

# Diversité des souches d'Encéphalopathie Spongiforme Transmissible chez les ruminants : enjeux, bilan et perspectives

## Introduction

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST), maladies neurodégénératives responsables notamment de la tremblante chez le mouton, de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), et de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) chez l'homme, sont dues à des agents transmissibles dits « non conventionnels », plus communément appelés prions. Une caractéristique spécifique des maladies à prions est l'accumulation dans le système nerveux central d'une protéine désignée PrP<sup>sc</sup>, forme anormalement repliée de la PrP<sup>c</sup>, une protéine cellulaire

abondante dans les neurones. La PrP<sup>sc</sup> est à ce jour le seul composant identifié comme étant spécifiquement associé à l'infectiosité. La théorie qui prévaut actuellement, dite du « tout protéine », propose que les prions sont des agents dépourvus de génome, dont la conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>, via une interaction physique directe entre les deux isoformes, constitue l'essence même de la propagation (revues : Prusiner 1998, Collinge 2001).

## 1 / Le phénomène de souches : une question au cœur de la problématique des EST

## Résumé

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) ou maladies à prion se caractérisent par l'accumulation dans le tissu nerveux d'une forme anormalement repliée d'une protéine cellulaire de l'hôte, la PrP<sup>c</sup>. Cette isoforme anormale, ou PrP<sup>sc</sup>, supposée responsable des désordres neurodégénératifs observés, est aussi assimilée par de nombreux auteurs à l'agent transmissible lui-même, lequel serait alors dépourvu de génome et se propagerait de manière épigénétique. Un phénomène au cœur des recherches sur les EST est l'existence de variants phénotypiques, ou souches. Les souches de prions peuvent être différenciées entre elles sur une base biologique, par la nature des manifestations anatomo-pathologiques engendrées lors de leur propagation chez un même hôte, en particulier une lignée pure de souris, et sur une base biochimique, par le profil moléculaire de la PrP<sup>sc</sup> présente dans le cerveau des individus atteints. Le déterminisme biologique et moléculaire de cette diversité et la dynamique évolutive qu'elle suggère demeurent largement incompris. De ce fait, la caractérisation des souches qui infectent les espèces naturellement atteintes par les EST constitue une tâche relativement ardue, au demeurant essentielle à la compréhension de l'épidémiologie de ces maladies, à leur contrôle sur le terrain et à la protection de la santé humaine. Les recherches menées à l'INRA visent à documenter la diversité des souches d'EST chez les petits ruminants par typage des isolats de tremblante naturelle, et à mieux comprendre le déterminisme de cette diversité. Elles ont également pour objectif l'amélioration des méthodes actuelles de typage en termes de rapidité et de fiabilité, notamment à travers le développement de souris transgéniques plus réceptives à la transmission que les souris conventionnelles.

La transmission par inoculation d'isolats d'EST issus d'espèces naturellement atteintes à des rongeurs de laboratoire – souris ou hamster –, qui constitue encore le principal mode de propagation expérimentale de ces agents, a révélé que des souches de prion biologiquement distinctes peuvent être propagées chez un même hôte (revue : Bruce 2003). Les souches se différencient par diverses propriétés, dont le temps écoulé entre l'inoculation et l'apparition des symptômes cliniques, la distribution spatiale des lésions et des dépôts de PrP<sup>sc</sup> dans le cerveau, la résistance à l'inactivation du prion, ainsi que la signature biochimique de la PrP anormale, seul marqueur moléculaire disponible des infections à prion.

L'existence de souches, manifestation d'une variation naturelle bien connue chez des agents infectieux tels que les virus, est plus inattendue dans le cas d'agents supposés se propager de manière épigénétique, c'est-à-dire en l'absence de génome. La confrontation de ce phénomène avec la conjecture

« tout protéine » a de fait donné lieu à de vifs débats. La capacité de la PrPsc à former différents conformères ou types d'agrégat stables, chacun perpétuant fidèlement « sa différence », pourrait rendre compte de la diversité observée, et certains arguments expérimentaux vont en effet dans ce sens (Safar *et al* 1998). Quoi qu'il en soit, l'existence de souches de prions capables de se propager chez un même hôte avec des caractères phénotypiques distincts n'est plus contestée, et c'est désormais sur la nature de l'information qui sous-tend une telle diversité que subsistent des interrogations. A ce titre, le phénomène de souche est une préoccupation majeure des recherches menées sur les prions, qu'il s'agisse des prions de mammifères ou d'entités répondant aux mêmes caractéristiques et rencontrées chez la levure (revue : Tuite 2004). Toutefois l'enjeu n'est pas seulement d'ordre fondamental, car cette connaissance a aussi, comme nous le verrons, des implications directes en termes de santé humaine et animale.

## 2 / L'adaptation de souches d'EST à la souris révèle un potentiel de variation phénotypique surprenant

Les observations laissant soupçonner l'existence d'une variation naturelle de l'agent EST ne sont pas récentes, puisque dès 1926 était consignée l'existence d'une forme soit « nerveuse », soit « prurigineuse » de tremblante chez le mouton, et qu'au début des années 70 cette observation était confirmée chez la chèvre, avec la démonstration que ces deux formes restaient stables au cours de passages successifs. A cette même époque, un groupe de chercheurs à Edinburgh, A. Dickinson, puis M. Bruce et H. Fraser entamaient une étude de grande ampleur qui débouchera sur la stabilisation et l'individualisation d'un nombre élevé de souches chez la souris, obtenues par passages itératifs d'isolats de tremblante ovine ou caprine, directement ou après transmission à un ou plusieurs hôtes intermédiaires. L'existence de « plus de 20 souches distinctes » est souvent mentionnée dans la littérature en référence à ces travaux. En réalité les données publiées documentent l'existence de 8 souches propagées sur la souris C57BL, et de 6 autres souches sur la souris VM, deux lignées consanguines qui portent des allèles de PrP différents (revues : Bruce et Fraser 1991, Bruce 2003).

Il est malaisé d'admettre qu'une telle variation (même en considérant individuellement ces deux nombres dont l'addition n'est pas nécessairement légitime) puisse être entièrement imputable à la diversité des conformères de PrPsc. Certains auteurs ont avancé l'hypothèse que les chaînes de glycanes attachées à la PrP pourraient influencer les propriétés biologiques de l'agent, contribuant ainsi à la variation observée (Collinge *et al* 1996). La protéine PrP comporte deux sites de glycosylation variablement occupés, et la distribution des glycoformes associées à la

PrPsc peut en effet présenter des différences notables selon les souches (voir ci-dessous). Une chose est claire en tout cas, le déterminisme moléculaire de la diversité des prions de mammifères nous échappe largement.

## 3 / Explorer la diversité des souches d'EST chez les petits ruminants : pourquoi, comment ?

### 3.1 / Les enjeux

Une connaissance approfondie des données épidémiologiques est un atout précieux pour la mise en place de mesures destinées à contrôler la diffusion d'une maladie infectieuse animale et à protéger la santé publique lorsque celle-ci est également menacée. Or bien des questions concernant l'épidémiologie de la tremblante restent sans réponse.

- La diversité des souches d'EST circulant sur le terrain est-elle aussi importante que celle qui s'observe au sein des souches adaptées à la souris ?
- Les souches présentent-elles une distribution spatio-temporelle différenciée : retrouve-t-on des souches identiques dans des élevages géographiquement éloignés, dans différents pays ou continents ? Le phénotype d'une souche est-il susceptible d'évoluer au fil du temps au sein d'un même élevage ?
- Les foyers de tremblante sporadique ou épizootique impliquent-ils des souches distinctes ?
- Les souches circulant dans les élevages ovins et caprins sont-elles les mêmes ?

Il est établi que les souches d'EST peuvent présenter des différences notables en termes de préférence allélique (c'est-à-dire la propension plus ou moins marquée à infecter des individus d'un génotype donné au locus *Prnp*) (Goldmann *et al* 1994), de potentiel de transmission inter-spécifique (Bruce et Fraser 1991), d'aptitude à coloniser les tissus périphériques et à persister dans l'environnement, etc. L'élaboration d'un inventaire des souches naturelles de tremblante représente donc une étape nécessaire vers une meilleure compréhension de leur comportement sur le terrain.

La caractérisation des souches d'EST chez les petits ruminants vise également à répondre à deux autres préoccupations importantes.

Bien que l'agent de la tremblante ne soit pas considéré comme présentant un caractère de dangerosité pour l'homme, l'émergence de l'ESB oblige désormais à considérer l'espèce ovine comme porteuse d'un risque potentiel, en raison de sa sensibilité démontrée expérimentalement à un agent auquel elle a été temporairement exposée via l'utilisation de compléments alimentaires contaminés. En fait, il est probable que des moutons ont été infectés par l'ESB, et certains de ces animaux ont pu entrer dans la chaîne alimentaire (Baylis *et al* 2002). Le retrait systématique de certains

tissus à risque spécifié en vigueur depuis 1996 a précisément pour but de se prémunir vis-à-vis d'un tel risque. La question actuellement posée est celle de l'identification d'un troupeau de petits ruminants dans lequel l'agent ESB pourrait persister via une transmission inter-individuelle. Dans cette éventualité, les mesures de protection du consommateur devraient être réévaluées. Une telle démarche s'inscrit dans le cadre des campagnes visant à préciser la prévalence de la tremblante à l'échelon national par l'utilisation de tests rapides, mais suppose la mise au point d'une technique capable de différencier l'agent ESB des différentes souches d'EST ovines.

L'éradication de la tremblante représente à terme le moyen le plus sûr de résoudre les problèmes posés en termes de santé humaine et animale. Le plan d'éradication mis en place depuis quelques années dans différents pays européens repose sur une introduction massive de l'allèle ARR dit « de résistance » dans les troupeaux, par croisement systématique avec des béliers homozygotes pour cet allèle (Vilotte 2004, ce numéro). Si cette stratégie a montré une efficacité indéniable à l'échelon du troupeau, des interrogations subsistent toutefois quant à son efficacité à long terme. Il est d'ores et déjà établi que la résistance conférée par cet allèle n'est pas absolue puisque des animaux ARR/ARR inoculés avec de fortes doses de l'agent ESB développent la maladie (Houston 2003). D'autre part, la découverte récente de cas de tremblante dits « atypiques » (Benestad *et al* 2003 ; voir ci-dessous), ainsi que de prélèvements de cerveau dits « discordants » (c'est-à-dire positifs ou négatifs selon le test utilisé ; Buschmann *et al* 2004) est préoccupante à cet égard. Elle conduit en effet à s'interroger sur l'exhaustivité des techniques de diagnostic en vigueur, et sur la possibilité qu'une souche de tremblante différente de celles actuellement connues puisse se multiplier sur des individus porteurs de l'allèle ARR.

Compte tenu de ces enjeux, l'amélioration des méthodes de caractérisation – ou typage – de souche en termes de fiabilité et de rapidité, d'une part, et la mise en place de méthodes de diagnostic qui garantissent une détection exhaustive des cas de tremblante, d'autre part, constituent à l'évidence deux priorités.

### 3.2 / Typage sur une base anatomo-pathologique après transmission à la souris conventionnelle

Les travaux du groupe d'Edinburgh mentionnés précédemment ont jeté les bases d'une méthode de typage décrite dans l'encadré 1. Celle-ci est maintenant appliquée au typage d'isolats de tremblante ovine du terrain dans différentes équipes dont celle de l'INRA de Tours (PII), notamment dans le cadre de projet européens (FAIR CT 97-3305, BSE in sheep). Il s'agit d'une méthode longue et onéreuse, requérant de surcroît un savoir-faire très spécifique qui restreint sa mise en oeuvre à un nombre limité de laboratoires.

Quel est l'état actuel des connaissances sur la diversité naturelle de l'agent de la tremblante ovine ? Suite à l'inoculation d'un isolat de tremblante du terrain à la souris conventionnelle, la maladie ne se manifeste qu'après un long temps d'incubation (jusqu'à deux ans et plus) et ne touche souvent qu'un faible pourcentage de souris. Un nombre substantiel d'isolats sont impossibles à transmettre à ces souris, en particulier ceux issus d'animaux portant une alanine en position 136 de la protéine prion à l'état homozygote (à l'exception notable de l'ESB). Il se dégage de ces travaux qu'au moins trois souches distinctes (désignées ME7-, 87A- et 221c-like) peuvent être individualisées par typage d'isolats ovins du terrain sur souris (Bruce *et al* 2002). Cependant, notamment en raison du faible nombre d'isolats qui ont pu être caractérisés par cette approche, il n'est pas sûr que ces données fournissent un reflet exhaustif et fidèle de la variation naturelle.

Un apport marquant de la méthode de typage sur souris conventionnelle a été de montrer que l'agent de l'ESB possède des caractéristiques tout à fait uniques qu'il conserve après passage chez la souris conventionnelle quelle que soit l'espèce d'origine et qui permettent de différencier l'agent bovin (ESB) expérimentalement transmis au mouton de souches de tremblante classiques. De même, les similitudes mises en évidence dans ce système entre l'agent de l'ESB et celui du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob constituent l'un des arguments les plus forts en faveur de l'origine bovine de cette maladie chez l'homme (Bruce *et al* 1997). Pour toutes ces raisons, le typage sur souris conventionnelles – en particulier la lignée RIII, la plus rapide – demeure la référence en matière d'identification de l'ESB dans toutes les espèces, en attendant la validation des méthodes alternatives qui se sont développées ces dernières années.

### 3.3 / Apport potentiel des souris transgéniques

Les limitations de la méthode s'appuyant sur des souris conventionnelles, notamment son temps de réponse considérable et l'insuccès de certaines transmissions, justifiaient un effort visant à l'obtention d'un modèle animal plus réceptif.

La PrPc détermine non seulement la susceptibilité d'un hôte à la maladie, mais aussi sa réceptivité à l'infection par des prions provenant d'une autre espèce. Ce rôle de la PrP dans le contrôle de la barrière d'espèce a pu être établi de manière convaincante grâce à des expériences de transgénèse, en montrant que l'expression d'un transgène codant la PrP de hamster rendait la souris très réceptive à une souche de prion adaptée au hamster. Cette découverte a conduit au développement de souris transgéniques exprimant la PrP d'espèces naturellement affectées. Ainsi, des souris transgéniques pour la PrP humaine améliorent considérablement l'efficacité de transmission d'isolats d'EST humains à cette espèce (revue : Vilotte et Laude 2002). Il était

donc tentant d'appliquer cette approche à l'agent de la tremblante.

Un travail réalisé à l'INRA de Jouy-en-Josas, fruit d'une collaboration étroite entre généticiens (LGBC) et virologistes (VIM), avait

montré que la transmission primaire de deux isolats ovins issus de moutons VRQ à des souris transgéniques pour la protéine PrP ovine (tgOv-VRQ) conduisait à des temps d'incubation beaucoup plus brefs et plus homogènes

### Encadré 1. Typage biologique de souches d'EST sur souris conventionnelles.

Cette méthode, mise au point pour caractériser les souches d'EST préalablement adaptées à la souris, prend en compte deux types de données : la durée d'incubation observée sur diverses lignées de souris et le « profil lésionnel » fondé sur le dénombrement des vacuoles dans différentes zones du cerveau. Elle est mise en œuvre en trois étapes :

1 – **Isolement** des souches par inoculation d'un échantillon (cerveau ovine, bovin, humain...) à un panel de trois lignées de souris consanguines représentant les deux principaux génotypes au locus *Prnp* chez la souris : a) dit « incubation courte » pour les souris RIII et C57BL ; b) dit « incubation longue » pour la souris VM. L'hétérogénéité des résultats habituellement observée lors de cette transmission primaire (titre infectieux, barrière d'espèce, de génotype ?...) ne permet pas – à l'exception notable de l'ESB (voir ci-dessous) – de caractériser clairement les isolats à ce stade.

2 – **Stabilisation** par plusieurs sous-passages sur les lignées C57 et VM. Au cours de ces passages, la durée d'incubation diminue jusqu'à se stabiliser et le pourcentage de souris infectées augmente et atteint en général 100 %. Ce processus, qui peut nécessiter au moins trois passages successifs, conduit souvent à l'isolement de souches différentes sur les deux lignées.

3 – **Caractérisation** proprement dite des « souches » obtenues par réinoculation au panel RIII, C57BL, VM et le croisement C57xVM.

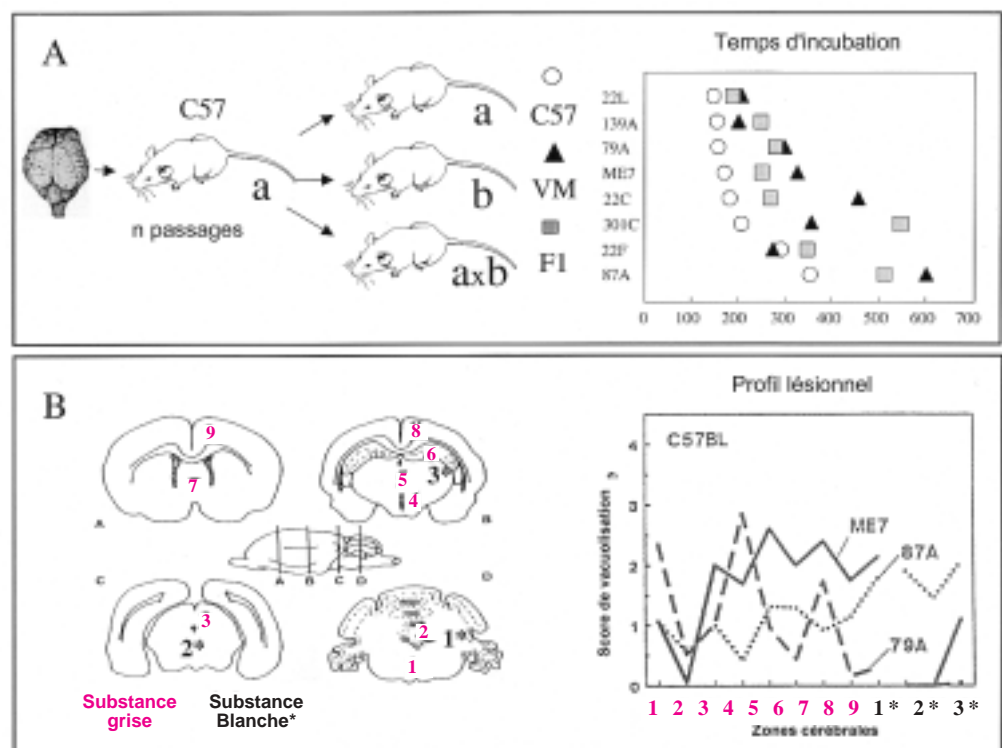
La durée d'incubation, qui dépend du génotype des souris au locus *Prnp* – mais aussi d'autres

gènes qu'il reste à identifier (Moreno *et al* 2002, Vilotte 2004, ce numéro) – est enregistrée pour chaque lignée. Le cadre A présente les résultats obtenus avec huit souches de tremblante (stabilisées sur lignée C57), ici sur souris C57, VM et la F1 C57xVM (d'après Bruce et Fraser 1991).

Le « profil lésionnel » est ensuite déterminé sur des souris en phase terminale de la maladie. Il est obtenu, à partir de coupes histologiques pratiquées à des niveaux précis du cerveau, en évaluant l'intensité de la vacuolisation dans neuf zones de substance grise et trois zones de substance blanche. Un score (semi-quantitatif) de 1 à 5 (1 à 3 pour la substance blanche) est attribué en fonction du nombre de vacuoles présentes. Le profil lésionnel ainsi obtenu diffère de manière reproductible selon les souches, comme on le voit ici pour les souches ME7, 87A et 79A (cadre B).

Ce typage est répétable et caractéristique de chaque souche. Il a pour inconvénient majeur d'être très long à mettre en œuvre (jusqu'à trois ans et plus).

L'ESB peut être caractérisée plus rapidement, puisqu'elle présente, dès la transmission primaire, chez la souris RIII, au moins trois caractéristiques qui, associées, suffisent à l'identifier quelle que soit l'espèce d'origine (bovine, ovine, féline, humaine...) : son profil lésionnel, le profil électrophorétique de la PrPres en western-blot (figure 1) et sa durée d'incubation inférieure à un an (cette dernière donnée étant cependant plus variable car dépendante du titre infectieux de l'inoculum de départ).





que chez la souris non-transgénique (Vilotte *et al* 2001). Ce résultat incitait à poursuivre l'évaluation de ces souris en tant qu'outil de caractérisation des isolats ovins.

Une quarantaine d'isolats européens de provenances géographiques et de génotypes divers ont été inoculés par voie intracérébrale aux souris tgOv (lignée tg338). La très grande majorité des isolats ont été transmis avec une efficacité de 100 %. Les temps de survie moyens observés sont très variables selon les isolats, allant de ~ 70 à ~ 700 jours, et n'excèdent pas 200 jours pour la moitié d'entre eux, ce qui représente un progrès très substantiel comparé à la souris conventionnelle. De plus, l'analyse du temps de survie en passage secondaire et du profil biochimique de la PrPsc accumulée dans le cerveau des souris permet de classer ces isolats en cinq groupes principaux, dont aucun ne montre des caractéristiques similaires à celles de l'agent ESB expérimentalement transmis au mouton (AFSSA-Lyon) et inoculé à ces mêmes souris. Le premier bilan qu'il est possible de dresser à partir de ces travaux est donc plutôt encourageant, et conforte l'idée que le typage de souches ovines gagnerait à s'appuyer sur l'utilisation de souris tgOv-VRQ.

### 3.4 / Méthodes alternatives au typage biologique sur souris

Même amélioré via l'utilisation de lignées génétiquement modifiées, le biotypage sur souris n'en restera pas moins une méthode lourde, avec un temps de réponse relativement élevé. Ce constat justifie la recherche de méthodes alternatives qui permettent de s'affranchir de l'inoculation à la souris, et qui soient éventuellement applicables de manière plus systématique aux isolats de terrain.

Un premier type d'approche, principalement explorée par des équipes anglo-saxonnes, repose sur l'idée qu'un typage neuropathologique – fondé sur la localisation cérébrale des lésions et/ou des dépôts de PrPsc – pourrait être pratiqué directement sur le cerveau des ovins atteints (Gonzalez *et al* 2002, Ligios *et al* 2002). Les premiers résultats font surtout ressortir pour l'instant la difficulté de l'entreprise, une difficulté attendue dans la mesure où l'analyse porte sur une population génétiquement non homogène, contrairement à la souris. Le polymorphisme au locus *Prnp* n'étant pas seul en cause, il est délicat de faire la part de ce qui relève d'un effet souche ou du fond génétique au sein de la variation observée. Il semble néanmoins émerger de ces travaux la notion que l'analyse immuno-histochimique fournirait une base plus solide que le profil lésionnel dans une perspective de typage.

Un autre démarche, plus largement poursuivie, s'appuie sur l'analyse biochimique de la PrPsc extraite de tissus provenant des animaux atteints. L'examen en simple western blot du profil de migration de la fraction PrPsc résistante à la digestion protéolytique, la PrPres, fait en effet apparaître que l'abondance de chaque glycoforme (bi-, mono- et

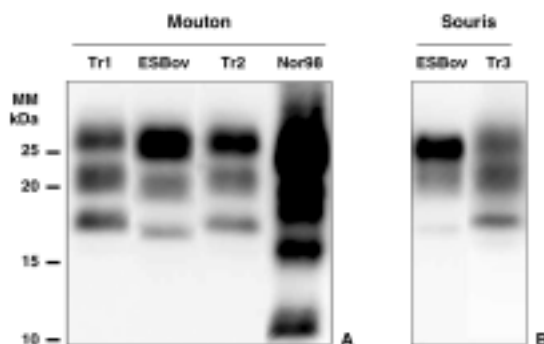
non glycosylée) ainsi que leur taille peut présenter des différences notables entre souches. C'est sur cette base qu'a été proposée une première classification des isolats de MCJ humains en quatre types majeurs (figure 1). Diverses équipes, françaises notamment, travaillent à la mise au point de tests western blot (Stack *et al* 2002) ou Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) dits « différentiels », avec pour objectif majeur de différencier l'agent bovin ESB des souches d'EST ovines classiques dans le cadre d'opérations de testage pratiquées à grande échelle.

Un réseau national de typage des souches d'EST infectant les petits ruminants, co-financé par le Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) Infections à Prions et la Direction Générale de l'Alimentation, regroupe l'ensemble des partenaires concernés par ces activités, dont trois équipes de l'INRA. L'identification d'un isolat montrant une signature moléculaire suspecte dans l'un des tests conduit à son inoculation à un panel de souris conventionnelles ou transgéniques. Plusieurs centaines d'isolats du terrain ont été analysés à ce jour dans le cadre de ce dispositif, sans qu'aucun d'entre eux n'ait manifesté un comportement identique à celui de l'agent ESB. Il est envisageable que, dans un futur plus ou moins proche, le typage biochi-

**Figure 1.** Typage biochimique des EST.

Le profil électrophorétique de la protéine PrPres (obtenue après traitement ménagé de la PrPsc par la protéinase K) extraite du cerveau des sujets infectés et révélée par la technique du western-blot varie selon les souches. Les différences observées portent sur deux critères qui sont tous les deux pris en compte pour analyser le profil : la masse moléculaire (en kilodaltons) de la bande la plus basse et la proportion de chaque glycoforme bi-, mono- et non-glycosylée. Chez le mouton, par exemple, le profil de la PrPres de l'ESB inoculée expérimentalement (ESBov) ou celui de la souche de tremblante atypique norvégienne (Nor98) sont particulièrement caractéristiques et se distinguent d'autres souches de tremblante plus classiques (Tr1 et Tr2) (révélation anticorps 8G8) (A). On retrouve les mêmes différences chez la souris C57BL après inoculation de l'ESB « ovinisée » ou d'un isolat de tremblante (révélation anticorps 2D6) (B).

Cette technique a permis de distinguer quatre types de profils dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (Collinge *et al* 1996).



mique des isolats ovins puisse, après une étape intermédiaire de validation par transmission à la souris, se substituer au typage biologique, ce qui constituerait un progrès important tant au plan pratique qu'éthique.

#### 4 / Un exemple de tremblante atypique : le type Nor98

En Norvège, entre 1998 et mai 2004, 38 cas de tremblante d'un type nouveau, nommé Nor98, (contre 10 cas de tremblante dite « classique » dans ce pays au cours de la même période) ont été enregistrés. Les caractéristiques inhabituelles de cette infection ont d'emblée permis aux scientifiques du National Veterinary Institute d'Oslo de suspecter une forme de tremblante originale (Benestad *et al* 2003). Toutes les races ovines rencontrées en Norvège sont concernées et la moyenne d'âge des animaux positifs est de l'ordre de 6 ans contre 3 ans pour les cas classiques. Aucun cas n'a été décrit chez des individus porteurs de l'allèle VRQ, génotype habituellement sensible, et 62 % des cas portent l'allèle AHQ, généralement associé à une résistance marquée à la tremblante. Le séquençage du gène *Prnp* chez quelques animaux atteints de différents génotypes n'a pas mis en évidence de mutation particulière dans la région codante.

Les symptômes observés se résument à de l'ataxie et de l'anxiété, sans prurit ni perte de laine, deux manifestations souvent rencontrées dans la tremblante. Les lésions de spongieuse, lorsqu'elles sont présentes, se rencontrent principalement dans les cortex cérébral et cérébelleux, et jamais dans la région de l'obex, l'un des tissus les plus touchés dans la tremblante classique, et choisi pour cette raison comme zone de référence pour le diagnostic officiel des EST animales.

Les dépôts de PrPsc dans l'encéphale sont de l'ordre de 8 à 10 fois plus faibles chez les animaux Nor98 que dans les cas de tremblante classiques. En collaboration avec nos collègues norvégiens et le laboratoire départemental d'analyses (LDA) de Tours, nous avons montré qu'ils ne sont mis en évidence en ELISA ou western-blot que par l'utilisation de méthodes incluant une étape de concentration de la PrPsc dans le processus d'extraction. En western-blot, la PrPres présente un profil inédit jusqu'alors en tremblante – mis en évidence pour la première fois à l'INRA de Tours – avec une bande majeure diffuse autour de 12 kDa, quel que soit le génotype du mouton (figure 1).

Lorsque le marquage en immunohistochimie de la PrPsc est positif, il est net et souvent marqué dans le cervelet et parfois le mésencéphale, alors qu'il est, en raison d'une distribution faible et diffuse, plus difficile à distinguer du bruit de fond dans les autres régions du cerveau. Dans aucun des cas Nor98, ce marquage n'a été positif au niveau de l'obex dans la région du noyau dorsal moteur du nerf vague, concerné au premier chef dans les cas de tremblante classique (van Keulen *et al* 2000). De même, aucune

accumulation de PrPsc n'a été observée dans les tissus lymphoïdes des animaux atteints, quel que soit leur génotype (alors que, par exemple, chez les ovins ARQ/ARQ, certains de ces tissus sont positifs dans les semaines qui suivent la naissance en tremblante classique) et quelle que soit la méthode de détection utilisée : immunohistochimie, ELISA ou western-blot.

La transmission d'un isolat AHQ/AHQ aux souris conventionnelles utilisées pour le typage a échoué, après 850 jours d'incubation, sans doute en raison de la présence d'une alanine en position 136 sur la protéine PrP (voir 3.2). En revanche, l'inoculation de cet isolat à des souris transgéniques de la lignée tg338 surexprimant l'allèle VRQ ovin a permis une transmission efficace, avec un temps de survie moyen de l'ordre de 300 et 200 jours en passages primaire et secondaire, respectivement. L'analyse en western blot a en outre montré que la PrPres extraite du cerveau de ces souris présentait le même profil atypique que celui des moutons, et qu'aucune accumulation n'était détectable dans la rate. Ces observations établissent pour la première fois qu'un agent infectieux est bien à l'origine des cas sporadiques Nor98 et que cette souche conserverait ses caractéristiques après adaptation aux souris transgéniques.

La pathogénèse de cette infection mérite une étude approfondie, dans la mesure où l'absence de dépôts de PrPsc détectables dans les organes lymphoïdes pourrait éventuellement refléter un mode de contamination inhabituel. D'autre part, le ciblage apparent des génotypes Alanine 136 soulève la question d'une possible propagation chez des animaux de génotypes ARR. Enfin, le profil très particulier de la PrPres en western-blot fait du type Nor98 un bon modèle d'étude de la relation structure de la PrPsc-phénotype de souche. Afin de répondre à ces questions, un projet incluant divers laboratoires INRA (PII, PRC et Spectrométrie de masse à Tours-Nouzilly, VIM à Jouy-en-Josas et ENV-Toulouse) et deux laboratoires étrangers (S. Benestad, Norvège et A. Bossers, Pays-Bas) vient d'être financé par le GIS-Infections à Prions.

#### 5 / Souches, barrière d'espèce et évolution phénotypique

La diversité des souches d'EST observée au sein d'une même espèce soulève d'autres questions importantes : celle de la relation entre effet souche et potentiel de transmission interspécifique, et celle des mécanismes qui sous-tendent leur évolution phénotypique, notamment lors d'un franchissement de barrière d'espèce.

L'accumulation des données résultant de la transmission expérimentale d'isolats d'EST naturels au rongeur, ou d'une souche adaptée d'un rongeur à un autre rongeur, aboutit à une double constatation. Tout d'abord, l'aptitude de l'agent EST à provoquer une maladie chez une autre espèce varie considérablement d'une souche à l'autre (Bruce et Fraser 1991,

Collinge *et al* 1996). La notion de barrière de transmission semble donc plus appropriée que celle de barrière d'espèce pour décrire un tel phénomène. L'issue d'une infection hétérologue semble dépendre au premier chef d'une interaction entre la souche d'agent présente chez le donneur et la PrPc du receveur, beaucoup plus que du degré d'homologie entre les séquences PrPc des espèces considérées. D'autre part, il apparaît que le franchissement de cette barrière peut s'accompagner ou non d'une perte des propriétés phénotypiques de l'agent (Bruce et Fraser 1991). Un exemple particulièrement bien documenté est celui de la transmission d'un isolat (Stetsonville) d'EST du vison au hamster, qui conduit à l'isolement de deux souches stables nettement distinctes au plan pathologique et biochimique, désignées « hyper » et « drowsy » (Bessen et Marsh 1992). A l'inverse, certaines souches, et l'agent ESB en est un exemple remarquable, tendent à conserver leurs propriétés après transmission à un nouvel hôte. Cette stabilité est d'autant plus intrigante qu'une instabilité phénotypique se manifeste parfois lors de la transmission en série d'une souche dans une même lignée pure de souris (par exemple, émergence de la souche ME7 à partir de la souche 87A chez la souris C57BL).

La souris transgénique exprimant un gène *Prnp* de la même séquence que celui du donneur constitue a priori un modèle de choix pour étudier le degré d'implication de la PrPc du receveur dans les phénomènes décrits plus haut. En d'autres termes, l'expression d'un gène *Prnp* homologue à celui du donneur est-elle suffisante pour abolir la barrière de transmission interspécifique, et assurer notamment un maintien du phénotype de souche ? De façon remarquable, la transmission d'isolats représentatifs des quatre types de MCJ humain à une lignée de souris trans-

géniques exprimant la PrP humaine conduit à un maintien de leurs caractéristiques respectives (Collinge 2001). Cependant, des travaux réalisés à l'INRA de Jouy-en-Josas incitent à relativiser ces conclusions. En effet, la transmission homologue de plusieurs isolats de génotype VRQ – dont un isolat issu de la Station Expérimentale de Langlade – à des souris transgéniques tgOv-VRQ, a produit des résultats complexes et pour le moins surprenants. La transmission à des lignées qui sur-expriment la PrP conduit à l'individualisation de deux souches stables distinctes, ayant l'une et l'autre un phénotype différent de celui de l'isolat de départ, tandis que la propagation de ce même isolat sur des lignées qui expriment la PrP à un niveau proche de celui du mouton permet le maintien d'une souche proche de l'isolat naturel. Ces observations sont sans doute importantes, car elles incitent à penser que l'expression d'une PrP homologue ne garantit pas une abolition complète de la barrière de transmission, et que d'autres déterminants, dont le niveau d'expression de la PrP, pourraient moduler l'évolution phénotypique des souches d'EST tout aussi efficacement que la confrontation de l'agent à une nouvelle séquence de PrP.

## Conclusion

Ainsi que cette synthèse a tenté de l'illustrer, l'étude et la caractérisation des souches d'EST revêtent une importance particulière tant au plan purement cognitif qu'à celui de la santé publique. Les travaux présentés montrent une forte implication de l'INRA, qu'il s'agisse de sa contribution à l'effort de typage engagé à l'échelon national et européen, ou de la mise au point de nouveaux outils visant à pallier les limitations des méthodes actuelles.

## Références

- Baylis M., Houston F., Kao R.R., McLean A.R., Hunter N., Gravenor M.B., 2002. BSE - a wolf in sheep's clothing? *Trends in Microbiology*, 10, 563-570.
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M.A., Bratberg B., 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record*, 153, 202-208.
- Bessen R.A., Marsh R.F., 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *Journal of General Virology*, 73, 329-334.
- Bruce M.E., 2003. TSE strain variation. *British Medical Bulletin*, 66, 99-108.
- Bruce M.E., Fraser H., 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 172, 125-138.
- Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCordle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J., 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 498-501.
- Bruce M.E., Boyle A., Cousens S., McConnell I., Foster J., Goldmann W., Fraser H., 2002. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *Journal of General Virology*, 83, 695-704.
- Buschmann A., Biacabe A.G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J.Y., Erhardt G., Luhken G., Baron T., Groschup M.H., 2004. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods*, 117, 27-36.
- Collinge J., 2001. Prion diseases of human and animals: Their causes and molecular basis. *Annual Review Neuroscience*, 24, 519-550.
- Collinge J., Sidle K.C., Meads J., Ironside J., Hill A.F., 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383, 685-690.
- Goldman W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J., 1994. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *Journal of General Virology*, 75, 989-995.
- Gonzalez L., Martin S., Begara-McGorum I., Hunter N., Houston F., Simmons M., Jeffery M., 2002. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with sheep scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 126, 17-29.
- Houston F., Goldman W., Chong A., Jeffery M., Gonzalez L., Foster J., Parnham D., Hunter N., 2003. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 423, 498.
- Ligios C., Jeffrey M., Ryder S.J., Bellworthy S.J., Simmons M.M., 2002. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology*, 127, 45-54.

Moreno C.R., Lantier F., Lantier I., Sarradin P., Elsen J.M., 2003. Detection of new quantitative trait loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, 165, 2085-2091.

Prusiner S., 1998. Prions. *Proceedings National Academy of Sciences of the USA*, 95, 13363-13383.

Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F.E., Prusiner S.B., 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nature Medicine*, 4, 1157-1165.

Stack M.J., Chaplin M.J., Clark J., 2002. Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathologica*, 104, 279-286.

Tuite M.F., 2004. Cell biology: the strain of being a prion. *Nature*, 18, 265-267.

Van Keulen L.J., Schreuder B.E., Vromans M.E., Langeveld J.P., Smits M.A., 2000. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology Supplementum*, 57-71.

Vilotte J.L., 2004. Variabilité génétique de la résistance aux ESST chez l'animal. *Productions Animales*, Numéro hors série, 61-66.

Vilotte J.L., Laude H., 2002. Transgenesis applied to transmissible spongiform encephalopathies. *Transgenic Research*, 11, 547-564.

Vilotte J.L., Soulier S., Essalmani R., Stinnakre M.G., Vaiman D., Lepoury L., Da Silva J.C., Besnard N., Dawson M., Buschmann A., Groschup M., Petit S., Madelaine M.F., Rakatobe S., Le Dur A., Vilette D., Laude H., 2002. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *Journal of Virology*, 75, 5977-5984.

---

## Abstract

### *Strain diversity in transmissible spongiform encephalitis of ruminants: concerns, facts and prospects*

A hallmark of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) or prion diseases is the accumulation in nervous tissues of an abnormally folded form of the host protein PrP<sup>c</sup>. This misfolded isoform (PrP<sup>sc</sup>) is assumed to be responsible for the observed neurodegenerative disorders, and is the only component specifically associated with prion infectivity yet identified. The most widely held view is that prions propagate epigenetically, through the conversion of PrP<sup>c</sup> into PrP<sup>sc</sup>. A phenomenon at the heart of the research on prion diseases is the existence of phenotypical variants, or strains. Prion strains can be differentiated on a biological basis, since different strains induce different anatomic-pathological manifestations upon propagation into the same host, and on a biochemical

basis, i.e. the molecular profile of PrP<sup>sc</sup> accumulating in the brain of the diseased individuals. However, the precise biological and molecular mechanisms underlying such diversity and the evolution dynamics that it implies, remain to be learned. Investigating prion strain variation in naturally infected species, such as sheep and humans, is a highly demanding task, albeit crucial for a better knowledge of the epidemiology of these diseases, their control on the field, and the protection of human health. Research carried out by INRA laboratories is aimed at documenting TSE strain diversity in ruminants through the typing of natural sheep scrapie isolates, and at improving our understanding of this phenomenon. One way to achieve these objectives is to develop faster and more reliable typing methods, including through the development of transgenic mice exhibiting a higher susceptibility to transmission over conventional mice.