

# Mise en évidence de l'existence d'une diversité phénotypique dans les maladies à prions chez les bovins

## *Phenotypic diversity revealed in cattle prion diseases*

Par Thierry BARON et Anne-Gaëlle BIACABE<sup>(1)</sup>  
(communication présentée le 1<sup>er</sup> avril 2004)

### RÉSUMÉ

On considérait jusqu'alors que l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) était liée à l'infection par un agent infectieux unique, expliquant les caractéristiques très uniformes de la maladie chez les bovins. De façon inattendue, nous avons rencontré en France six cas, parmi des bovins diagnostiqués comme atteints d'ESB, qui présentent des caractéristiques moléculaires de la protéine prion pathologique, marqueur de l'infection, tout à fait différentes de celles habituellement rencontrées dans l'ESB. Deux cas présentant des caractéristiques différentes, aussi bien de l'ESB typique que des 6 cas précédents, ont par ailleurs été identifiés récemment en Italie. Les éléments de caractérisation histopathologique de ces deux derniers cas suggèrent par ailleurs très fortement qu'il s'agit d'une maladie différente de l'ESB. Les hypothèses concernant l'origine de ces cas atypiques sont discutées.

**Mots-clés :** encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), prion, tremblante, maladie de Creutzfeldt-Jakob, souche.

### SUMMARY

Up until now, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) was thought to be caused by just one pathogen, which explained the highly uniform features of the disease in cattle. Unexpectedly, among cattle diagnosed with BSE in France, we found six cases where the disease marker, i.e. the prion protein, had molecular features clearly distinct from those typically found in BSE. Furthermore, two other cases were recently identified in Italy, with features different both from typical BSE and from these six atypical cases in France. Histopathological features in these two Italian cases also strongly suggested that the disease affecting these animals might not have been BSE. Hypotheses on the origin of such atypical cases are being discussed.

**Key words:** bovine spongiform encephalopathy (BSE), prion, scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, strain.

(1) AFSSA-Lyon. 31, avenue Tony Garnier, 69364 Lyon CEDEX 07 – Tel : 04-78-72-65-43 Fax : 04-78-61-91-45 e-mail : t.baron@lyon.afssa.fr

Inconnue auparavant, l'encéphalopathie spongiforme bovine, communément appelée "maladie de la vache folle", est identifiée au Royaume Uni dans les années 1985-1986. Dès 1988, l'appartenance de cette maladie au groupe des encéphalopathies spongiformes est montrée par la présence des lésions neurodégénératives caractéristiques de ces maladies, par la démonstration de sa transmissibilité à la souris, ainsi que par la mise en évidence de l'accumulation dans le cerveau des vaches malades d'une forme anormale d'une protéine de l'hôte appelée protéine prion (PrP). Ces caractéristiques se retrouvent en effet dans l'ensemble des maladies appartenant à ce groupe, aussi bien chez l'animal, notamment dans la plus connue de ces maladies animales, la tremblante du mouton ou de la chèvre, que chez l'homme, avec la maladie de Creutzfeldt-Jakob. L'identification d'un variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) chez l'homme au Royaume-Uni, en avril 1996, puis en France, a conduit à la confirmation de la transmissibilité de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) à l'espèce humaine.

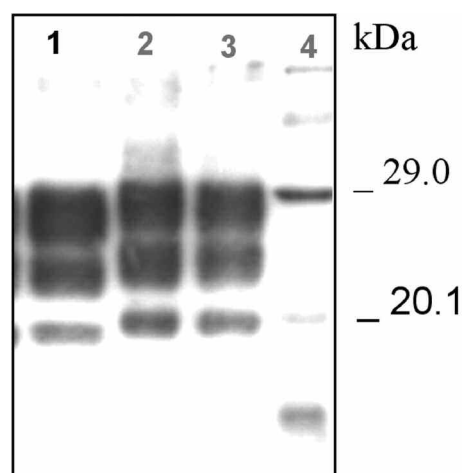
En recherchant les causes communes possibles à cette nouvelle maladie dès son apparition en Grande Bretagne, les études épidémiologiques ont rapidement mises en cause l'utilisation des farines de viandes et d'os, distribuées comme complément protéique dans l'alimentation des bovins, en particulier dans les élevages laitiers. Compte tenu de l'extraordinaire résistance des agents infectieux impliqués dans ces maladies, notamment au chauffage, les modifications de procédés de fabrication de ces farines auraient permis l'adaptation et le recyclage d'un agent infectieux chez les bovins et une large dissémination par voie alimentaire. L'origine de cet agent infectieux reste encore aujourd'hui inconnue. L'hypothèse du recyclage d'un agent infectieux provenant de la tremblante des petits ruminants a souvent été évoquée, les carcasses de petits ruminants étant également incorporées aux farines de viandes et d'os. Une autre hypothèse envisagée concerne l'existence d'une éventuelle maladie sporadique rare qui pourrait avoir été méconnue avant l'apparition de l'épizootie, à l'image de la maladie de Creutzfeldt-Jakob humaine sous sa forme la plus fréquente.

La maladie bovine apparaissait en tout cas jusqu'à présent remarquablement uniforme. D'abord sous l'aspect pathologique, la localisation des lésions neuropathologiques est très univoque, en région bulbo-protubérancielles, en particulier dans les noyaux du tractus solitaire et du tractus spinal du nerf trijumeau, quel que soit l'animal atteint. Concernant, ensuite, la caractérisation de l'agent infectieux, des expériences de transmission de la maladie à la souris à partir de bovins atteints d'ESB issus de différentes régions du Royaume-Uni, à différentes périodes de l'épidémie, mais aussi de Suisse, ont aussi révélé un comportement remarquablement homogène, en faveur de l'hypothèse de l'infection des bovins par un agent infectieux unique. Ces données contrastent avec la possibilité d'isoler à partir de la tremblante des petits ruminants des "souches" d'agent infectieux présentant des caractéristiques variables, eu égard à la durée d'incubation et à la distribution des lésions neurologiques chez la souris, mais remarquablement stables

pour une souche donnée dans une lignée de souris donnée. Il doit être souligné néanmoins que, chez les bovins, ces expériences n'ont jusqu'à présent été réalisées qu'à partir d'un nombre très limité d'isolats (9 cas britanniques et 2 cas suisses), ce qui rend peu probable qu'on ait pu identifier une souche aux propriétés différentes, dans l'hypothèse où une telle souche existerait chez les bovins.

Depuis 1996, des méthodes moléculaires ont été envisagées, d'abord chez l'homme, pour la distinction de différentes entités pathologiques. Elles reposent principalement sur la caractérisation du profil électrophorétique de la protéine prion préalablement partiellement digérée par la protéinase K et détectée par la technique de *Western blot* (PrP res). Les critères de caractérisation portent, d'une part, sur les proportions respectives des trois glycoformes de la protéine (formes bi-, mono- et non glycosylée) et d'autre part, sur la masse moléculaire apparente de ces glycoformes. Ces travaux ont permis, non seulement la distinction de souches expérimentales adaptées à la souris mais aussi celle de la tremblante naturelle et de l'infection expérimentale par l'agent de l'ESB chez le mouton. Les travaux réalisés avec de telles méthodes sont restés jusqu'à présent très limités.

Nous avons envisagé l'application de telles méthodes chez les bovins identifiés comme atteints d'encéphalopathie spongiforme en France par les programmes de surveillance active menés chez les bovins de plus de 24 mois à l'abattoir et à l'équarrissage. Ces études ont actuellement permis de repérer six cas présentant des caractéristiques moléculaires clairement distinctes de celles communément rencontrées dans l'ESB (BIACABE *et al.*, 2004). Les caractéristiques principales de ces six cas sont présentées dans le tableau 1. Ces six cas présentent en effet, d'une part, une plus faible représentation de la forme bi-glycosylée de la protéine PrP res et d'autre part, une masse moléculaire plus élevée de la forme non glycosylée (environ + 1 kDa par comparaison à l'ESB typique) (figure 1). Cette masse moléculaire plus élevée est aussi corrélée à la reconnais-



**Figure 1** : Détection de la protéine prion pathologique préalablement digérée par la protéinase K chez 3 bovins. 1 : cas typique d'ESB, 2 – 3 : cas variants identifiés en France, 4 : témoins de poids moléculaires. On note la masse moléculaire apparente plus élevée de la protéine dans les 2 cas variants par comparaison avec le cas typique d'ESB, plus particulièrement visible pour la forme non glycosylée de la protéine (bande d'environ 20 kDa).

sance claire de la protéine par un anticorps monoclonal particulier (P4) en Western blot, alors que la protéine n'est pas reconnue par cet anticorps dans l'ESB typique. Ceci résulte d'une différence dans le clivage de la protéine sous l'action de la protéinase K utilisée lors de son extraction à partir du cerveau. L'épitope reconnu par l'anticorps P4 (séquence des acides aminés 101 à 107 de la PrP bovine) n'est préservé que dans les cas atypiques.

Une autre étude a récemment décrit deux cas atypiques chez des bovins en Italie (CASALONE *et al.*, 2004), dont les caractéristiques essentielles sont indiquées dans le **tableau 1**. Les caractéristiques moléculaires de ces deux cas sont également distinctes de l'ESB typique, mais elles sont aussi tout à fait différentes de celles des six cas atypiques précédemment décrits identifiés en France. En effet, si ces deux cas italiens sont également caractérisés par une plus faible proportion de forme bi-glycosylée de la protéine, ils présentent en revanche une masse moléculaire plus faible en comparaison avec l'ESB typique. Il existe ainsi manifestement chez les bovins deux types moléculaires différents et distincts de l'ESB. Cette situation peut rappeler l'existence d'au moins deux types moléculaires différents de la maladie de Creutzfeldt-Jakob sous sa forme sporadique chez l'homme.

De façon très importante, l'étude de ces deux cas atypiques en Italie a comporté une étude de la distribution cérébrale de l'accumulation de la protéine prion pathologique et des lésions. Les conclusions principales montrent aussi une différence considérable avec l'ESB. Les plus importantes quantités de protéine prion pathologique sont trouvées dans le bulbe olfactif, et non dans l'obex comme dans l'ESB. De plus, au niveau de l'obex, il n'existe aucune accumulation détectable de PrP Sc au niveau du noyau dorsal du nerf vague, comme c'est le cas dans l'ESB. Ceci suggère que les mécanismes de neuroinvasion pourraient être différents de l'ESB. Enfin, ces deux cas sont aussi caractérisés par la présence de plaques amyloïdes, contrairement à l'ESB typique.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant l'origine de ces cas atypiques. Les premières hypothèses concernent une modification de l'agent de l'ESB. Certaines observations réalisées dans des modèles expérimentaux de souris transgéniques exprimant la protéine prion humaine ont en effet montré une possibilité de modifications des caractéristiques phénotypiques de la protéine prion pathologique.

Ces modifications peuvent être liées à des changements de séquence du gène codant pour la protéine prion humaine, voire à d'autres facteurs génétiques non identifiés liés au fond génétique de la souris. Dans les cas bovins atypiques, aucune modification de la séquence du gène codant pour la protéine prion n'a été identifiée, aussi bien dans les quatre cas français étudiés que dans les deux cas italiens.

L'apparition de cas atypiques chez les bovins pourraient aussi témoigner d'une possibilité de contamination par un agent infectieux différent de celui à l'origine de l'épizootie d'ESB. Les éléments de réponse à ces interrogations seront apportés par les travaux en cours de caractérisation de l'agent infectieux, avec des expériences de transmission de la maladie à différentes lignées de souris, conventionnelles ou transgéniques. Une origine à partir d'un agent infectieux infectant une autre espèce, comme le mouton par exemple, pourrait être envisagée, en particulier dans un contexte où cette hypothèse a souvent été évoquée concernant l'origine même de l'épizootie d'ESB. Une autre hypothèse est représentée par l'existence possible d'une maladie sporadique rare, comme cela est proposé pour l'origine de la forme la plus fréquente de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme. Une telle hypothèse propose un mécanisme accidentel de transformation de la protéine prion de l'hôte en forme pathologique.

Quelle que soit l'hypothèse retenue, les conséquences prévisibles de ces nouvelles données peuvent être très importantes. S'il s'agissait d'une modification de l'agent de l'ESB, les caractéristiques biologiques de cet agent ne pourraient a priori être prévues dès lors que des modifications moléculaires aussi importantes sont apparues. Par ailleurs, ceci renforcerait la possibilité que des modifications surviennent à l'issue d'une transmission interspécifique, par exemple à l'homme ou chez les petits ruminants. La possibilité qu'il soit difficile de reconnaître l'infection par l'agent de l'ESB dans une telle situation en serait accrue. Dans l'hypothèse où un agent infectieux différent serait impliqué dans ces cas, les propriétés biologiques de cet agent infectieux, en terme de physiopathologie et de pouvoir pathogène, seraient inconnues. En particulier, dans l'hypothèse de l'existence d'une maladie sporadique, ceci signifierait, par ailleurs, la possibilité d'une maladie bovine indépendante de toute source de contamination alimentaire liée à l'épizootie de ces dernières années. La pérennité de telles affections chez les bovins devrait alors être envisagée.

Cas	Âge (ans)	Localisation géographique	Race	Origine	Test de dépistage utilisé
V1 <sub>F</sub>	10	Loire Atlantique	Croisé	Abattoir	Platelia (Biorad)
V2 <sub>F</sub>	15	Côtes d'Armor	Prim'Holstein	Équarrissage	Prionics-Check (Prionics AG)
V3 <sub>F</sub>	8	Loire Atlantique	Charolais	Équarrissage	Prionics-Check (Prionics AG)
V4 <sub>F</sub>	8	Creuse	Limousin	Abattoir	Prionics-Check (Prionics AG)
V5 <sub>F</sub>	12	Loire	Croisé	Équarrissage	Prionics-Check (Prionics AG)
V6 <sub>F</sub>	13	Jura	Montbéliard	Équarrissage	Platelia (Biorad)
V1 <sub>I</sub>	15	Italie	Piémontaise	Abattoir	Prionics-Check (Prionics AG)
V2 <sub>I</sub>	11	Italie	Brune des Alpes	Abattoir	Prionics-Check (Prionics AG)

**Tableau 1 :** Principales caractéristiques des cas bovins atypiques identifiés en France et en Italie.

### BIBLIOGRAPHIE

• BIACABE A-G, LAPLANCHE J-L, RYDER S et BARON T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO reports*, **5**, 110-114.

• CASALONE C, ZANUSSO G, ACUTIS P, FERRARI S, CAPUCCI L, TAGLIAVINI F, MONACO S et CARAMELLI M (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy : molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, **101**, 3065-3070.