

Bull. Acad. Vét. de France, 1991, 64, 139-145

COMMUNICATIONS

Recherche d'un témoin biochimique urinaire de l'infection du mouton par la tremblante

par BRUGÈRE Henri*, BANISSI Claire**, BRUGÈRE-PICOUX Jeanne***,
CHATELAIN Jacqueline**** et BUVET René*****

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent une méthode électro-chimique qui permet de révéler la présence d'un composé particulier dans l'urine de moutons atteints de tremblante.

Mots clés : Tremblante - Encéphalopathies spongiformes.

SUMMARY

RESEARCH OF A BIOCHEMICAL MARKER OF SCRAPIE IN THE URINE OF SHEEP

The authors describe an electrochemical method which allows to reveal the presence of a peculiar chemical in the urine of scrapie infected sheep.

Key words : Scrapie - Spongiform encephalopathies.

-
- * Professeur, Laboratoire de Physiologie Thérapeutique, Ecole Nationale Vétérinaire - 94707 Maisons-Alfort (France).
 - ** Chercheur Doctorant, Laboratoire d'Energétique Electrochimique et Biochimique, Université Paris - Val-de-Marne - 94000 Créteil (France).
 - *** Professeur, Laboratoire de Pathologie du Bétail, Ecole Nationale Vétérinaire - 94704 Maisons-Alfort (France).
 - **** Docteur ès sciences, FRA Claude-Bernard, Neurochimie et Communications Cellulaires, Service de Biochimie et UPR 43 CNRS, Hôpital Saint-Louis - 75010 Paris (France).
 - ***** Professeur, Laboratoire d'Energétique Electrochimique et Biochimique, Université Paris - Val-de-Marne - 94000 Créteil (France).

Le regain d'intérêt pour les encéphalopathies spongiformes des ruminants suscité par l'épidémie anglaise d'encéphalopathie spongiforme bovine a souligné l'un des principaux problèmes rencontrés dans le dépistage et dans le diagnostic de ces affections, en l'occurrence l'absence pratiquement totale de méthode de diagnostic, en particulier biochimique, utilisable du vivant de l'animal.

Le fait qu'une méthode électrochimique ait permis récemment de démontrer la présence dans l'urine humaine d'un composé oxydable chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [11] nous a suggéré de rechercher si le même composé pouvait être retrouvé dans l'urine de moutons atteints de tremblante. Cette démarche était limitée à la recherche d'un marqueur biochimique potentiel et n'avait, en aucune façon, l'objectif d'établir quelque corrélation que ce soit entre deux affections, qui, en l'état actuel des connaissances sont considérées comme ayant des étiologies et des physiopathologies différentes.

C'est le résultat de cette étude préliminaire que nous rapportons ci-après.

MATERIEL ET METHODES

La méthode utilisée, dite micro-électrolyse capillaire répétitive, consiste à étudier les variations d'intensité d'électrolyse des composés oxydables ou réductibles contenus dans une solution imbibant une électrode poreuse inerte, lorsqu'on soumet celle-ci à des variations de potentiel correspondant à une succession de balayages aller et retour entre deux valeurs extrêmes de potentiel [1, 9].

Au cours de tels balayages, à potentiel d'abord croissant, les différents composés contenus dans la solution s'oxydent successivement, chacun à un potentiel qui le caractérise, faisant apparaître sur les tracés représentant l'intensité en fonction du potentiel une succession de pics dont la surface et l'amplitude sont proportionnelles à la concentration de chaque composé.

Au retour, à potentiel décroissant de ce premier balayage aller, on réduit successivement les produits issus de l'oxydation des composés initialement présents dans la porosité de l'électrode.

Un second balayage aller et retour met en évidence les réactions d'oxydo-réduction réversibles et permet de déterminer le degré de stabilité des composés présents au sein de l'électrode. Le pic correspondant au catabolite marqueur des démences de type Alzheimer apparaît au premier balayage retour, à un potentiel voisin de 850 mV. Dans les urines de déments de type Alzheimer, il a été noté [11] que l'amplitude de ce pic, appelé pic A, est significativement augmentée par rapport à l'amplitude des pics voisins, si bien qu'il tend parfois même à devenir plus important que ceux-ci, phénomène qui n'est jamais rencontré pour

les urines provenant de sujets âgés non déments. Par ailleurs, l'amplitude de ce pic est très atténuée lors du second balayage retour, le composé ayant été partiellement détruit par réoxydation au deuxième balayage aller.

Afin de rechercher la présence de ce marqueur dans les urines de moutons atteints de tremblante, nous avons retenu, pour l'exploitation des tracés quatre indices chiffrés nous permettant de nous affranchir des variations de diurèse. Les deux premiers, notés Q2 et Q3 sont obtenus en divisant l'intensité du pic A au premier balayage (R6 [1]) par l'amplitude des pics voisins servant de référence, respectivement situés à 750 mV (R5) et 650 mV (R4). Les deux autres indices notés D/R5 et D/R4 sont calculés en divisant la différence (D) entre les intensités du pic A au premier (R6 [1]) et au second balayage (R6 [2]) par l'amplitude des pics de référence. Un cinquième indice (R5/R4) a été calculé afin de vérifier la validité de notre système de référence. Tous ces indices ont été calculés pour les moutons témoins et les moutons atteints de tremblante. La significativité statistique des différences observées a été évaluée au moyen du test t de Student.

Deux groupes expérimentaux de brebis ont été constitués par 16 brebis malades provenant d'élevages contaminés et 19 brebis saines servant de témoins. Les malades étaient toutes en phase clinique, mais à des stades évolutifs différents.

Chez tous les animaux, l'urine était obtenue par cathétérisme vésical et congelée immédiatement. Pendant la période de l'étude, tous les animaux étaient entretenus dans des conditions semblables de stabulation et recevaient la même alimentation à base de foin de graminées.

Un certain nombre de brebis étant parvenues au terme de l'évolution de la maladie pendant l'étude, leurs encéphales ont été prélevés immédiatement après la mort ou l'euthanasie et préparés en vue d'un examen histologique (fixation par le formaldéhyde à 10 %, inclusion en paraffine, coloration par l'hémalum-éosine). Les coupes ont porté sur le bulbe (*Medulla oblongata*), en raison de la constance de localisation des lésions à cette région de l'encéphale [10].

RESULTATS

Les résultats sont présentés dans le tableau I, ainsi que la significativité statistique. Il apparaît que l'amplitude (en cm) du pic A au premier balayage est de $1,105 \pm 0,257$ chez les malades, au lieu de $0,654 \pm 0,207$ chez les témoins. Des valeurs plus élevées chez les malades que chez les témoins (respectivement $0,712 \pm 0,155$ et $0,543 \pm 0,186$) sont aussi observées au second balayage, bien que l'écart soit à ce moment déjà très amoindri par l'oxydation produite lors du premier

balayage. La différence de hauteur des pics entre les deux balayages (D), met en évidence un écart important (respectivement 0,393 et 0,111 pour les deux lots). Les valeurs individuelles de ces différences sont portées sur un graphique (fig. 1) de façon à donner un aperçu de la distribution. Cette représentation montre que les deux populations sont différentes mais qu'elles se recouvrent partiellement, essentiellement du fait de deux valeurs basses observées chez des malades.

Tableau I
Résultats (moyenne et écart-type) de l'analyse des tracés d'analyse voltampérométrique d'urines de brebis saines et de brebis atteintes de tremblante

Paramètre	Malade	Témoin	Statistique
n	16	19	p
R6(1)	1,105 ± 0,257	0,654 ± 0,207	<0,001
R6(2)	0,712 ± 0,155	0,543 ± 0,186	0,006
R5	2,818 ± 1,052	3,407 ± 1,435	n.s.
R4	1,241 ± 0,284	1,469 ± 0,602	n.s.
D	0,393 ± 0,125	0,111 ± 0,0607	<0,001
Q2 = R6(1)/R5	0,443 ± 0,176	0,222 ± 0,11	<0,001
Q3 = R6(1)/R4	0,92 ± 0,265	0,467 ± 0,11	<0,001
D/R5	0,04 ± 0,038	0,158 ± 0,074	<0,001
D/R4	0,082 ± 0,049	0,332 ± 0,1312	<0,001
R5/R4	2,322 ± 0,775	2,391 ± 0,745	n.s.

Les pics R4 et R5 pris comme éléments de référence ne diffèrent pas dans les deux groupes, de même que le rapport R4/R5. Les paramètres Q2 et Q3, obtenus en rapportant la hauteur des pics R6 aux pics R5 et R4, conduisent à des différences très significatives entre malades et témoins, et il en est de même pour les rapports D/R5 et D/R4.

Parmi les malades, 13 brebis sont mortes au cours de l'étude et des examens histologiques ont été pratiqués chez 12 d'entre elles. Les lésions de spongiose interstitielle et de vacuolisation neuronale ont permis de confirmer dans tous les cas l'atteinte par la tremblante.

DISCUSSION

L'utilisation de méthodes électrochimiques pour mettre en évidence, ou doser quantitativement, des composés biologiques a déjà été exploitée dans le domaine de la neurochimie, ne serait-ce que pour la détection

électrochimique des catabolites des amines biogènes en sortie de colonne chromatographique. La méthode proposée ici se différencie de ces techniques classiques surtout par le fait qu'elle opère sans séparation préalable. Les méthodes électrochimiques offrent, par ailleurs, une possibilité d'investigation *in vivo*, puisqu'il est possible de réaliser ces réactions d'oxydo-réduction directement au sein du tissu nerveux à l'aide de micro-électrodes mises en place par stéréotaxie [6, 7]. Les composés détectés de cette manière sont essentiellement des molécules à structure aromatique ou hétérocyclique, telles que des dérivés des catécholamines et de la sérotonine.

Distribution de l'indice D chez les moutons

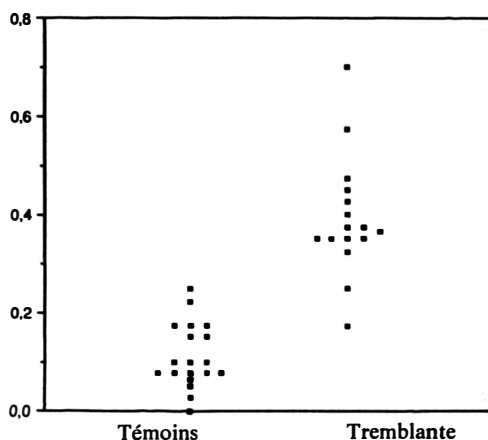


Fig. 1

Histogramme montrant la dispersion du paramètre D (amplitude de la diminution du pic 850 mV entre les deux premiers balayages) chez les brebis saines et les brebis atteintes de tremblante.

In vitro et appliquée à des solutions en phase aqueuse, la méthode permet de révéler les mêmes produits (VMA, MHPG, HVA, 5-HIAA...) ainsi que des nutriments ou des métabolites (ascorbate, acide urique, alloxane). L'étude de l'urine de plus d'une centaine de patients humains atteints de démence de type Alzheimer a montré qu'il existe une corrélation entre l'existence de la maladie et l'amplitude du pic A [11]. Ces fortes amplitudes n'ont pas été retrouvées chez les malades souffrant d'un autre type d'atteinte des fonctions nerveuses supérieures (insuffisance cérébrale d'origine vasculaire). La nature précise du composé responsable du pic de 850 mV n'est actuellement pas établie, mais il

est acquis qu'il ne s'agit, ni d'un dérivé connu des catécholamines, ni du 5-HIAA. Rappelons cependant que, chez les moutons atteints de tremblante, il existe une altération du métabolisme de la sérotonine avec baisse du taux sanguin [4] et que lors de l'évolution clinique de la maladie expérimentale chez l'animal de laboratoire, on a mis en évidence une réduction de la sérotonine et du 5-HIAA et une réduction des taux de DOPAC et de DHPG dans le système nerveux central [2].

Au vu des résultats obtenus à la suite de cet essai préliminaire, il apparaît qu'il existe une différence significative entre les deux groupes d'animaux et que l'on peut conclure à la présence dans l'urine des moutons atteints de tremblante d'un composé qui n'existe pas ou qui n'existe qu'à plus faible concentration chez les animaux sains. D'autres critères électrochimiques (le produit est oxydé à 1 200 mV et son dérivé d'oxydation est réductible à 850 mV) laissent penser que c'est sans doute le même composé qui est présent chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer et chez les moutons à tremblante. On peut faire l'hypothèse que, dans ces deux affections dégénératives du système nerveux central, un même produit, soit un neuro-transmetteur, soit un de ses métabolites, ou encore un produit du catabolisme du tissu nerveux se trouve éliminé en plus grande quantité par voie urinaire. Mentionnons que des échantillons de liquide céphalorachidien de deux brebis malades se sont avérés négatifs. Une autre éventualité serait que le produit caractérise l'état de dépérissement dans lequel se trouvent les animaux, mais dans ce cas, même si divers métabolites (acide urique, alloxane) sont effectivement reconnus par la méthode, aucun d'entre eux ne peut être confondu avec le pic concerné.

Les résultats de cette étude doivent aussi être replacés dans le contexte clinique de la tremblante et des encéphalopathies spongiformes en général. Sans doute, dans la phase clinique, des symptômes typiques peuvent avoir une grande valeur diagnostique surtout dans un contexte de suspicion. Quelques méthodes d'examen para-clinique pourraient alors apporter un diagnostic de certitude : l'électroencéphalographie [5, 12] ou la recherche des potentiels évoqués visuels [3] font apparaître des anomalies caractéristiques, mais leur mise en œuvre dans les conditions du terrain reste difficile à envisager. D'éventuels marqueurs biochimiques seraient incontestablement les meilleurs atouts pour permettre le dépistage de ces affections. La recherche des paramètres usuels de biochimie clinique n'a jusqu'à maintenant fait apparaître que des modifications minimales chez les moutons malades, ou des déviations qui ne font que confirmer un fait déjà perceptible à l'examen clinique (par exemple, élévation de la créatine kinase, suite à l'hyperactivité musculaire) [8].

C'est pourquoi, dans la situation actuelle, la mise en application d'une méthode non spécifique, capable de révéler, en une seule opération, un nombre élevé d'espèces chimiques, est une voie de recherche qui peut s'avérer plus fructueuse que la détermination de paramètres biochimiques

choisis de façon aléatoire. Il reste, cependant, à confirmer sur de plus grands effectifs l'existence de ce pic chez les malades et, aussi rapidement que possible, à identifier la substance en cause.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mme Geneviève DELVAUX, de l'Ecole Nationale Vétérinaire, qui a réalisé les préparations histologiques et M. Georges DURAND, technicien, de la Station de Physiologie de la Reproduction INRA de Tours-Nouzilly, pour l'aide constante qu'il apporte à notre équipe.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BANISSI (C.). — Exploitation de techniques électrochimiques pour le suivi analytique dans les liquides biologiques de désordres du métabolisme des neuro-médiateurs aromatiques. Rapport de DEA, Université Paris - Val-de-Marne, 1989.
- [2] BASSANT (M.H.), PICARD (M.), OLICHON (D.), CATHALA (F.) and COURT (L.). — Changes in the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic levels in the brain of scrapie-infected rats. *Brain research*, 1986, 367, 360-363.
- [3] CHAMBERLAND (D.). — Contribution à l'étude des potentiels évoqués visuels du mouton sain et au cours de la tremblante. Thèse Doc. Vét., Alfort-Créteil, 1980.
- [4] CHATELAIN (J.), HAIMART (M.), LAUNAY (J.M.), BAILLE (V.), DREUX (F.) et CATHALA (F.). — Sérotoninémie et histaminémie chez des ovins endémiquement atteints de tremblante. *C.R. Soc. Biol.*, 1984, 178, 664-670.
- [5] COURT (L.), CHAMBERLAND (D.), MESTRIES (J.C.), CHATELAIN (J.) et BRETON (P.). — Activité électrique cérébrale dans la tremblante du mouton. Rapport du CRSSA, 1982, Trav. Scient. n° 13, D 113, p. 323.
- [6] CRESPI (F.). — La voltamétrie différentielle impulsionnelle : une nouvelle, élégante méthodologie pour l'exploration in vivo du métabolisme et des interactions des monoamines neuronales dans des aires cérébrales spécifiques. *Les Entretiens du Carla*, 1989, 7, 63-73.
- [7] GONON (F.), BUDA (M.), CESPUGLIO (R.), JOUVET (M.) and PUJOL (J.F.). — In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats : dopamine or DOPAC ? *Nature*, 1980, 286, 902-904.
- [8] MEUNIER (G.D.). — Contribution à l'étude du diagnostic précoce de la tremblante naturelle du mouton. Etude épidémiologique, clinique, nécropsique et biochimique. Thèse Doct. Vét., Alfort-Créteil, 1981.
- [9] MOUTET (M.). — Caractérisation et évaluation rapide des composés électrochimiques oxydables dans les urines normales et pathologiques. Thèse de Doct. ès scien., Université Paris - Val-de-Marne, 1986.
- [10] PARRY (H.B.). — Scrapie disease in sheep. Academic Press, London, 1983.
- [11] PLANQUES (B.), BANISSI (C.), JEANNIN (C.), BIZIEN (A.) et BUYET (R.). — Caractérisation électroanalytique des démences de type Alzheimer. Actes du IV^e Congrès International de Gérontologie, Montréal, 1990, Edisem, St-Hyacinthe, Québec et Masson Paris, p. 262-266.
- [12] STRAIN (G.M.), OLCOTT (B.M.) and BRAUN (W.F.). — Electroencephalogram and evoked potentials in naturally occurring scrapie in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, 47, 828-836.