

¹ INRA, Laboratoire de Pathologie infectieuse et immunologie, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

² INRA, Département de génétique animale, Domaine de Langlade, Pomportuzat, F-31450 Montgiscard

³ UMR INRA-ENVT, Unité mixte de recherche Interactions hôtes-agents pathogènes, ENVT, 23 Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex

⁴ INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, Chemin de Borde-Rouge-Auzeville, BP 27, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex

Courriel : lantier@tours.inra.fr

Le diagnostic des encéphalopathies spongiformes chez les ruminants

Introduction

Chez l'animal, le diagnostic des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) a tout d'abord reposé sur les signes cliniques et la description des lésions de vacuolisation observées dans le Système Nerveux Central (SNC). Bien que ces aspects soient loin d'avoir été décrits complètement et fassent encore l'objet de recherches (encadré 1),

Résumé

Le diagnostic des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) des ruminants est aujourd'hui basé sur la mise en évidence de l'isoforme pathologique, résistante à la protéinase K, de la protéine PrP, la PrPres. La PrPres peut être mise en évidence *in situ*, à l'aide de techniques immunohistochimiques ou, bien après extraction et traitement à la protéinase K, par des techniques immunochimiques (western blot, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Si le diagnostic de routine des encéphalopathies spongiformes animales a fait de gros progrès ces dernières années, il demeure un diagnostic post-mortem qui n'est applicable qu'aux tissus nerveux d'animaux suffisamment âgés pour permettre la formation de dépôts de PrPres dans le système nerveux central. La biopsie d'amygdales offre une possibilité de diagnostic ante-mortem chez les seuls animaux dont le tissu lymphoïde présente une accumulation de PrPres, les ovins génétiquement sensibles et la chèvre. Deux voies de développement des tests sont poursuivies actuellement : d'une part la mise au point d'un diagnostic sanguin précoce basé sur la détection de PrPres ou d'un autre marqueur spécifique de l'incubation d'une EST, et d'autre part des tests permettant de distinguer entre elles les souches de prion, notamment la souche Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB). Ces évolutions constitueraient un progrès considérable pour notre compréhension des modes de transmission des EST et pour l'efficacité de la prophylaxie sanitaire.

le diagnostic des encéphalopathies spongiformes animales s'appuie essentiellement sur la mise en évidence du seul marqueur spécifique consensuel : la présence d'une isoforme pathologique de la protéine PrP, la PrPsc (sc pour scrapie) ou PrPres (res pour résistante aux protéases). Des techniques d'immunohistochimie, de western blot et des tests Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) permettent un diagnostic de routine post-mortem sur les animaux dont le stade d'incubation de la maladie est suffisant pour que la PrPres se soit accumulée dans le cerveau. Chez certaines espèces (petits ruminants, cervidés sauvages), la PrPres est également détectable, et ce de façon précoce, dans les organes du système immunitaire des animaux. Mais l'exploitation en matière de diagnostic de cette signature du développement de la maladie doit tenir compte du génotype au gène *Prnp* de l'animal et de la souche d'EST probablement en cause (Schelcher *et al* 2004, ce numéro).

Les développements en cours ou prévisibles du diagnostic des EST sont d'une part d'aboutir à un diagnostic différentiel de la souche d'EST en cause, en particulier en faisant la distinction entre la souche de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) et les souches des autres EST (Sarradin et Laude 2004, ce numéro), et d'autre part de

Encadré 1. Signes cliniques et comportements associés aux EST chez les ovins.

E. BIDEAU¹, M.L. MAUBLANC¹, O. ANDREOLETTI², P. BERNARDET³, F. EYCHENNE⁴, J.M. ELSÉN¹,
G. LE PAPE, F. LANTIER³, F. SCHELCHER²

¹ INRA, Chemin de Borde-Rouge-Auzeville, BP 27, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex

² UMR ENVT-INRA, 23 chemin des Capelles, F-31076 Toulouse

³ INRA, Unité de Pathologie infectieuse et immunologie, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

⁴ INRA, Domaine expérimental de Langlade, Domaine de Langlade, Pompertuzat, F-31450 Montgiscard

Parmi les modèles animaux atteints d'EST, les petits ruminants font l'objet de nombreux travaux, notamment en génétique et physiopathologie, tandis que les signes cliniques et comportementaux associés à ces maladies sont très peu étudiés. Pourtant, tant pour la détection de la maladie dans les troupeaux que pour des besoins expérimentaux, un diagnostic précoce est nécessaire. En outre, la caractérisation d'isolats distincts d'EST permet de comparer entre elles les souches et pourrait fournir des indices utiles en épidémiologie. L'outil de référence pour ce faire est le typage biologique après inoculation à la souris. La symptomatologie pourrait-elle constituer un outil complémentaire de typage ?

Le programme mis en œuvre a pour objectif : (i) d'évaluer la possibilité de discriminer les souches d'EST (trois isolats de tremblante et un isolat d'ESB) à partir des modifications comportementales et du tableau clinique qu'elles provoquent chez les ovins ; (ii) de déterminer et de quantifier les modifications comportementales précoces (précédant les signes cliniques) qui apparaissent chez les ovins en incubation ; (iii) d'estimer chez les animaux atteints les corrélations existant entre la nature et la distribution des lésions neuropathologiques et les troubles cliniques et comportementaux ; (iv) de proposer une méthodologie d'aide au diagnostic précoce.

Les études sont menées sur trois lots expérimentaux : deux lots de moutons Romanov et Poll-

Dorset atteints de tremblante et un lot de Poll-Dorset inoculés avec l'ESB. Les signes cliniques d'un lot de mouflons méditerranéens (*Ovis gmelini*) atteints de tremblante est également analysé de façon comparative. Le statut d'infection des animaux est estimé par des biopsies d'amygdales. Un suivi clinique systématique et régulier est réalisé à partir d'une grille ouverte de tous les symptômes actuellement décrits. Par ailleurs, les animaux sains et malades sont filmés dans un dispositif standard permettant de quantifier les comportements. En phase terminale de la maladie, les animaux sont sacrifiés et les profils lésionnels du système nerveux central sont établis. Ceci nous permet de conclure sur l'existence de tableaux cliniques ou lésionnels différenciés en fonction des souches de tremblante et en cas d'ESB. Dans un deuxième temps, en sacrifiant un dernier lot d'animaux à des étapes-clés de l'apparition ou de l'aggravation des symptômes, on cherchera à mettre en relation les troubles cliniques ou comportementaux observés avec les profils lésionnels au niveau du système nerveux central.

Actuellement, l'expérimentation sur le lot de Poll-Dorset inoculé avec l'ESB (INRA Tours) est terminée et les films sont en cours d'analyse, ainsi que ceux réalisés sur les mouflons. Une expérimentation sur un lot de moutons Romanov atteints de tremblante naturelle est en cours au Domaine de Langlade (Toulouse). La dernière expérimentation sur un lot de moutons inoculés avec une souche de tremblante est engagée à l'ENV de Toulouse.

développer un test ante-mortem de détection des animaux en phase d'incubation de la maladie. Dans cette perspective, plusieurs approches sont mises en œuvre. La plus classique a pour objectif la détection de PrPres dans le sang des animaux infectés grâce à l'utilisation de techniques dont le seuil inférieur de détection de la PrPres soit le plus faible possible : électrophorèse capillaire, chromatographie haute performance, ELISA. D'autres s'efforcent de détecter des marqueurs de l'état d'incubation de l'hôte en recherchant de nouveaux ligands de la PrP ou bien de nouvelles signatures par l'étude de l'expression différentielle de certains gènes chez les animaux malades.

1 / Le diagnostic clinique et lésionnel de la tremblante et de l'ESB

Les noms " Tremblante " et " Scrapie " (de l'anglais *scrape* : gratter), font allusion aux signes cliniques dominants rencontrés dans la maladie du mouton : troubles moteurs et prurit. La phase clinique de la maladie survient

après une durée d'incubation longue pouvant varier de 1 à 3 ans ou plus. Les manifestations cliniques peuvent durer de 1 mois à 1 an. De nature neurologique, les signes cliniques varient en nombre et en intensité selon l'animal et la " souche " de l'agent infectieux en cause. Discrets au début, ils s'aggravent progressivement. On distingue classiquement, associés ou non (Detwiler 1992) :

1) des troubles du comportement (perte de l'instinct grégaire, hyperexcitabilité, anxiété, agressivité),

2) un prurit localisé d'abord à la tête, puis au dos, puis généralisé au corps entier et qui entraîne des pertes de laine et des lésions cutanées parfois sévères sur les zones de grattage,

3) des troubles moteurs (tremblements de la tête puis du corps entier, défaut de posture, troubles de la miction, incoordination locomotrice, et finalement impossibilité pour l'animal de se relever). L'animal en phase terminale est maigre, sale, présente une toison délabrée, des lésions de grattage et ne peut se tenir debout.

Il peut exister des formes moins typiques, telles que la forme "léthargique" (« drowsy » en anglais) décrite chez la chèvre et transmissible au mouton, qui se résume à une paralysie progressive, sans prurit ni tremblement.

C'est aussi le cas en matière d'ESB chez les bovins où les signes cliniques de troubles du comportement et de troubles locomoteurs sont parfois frustes (Cazeau *et al* 2004, Saegerman *et al* 2004). Afin de comparer les signes cliniques d'ovins infectés par la tremblante et l'ESB, une équipe d'éthologie du centre INRA de Toulouse a entrepris une observation systématique d'animaux infectés par ces deux souches (encadré 1).

D'une manière générale, les signes cliniques permettent de suspecter une EST mais ne sont pas suffisants pour le diagnostic.

L'autopsie ne permet pas la détection de lésions macroscopiques spécifiques de la maladie. En revanche, les lésions microscopiques rencontrées au niveau du SNC, encéphale et moelle épinière, sont caractéristiques des EST. Ce sont essentiellement :

- 1) une vacuolisation des neurones à l'origine de la spongiose (d'où le qualificatif "spongiforme" donné à ces affections),
- 2) une perte neuronale plus ou moins marquée,
- 3) la présence, assez rare comparée à d'autres EST, de "plaques amyloïdes" (colorables au rouge Congo) correspondant à l'accumulation de PrP^{Sc} sous forme agrégée,
- 4) une multiplication des astrocytes (astrocytose), cellules du cerveau à fonction immunitaire et nourricière vis-à-vis des neurones, dont la signification est encore mal connue.

Ces lésions se répartissent de façon variable dans diverses zones de l'encéphale (bulbe, protubérance, cervelet, mésencéphale principalement chez le mouton). L'intensité et la répartition des lésions de vacuolisation constituent un profil lésionnel qui dépend à la fois de la souche, de l'espèce hôte concernée, et du génotype au gène *Prnp* de l'individu atteint (Sarradin et Laude 2004, ce numéro). Mais si ce profil lésionnel est un outil de diagnostic très performant pour discriminer les souches entre elles après transmission à des lignées consanguines de souris de laboratoire, qui constituent un matériel génétique homogène reproductible, son utilisation directement chez l'animal atteint ne permet pas une identification fiable de la souche en cause (Begara-McGorum *et al* 2002). Une exception pourrait être la détection de plaques amyloïdes qui peut contribuer au diagnostic d'une infection de l'homme ou de l'animal par la souche ESB (Crozet *et al* 2001).

L'anatomopathologie permet le diagnostic des EST et était encore il y a quelques années la seule technique de référence ; néanmoins, elle est assez contraignante et longue à mettre en œuvre, ce qui explique le développement récent d'autres techniques diagnostiques.

2 / Le diagnostic immunologique des EST des ruminants

2.1 / La PrPres

La PrP cellulaire (PrPc) est une protéine normale de l'hôte dont les fonctions sont probablement multiples mais encore très mal connues. Son ancrage dans la membrane cellulaire est en faveur d'un rôle de récepteur ou de co-récepteur de molécules impliquées dans la signalisation cellulaire (Mouillet-Richard *et al* 2000). Un rôle de chaperonne, c'est-à-dire de régulation de la conformation des protéines et/ou des acides nucléiques (Derrington et Darlix 2002), une fonction de neuroprotection (Zanata *et al* 2002) contre les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) et une implication dans la régulation du métabolisme du cuivre (Brown *et al* 2004) sont également des fonctions de la PrP cellulaire pour lesquelles il existe des arguments solides. Lors du processus pathologique, la PrP s'accumule dans les tissus lymphoïdes puis dans les tissus nerveux sous forme d'aggrégats résistants à l'action des protéases, et notamment de la protéinase K, d'où la dénomination de PrPres de cette isoforme pathologique. Au début des années 1980, Stanley Prusiner (Prusiner 1982) a fait l'hypothèse que cette protéine constituait à elle seule l'agent infectieux des EST. Bien que cette hypothèse demeure très discutée, la PrPres n'en demeure pas moins la seule signature spécifique des EST. Le diagnostic des encéphalopathies spongiformes, au moins chez l'animal, est actuellement basé sur la détection de cette protéine.

2.2 / La détection immunologique de la PrPres

L'absence de réactifs spécifiques de la PrPres, c'est-à-dire de ligands capables de distinguer la PrPres de la PrPc, a conduit toutes les équipes ayant développé des tests de diagnostic à associer un traitement des tissus par la protéinase K (dont l'objectif est la destruction de la PrP cellulaire normale) à une technique immunologique de détection de la PrPres.

L'immunohistochimie permet la détection des dépôts de PrPres directement dans les tissus infectés. Les tissus lymphoïdes ou nerveux sont fixés par le formol et inclus en paraffine. Après traitement par des enzymes protéolytiques, des étapes de démasquage de la PrP (acide formique, autoclavage) favorisent la fixation des anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisés (Kitamoto *et al* 1987). Des systèmes d'amplification par la formation de complexes biotine-streptavidine sont généralement utilisés. Ces techniques sont utilisées couramment pour confirmer le diagnostic d'encéphalopathie spongiforme dans les tissus nerveux. Elles ont également été appliquées à l'étude de la dissémination de l'agent des EST à partir du site de contamination intestinal (Schelcher *et al* 2004, ce numéro).

ro) et à la mise en évidence de dépôts de PrPres dans les amygdales chez les ovins génétiquement sensibles à la tremblante (Andréoletti *et al* 2002). Ces dépôts de PrPres sont visualisables dans les amygdales bien avant la contamination des tissus nerveux (Schreuder *et al* 1998, van Keulen *et al* 1999, 2002). Des biopsies d'amygdales constituent un moyen de diagnostic ante-mortem applicable aux ovins génétiquement sensibles aux EST dès l'âge de 6 mois (Andréoletti *et al* 2000).

a / Le western blot

La technique de western blot a été utilisée dès la mise en évidence des dépôts de PrPres dans le cerveau des animaux atteints (Prusiner 1998, Cohen et Prusiner 1998). L'obtention d'anticorps monoclonaux (Demart *et al* 1999) et l'amélioration des techniques d'amplification du signal et surtout d'extraction de la PrP à partir des tissus infectés a permis d'améliorer considérablement la sensibilité de cette technique, sans toutefois atteindre celle de l'ELISA ou de l'immunohistochimie. La standardisation des différentes étapes a permis à la société Prionics™ de proposer cette technique pour le diagnostic de routine des EST.

b / Les tests ELISA

Les tests ELISA ont pour intérêt leur grande sensibilité et leur automatisation aisée. Plusieurs tests ont été proposés ces dernières années pour le diagnostic de routine des EST animales, grâce aux efforts de plusieurs laboratoires européens pour l'obtention d'excellents anticorps monoclonaux (Deslys *et al* 2001). Des comparaisons au niveau européen, réalisées en aveugle sur 1300 échantillons ont permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité de chacun des tests utilisés aujourd'hui en routine sur tous les bovins de plus de 24 mois abattus en France et chez les ovins de plus de 6 mois (Grassi 2003, Grassi *et al* 2000, 2001).

Leur simplicité d'utilisation a entraîné le large développement des tests ELISA dans le dépistage à grande échelle des animaux positifs à l'abattoir et à l'équarrissage. Néanmoins, les autres tests gardent tout leur intérêt, d'une part pour confirmer avec d'autres méthodes les tests positifs, et d'autre part en tant qu'outils de recherche, par exemple dans les études de pathogénie.

2.3 / Perspectives

Le diagnostic différentiel de l'agent de la tremblante de celui de l'ESB permettrait de s'assurer de l'absence de contamination des troupeaux ovins et caprins par la souche ESB. A titre expérimental plusieurs techniques sont aujourd'hui utilisées au sein d'un réseau français sur un grand nombre d'isolats. Ces techniques sont basées sur la différence de sensibilité à la digestion par les protéases de la PrPres extraite de tissus contaminés par la tremblante ou par l'ESB. Les fragments digérés sont reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques de différents fragments de la

PrPres et peuvent être mis en évidence par l'une ou l'autre des techniques immunologiques décrites ci-dessus (Lezmi *et al* 2004). La variété des souches de tremblante nécessite l'évaluation d'un grand nombre d'isolats pour rendre compte de cette diversité ; par ailleurs, ces résultats doivent être comparés avec ceux de l'inoculation à la souris qui demeure le seul test de référence pour l'identification des souches.

a / La détection de très faibles quantités de PrPres : un outil de diagnostic ante-mortem ?

Le test mis au point par M.J. Schmerr (Schmerr et Jenny 1998, Jackman et Schmerr 2003) est un dosage immunologique par compétition qui permet de détecter des quantités très faibles de PrPres (de l'ordre de 135 pg) dans les tissus, y compris le sang. A partir de cette technique, le projet Fiatest (encadré 2) s'efforce de développer une méthode fiable qui permettrait de détecter la PrPres après extraction à partir des leucocytes sanguins. D'autres laboratoires travaillent également à la mise au point de techniques de détection de PrPres circulante, par exemple en améliorant la sensibilité des techniques classiques (ELISA, Western blot) de détection de la PrP.

b / Nouvelles approches : recherche de nouvelles signatures spécifiques du développement des maladies à prions

La recherche de nouveaux ligands de la PrPres constitue une des approches possibles. Plusieurs protéines ont été identifiées comme étant capables de lier la PrPres : le plasminogène (Fischer *et al* 2000, Lasmezas 2003), un récepteur à la laminine (Simoneau *et al* 2003), des protéines de stress (Zanata *et al* 2002, voir aussi la revue de Gauczynski *et al* 2001). Des acides nucléiques peuvent également lier spécifiquement la PrP. Ainsi plusieurs auteurs (Weiss *et al* 1997, Adler *et al* 2003, Rhie *et al* 2003) ont fait une recherche systématique d'ARN capable de se lier avec la PrP en utilisant la méthode Selex (encadré 3). Ces ligands, désignés aptamères, pourraient à terme constituer de nouveaux outils de détection de la protéine prion.

Plusieurs approches différentielles plus globales peuvent être appliquées à l'identification de molécules dont la modulation de l'expression pourrait fournir des éléments de diagnostic. Il s'agit dans ces projets d'identifier une ou plusieurs signatures caractérisant l'incubation par l'animal d'une infection par le ou les agents des EST. L'idée est de parvenir à dresser un profil physiologique ou/et immunologique spécifique de cette phase de la maladie. Ainsi, une technique d'analyse du transcriptome par « cDNA microarray » a été appliquée par Baker et Manuelidis (2003) à la recherche de transcrits spécifiques de la maladie de Creutzfeldt-Jacob dans les cellules microgliales de souris infectées expérimentalement. L'identification de plusieurs transcrits spécifiquement régulés au cours de la phase d'incubation de la maladie démontre l'intérêt de ce type d'approche pour la défini-

**Encadré 2. Présentation du projet européen « Fiatest »
A diagnostic test for abnormal prion protein in live animals based on fluorescent
immunoassay using capillary electrophoresis and HPLC.**

P. SARRADIN¹, F. GOULARD¹, F. EYCHENNE², D. EVEREST³, F. LANTIER¹

¹ INRA, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

² INRA, Domaine de Langlade, Pompertuzat, F-31450 Montgiscard

³ VLA, New Haw, Addlestone, Surrey, UK

Le projet « Fiatest » vise à développer et à évaluer un test fiable et sensible pour le diagnostic ante-mortem des encéphalopathies spongiformes transmissibles. Pour cela, le projet se base sur des études antérieures de détection de la PrPsc dans le sang de moutons atteints de tremblante par une technique d'électrophorèse capillaire. Le projet vise à transférer la technique vers une séparation par micro-HPLC.

La méthode utilisée consiste en un dosage immunologique en compétition qui implique un peptide porteur d'un fluorochrome, un anticorps anti-PrP et la PrPsc. Les complexes peptide-fluorochrome et peptide-fluorochrome-anticorps sont séparés puis détectés par mesure de la fluorescence induite par laser. Pour améliorer et évaluer cette méthode, plusieurs étapes vont être étudiées et optimisées :

extraction de la PrPsc dans l'échantillon, choix du peptide, de l'anticorps et du fluorochrome, conditions analytiques (électrophorèse capillaire et micro-HPLC) et système de détection. Le passage de la séparation par électrophorèse capillaire à la micro-HPLC permet de diminuer les temps d'analyse et d'envisager une automatisation du système d'analyse.

Cette procédure sera par la suite étendue à la détection de la PrPsc dans différents tissus et fluides de mouton puis de bovin. Les résultats obtenus seront validés par comparaison avec les méthodes de référence (Western-Blot, ELISA, immunohistochimie) et porteront sur des échantillons de contrôle positifs et négatifs obtenus auprès des différents partenaires du projet.

Encadré 3. Recherche et caractérisation d'ARN ligands de la protéine prion.

D. MARC¹, P. VAUDIN¹, R. MERCEY¹, S. TEMIM¹, M.-C. MAUREL², I. LANTIER¹, F. LANTIER¹

¹ INRA, Pathologie Infectieuse et Immunologie, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

² INRA, Physiologie de la reproduction et comportements, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly

La nature exacte de l'agent infectieux des encéphalopathies spongiformes, ainsi que la fonction biologique de la protéine prion, sont deux problèmes qui restent encore à élucider. La théorie prion, selon laquelle la protéine prion porte à elle seule le caractère infectieux, n'a toujours pas été formellement démontrée. L'existence de souches distinctes et stables de l'agent infectieux, ainsi que le phénomène d'adaptation observé lors de passages interspécifiques sont plutôt en faveur d'une nature plus classique de l'agent infectieux, contenant un génome. Les deux principales hypothèses alternatives sont celle d'un virus ayant jusqu'à présent échappé aux recherches, et celle d'un virino, un petit acide nucléique pas nécessairement codant associé à la protéine PrP.

Enfin, la protéine PrP recombinante montre des propriétés de chaperonne à l'égard des acides nucléiques, en particulier des ARN, et réciproquement des résultats récemment publiés montrant que des molécules d'ARN facilitent la conversion *in vitro* de PrP normale en PrPres.

Sur la base de ces observations, et en posant l'hypothèse que la protéine prion interagit avec des acides nucléiques, nous avons cherché à identifier des ARN qui se lient *in vitro* à la protéine prion. Ces molécules pourraient contenir des motifs caractéristiques des acides nucléiques qui interagissent *in vivo* avec la protéine prion, soit en tant que ligands physiologiques, soit en tant que composant de l'agent infectieux. En utilisant la protéine

prion ovine recombinante, nous avons isolé, par une méthode de sélection *in vitro* (SELEX) appliquée à un large répertoire de séquences synthétiques, des ARN ligands (aptamères) de la protéine PrP recombinante. Par construction, ces aptamères sont des ARN de 80 nucléotides comportant une région centrale de 40 nucléotides aléatoires, flanquée par deux séquences fixes de 20 nucléotides. Les séquences de plus de 150 clones sélectionnés sont réparties dans plusieurs familles dont les membres présentent des motifs nucléotidiques communs.

L'interaction de ces ligands avec la PrP recombinante a été étudiée par le système Biacore. La protéine recombinante étant fixée à la surface d'une « sensorchip », les vitesses d'association et de dissociation des aptamères injectés ont permis de calculer leurs constantes d'affinité. La meilleure affinité a été observée pour l'aptamère représentant la plus grande famille. Ces aptamères pourraient ainsi constituer de nouveaux outils de détection de la protéine prion.

Nous avons recherché dans les banques de séquences les motifs nucléotidiques ou des éléments structuraux présents dans les aptamères synthétiques. Cela ne nous a pas permis pour l'instant d'identifier de manière univoque de possibles ligands naturels de la PrP. Cette recherche de ligands naturels est poursuivie par d'autres approches, parmi lesquelles la recherche d'ARN liés *in vivo* à la protéine PrP normale ou pathologique extraite de tissus d'animaux sains ou malades.

tion de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques.

Conclusion

Une marge de progrès considérables existe manifestement dans le domaine du diagnostic des encéphalopathies spongiformes. Chez l'animal, un diagnostic précoce permettrait l'élimination des animaux porteurs, susceptibles de transmettre ces maladies dans les troupeaux. Il permettrait également d'éliminer totalement de l'alimentation humaine les animaux contaminés tout en allégeant considérablement les mesures d'abattage des trou-

peaux qui représentent à la fois un coût important et un traumatisme sérieux pour le monde de l'élevage. Les différentes approches évoquées au cours de la réunion du Croisic sont prometteuses et devraient à terme permettre une détection soit de la PrPres, soit de nouveaux marqueurs des EST dans le sang ou les tissus nerveux périphériques des animaux atteints.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier C. Ducrot pour sa relecture attentive de cette revue et ses excellentes suggestions.

Références

- Adler V., Zeiler B., Kryukov V., Kascsak R., Rubenstein R., Grossman A., 2003. Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 332, 47-57.
- Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., 2000. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, 81, 3115-3126.
- Andréoletti O., Berthon P., Levavasseur E., Marc D., Lantier F., 2002. Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 50, 1357-1370.
- Baker C.A., Manuelidis L., 2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 100, 675-679.
- Begara-McGorum I., Gonzalez L., Simmons M., Hunter N., Houston F., 2002. Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *Journal of Comparative Pathology*, 127, 59-68.
- Brown D.R., Guantieri V., Grasso G., Impellizzeri G., Pappalardo G., 2004. Copper(II) complexes of peptide fragments of the prion protein. Conformation changes induced by copper(II) and the binding motif in C-terminal protein region. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 133-143.
- Cazeau G., Ducrot C., Collin E., Desjouis G., Calavas D., 2004. Questionnaire analysis of BSE cases in France detected by active surveillance and the reasons for non-notification. *Veterinary Record*, 154, 133-136.
- Cohen F.E., Prusiner S.B., 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 793-819.
- Crozet C., Bencsik A., Flamant F., Lezmi S., Samarut J., Baron T., 2001. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Reports*, 2, 952-956.
- Demart S., Fournier J.G., Creminon C., Frobert Y., Lamoury F., 1999. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265, 652-657.
- Derrington E.A., Darlix J.L., 2002. The Enigmatic Multifunctionality of the Prion Protein. *Drug News and Perspectives*, 15, 206-219.
- Deslys J.P., Comoy E., Hawkins S., Simon S., Schimmel H., 2001. Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, 409, 476-478.
- Detwiler L.A., 1992. Scrapie. *Revue Scientifique et Technique*, 11, 491-537.
- Fischer M.B., Roeckl C., Parizek P., Schwarz H.P., Aguzzi A., 2000. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408, 479-483.
- Gauczynski S., Hundt C., Leucht C., Weiss S., 2001. Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Advances in Protein Chemistry*, 57, 229-272.
- Grassi J., 2003. Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests. *Transfusion Clinique et Biologique*, 10, 19-22.
- Grassi J., Creminon C., Frobert Y., Fretier P., Turbica I., 2000. Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Archives of Virology Supplementum*, 197-205.
- Grassi J., Comoy E., Simon S., Creminon C., Frobert Y., 2001. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Veterinary Record*, 149, 577-582.
- Jackman R., Schmerr M.J., 2003. Analysis of the performance of antibody capture methods using fluorescent peptides with capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Electrophoresis*, 24, 892-896.
- Kitamoto T., Ogomori K., Tateishi J., Prusiner S.B., 1987. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Laboratory Investigations*, 57, 230-236.
- Lasmezas C.I., 2003. Putative functions of PrP(C). *British Medical Bulletin*, 66, 61-70.
- Lezmi S., Martin S., Simon S., Comoy E., Bencsik A., 2004. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical methods. *Journal of Virology*, 78, 3654-3662.
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J.L., Lehmann S., 2000. Signal transduction through prion protein. *Science*, 289, 1925-1928.
- Prusiner S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner S.B., 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 13363-13383.
- Rhie A., Kirby L., Sayer N., Wellesley R., Disterer P., Sylvester I., Gill A., Hope J., James W., Tahiri-Alaoui A., 2003. Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 39697-39705.

Saegerman C., Speybroeck N., Roels S., Vanopdenbosch E., Thiry E., 2004. Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 172-178.

Sarradin P., Laude H., 2004. Diversité des souches d'Encéphalopathie Spongiforme Transmissible chez les ruminants : enjeux, bilan et perspectives. *Productions Animales*, Numéro hors série, 13-20.

Schelcher F., Andréoletti O., Tabouret G., Lacroux C., Foucras G., Eychemme F., Berthon P., Sarradin P., Lantier F., Elsen J.M., 2004. Pathogénèse des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles : apports du modèle ovin. *Productions Animales*, Numéro hors série, 23-30.

Schmerr M.J., Jenny A., 1998. A diagnostic test for scrapie-infected sheep using a capillary electrophoresis immunoassay with fluorescent-labeled peptides. *Electrophoresis*, 19, 409-414.

Schreuder B.E., van Keulen L.J., Vromans M.E., Langeveld J.P., Smits M.A., 1998. Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Veterinary Record*, 142, 564-568.

Simoneau S., Haik S., Leucht C., Dormont D., Deslys J.P., 2003. Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP. *Biological Chemistry*, 384, 243-246.

van Keulen L.J., Schreuder B.E., Vromans M.E., Langeveld J.P., Smits M.A., 1999. Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 121, 55-63.

van Keulen L.J., Vromans M.E., van Zijderveld F.G., 2002. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 110, 23-32.

Weiss S., Proske D., Neumann M., Groschup M.H., Kretzschmar H.A., Famulok M., Winnacker E.L., 1997. RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *Journal of Virology*, 71, 8790-8797.

Zanata S.M., Lopes M.H., Mercadante A.F., Hajj G.N., Chiarini L.B., 2002. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO Journal*, 21, 3307-3316.

Abstract

Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in ruminants

The diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in ruminants relies on the detection of PrPres, the proteinase K (PK)-resistant pathological isoform of the prion protein. The latter can be detected *in situ* by immuno-histochemical methods, or by immunological methods following extraction from tissues and PK treatment (Western-blot, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Although considerable progress has been made in recent years in routine TSE diagnosis, it remains a post-mortem detection that is only possible in brain tissues from adult animals in which

sufficient amounts of PrPres have accumulated. Tonsil biopsies allow an ante-mortem diagnosis only in animals whose lymphoid tissues contain PrPres, i.e. sheep of susceptible genotypes and goats. Other methods are currently being explored : these are aimed at detecting in the blood either PrPres or a marker specifically expressed during the incubation period. In addition, a search is currently under way for tests that could distinguish strains of TSE, or specifically recognise the bovine spongiform encephalopathy strain. Such improvements should represent a considerable progress towards a better understanding of TSE transmission and epidemiology, which in turn may help in defining new prevention strategies.

