits de cerveau de bovins contaminés par L'ESB à des macaques, lesquels ont développé tous les symptômes de la maladie. L'aspect histopathologique du cerveau était identique à celui de patients décédés de la nvMCJ (Lasmezaz *et al*, 1996). Enfin, les propriétés biochimiques de l'agent responsable de l'ESB et de la nvMCJ semblent identiques (Collinge *et al*, 1996, Hill *et al*, 1997)

Toutefois, si un lien causal entre l'ESB et la nvMCJ est aujourd'hui admis, l'origine de l'infection de l'homme reste méconnue. L'hypothèse la plus probable serait une infection d'origine alimentaire par des produits de viandes contaminées dans la chaîne alimentaire.

Enfin, une autre ESST humaine est le Kuru. Décrite en 1957 par V. Zigas et D.Carleton Gajdusek en Papouasie-Nouvelle Guinée, où le cannibalisme était pratiqué, elle se propageait par la consommation rituelle du cerveau d'individus infectés. La durée d'incubation du Kuru, mot indigène décrivant les tremblements des malades, allait de 5 à plus de 40 ans . La mort survenait moins d'un an après l'apparition des premiers signes cliniques. Grâce à l'observation des symptômes et des coupes histologiques de cerveaux, le lien fut établi entre la tremblante, le kuru et la maladie de Creutzfeldt-Jacob.

Le Kuru aura tué au vingtième siècle plus de 3000 personnes sur une population de 30 000 Papous. L'origine de la maladie pourrait être un cas sporadique de la MCJ.

## II. LA PROTEINE PRION (PrP), L'AGENT RESPONSABLE DES ESST ?

### II.1. Nature de l'agent infectieux

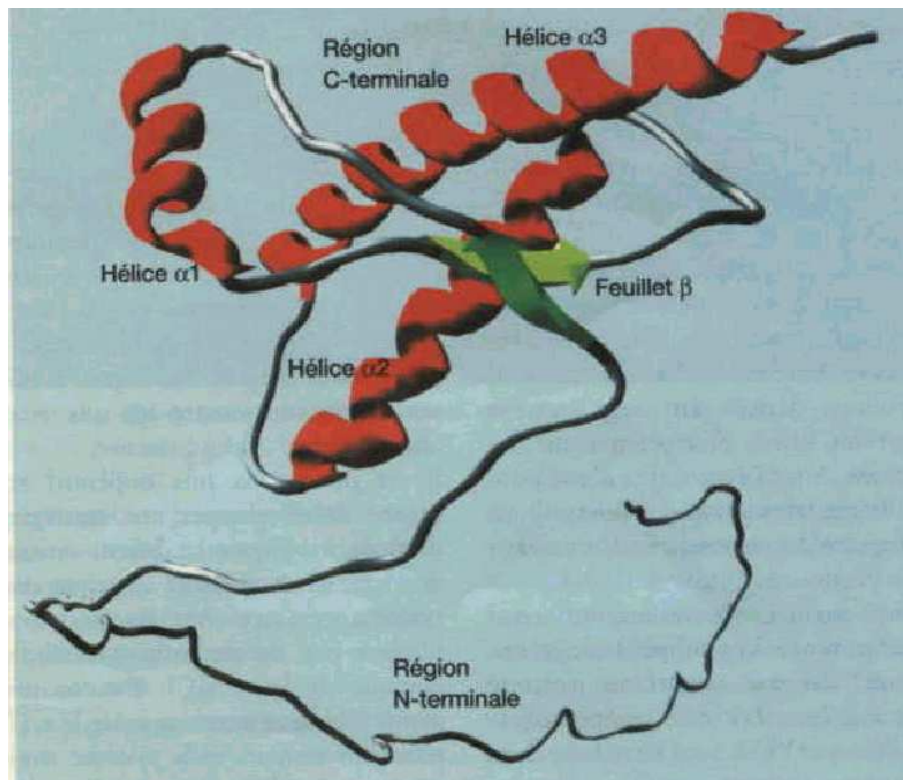
Les caractéristiques communes des ESST seraient dues à l'agent responsable de ces maladies, classé parmi les Agents Transmissibles Non Conventionnels ou ATNC et dont la nature exacte reste encore hypothétique.

Alors que l'idée d'un virus semblait la plus logique, en 1967, T.Alper montre que le spectre de résistance des ATNC aux rayonnements est inhabituel : il correspond non pas à celui des acides nucléiques mais à celui des protéines ! De plus, jusqu'alors, aucune structure de micro-organisme, et notamment de virus, n'était visible avec les microscopes les plus performants. Il n'existait même aucune réponse immunitaire, comme si cet agent était invisible pour les défenses de l'hôte.

C'est en 1980 que Stanley Prusiner, de l'Université de Californie, montre que les dépôts amyloïdes présents dans les cerveaux de hamster, auxquels il a inoculé l'agent de la tremblante, sont constitués d'une protéine hydrophobe, qu'il nomme prion, acronyme de « particule **protéique infectieuse** » ( Prusiner *et al*, 1982 et 1997). Il propose alors l'hypothèse de la nature exclusivement protéique des ATNC, allant à l'encontre du dogme selon lequel même les formes les plus simples de la vie, comme les virus, impliquent une transmission de matériel génétique sous forme d'acide nucléique (ADN ou ARN) ! Cette hypothèse est pourtant celle qui est majoritairement retenue aujourd'hui par la communauté scientifique et la pathogénicité de la protéine Prion (PrP) serait liée à l'acquisition d'une structure tridimensionnelle anormale de la protéine.

La protéine du prion cellulaire (PrP<sub>c</sub>) est en fait une protéine cellulaire N-glycosylée exprimée chez chacun et ancrée dans la membrane par un groupement GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) (figure 2).

Elle est exprimée dans quasiment tous les tissus mais est particulièrement abondante dans les neurones, cibles majeures de la dégénérescence liée aux ESST. Le rôle de la PrPc reste flou, mais elle serait impliquée dans la transmission des signaux entre les cellules nerveuses et dans la protection des neurones contre les dommages causés par les oxydants (Mouillet-Richard *et al*, 2000 ; Brown, 2001)



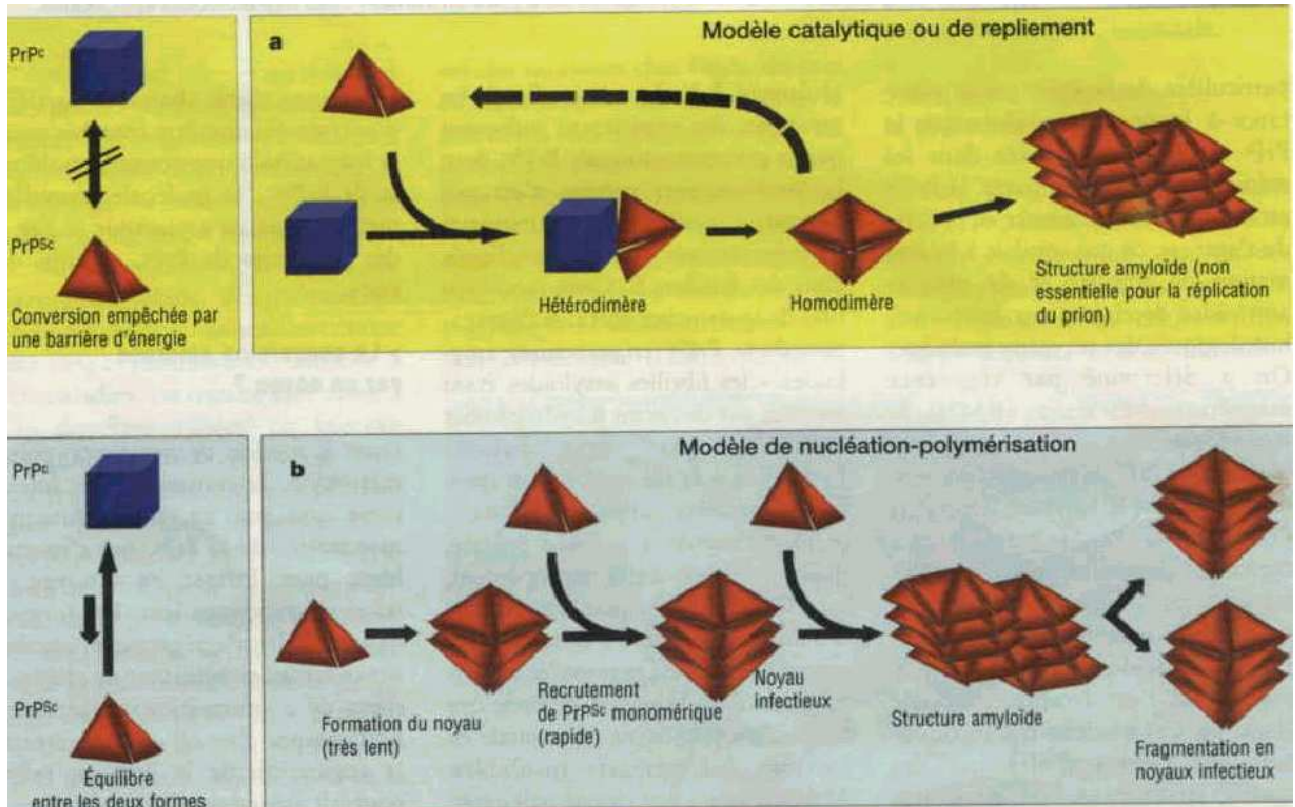
**Figure 2 :** Structure tridimensionnelle de la protéine prion normale (PrPc) : alors que l'extrémité C-terminale est structurée, principalement par des hélices  $\alpha$ , l'extrémité N-terminale est libre de se mouvoir en solution. (Guilbert, 2001)

La forme pathogène de la PrP, encore appelée PrPsc (pour « scrapie » en anglais), a la même composition que la PrPc mais diffère par sa structure tridimensionnelle : elle est capable de se « reproduire » en induisant un changement de la structure de la protéine native. Ce processus a un caractère auto catalytique, aboutissant à une accumulation de PrPsc à partir de la PrPc, sous forme d'agrégats dits « amyloïdes », d'aspect filamenteux, détectables sur les coupes histologiques des malades. La PrPsc se distingue également par sa résistance partielle à la digestion par une enzyme, la protéinase K. C'est pourquoi on l'appelle aussi PrPres (res pour résistante).



Deux modèles ont été proposés pour expliquer la transconformation de la PrPc en PrPsc ( figure 3):

- le modèle auto catalytique (ou modèle de la matrice)
- le modèle de nucléation polymérisation



**Figure 3 :** modèles hypothétiques de conversion conformationnelle de PrPc en PrPsc : le modèle catalytique et le modèle de nucléation polymérisation ( Guilbert, 2001).

Il existe aussi une présomption quant à l'existence d'un facteur supplémentaire, la protéine X, ou d'une protéine « chaperonne », qui seraient nécessaires à la transconformation de la PrPc en PrPsc.

A noter qu'il existe plusieurs souches d'ATNC : plus de 20 ont été identifiés, mais leur structure exacte, tout comme celle du support de l'information génétique n'est pas encore connue. De telles connaissances seraient cependant utiles pour permettre d'identifier et de caractériser les éléments clés de la transconformation.

## II.2. La dynamique du prion

Andréoletti *et al* (2000) ont montré que la PrPsc est détectable dès l'âge de 2 mois dans les formations lymphoïdes annexées au tube digestif, comme les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques, des brebis très sensibles à la tremblante. Elle s'accumule ensuite dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal vers 4 mois et gagne tous les tissus lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques) à 6 mois pour atteindre le système nerveux central vers l'âge de 9 mois. La phase clinique commence vers 18 mois .

Ainsi, le processus de neuroinvasion par l'agent de la tremblante semble comporter deux phases :

- une phase de colonisation des organes lymphoïdes (rate, nœuds lymphatiques, amygdales, appendice), où le système immunitaire amplifie la réplication de l'agent. Les cellules dendritiques et les macrophages seraient les premiers à accumuler la PrPsc.
- une phase de transport axonal *via* le système nerveux périphérique. Ainsi, l'ATNC gagne la moelle épinière et progresse pour gagner l'encéphale où il se réplique de façon exponentielle, entraînant la mort neuronale.

Si le système immunitaire semble jouer un rôle dans le transport de la PrPsc, il existe cependant certaines formes d'ESST, comme chez les moutons à sensibilité moyenne ou chez les bovins atteints d'ESB, où l'on ne retrouve la PrPsc que dans le système nerveux central et où le système immunitaire ne semble pas ou peu impliqué (Andréoletti *et al*, 2000).

Enfin, Moudjou *et al* ont étudié la distribution de la PrPc chez le mouton : les tissus les plus riches au niveau quantitatif en PrPc sont le cerveau, puis des tissus non neuronaux comme les poumons, les muscles splanchniques, le cœur, l'utérus, le thymus et la langue (qui contient 20 à 50 fois moins de PrPc que le cerveau). Les autres tissus comme le tractus gastro-intestinal sont pauvres en PrPc, le foie restant le tissu le moins riche.

Ainsi, les organes dans lesquels l'infectiosité est démontrée (comme les amygdales, le thymus, la rate, les intestins) ne contiennent pas plus de PrPc que les tissus qui ne supportent pas l'infection (muscles squelettiques, cœur...). Par conséquent, comme la « barrière

d'espèce », il pourrait exister une « barrière de tissus » qui modulerait l'existence de l'infection.

Quoi qu'il en soit, de nombreux travaux tentent aujourd'hui de « pister » le prion pour établir son trajet dans l'organisme, ce qui permettrait de comprendre la cinétique de la maladie et de localiser plus facilement les éléments contaminants.

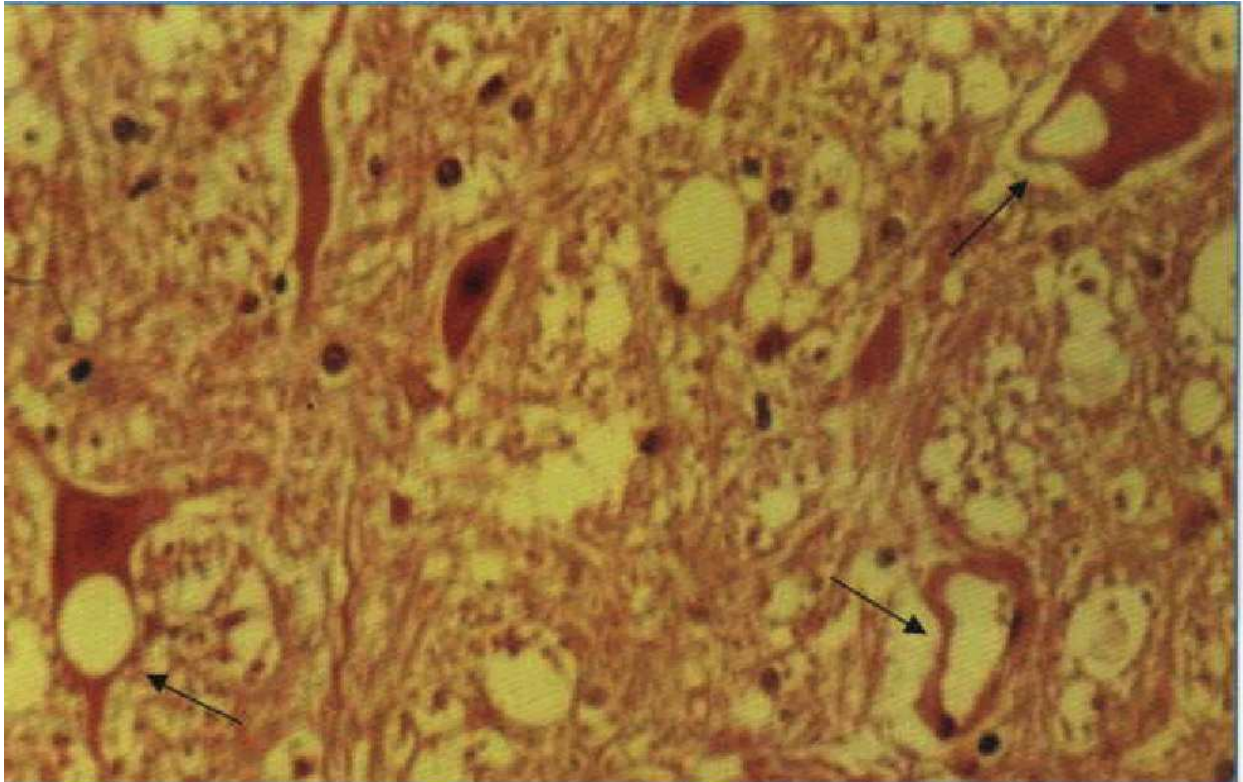
### **III. DIAGNOSTIC DES ESST**

Les ESST n'entraînent aucune inflammation décelable dans le cerveau ou dans le reste de l'organisme (pas d'infiltration leucocytaire) et aucune réaction immunitaire n'est détectable. Le diagnostic sérologique n'est de ce fait pas possible et il n'existe aucun test biologique autorisant une détection directe de l'agent infectieux. Seule l'apparition des signes cliniques, reflet d'une atteinte du système nerveux, permet une suspicion clinique. Sa confirmation repose sur la détection post-mortem des lésions histopathologiques et sur la détection de la forme anormale de la PrP.

En pratique, la détection des lésions microscopiques par histologie est effectuée sur des coupes d'encéphales, où l'on observe les lésions typiques des ESST (figure 4) :

- vacuolisation des péricaryons (corps neuronaux) et dépopulation neuronale
- spongiose du neuropile (zone d'enchevêtrement des axones)
- astrocytose ou gliose : prolifération (hypertrophie et hyperplasie) des cellules gliales ou astrocytes, qui forment le tissu de soutien du système nerveux central
- dépôts amyloïdes, observés après coloration au rouge congo.

Aucune lésion n'est détectable dans le tissu lymphoïde.



**Figure 4** : Bulbe d'ovin atteint de tremblante. Noter la vacuolisation neuronale et du neuropile (Schelcher, 2002)

La détection de la PrPsc dans le tissu nerveux requiert des techniques d'immunohistochimie, utiles en phase clinique sur prélèvements du tronc cérébral et en phase pré clinique et clinique sur les tissus lymphoïdes prélevés sur les animaux infectés (Herrmann *et al*, 2002).

Enfin, la détection de la PrPsc dans le tissu nerveux par Western Blot (séparation par électrophorèse suivie d'une immunodétection) ou par ELISA (immunodétection en plaques) donne des résultats en 7 à 8 heures. Ces tests rapides, qui nécessitent l'élimination préalable de la PrPc par digestion enzymatique ou dénaturation, 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 des cas d'ESB : les kits Prionics ® et Biorad ® utilisent respectivement le Western Blot et la technique ELISA.

Ces tests ont montré une efficacité équivalente à celle de la technique de référence de la détection des ATNC, qui consiste à inoculer directement le matériel potentiellement infectieux par voie intracérébrale à un animal de laboratoire (souris, hamster). Mais aujourd'hui, les recherches continuent pour élaborer un test utilisable en routine, permettant

grâce à une haute sensibilité la détection de la PrPsc dans le sang, afin de repérer les malades non seulement en phase clinique, mais aussi en période d'incubation.

#### **IV. ASPECTS GENETIQUES DE LA SENSIBILITE AUX ESST**

Il existe chez les ovins une variabilité génétique de la résistance aux ESST, due en grande partie au polymorphisme du gène Prnp qui code pour la protéine prion. Cette variabilité est bien documentée et a fait l'objet de nombreux travaux depuis 1938 au Royaume Uni.

Une vingtaine d'allèles du gène PrP sont connus à ce jour : (figure 5)

Tous dérivent du même gène ancestral, de type A136 R154 Q171, pour désigner les acides aminés codés par le gène aux codons 136, 154 et 171, par une mutation unique. Le symbole A désigne l'alanine, R l'arginine, Q la glutamine.

L'allèle codé ARR confère une résistance à la tremblante : d'après une enquête épidémiologique menée à l'échelle européenne, les moutons homozygotes ARR/ARR ne semblent pas atteints par la maladie et les hétérozygotes ne le sont que rarement. Au contraire, l'allèle codant pour la valine (V) en position 136, pour l'arginine en 154 et pour la glutamine en 171, noté VRQ, confère une grande sensibilité à la tremblante.

Enfin, il semblerait que les ovins homozygotes ARR/ARR ne soient pas porteurs de la contamination en situation naturelle, alors que les animaux homozygotes VRQ/VRQ pourraient l'être très jeunes, comme on l'a noté précédemment.

ALLÈLE	CODONS									
	112	136	137	138	141	151	154	171	176	211
• ARQ (ancêtre)	M	A	M	S	L	R	R	Q	N	R
• T112ARQ	T	A	M	S	L	R	R	Q	N	R
• VRQ	M	V	M	S	L	R	R	Q	N	R
• TRQ	M	T	M	S	L	R	R	Q	N	R
• AT137RQ	M	A	T	S	L	R	R	Q	N	R
• AN138RQ	M	A	M	N	L	R	R	Q	N	R
• AF141RQ	M	A	M	S	F	R	R	Q	N	R
• AC151RQ	M	A	M	S	L	C	R	Q	N	R
• AHQ	M	A	M	S	L	R	H	Q	N	R
• ARH	M	A	M	S	L	R	R	H	N	R
• ARR	M	A	M	S	L	R	R	R	N	R
• ARK	M	A	M	S	L	R	R	R	K	R
• ARQK176	M	A	M	S	L	R	R	Q	K	R
• ARQQ211	M	A	M	S	L	R	R	Q	N	Q

**Figure 5** : allèles connus du gène PrP ovin (Elsen *et al*, 2002)

On retrouve chez l'homme cette différence d'expression de la maladie liée au polymorphisme du gène PrP, dans le cas du Kuru et du nouveau variant de MCJ : l'hétérozygotie au niveau du codon 129 retarderait l'apparition de la maladie, voire protégerait de l'infection. Enfin, dans le cas du gène PrP bovin de l'ESB, peu de polymorphisme a été décrit et aucune sensibilité envers l'infection ou la durée d'incubation ne paraît être définie par des différences génétiques.

En 1997, Smits montrait la relation entre le changement de conformation de la PrP et l'existence de diverses souches ou variants de la PrP, chacune d'elles ayant une affinité pour des génotypes différents. Par la suite, Bossers *et al* (2000), en étudiant la conversion *in vitro* des différents variants de la PrPc, montra que la susceptibilité du mouton était déterminée non seulement par le génotype de l'animal cible mais aussi par le génotype du prion infectieux utilisé ou inoculé. La conversion de la PrP en PrPsc serait modulée par le polymorphisme de la PrPc et de la PrPsc. Ainsi, la transmission de la maladie nécessite de passer la barrière du polymorphisme, en plus de la barrière d'espèce.

La tremblante naturelle est donc le résultat de l'interaction entre les éléments génétiques de l'animal (polymorphisme du gène PrP, expression variable du gène) et les

variants génétiques de l'agent infectieux. Toutefois, les variations de codage n'expliquent pas à elles seules les différences de sensibilité entre les races et les individus. D'autres éléments génétiques ont aussi une influence sur le temps d'incubation et la susceptibilité. Il est possible que d'autres gènes agissent de même, sans oublier le rôle primordial en circonstances naturelles de la pression et de la durée d'infection, de l'âge des animaux, etc...

Dans tous les cas, les connaissances actuelles permettent d'envisager, grâce à une approche génétique, une alternative aux stratégies obligatoires d'abattage et de désinfection souvent décevantes, dans le but d'éradiquer la maladie. Les moyens mis en œuvre par les Unités de Promotion des Races (UPRA) françaises sont variables selon les races, celles-ci différant dans leur sensibilité à la tremblante et dans l'incidence de la maladie par la fréquence des différents allèles du gène PrP (par exemple, la race Manech Tête Rousse représente 2/3 des foyers de tremblante recensés en France).

Mais l'utilisation et la sélection de reproducteurs homozygotes ARR/ARR, en particulier les béliers des centres d'insémination artificielle, grâce au génotypage à grande échelle des animaux pour leur gène PrnP, devrait donner rapidement une augmentation de la fréquence de l'allèle ARR et l'élimination de l'allèle VRQ, pour aboutir à une protection plus importante des élevages.

## **V. LA TRANSMISSION PAR TRANSFUSION SANGUINE : OU EN EST-ON DES RISQUES ?**

La transmission des ESST animales et humaines semble s'effectuer principalement par voie orale dans les conditions naturelles. Si l'on en croit les données épidémiologiques, le cannibalisme était bien en cause dans la transmission du kuru et si l'incertitude demeure sur le mode de contamination précis des moutons atteints de tremblante, les farines animales et les animaux malades entrés dans la chaîne alimentaire humaine seraient bien à l'origine de l'épidémie de l'ESB et de l'apparition des nouveaux cas de MCJ.

La notion de barrière d'espèce a été remise en cause lorsque que Hill a montré qu'il est possible de transmettre le prion du hamster à des souris chez lesquelles il se réplique, sans même causer de signe clinique ( Hill et al, 2000), suggérant que des sujets apparemment sains, mais abritant en fait des formes subcliniques, pourraient transmettre la maladie de manière iatrogène.

Enfin, la transmission de MCJ par l'hormone de croissance hypophysaire a attiré l'attention sur le fait que les produits sanguins pourraient contribuer à la transmission de la MCJ iatrogène.

Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude épidémiologique n'avait mis en évidence le risque de développement de MCJ suite à une transfusion sanguine ou après l'administration de produits sanguins. Toutefois, en décembre 2003, les autorités britanniques annonçaient qu'un patient décédé à l'automne de la nvMCJ avait reçu en 1996 du sang provenant d'un donneur qui avait succombé trois ans plus tard à cette même maladie. Même s'il est impossible de déterminer si la personne transfusée a été contaminée par le biais de la transfusion ou si les deux malades ont été contaminés séparément, il pourrait bien s'agir là du premier cas susceptible d'étayer l'hypothèse d'une transmission de la maladie par transfusion sanguine.

De plus, le nvMCJ présente des différences avec la forme sporadique, à la fois sur le plan épidémiologique, avec notamment l'existence de risques 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 (La PrPres est retrouvée dans les amygdales, la rate, les nœuds lymphatiques, l'appendice, les plaques de Peyer).

La brebis infectée par voie orale avec l'agent de la BSE représente un modèle d'étude de la pathogénie du nouveau variant de la MCJ, en raison de la voie commune de contamination et de la distribution parallèle dans les organes lymphoïdes. A partir de ce modèle, les travaux de Houston *et al* ont montré qu'une ESST peut être transmise par transfusion du sang total d'un animal infecté avec l'agent de l'ESB au cours de la phase pré clinique de la maladie (Houston *et al*, 2000).

De même, les données expérimentales classiquement obtenues à partir des modèles rongeurs inoculés par voie intracérébrale indiquent que le sang peut contenir l'agent infectieux de la MCJ, suggérant l'existence d'un risque transfusionnel potentiel.



Brown *et al* ont ainsi détecté l'infectivité dans le sang total de rongeurs expérimentalement infectés, en particulier dans leur « buffy coat », dans lequel la PrPsc est associée aux leucocytes (Brown *et al*, 1999). Enfin, l'infectiosité du sang dans le cas de processus physiopathologiques spontanés d'ESST a été fortement suggéré par les travaux de Schmerr *et al*, qui ont aussi détecté la PrPsc dans le « buffy coat » d'agneaux âgés d'un mois et dont la mère était atteinte de tremblante naturelle (Schmerr *et al*, 1999).

Ainsi, le risque potentiel de transmission du nouveau variant de la MCJ par transfusion sanguine, allié à la méconnaissance de la prévalence de l'infection pré-symptomatique dans la population donneuse de sang, a conduit à des restrictions d'usage du sang en fonction des pays donneur. Par exemple, la FDA ( Food and Drug Administration) américaine a banni du don du sang l'ensemble des européens.

Effectivement, le risque de transmission d'une ESST par transfusion de l'agent infectieux est multifactoriel. Il dépend :

- du stade clinique de la maladie du donneur
- de la susceptibilité du receveur à l'infection et de son génotype (sensible ou résistant)
- de la distribution de l'agent au niveau de l'organisme
- de la clairance plasmatique de la protéine infectieuse.

Des mesures de précautions, comme la leucofiltration du sang, ont aussi été finalement adoptées par de nombreux pays dès 1997 pour limiter le risque transfusionnel en diminuant la concentration sanguine des cellules blanches qui seraient associées à l'infectivité, même si des données scientifiques supplémentaires sont nécessaires pour définir ces risques et renforcer la confiance des patients.

## **2<sup>ème</sup> partie : REALISATIONS EXPERIMENTALES**

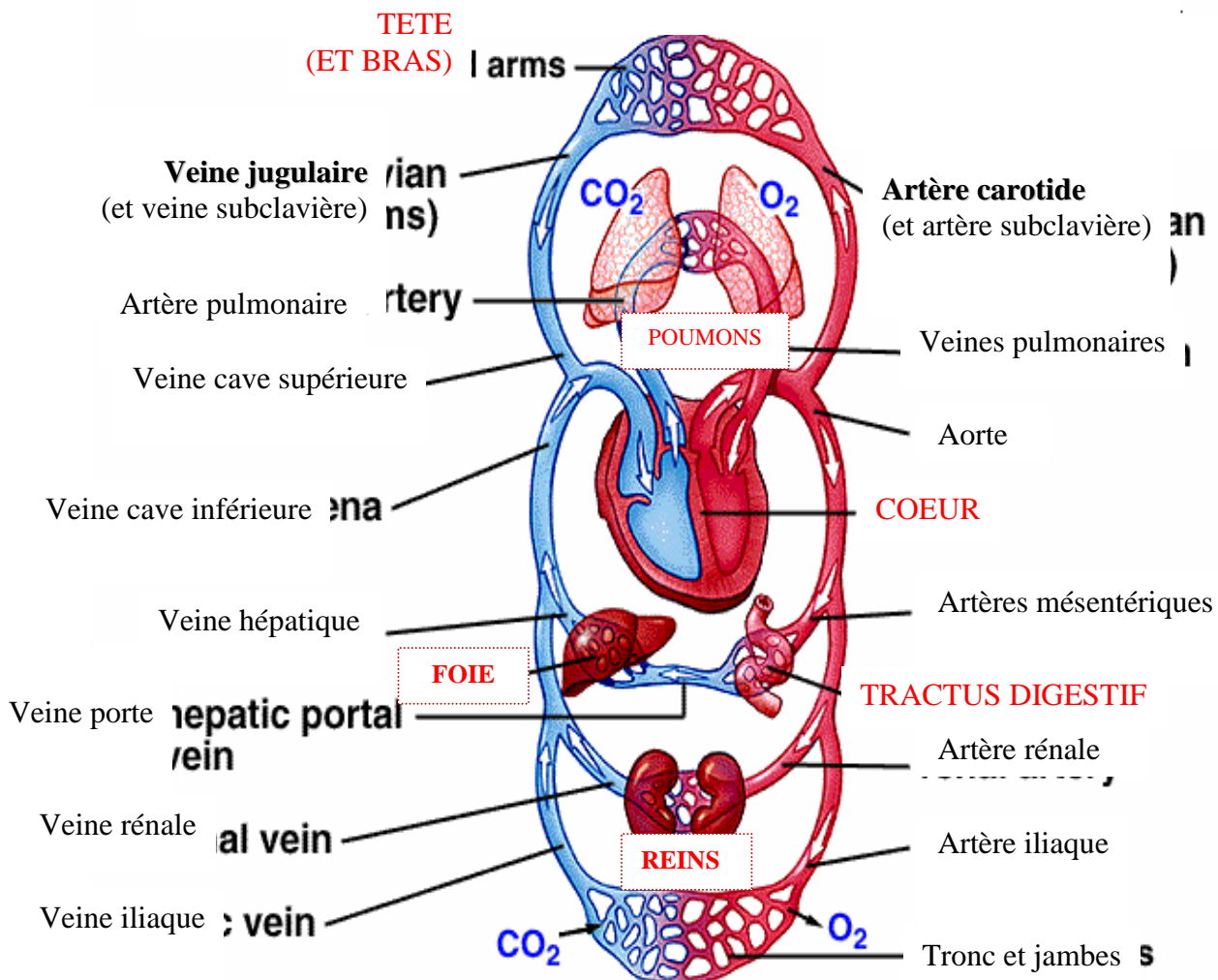
### **CONTRIBUTION A L'ESTIMATION DU RISQUE TRANSFUSIONNEL : ANALYSE DE LA DISPOSITION DE LA PrP ADMINISTREE PAR VOIE SANGUINE CHEZ LA BREBIS**

# I. INTRODUCTION

Nous avons vu que le risque, actuellement hypothétique, de transmission iatrogène de l'agent de la nouvelle variante de la MCJ par transfusion sanguine a conduit à de nombreuses mesures de précautions dans plusieurs pays. Mais des données scientifiques supplémentaires sont nécessaires pour caractériser ce danger transfusionnel.

Le risque transfusionnel d'une ESST dépend de l'exposition de l'organisme à l'agent infectieux, c'est-à-dire, du titre infectieux du sang au cours des phases clinique et pré-clinique de la maladie et de la capacité de l'organisme à éliminer plus ou moins rapidement la protéine infectieuse, *i.e.* de sa clairance.

La clairance totale d'un organisme peut être modélisée comme suit (figure 6) :



**Figure 6** : Modélisation de la clairance totale (Mader S., 1997)

Elle est fonction du débit cardiaque de l'organisme et du coefficient d'extraction des différents organes épurateurs (reins, foie, poumons, autres...).

A notre connaissance, la clairance, paramètre fondamental à estimer pour apprécier le risque transfusionnel n'a jamais été évaluée de façon formelle : le devenir de la protéine infectieuse au cours des premières heures qui suivent son introduction dans la circulation sanguine n'a jamais été précisé, ni en termes cinétiques, ni en termes mécanistiques (sites et mécanismes de clairance de la protéine).

Les concentrations plasmatiques de PrPsc sont la résultante de deux événements : le taux d'entrée de la protéine dans le plasma et sa clairance, dont la connaissance permettrait de déterminer les concentrations plasmatiques de PrPsc correspondant aux différents taux d'entrée de la protéine et, en particulier, la concentration en PrPsc qui correspond à la valeur du seuil infectieux. D'après Safar, l'unité de dose infectieuse correspondrait à  $10^5$  molécules de PrPsc (Safar *et al*, 1998).

L'évaluation de la clairance de la PrPsc constitue également un élément important de l'estimation du rôle potentiel de la circulation sanguine dans la dissémination de l'agent infectieux.

De plus, Shaked *et al*, en 2001, ont montré qu'une isoforme de la PrP résistante à la protéinase K est détectée dans les urines de hamster expérimentalement infecté, ainsi que chez des vaches et des hommes atteints d'ESST (Shaked *et al*, 2001). La présence de la PrPres dans les urines pendant la phase pré-symptomatique de la maladie suggère la libération de la protéine dans le sang, sous une forme non agrégée, à partir du système nerveux central ou des organes périphériques. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes de clairance de la protéine et de leur impact physiopathologique.

Ainsi, nous nous proposons de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la protéine prion recombinante ovine, utilisée comme modèle pour la protéine pathologique ou PrPsc.

En ce qui concerne les mécanismes responsables de la susceptibilité génétique à la tremblante, ils n'ont pas été clairement identifiés. Le caractère résistant à la tremblante pourrait impliquer des différences de niveau d'exposition à l'agent infectieux et cela, de deux façons : la clairance plasmatique pourrait être influencée par le génotype du receveur, ou encore, le polymorphisme de la PrPc pourrait conduire à des clairances différentes pour les variants de la protéine. C'est ainsi que Rezaei *et al.* (2000) ont montré que le variant V136R154Q171 de la protéine prion ovine recombinante et qui est associé à une forte sensibilité à la tremblante, est intrinsèquement plus stable que le variant A136R154R171 de la protéine, lié au caractère résistant à la maladie. Selon ces auteurs, la stabilité supérieure du variant V136R154Q171 de la protéine PrPc pourrait être à l'origine d'une réduction *in vivo* de la clairance de la protéine

Le modèle ovin présente deux avantages majeurs pour l'étude que nous allons mener :

- l'existence de lignées de brebis présentant différents degrés de résistance à la maladie
- la disponibilité de différents variants de la protéine recombinante correspondant au génotype sensible ou résistant.

Ces deux atouts devraient permettre une étude approfondie de l'impact de facteurs génétiques sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP. D'une part, nous pourrions déterminer si la plus grande stabilité du variant VRQ est effectivement associée à une réduction de la clairance *in vivo* et, d'autre part, l'utilisation des différentes lignées génétiques de brebis nous permettra d'analyser l'influence du génotype sur les paramètres pharmacocinétiques de la PrP et ainsi de déterminer si la résistance à la maladie peut être expliquée, du moins en partie, par une différence du métabolisme de la PrP.

## **II. OBJECTIFS**

Nos objectifs sont donc :

- déterminer les paramètres pharmacocinétiques fondamentaux de la PrP recombinante ovine
- examiner l'influence du génotype de l'hôte sur ces paramètres
- comparer *in vitro* la stabilité des variants ARR et VRQ dans le plasma et le sang ovins
- comparer les clairances des variants ARR et VRQ de la protéine recombinante
- évaluer les mécanismes de clairance plasmatique de la PrP : élimination urinaire, rôle du système réticulo-endothélial.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons effectué une étude pharmacocinétique de la PrP recombinante *in vivo*, pour en analyser la disposition après son administration par voie intra veineuse. Nous avons ensuite tenté de déterminer le rôle des poumons et du foie dans les mécanismes de clairance de la protéine.

Dans une deuxième partie, nous avons analysé et comparé, *in vitro*, la stabilité des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante dans le sang et le plasma de brebis.

## **III. MATERIELS ET METHODES**

### **III.1. Analyse pharmacocinétique de la PrP recombinante in vivo.**

#### **III.1.1. Expérience 1 : Analyse de la disposition de la PrP recombinante administrée par voie IV**

##### ◆ Objectifs

Les objectifs de cette première expérience sont multiples :

- déterminer *in vivo* les paramètres cinétiques de la PrP recombinante.
- comparer la clairance des différents variants de la protéine.
- étudier l'influence du génotype de l'hôte sur la clairance.

- Evaluer l'élimination rénale de la PrP recombinante par la détermination des concentrations urinaires en PrP. En effet, la PrP<sub>C</sub>, dont le poids moléculaire est de 33 kDa pourrait être éliminée par filtration glomérulaire, le rein pouvant filtrer des protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 60 kDa.

◆ Animaux.

- Caractéristiques

L'essai a été réalisé avec 10 brebis saines de race Romanov, adultes, de poids homogène (environ 42 kg), originaires du domaine expérimental INRA de Langlade. Cinq brebis étaient de génotype homozygote A136A136R171R171 (résistant) et les 5 autres étaient de génotype V136V136Q171Q171 (très sensible). Une fiche individuelle mentionnait les caractéristiques suivantes : élevage d'origine, identification, génotype au niveau des codons 136, 154 et 171 du gène PrP, poids, race et âge.

- Hébergement.

Chaque brebis était hébergée dans une cage à métabolisme individuelle, dans une bergerie du service de physiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Elle recevait quotidiennement du foin *ad libitum* et 200g de concentrés, matin et soir, à heures fixes (08:00 et 16:00). Elle était également abreuvée à volonté.

◆ Protocole expérimental

L'expérience a comporté 2 périodes, séparées par un intervalle de 2 jours. Au cours de celles-ci, la disposition des variants de la PrP recombinante a été examinée après l'administration par voie intraveineuse des variants à la dose unique de 0.02 mg/kg, selon un plan d'expérience en crossover ( voir plan d'expérience ci-dessous : tableau 1).

Les animaux furent systématiquement pesés la veille de chacune des administrations afin d'ajuster la dose au poids vif.

Brebis (n°)	Génotype	Période 1	Période 2
1	AARRRR	ARR	VRQ
2	AARRRR	ARR	VRQ
3	AARRRR	VRQ	ARR
4	AARRRR	VRQ	ARR
5	VVRRQQ	ARR	VRQ
6	VVRRQQ	ARR	VRQ
7	VVRRQQ	VRQ	ARR
8	VVRRQQ	VRQ	ARR

**Tableau 1** : Plan d'expérience : ordre d'administration des variants VRQ et ARR de la PrP recombinante aux brebis de génotype VVRRQQ et AARRRR.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés pendant l'heure qui précède les administrations de PrP recombinante (3 prélèvements à 20 minutes d'intervalle), puis aux temps 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes, puis toutes les heures, jusqu'à 12 heures post administration . Enfin, des prélèvements de sang ont été effectués aux temps 24, 36, et 48 heures après l'administration.

La totalité du volume urinaire de la vessie a été prélevée avant l'administration, puis toutes les heures post administration, pendant 12 heures. A chaque fois, le volume total des urines a été déterminé.



### III.1.2. Expérience 2 : Evaluation de l'élimination pulmonaire et hépatique de la PrP recombinante.

#### ◆ Objectifs

Les mécanismes de clairance de la protéine prion n'ont pas été encore identifiés. Nous en avons envisagé deux types : une élimination rénale et une clairance par le système réticulo-endothélial (SRE) des poumons et du foie.

En effet, le SRE, nous l'avons vu, est une des premières cibles du prion : dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires, l'infectivité est détectée très tôt. De plus, Beringue *et al* ont montré le rôle des macrophages du SRE dans le contrôle de l'infection des tissus périphériques par l'agent de la tremblante (Beringue *et al*, 2000).

Chez les ruminants, le principal organe du SRE impliqué dans l'élimination des protéines est , non pas le foie, mais les poumons (Brain *et al*, 1999) : les macrophages pulmonaires intravasculaires, liés à l'endothélium des capillaires sont les principaux lieux de la phagocytose. C'est la raison pour laquelle nous avons évalué un éventuel effet de premier passage pulmonaire (c'est-à-dire une élimination directe de la protéine lors de son premier transit par les poumons, avant la distribution aux organes), en comparant la clairance de la protéine obtenue après son administration dans l'artère carotidienne (en s'affranchissant de l'effet de premier passage pulmonaire, voir figure 6) avec celle obtenue après une administration par voie intraveineuse.

Dans le foie, le rôle de la phagocytose est dévolu aux cellules de Kupffer, macrophages des sinusoides hépatiques. Ainsi, dans un deuxième temps, afin d'évaluer l'élimination de la PrP recombinante par le SRE de cet organe, nous avons évalué les paramètres pharmacocinétiques de la protéine , 24 heures après l'administration intraveineuse de gadolinium (GdCl<sub>3</sub>), connu pour inhiber spécifiquement l'activité phagocytaire des cellules de Kupffer.

#### ◆ Animaux

Les brebis de l'expérience 1 ont été utilisées, dans des conditions d'hébergement identiques.

#### ◆ Protocole expérimental

- Evaluation de l'effet de premier passage pulmonaire.

Après un essai pilote sur une brebis témoin, 3 brebis (1 à génotype ARR, 2 à génotype VRQ) ont été utilisées pour cette expérience. Au cours d'une intervention chirurgicale, sur chacune d'elles, un cathéter a été mis en place dans une artère carotidienne. La disposition de la PrP a été examinée après l'administration du variant VRQ de la protéine, à la dose de 0.02 mg/kg, par voie intracarotidienne.

Les prélèvements de sang et d'urine ont été réalisés dans les mêmes temps que lors des périodes 1 et 2.

- Analyse du rôle du SRE hépatique.

Un essai pilote unique a été réalisé avec une brebis à génotype VVRRQQ. Une administration intraveineuse de gadolinium, à la dose de 20 mg/kg a été effectuée 24h avant l'injection par voie intraveineuse du variant VRQ de la protéine prion.

Des prélèvements de sang et d'urines ont été réalisés selon le même protocole que celui développé au cours de l'expérience 1.

### III.1.3. Procédure expérimentale

#### ◆ Préparation des solutions de PrP recombinante.

Les variants ARR et VRQ de la PrP recombinante ont été fournis par J. Grosclaude, de L'INRA de Jouy en Josas (55 mg de chaque variant), en solution dans du tampon MOPS 0.1M à la concentration de 1.1 mg/ml pour le variant VRQ et à la concentration de 0.8 mg/ml pour le variant ARR. Les solutions ont été conservées à une température comprise entre 4 et 8°C.

Pour l'ensemble des administrations, une solution de chaque variant a été préparée à la concentration de 0.2 mg/ml dans un « pool » de plasma de brebis romanov recueilli sur

EDTA. La solution préparée a été aliquotée et conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Deux fractions aliquotes de  $200\ \mu\text{L}$  ont été prélevées et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour déterminer avec précision la dose administrée .

◆ Préparation de la solution de gadolinium.

Le gadolinium (Sigma®) a été dissous à la concentration de  $0.2\ \text{g/ml}$  dans du sérum physiologique.

◆ Administrations.

Les administrations ont été réalisées par une personne ne participant pas aux prélèvements.

La solution de PrP recombinante a été administrée à l'aide d'une seringue de  $5\ \text{mL}$ , à la dose de  $0.02\ \text{mg/kg}$ , le volume étant ajusté selon le poids de chaque animal. La dose exacte de protéine ainsi administrée a été vérifiée par la pesée de la seringue avant et après chaque administration.

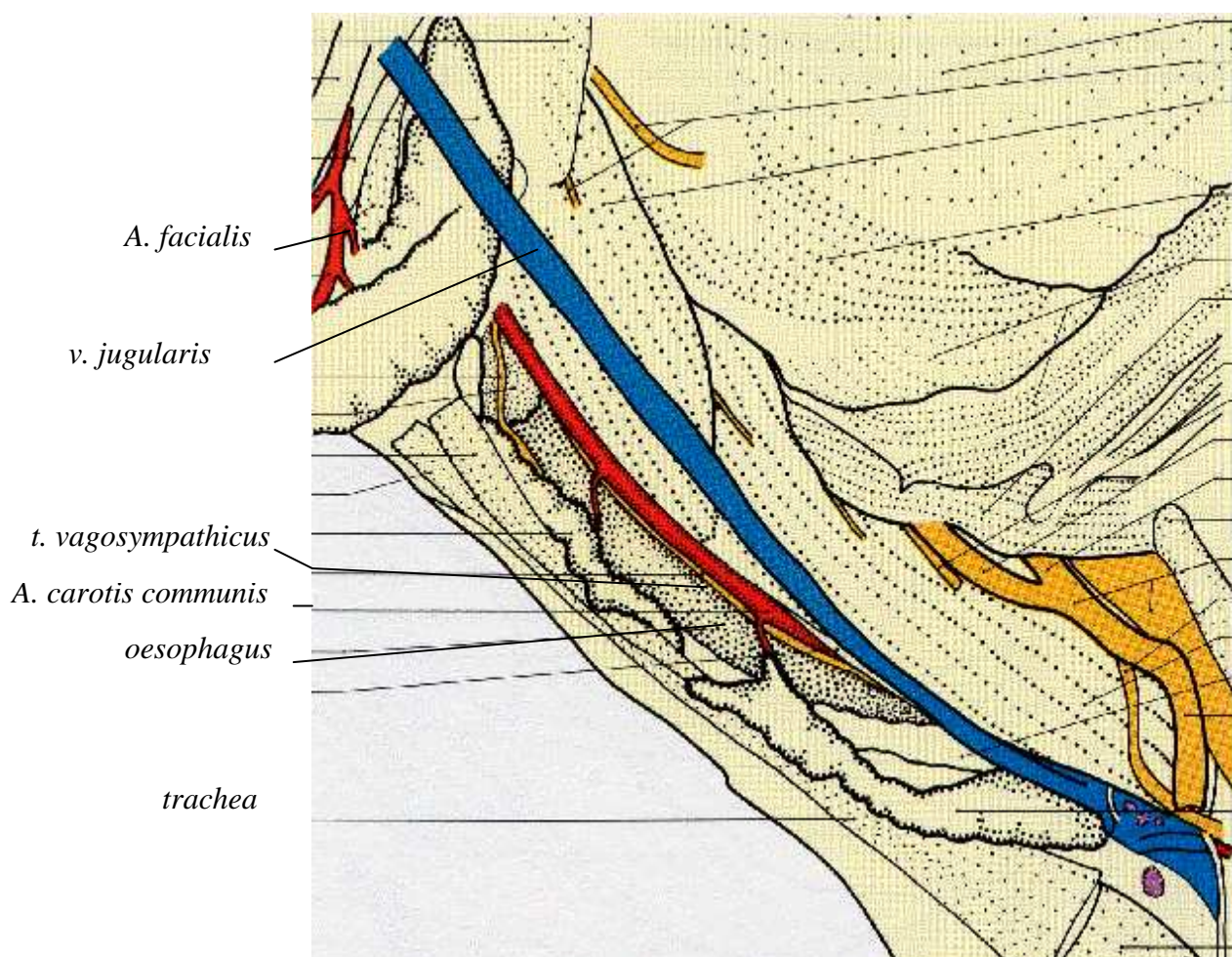
De même, la solution de gadolinium a été administrée à l'aide d'une seringue de  $5\ \text{mL}$ , à la dose de  $20\ \text{mg/kg}$ .

Les administrations intraveineuses ont été effectuées à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire droite de chaque brebis tondue au niveau de l'encolure, la veille de chaque période. En ce qui concerne l'administration intra-artérielle, les brebis ont subi une anesthésie générale nous permettant de mettre en place un cathéter intra-carotidien du côté droit sur chacune d'elles, 2 jours avant l'administration du variant de la PrP recombinante par cette voie intra-artérielle.

Après les administrations, le cathéter était systématiquement rincé avec  $5\ \text{mL}$  de sérum physiologique hépariné.

◆ Méthode de mise en place d'un cathéter intra-carotidien.

L'artère carotide, recouverte par une épaisse couche musculaire, n'est pas accessible pour des prélèvements directs. Pour l'atteindre, il a donc fallu disséquer la région de l'encolure droite des brebis, de manière à visualiser l'artère (figure 7). Nous avons alors installé un cathéter dans la carotide, rattachés par des points aux muscles adjacents et relié à l'extérieur par une tubulure laissée à demeure.



**Figure 7:** Visualisation de l'artère carotide après dissection de l'encolure.

#### ◆ Prélèvements sanguins.

Au cours de chaque période, les prélèvements sanguins ont été réalisés à l'aide d'un cathéter inséré, la veille des manipulations, dans la veine jugulaire gauche de chaque brebis (tondue au niveau de l'encolure) et prolongé d'une tubulure permettant une manipulation minimale des animaux. Les cathéters utilisés (Hémocath 30 et Vygon, Paris) étaient stériles et héparinés (Héparine Roche) afin d'éviter toute obstruction par coagulation. Entre chaque prélèvement, ils restaient bouchés.

Pour chaque prélèvement, 3 seringues étaient utilisées : deux de 2 mL et une de 5 mL. En effet, avant le prélèvement, un volume d'au moins 1 mL du contenu du cathéter était prélevé puis éliminé. Ensuite, 5 mL de sang étaient recueillis et placés dans un tube en polypropylène contenant de l'EDTA. Enfin, le cathéter était rincé avec 1 mL de sérum physiologique hépariné (10 U/ mL).

Immédiatement mélangé par retournement, le sang était rapidement centrifugé à 3000g. Le plasma était alors réparti en 3 fractions aliquotes dans des tubes de polypropylène de 5 ml et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Chaque tube a été identifié avec le numéro de protocole (PKPRP02/01), le numéro de la brebis, le numéro du prélèvement (P101 à P126 pour la période 1, P201 à P226 pour la période 2...) et la nature de l'échantillon. L'ensemble des tubes fut regroupé dans une poche plastique scellée et contenant une fiche signalétique précisant la nature des prélèvements, le tout étant conservé au congélateur, à une température inférieure à  $-20^{\circ}\text{C}$ , en attendant la réalisation des dosages.

#### ◆ Prélèvements urinaires.

Les brebis ont été équipées, le matin de chaque manipulation, d'une sonde de Foley siliconée (Charrière 12, Rush), maintenue en place à l'aide du ballonnet pendant la durée des prélèvements. L'extrémité de la sonde était obturée entre les prélèvements. Ainsi, la totalité des urines contenues dans la vessie était recueillie toutes les heures à l'aide d'une seringue de 50 ml, le volume prélevé étant noté. Puis, un échantillon de 500  $\mu\text{L}$  d'urine était prélevé et placé dans un tube de propylène de 5 mL. Le volume restant était placé dans un pot de polypropylène de 30 mL. Finalement, les échantillons d'urine ont été identifiés de la même manière que les prélèvements sanguins et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

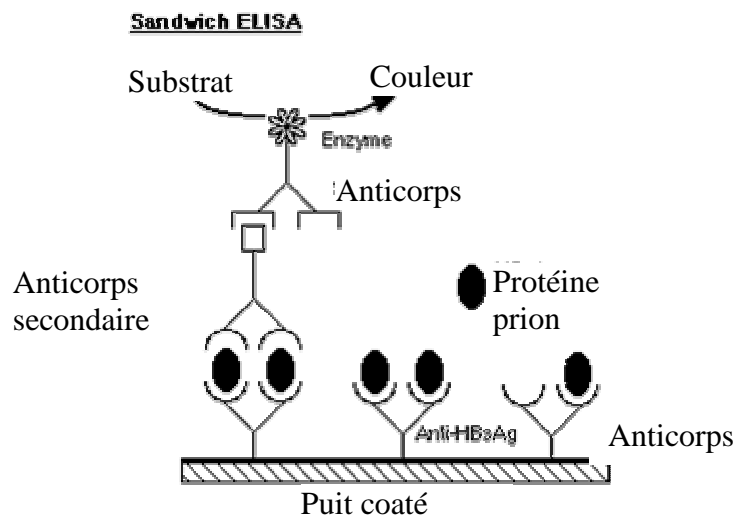
◆ Méthode analytique : dosage de la PrP.

La PrP a été dosée par ELISA selon une méthode mise au point par le CEA (Centre d'Etude Atomique) et qui est à la base du test Biorad® du diagnostic officiel de l'ESB. Ce dosage a été adapté et validé au laboratoire de physiologie de l'ENVT pour le dosage de la protéine du prion dans le plasma ovin.

**Principe du dosage (figure 8) :**

Ce dosage non-compétitif, aussi appelé dosage « sandwich ». Un premier anticorps anti-protéine prion est coaté au fond des puits. L'échantillon biologique est ensuite déposé puis, un second anticorps anti-protéine prion (reconnaissant un épitope différent du premier anticorps), couplé à l'acétyl choline estérase est ajouté. La révélation est ensuite obtenue après adjonction du réactif de Ellman : ce chromophore passe d'une couleur transparente à jaune foncé suivant le taux de protéines révélées. La mesure de la coloration obtenue est faite par spectrophotométrie à 414 nm : à partir de la densité optique obtenue, nous avons donc accès à la concentration en protéine prion.

Une gamme et des contrôles qualité de chaque variant ont été préparés dans du plasma ovin et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 8 :** Principe du dosage ELISA.

## **III.2. Analyse de la stabilité de la PrP recombinante in vitro**

### **III.2.1. Objectifs**

Afin d'évaluer l'éventuelle existence d'une clairance de la PrP dans le plasma ou le sang, nous avons comparé la stabilité des variants VRQ et ARR de la PrP recombinante *in vitro*, dans le sang et le plasma maintenus à 37°C et sous agitation.

Le premier objectif était de comparer la stabilité dans le sang et le plasma des deux variants de la PrP. En effet, les résultats obtenus *in vitro* par Rezaie et al. montrent une plus grande stabilité du variant VRQ. Une différence significative de stabilité entre ces deux variants pourrait être à l'origine d'une différence de clairance *in vivo* de la protéine dans le compartiment sanguin ou plasmatique.

Le deuxième objectif était de s'assurer que la PrP n'était pas dégradée très rapidement entre les temps de prélèvements, de centrifugation, de recueil du plasma et les dosages, de manière à valider notre protocole expérimental.

### **III.2.2. Protocole expérimental**

Afin de tester l'évolution des concentrations des variants ARR et VRQ dans le sang et le plasma, une solution de chaque variant a été préparée et mise à incuber dans une étuve réglée à 37°C, dans du sang d'une part, dans du plasma d'autre part. Des prélèvements de ces solutions furent effectués à intervalles réguliers, soit à 0.5, 1, 2, 4, 6 et 24 heures après la mise en solution des variants.

### **III.2.3. Procédure expérimentale**

#### ◆ Préparation des solutions

Deux solutions de chaque variant (VRQ et ARR) ont été préparées : l'une dans du plasma et l'autre dans du sang recueilli sur EDTA, à partir d'échantillons de plasma obtenus au cours de l'expérience 1 et dont les concentrations des variants ARR et VRQ avaient été respectivement évaluées par ELISA..

◆ Prélèvements plasmatiques et sanguins

Au différents intervalles de temps, à l'aide d'une micropipette, 500µL de la solution de plasma étaient prélevés et congelés à -20°C dans un tube de propylène de 5 mL.

De même, 1 mL de la solution de sang était prélevé et recueilli dans un tube de propylène contenant de l'EDTA. Il était alors centrifugé pendant 10 minutes à 3000g. Le plasma issu de la solution de sang pouvait alors être prélevé et conservé à -20°C.

◆ Méthode analytique : dosage de la PrP

La méthode ELISA utilisée fut la même que décrite précédemment.

## IV. ANALYSES

### IV.1. Analyse pharmacocinétique des données plasmatiques.

L'analyse pharmacocinétique des données a été effectuée à l'aide d'un programme de régression non-linéaire adapté de Multi (Yamaoka et al., 1981).

- Les données des **concentrations plasmatiques en protéines** ont été ajustées à l'équation polyexponentielle 1.

$$C(t) = \sum_{i=1}^n Y_i \exp(-\lambda_i t) \quad \text{Equation 1}$$

Où C(t) représente la concentration plasmatique en PrP au temps t (h), Y<sub>i</sub> est le ième coefficient et λ<sub>i</sub> le ième exposant. Les estimations initiales ont été obtenues en utilisant la méthode des résiduelles. Les paramètres pharmacocinétiques obtenus ont été ajustés par une régression non linéaire utilisant la méthode des moindres carrés étendus.



- **La clairance plasmatique du variant (Cl, en mL/kg/min)** a été calculée selon l'équation 2 :

$$Cl = \text{Dose} / \text{AUC} \quad \text{Equation 2}$$

où AUC (ng.min/ml) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en PrP en fonction du temps. Ainsi, la clairance permet de mesurer la capacité d'élimination de l'organisme et représente le volume de sang totalement épuré de l'analyte par l'organisme par unité de temps. Elle s'exprime par un débit.

- **Le volume de distribution du compartiment central (Vc, en mL/kg)** a été calculé à l'aide de l'équation 3 :

$$Vc = \text{dose} / \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right) \quad \text{Equation 3}$$

Il représente le volume initial au temps 0.

- **Le volume de distribution à l'équilibre (VSS, en mL/kg)** a été calculé à l'aide de l'équation 4 :

$$VSS = Vc \left( 1 + \sum_{i=1}^n K_{1n} / K_{n1} \right) \quad \text{Equation 4}$$

Où  $k_{1n}$  et  $k_{n1}$  sont les constantes de premier ordre traduisant les échanges entre les compartiments du modèle.

Vss permet de calculer la quantité de métabolite dans l'organisme à un temps donné à partir des concentrations plasmatiques.

- **Le temps moyen de résidence (MRT, en min)** a été calculé à l'aide de l'équation 5 :

$$\text{MRT} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i / \lambda_i^2}{\sum_{i=1}^n Y_i / \lambda_i} \quad \text{Equation 5}$$

Il s'agit du temps moyen passé dans l'organisme par la molécule administrée.

#### **IV.2. Analyse statistique.**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat<sup>®</sup> (version 8.0, SPSS Inc, Chicago, USA).

Les moyennes arithmétiques, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés pour chacun des paramètres.

Pour les paramètres obtenus au cours de l'expérience, le modèle d'analyse de variance a été le suivant :

$$Y_{i,j,k,l} = \mu + V_i + G_j + P_k + B_{lj} + (G_j * V_i) + \varepsilon_{ijkl}$$

où :

$Y_{i,j,k,l}$  est la réponse observée pour la brebis l, de génotype j, durant la période k, et à qui l'on a administré le variant i.

$\mu$  est l'effet moyen général

$V_i$  est l'effet du variant i

$G_j$  est l'effet du génotype j

$P_k$  est l'effet de la période k

$B_{lj}$  est l'effet de la brebis l de génotype j

$G_j * V_i$  est l'effet de l'interaction du génotype j avec le variant i

$\varepsilon_{ijkl}$  est le terme d'erreur du modèle .

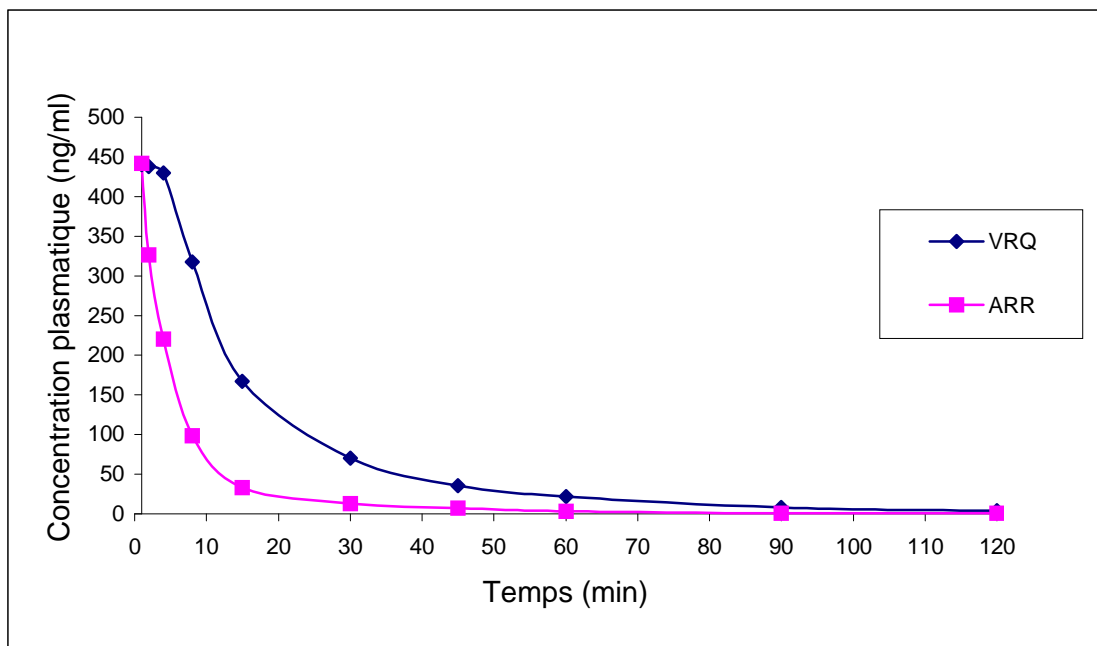
## V. RESULTATS

### V.1. Analyse pharmacocinétique de la PrP recombinante

#### V.1.1. Expérience 1 : Analyse de la disposition de la PrP recombinante administrée par voie IV

- ◆ Exemple de cinétique des concentrations plasmatiques de la PrP recombinante au cours du temps.

La figure 9 illustre l'évolution temporelle des variants ARR et VRQ de la protéine prion administrée par voie IV à la dose de 0.02 mg/kg chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ :



**Figure 9 :** Evolution temporelle des concentrations plasmatiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ, après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0.02 mg/kg.

Ainsi, l'observation visuelle de cette figure suggère que le variant ARR de la protéine prion est éliminé plus rapidement que le variant VRQ.

- ◆ Paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante pour les génotypes AAARRR et VVRRQQ.
- Les tableaux 2a et 2b donnent les paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus lors des périodes 1 et 2, après l'administration intraveineuse des deux variants à la dose de 0,02 mg/kg aux brebis de génotype AAARRR (tableau 2a) et aux brebis de génotype VVRRQQ (tableau 2b) :

	BREBIS 1		BREBIS 2		BREBIS 3		BREBIS 4	
GENOTYPE	AARRRR		AARRRR		AARRRR		AARRRR	
VARIANT	ARR	VRQ	ARR	VRQ	ARR	VRQ	ARR	VRQ
Vc (mL/kg)	32.78	28.98	44.39	39.91	59.65	48.34	31.61	28.00
Vss (mL/kg)	38.66	37.55	48.71	46.12	250.10	78.85	42.34	40.82
Cl (mL/(kg.min))	2.38	1.39	3.58	2.34	3.07	1.69	2.28	1.46
MRT (min)	16.2	27.0	13.6	19.7	81.4	46.7	18.5	27.9

**Tableau 2a** : Paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0,02 mg/kg aux brebis de génotype AARRRR

	BREBIS 5		BREBIS 6		BREBIS 7		BREBIS 8	
GENOTYPE	VVRRQQ		VVRRQQ		VVRRQQ		VVRRQQ	
VARIANT	ARR	VRQ	ARR	VRQ	ARR	VRQ	ARR	VRQ
Vc (mL/kg)	38.96	30.91	56.65	42.06	53.65	42.06	36.16	39.68
Vss (mL/kg)	62.15	41.35	66.65	56.00	97.83	83.04	46.51	50.96
Cl (mL/(kg.min))	3.21	1.80	4.45	2.36	5.50	1.96	3.51	2.26
MRT (min)	19.3	23.0	14.9	23.7	21.7	42.4	13.2	22.5

**Tableau 2b** : Paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0,02 mg/kg aux brebis de génotype VVRRQQ.

- Le tableau 3 donne les valeurs moyennes (+/- écart-type) des différents paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus lors de cette expérience, ainsi que la moyenne globale de ces paramètres obtenus chez les brebis à génotype AARRRR et à génotype VVRRQQ :

PARAMETRES	VARIANT		GENOTYPE	
	ARR	VRQ	AARRRR	VVRRQQ
Vc (mL/kg)	44.2 ± 11.1	37.5 ± 7.3	39.2 ± 11.1	63.1 ± 8,6
Vss (mL/kg)	81.6 ± 70.7	54.3 ± 17.5	72.9 ± 72.8	63.1 ± 19.1
Cl (mL/(kg.min))	3.37 ± 0.83**	1.91 ± 0.39**	2.27 ± 0.77	3.01 ± 1.08
MRT (min)	24.9 ± 23.0	29.2 ± 9.9	31.4 ± 22.7	22.6 ± 8.9

**Tableau 3** : Paramètres pharmacocinétiques moyens ( $\pm$  écart type) des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante ovine administrée par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg à 4 brebis à génotype AARRRR et à 4 brebis à génotype VVRRQ, et moyenne globale ( $\pm$  écart type) des paramètres des variants VRQ et ARR obtenus chez les brebis à génotype AARRRR et VVRRQQ.

\*\*P<0.01 : les valeurs indiquées par ces deux astérisques sont significativement différentes.

Ainsi, la clairance moyenne du variant ARR a été significativement supérieure à celle du variant VRQ ( $3.37 \pm 0.83$  versus  $1.91 \pm 0.39$ , \*\*P<0.01). Aucune différence significative entre les deux variants n'a été trouvée pour les autres paramètres pharmacocinétiques.

Enfin, les paramètres pharmacocinétiques moyens des brebis à génotype AARRRR n'ont pas différé de ceux des brebis à génotype VVRRQQ.

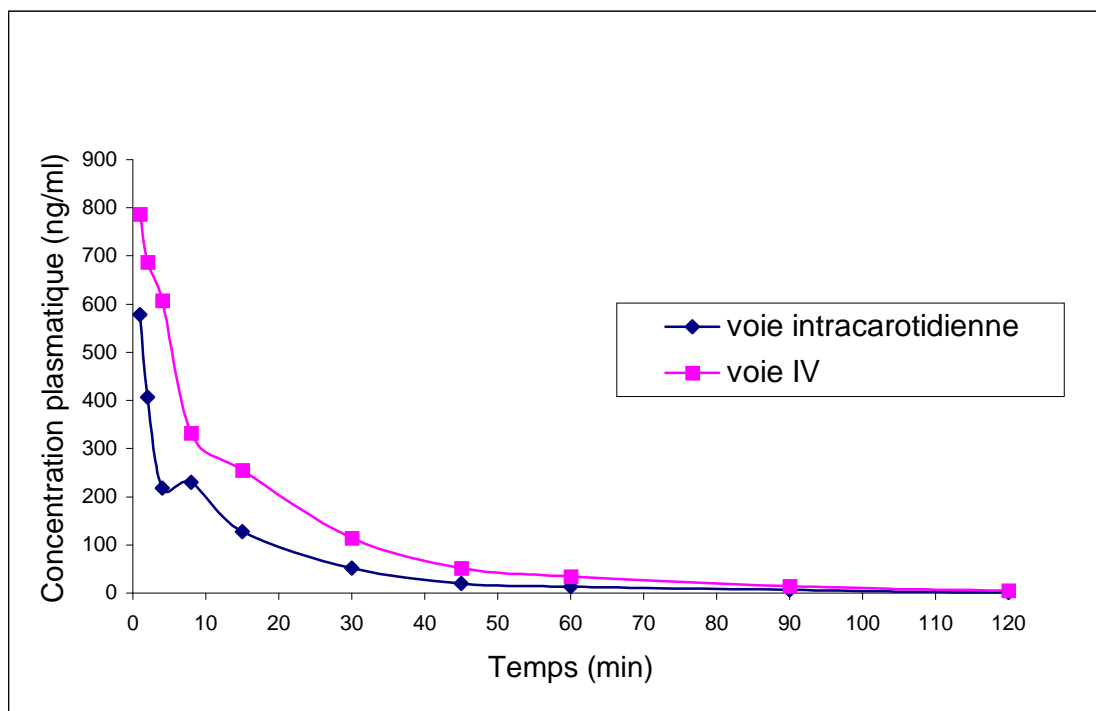
- la PrP recombinante n'a pas été détectée dans les urines, quel que soit le variant génétique de la PrP et le génotype des brebis.

V.1.2. Expérience 2 : Evaluation de l'élimination pulmonaire et hépatique de la PrP recombinante.

◆ Evaluation de l'effet de premier passage pulmonaire

- Exemple de cinétique des concentrations plasmatiques de la PrP recombinante au cours du temps.

La figure 10 illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la protéine prion, administré soit par voie intracarotidienne, soit par voie IV, chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ.



**Figure 10 :** Exemple de l'évolution des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP recombinante chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ, après l'administration du variant par voie IV ou par voie intracarotidienne.

Le profil des concentrations plasmatiques du variant VRQ ne semble pas être très différent, selon sa voie d'administration.

- Paramètres pharmacocinétiques du variant VRQ de la PrP recombinante, administré par voie intracarotidienne.

Les tableaux 4 et 5 donnent les paramètres pharmacocinétiques individuels et moyens obtenus pour le variant VRQ administré à la dose de 0,02 mg/kg à une brebis de génotype AARRRR et à deux brebis de génotype VVRRQQ, soit par voie intracarotidienne lors de l'expérience 2 (tableau 4), soit par voie intraveineuse lors de l'expérience 1 (tableau 5).

(Remarque : l'expérience 2 étant réalisée sur un nombre limité de brebis, aucune analyse statistique n'a été effectuée.)

	BREBIS 4	BREBIS 6	BREBIS 7	
GENOTYPE	AARRRR	VVRRQQ	VVRRQQ	MOYENNE
Vc (mL/kg)	30.24	39.34	34.27	34.62
Vss (mL/kg)	37.74	59.82	77.36	58.31
Cl (mL/(kg.min))	1.47	3.10	2.25	2.27
MRT (min)	25.66	19.27	34.35	26.43

**Tableau 4** : Paramètres pharmacocinétiques du variant VRQ administré par voie intracarotidienne à la dose de 0,02 mg/kg kg à une brebis de génotype AARRRR et à deux brebis de génotype VVRRQQ.

	BREBIS 4	BREBIS 6	BREBIS 7	
GENOTYPE	AARRRR	VVRRQQ	VVRRQQ	MOYENNE
Vc (mL/kg)	28.00	VVRRQQ	34.27	37.37
Vss (mL/kg)	40.82	56.00	83.04	59.95
Cl (mL/(kg.min))	1.46	2.36	1.96	1.93
MRT (min)	27.9	23.7	42.4	31.33

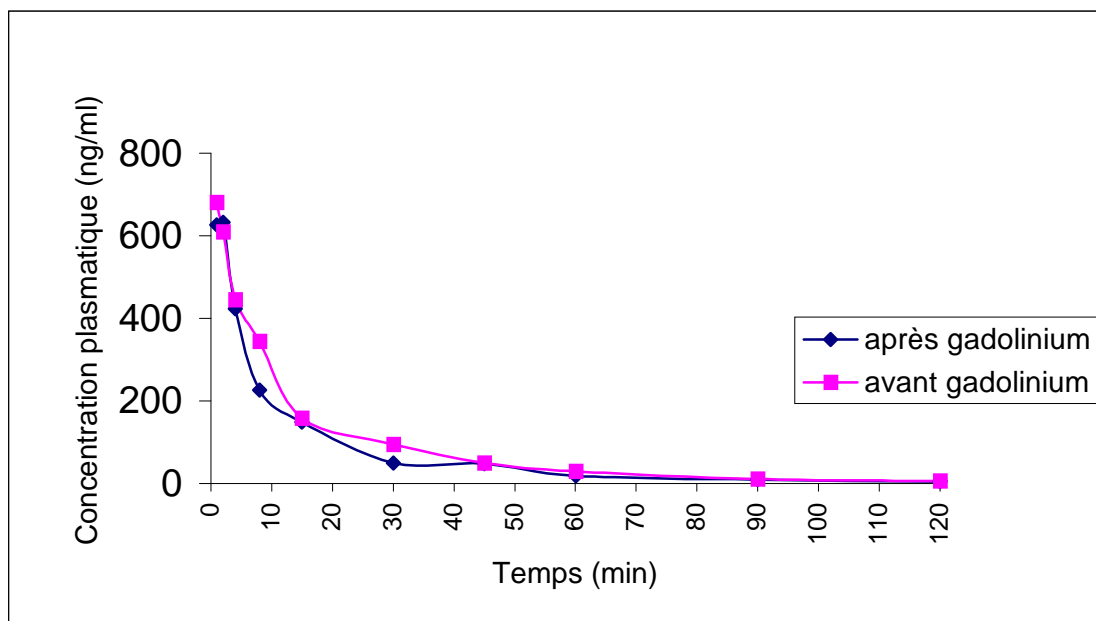
**Tableau 5** : Paramètres pharmacocinétiques du variant VRQ administré par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg kg à une brebis de génotype AARRRR et à deux brebis de génotype VVRRQQ.

Nous voyons ici qu'en comparant les moyennes des données pharmacocinétiques obtenues lors de ces deux expériences, aucune différence significative n'est observée entre les différents paramètres selon le mode d'administration du variant VRQ.

En particulier, la clairance moyenne du variant VRQ n'est pas modifiée selon qu'il est administré par voie intraveineuse ou intracarotidienne.

◆ Analyse du rôle du SRE hépatique.

La figure 11 illustre l'évolution au cours du temps des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP recombinante, administré par voie intraveineuse, avant ou 24h après une administration IV de gadolinium à la dose de 20 mg/kg.



**figure 11** : Evolution des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP recombinante administrée par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg à une brebis de génotype VVRRQQ, avant et 24h après l'administration IV de gadolinium à la dose de 20 mg/kg.

L'observation des cinétiques de décroissance des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP, avant et après l'administration de gadolinium, ne montre pas de modification de la disposition du variant VRQ de la protéine.



## V.2. Analyse de la stabilité de la PrP recombinante *in vitro*

Le tableau suivant illustre l'évolution temporelle *in vitro* des concentrations sanguines et plasmatiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante.

Temps (en h)	Variant VRQ		Variant ARR	
	sang	Plasma	sang	plasma
0	14.93	12.01	26.28	11.53
0.5	13.67	10.43	24.38	11.25
1	21.14	11.56	34.77	9.78
2	14.72	13.36	25.97	12.31
4	17.79	10.77	30.36	10.34
6	19.67	9.89	32.89	10.00
24	9.12	6.88	17.04	7.08
Diminution des concentrations en PrP au bout de 24h	38.9%	42.7%	33.8%	38.6%

**Tableau 6** : Concentrations plasmatiques de la PrP recombinante obtenues à différents temps après la mise en solution des variants dans du sang ou du plasma et conservation de la solution à 37°C, sous agitation.

Nous voyons ici que les concentrations plasmatiques des échantillons sanguins et plasmatiques des deux variants de la PrP recombinante restent à peu près constantes pendant 6h, c'est-à-dire pendant un délai supérieur au temps pendant lequel les concentrations plasmatiques des variants demeurent supérieures à la limite de quantification après leur administration IV.

Au bout de 24h, la diminution des concentrations en PrP recombinante est à peu près semblable selon les solutions et les variants.

## **VI. DISCUSSION**

Dans cette étude, nous avons caractérisé les paramètres pharmacocinétiques de la protéine prion recombinante dans le modèle ovin.

Nous avons tout d'abord montré que la clairance du variant ARR était en moyenne deux fois supérieure à celle du variant VRQ ( $3.37 \pm 0,83$  vs  $1.91 \pm 0.39$  mL/kg/min ). Le variant ARR, associé au caractère résistant à la tremblante, est ainsi plus vite éliminé que le variant VRQ, associé à une forte sensibilité à la maladie. Cette différence de clairance entre les variants de la PrP pourrait contribuer aux mécanismes de sensibilité génétique : la transconformation de la PrPc en PrPsc serait facilitée ou exacerbée chez les brebis à génotype VRQ par une plus lente élimination des protéines néoformées.

Toutefois, pour chaque variant de la protéine, le génotype de la brebis receveuse n'a pas eu d'influence sur les paramètres pharmacocinétiques de la protéine.

Les valeurs de clairance des variants de la PrP sont faibles : elles ne représentent en moyenne que 3 % du débit cardiaque d'une brebis. L'aptitude de l'organisme à éliminer la PrP du plasma est donc limitée, ce qui justifie la crainte d'un risque de transmission des ESST par transfusion sanguine.

Le volume de distribution à l'équilibre ( $V_{ss}$ ) de la protéine est également faible : il est de  $81.6 \pm 70.7$  et de  $54.3 \pm 17.5$  mL/kg, respectivement pour les variants ARR et VRQ. Cela indique que la distribution de la protéine est largement limitée au secteur plasmatique : la diffusion extravasculaire reste restreinte.

Ce faible volume de distribution de la protéine explique aussi que, malgré une faible clairance, son temps moyen de résidence dans l'organisme soit bref :  $24.9 \pm 23.0$  min pour le variant ARR et  $29.2 \pm 9.9$  pour le variant VRQ.

Les résultats obtenus présentant une élimination plus rapide du variant ARR par rapport au variant VRQ sont compatibles avec les résultats obtenus *in vitro* par Rezaie et al, qui suggèrent une plus grande stabilité du variant VRQ.

Toutefois, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de différence majeure de stabilité entre les variants ARR et VRQ. On peut ainsi affirmer que la différence de clairance des variants de la PrP ne peut être attribuée à une différence de métabolisme des variants dans les compartiments sanguins et plasmatiques : les concentrations d'échantillons sanguins et plasmatiques des deux variants restent constantes pendant 6 heures, soit pendant un délai supérieur au temps pendant lequel les concentrations plasmatiques en PrP sont supérieures à la limite de quantification après leur administration intraveineuse.

En ce qui concerne les mécanismes d'élimination de la PrP et, en particulier, le rôle du système réticulo-endothélial des poumons et du foie, plusieurs points sont à retenir :

Nous avons montré que la clairance moyenne des variants de la PrP obtenue par voie intracarotidienne n'est guère différente de celle obtenue après une administration intraveineuse :  $2.3 \pm 0.8$  mL/kg/min pour la voie intracarotidienne *versus*  $1.9 \pm 0.5$  mL/kg/min pour la voie intraveineuse. A priori, on pourrait donc exclure l'existence d'un effet de premier passage pulmonaire dans l'élimination de la PrP.

Nous n'avons pas observé de modification de la disposition du variant VRQ de la protéine après l'administration de gadolinium. Cela impliquerait que les cellules de Kupffer ne contribuent pas aux mécanismes d'élimination de la PrP.

Une étude d'invalidation des cellules de Kupffer réalisée précédemment au laboratoire de l'ENVT avait montré que le protocole que nous avons suivi permettait de multiplier par 2 l'activité de la créatine kinase (CK) plasmatique basale, et d'en diminuer la clairance plasmatique, suggérant ainsi une implication du système réticulo-endothélial dans son élimination chez la brebis. Or, afin de vérifier que l'administration de gadolinium avait bien inhibé, lors de nos études, l'activité phagocytaire hépatique, nous avons évalué chez 4 brebis l'effet de ce traitement sur les concentrations plasmatiques basales de la créatine kinase. Malheureusement, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une augmentation de l'activité de la CK plasmatique suite à l'administration de gadolinium.

Par conséquent, nous n'avons pas pu valider l'approche méthodologique développée pour analyser le rôle des cellules de Kupffer dans l'élimination des la PrP.

Il est cependant important de valider notre protocole d'inhibition de l'activité phagocytaire du foie par le gadolinium pour pouvoir affirmer que le SRE hépatique n'est pas impliqué dans la clairance de la protéine. Ainsi, nous pourrions confirmer l'absence de contribution des cellules phagocytaires hépatiques à l'élimination du variant VRQ de la PrP et examiner une éventuelle participation de ces mécanismes dans l'élimination du variant ARR. L'implication ou non du système phagocytaire hépatique dans l'élimination des deux variants pourrait expliquer le rapport égal à 2 entre les clairances plasmatiques des variants.

Il serait également intéressant d'évaluer le coefficient d'extraction de la protéine par le foie par l'analyse de la biodisponibilité de la protéine après son administration directement dans la veine porte et en prélevant le sang dans la veine cave inférieure.

Enfin, les valeurs des clairances plasmatiques que nous avons trouvées sont du même ordre de grandeur que le débit de filtration glomérulaire, ce qui est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la PrP est éliminée par les reins. La PrP recombinante n'a cependant pas été détectée dans les urines, ce qui pourrait laisser penser que la PrP recombinante est peu ou pas éliminée par filtration glomérulaire.

Des suites visant à mieux explorer les mécanismes de clairance urinaire ont été récemment données à notre étude : l'évaluation de l'effet de la néphrectomie bilatérale sur la disposition de la PrP recombinante administrée par voie IV a montré que le rapport des clairances évaluées avant et après l'ablation du rein était de l'ordre de 2. Cela suggère finalement que le rein contribue à 50% de l'élimination de la protéine du prion.

Il est probable que notre méthode de dosage, utilisant le couple d'anticorps (12F190, SAF 34) n'a pas pu détecter la présence de fragments de la protéine dans les urines.

Dans tous les cas, d'autres mécanismes d'élimination de la protéine prion sont mis en jeu et doivent être explorés, comme le métabolisme hépatique. L'identification des systèmes de clairance de la protéine permettrait de déterminer des facteurs de risques, comme l'insuffisance rénale et d'ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques, grâce à une modulation de la clairance.

# CONCLUSION

Cette étude a permis de contribuer à l'estimation du risque de transmission de l'agent responsable des maladies à prion lors d'une transfusion sanguine chez l'homme.

En attendant d'être capable de détecter la protéine dans le sang dès les phases pré-cliniques de la maladie, la connaissance des paramètres pharmacocinétiques de la protéine prion, en particulier, sa clairance, des mécanismes d'élimination de la PrP par l'organisme et des facteurs de susceptibilité génétique à la maladie sont indispensables pour mieux caractériser les « stratégies » et la dynamique du prion.

En pratique, les tests utilisés à l'heure actuelle permettent de proposer une protection de l'homme au niveau de la sécurité de la chaîne alimentaire, notamment grâce à un dépistage systématique de l'ESB à l'abattoir et à l'élimination des animaux positifs. De nouvelles générations de tests plus sensibles pourront peut-être à terme jouer un rôle équivalent au niveau de la transfusion sanguine.

En dehors des projets fondés sur une approche fondamentale, les efforts de recherche s'orientent aussi aujourd'hui vers la prévention (diagnostic, décontamination), le contrôle et l'exploration de nouvelles approches thérapeutiques.

Pour l'avenir, et en attendant la levée des incertitudes sur la nature et le mode d'action des agents de ces maladies, l'application de mesures de bon sens semble capitale : si les maladies humaines restent rares, leur évolution dramatique, la longueur de leur période d'incubation, l'inefficacité des traitements disponibles justifient les mesures adoptées, en France et ailleurs, pour éliminer les facteurs de risques et la prise en compte systématique du principe de précaution.

# **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

<u>Figure 1</u> : Brebis Manech atteinte de tremblante et à la toison dépenaillée.....	10
<u>Figure 2</u> : Structure tridimensionnelle de la protéine du prion normale (PrPc).....	16
<u>Figure 3</u> : Modèles hypothétiques de conversion conformationnelle de la PrPc en PrPsc: le modèle catalytique et le modèle de nucléation polymérisation.....	17
<u>Figure 4</u> : Bulbe ovin atteint de tremblante, avec vacuolisation neuronale et du neuropile....	20
<u>Figure 5</u> : Allèles connus du gène PrP ovin.....	22
<u>Figure 6</u> : Modélisation de la clairance totale.....	27
<u>Figure 7</u> : Visualisation de l'artère carotide après dissection de l'encolure.....	36
<u>Figure 8</u> : Principe du dosage ELISA.....	38
<u>Figure 9</u> : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ, après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0.02 mg/kg.....	43
<u>Figure 10</u> : Exemple de l'évolution des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP recombinante chez une brebis représentative à génotype VVRRQQ, après l'administration du variant par voie IV ou par voie intracarotidienne.....	46
<u>Figure 11</u> : Evolution des concentrations plasmatiques du variant VRQ de la PrP recombinante administrée par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg à une brebis de génotype VVRRQQ, avant et 24h après l'administration IV de gadolinium à la dose de 20 mg/kg.....	48
<u>Tableau 1</u> : Plan d'expérience : ordre d'administration des variants VRQ et ARR de la PrP recombinante aux brebis de génotype VVRRQQ et AARRRR.....	32
<u>Tableau 2a</u> : Paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0,02 mg/kg aux brebis de génotype AARRRR.....	44

<u>Tableau 2b</u> : Paramètres pharmacocinétiques des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante obtenus après l'administration intraveineuse des variants à la dose de 0,02 mg/kg aux brebis de génotype VVRRQQ.....	44
<u>Tableau 3</u> : Paramètres pharmacocinétiques moyens ( $\pm$ écart type) des variants ARR et VRQ de la PrP recombinante ovine administrée par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg à 4 brebis à génotype AARRRR et à 4 brebis à génotype VVRRQ, et moyenne globale ( $\pm$ écart type) des paramètres des variants VRQ et ARR obtenus chez les brebis à génotype AARRRR et VVRRQQ.....	45
<u>Tableau 4</u> : Paramètres pharmacocinétiques du variant VRQ administré par voie intracarotidienne à la dose de 0,02 mg/kg kg à une brebis de génotype AARRRR et à deux brebis de génotype VVRRQQ.....	47
<u>Tableau 5</u> : Paramètres pharmacocinétiques du variant VRQ administré par voie intraveineuse à la dose de 0,02 mg/kg kg à une brebis de génotype AARRRR et à deux brebis de génotype VVRRQQ.....	47
<u>Tableau 6</u> : Concentrations plasmatiques de la PrP recombinante obtenues à différents temps après la mise en solution des variants dans du sang ou du plasma et conservation de la solution à 37°C, sous agitation.....	49

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson RM., Donnelly CA., Ferguson NM. *et al.* Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 1996, **382** : 779-88.

Andréoletti O., Berthon P., Marc D., *et al.* Early accumulation of PrP<sup>sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J.Gen.Virol*, 2000, **81** : 3115-3126

Beringue V., Demoy M., Lasmézas C.I. *et al.* Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *Journal of Pathology*, 2000, **190** : 495-502.

Bossers A., De Vries R., Smits M.A. Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *Journal of Virology*, **74** : 1407-1414.

Brain J.D., Molina R.M., DeCamp M.M., and Warner A.E. Pulmonary intraascular macrophages : their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *The American Physiological Society*, 1999, **276** : 146-154.

Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci*, 2001, 24 : 85-90.

Brown P., Cervenakova L., MacShane L.M. *et al.* Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jacob disease in humans. *Transfusion*, 1999, **39** : 1169-1178.

Bruce ME., Will RG., Ironside JW. *et al.* Transmissions to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, **389** : 498-501.



Collinge J., Sidle K.C., Meads J. et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. *Nature*, 1996, **383** : 685-690.

Cuillé et Chelle. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1936, **203** : 1552-1554.

Dormont D. Les mécanismes de la mort neuronale. *Biofutur hors série*, avril 2001 : 22-25.

Elsen J.M., Barillet F., François D. et al. Génétique de la sensibilité à la tremblante des ovins. *Bulletin des GTV*, décembre-janvier 2002, **13** : 123-128.

Foster J., Mckeivey W., Fraser H. et al. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec*, 1992, **130** : 341-343.

Foster J.D., Hunter N., Williams A. et al. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet .Rec.*, 1996, **138** : 559-562.

Greig J.R. Scrapie in sheep. *J.Comp.Patho.*, 1950, **60** : 263-266.

Guilbert C. La dynamique du prion. *Biofutur hors série*, avril 2001 : 30-33.

Hadlow WJ., Kennedy RC., Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146** : 657-664.

Herrmann L.M., Baszler T.V., Knowles D.P., Cheevers W.P. PrPsc is not detected in peripheral blood leucocytes of scrapie-infected sheep : determining the limit of sensibility by immunohistochemistry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9** : 499-502.

Hill A.F., Debruslais M., Joiner S. et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, **389** : 448-450.

Hill A.F., Joiner S., Linehan J. et al. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *PNAS*, 2000, **97**, 18 : 10248-10253.

Houston F., Foster J.D., Chong A. et al. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *The Lancet*, 2000, **356** : 999 – 2000.

Lasmezas C.J., Deylys J.P., Demaimay R. et al. BSE transmission to macaques. *Nature*, 1996, **381** : 743-744.

Mader SS. Inquiry into life, 8ème édition, The McGraw-Hill Companies, 1997.

Moudjou M. Frobert Y, Grassi J., la Bonnardière C. Cellular prion protein status in sheep : tissue-specific biochemical signatures. *J.Gen.Virol*, 2001, **82** : 2017-2024.

Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C. et al. Signal transduction through prion protein. *Science*. 2000, **289**: 1925-1928.

OIE (page consultée le 24 janvier 2004). Adresse URL : [http://www.oie.int/fr/info/fr\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/fr/info/fr_esbmonde.htm)

Pattison IH., Millson GC. Distribution of the scrapie agent in the tissue of experimentally inoculated goats. *J. Comp. Patho*, 1962, **72** : 233-244.

Prusiner S.B. et al. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216** : 136-144.

Prusiner S.B. et al . Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 1997, **278** : 245-251.

Race R., Jenny A., Sutton D. Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node : implication for transmission and antemortem diagnosis. *J. Infect.Dis.*, 1998, **178** : 949-953.

Rezaei H., Marc D., Choiset Y. et al. High yield purification and physico- chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267** : 2833-2839.

Safar J., Wille H., Itri V. et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat.Med.*, 1998, **4** : 1157-1165.

Schelcher F., Andreoletti.O., Tabouret G., Cabanié P. La tremblante des petits ruminants : diagnostic. *Bulletin des GTV*, décembre-janvier 2002, **13** : 113-118.

Schmerr M.J., Jenny A.L., Bulgin M.S. et al. Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J.Chromatogr.*, 1999, **853** : 207.

Shaked G.M., Shaked Y., Kariv-Inbal Z., et al. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *Journal of Biological Chemistry* , 2001, **276** : 31479-31482.

Sigurdarson S., Ducrot C. Icelandic scrapie eradication program. *European Scrapie Network*, 1998.

Will RG., Ironside JW., Zeidler M. et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 1996, **347**: 921-925.

Wisniewski H.M., Sigurdarson S., Rubenstein R., Kascak R.J., Carp R.I. Mites as vectors for scrapie. *Lancet*, 1996, **347** : 114.