



**HAL**  
open science

# Etude de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine Expérimentalement Transmise aux Ovins

Stephane Lezmi

► **To cite this version:**

Stephane Lezmi. Etude de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine Expérimentalement Transmise aux Ovins. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : 52-2004 . tel-00944498

**HAL Id: tel-00944498**

**<https://theses.hal.science/tel-00944498>**

Submitted on 10 Feb 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **THESE**

présentée devant

l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

19 avril 2004

par

**Stéphane LEZMI**

---

**Etude de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine  
Expérimentalement Transmise aux Ovins**

---

Directeur de thèse

Thierry BARON

Rapporteurs : Pr. J.M. VERDIER  
Pr. F. SCHELCHER

Examineurs : Pr. B. LINA, Président  
Dr. C. LASMEZAS  
Dr. A. BENCSIK  
Dr. T. BARON

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-Président du Conseil Scientifique  
Vice-Président du Conseil d'Administration  
Vice-Présidente du Conseil des Etudes et  
de la Vie Universitaire  
Secrétaire Général

## **M. le Professeur D. DEBOUZIE**

M. le Professeur J.F. MORNEX  
M. le Professeur R. GARRONE  
Mme J. GALLEZOT Maître de Conférences  
  
M. J.P. BONHOTAL

## SECTEUR SANTE

### Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur J.DOURY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE
Département de Formation à la Recherche et à l'Evaluation Pédagogiques	Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

## SECTEUR SCIENCES

### Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
UFR STAPS	Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX
Département de 1 <sup>er</sup> cycle Sciences	Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. ODIN
IUT B	Directeur : M. le Professeur G. MAREST
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur D. SERANT



*A mes parents et en particulier à ma mère pour tes encouragements, ton soutien et ta patience ; trouve dans ce travail le témoignage de mon profond attachement,*

*A Johann et Isabelle,*

*A Arlette, Marc et Maëva pour votre aide, votre gentillesse et votre disponibilité,*

*A tous mes amis.*

Remerciements.....	6
Liste des publications présentées.....	8
Abréviations.....	9
Liste des figures et tableaux.....	11
Introduction.....	14
<b>Aperçu sur les maladies à prion.....</b>	<b>18</b>
<b>I - Nature des agents infectieux - Approche physiopathologique des maladies à prions .....</b>	<b>18</b>
<b>A- Nature des agents infectieux.....</b>	<b>18</b>
1- Inhabituelle résistance des agents infectieux : notion d'agent transmissible non conventionnel (ATNC).....	18
2 - Concept du prion : une protéine infectieuse.....	19
3 - Autres hypothèses sur la nature de l'agent infectieux.....	22
<b>B - La protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>).....</b>	<b>23</b>
1 - Expression de la PrP <sup>c</sup> .....	23
2 - Autres formes de PrP <sup>c</sup> , et identification d'une protéine PrP <sup>c</sup> -like : la protéine doppel.....	25
3 - Les fonctions de la PrP <sup>c</sup> .....	26
PrP <sup>c</sup> et métabolisme du cuivre.....	27
PrP <sup>c</sup> , signalisation et adhésion cellulaire.....	28
4 - Importance de la PrP <sup>c</sup> dans les maladies à prion : un support moléculaire au phénomène de barrière d'espèce et aux maladies héréditaires humaines.....	29
<b>C - Modes de dissémination de l'agent dans l'organisme : importance du système immunitaire et du système nerveux autonome.....</b>	<b>31</b>
1- Importance du système immunitaire.....	31
2 - Identification des cellules immunes impliquées dans la dissémination périphérique de l'agent infectieux.....	33
Un rôle peu probable des lymphocytes T (LT) et des lymphocytes B (LB).....	33
Importance des Cellules Folliculaires Dendritiques (FDCs).....	34
Les Macrophages et l'élimination de l'agent infectieux.....	36
Rôle des Cellules Dendritiques (DCs).....	37
Autres facteurs impliqués.....	37

3 - Voies d'entrées de l'agent infectieux dans le SNC : la neuro-invasion.....	38
4 - Neuropathologie : la mort neuronale.....	41
Approche physiopathologique de la mort neuronale en culture cellulaire.....	42
Approche physiopathologique de la mort neuronale sur modèles murins.....	42
Autres mécanismes proposés.....	43
<b>II – Approche comparative des caractéristiques de ces affections au travers de quelques exemples.....</b>	<b>44</b>
<b>A - La tremblante du mouton.....</b>	<b>44</b>
1- Description générale.....	44
2- Contagiosité de la tremblante.....	45
3- Signes cliniques.....	46
4- Susceptibilité génétique des moutons à la tremblante.....	47
5- Sites d'accumulation de la PrP <sup>Sc</sup> et de l'infectiosité chez les moutons.....	50
6- Tremblante des petits ruminants et MCJ chez l'homme.....	52
<b>B - L'encéphalopathie spongiforme bovine.....</b>	<b>53</b>
1- Généralités.....	53
2- Signes cliniques.....	54
3- Susceptibilité génétique et contagiosité de l'ESB.....	54
4- Infectiosité de différents tissus - Sites d'accumulations de la PrP <sup>Sc</sup> .....	55
<b>C - L'encéphalopathie spongiforme bovine transmise expérimentalement aux ovins.....</b>	<b>56</b>
1- Présentation des études portant sur la transmission de l'ESB au mouton.....	56
2- Susceptibilité génétique des moutons à l'ESB.....	57
3- Doses infectieuses et estimation d'une potentielle épidémie dans les troupeaux.....	59
4- Signes cliniques.....	60
5- Tissus infectieux et sites d'accumulation de la PrP anormale.....	60
<b>D - L'encéphalopathie spongiforme féline.....</b>	<b>63</b>
1- Description de la maladie.....	63
2- Signes cliniques.....	63
3- Sites d'accumulation de la PrP anormale.....	64
<b>E - Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) chez l'homme.....</b>	<b>64</b>
1- Description de la maladie.....	64

2- Approche épidémiologique et origine de la maladie.....	65
3- Sites d'accumulation de la PrP anormale chez les patients atteints de vCJD.....	66
<b>F - Autres ESST animales.....</b>	<b>67</b>
L'encéphalopathie spongiforme du vison.....	67
La maladie du dépérissement chronique des cervidés.....	67
<b>III - Identification des souches d'agent infectieux dans les maladies à prion.....</b>	<b>69</b>
<b>A - Caractérisation des agents infectieux par analyse des lésions cérébrales chez l'hôte infecté.....</b>	<b>69</b>
<b>B - Caractérisation des souches sur modèles murins : le modèle de référence.....</b>	<b>70</b>
1- Signes cliniques et périodes d'incubation chez la souris.....	70
2- Importance des facteurs génétiques sur la période d'incubation chez la souris – isolement des souches d'ESST.....	71
3- Lésions neuropathologiques – définition du profil lésionnel.....	74
4- Les limites de la méthode .....	75
Transmissibilité de la maladie et barrière d'espèces.....	75
Variabilité individuelle des lésions de vacuolisation.....	76
Importance de la voie d'inoculation.....	76
Stabilité relative des souches.....	77
Coexistence de souches dans un même isolat.....	77
Effet 'modification – mutation' induit par l'hôte.....	78
5- Proposition d'une classification des souches.....	79
6- Souche(s) d'encéphalopathie spongiforme bovine.....	81
<b>C - Identification des souches par analyse du seul marqueur spécifique de la maladie : la protéine prion anormale.....</b>	<b>83</b>
1- Analyse neuroanatomique des sites d'accumulation de la PrP <sup>sc</sup> .....	83
2- Résistance aux protéases.....	85
3- Analyse des ratios de glycoformes.....	86
4- Analyse des sites de clivages de la PrP <sup>sc</sup> .....	89
Profils électrophorétiques après PK.....	89
Analyse du métabolisme de la PrP <sup>sc</sup> par les cellules.....	93
5- Analyse immuno-conformationnelle de la PrP anormale.....	94
<b>Conclusion sur les méthodes d'identification des souches.....</b>	<b>95</b>



<b>Etude Expérimentale</b> .....	97
<b>Objectifs du travail de thèse</b> .....	98
 <b>Première partie : Identification des sites d'accumulation de la PrP chez le mouton atteint de tremblante, expérimentalement infecté par l'ESB et chez le guépard atteint de FSE.</b>	
<b>Article 1</b> : Distribution of the disease-associated prion protein (PrP <sup>d</sup> ) in sheep infected with French cattle BSE agent – influence of the genotype (ARQ/ARQ, ARR/ARR) on PrP <sup>d</sup> tissues targeting.....	101
<b>Article 2</b> : First case of Feline Spongiform Encephalopathy in a captive cheetah born in France - PrP <sup>Sc</sup> analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland.....	124
<b>Article 3</b> : CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrP <sup>Sc</sup> accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep.....	134
<b>Article 4</b> : Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen : a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie.....	143
<b>Article 5</b> : Characterization of the PrP <sup>Sc</sup> accumulation in brain and lymphoid tissues of scrapied sheep using ELISA and immunohistochemistry.....	152
 <b>Deuxième partie : Contribution à l'identification de l'agent de l'ESB par analyse de la PrP anormale et par typage sur deux modèles murins</b>	
<b>Article 6</b> : Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie isolates and experimental BSE in sheep using Western blot and immunohistochemical methods.....	171
<b>Article 7</b> : Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE.....	184
<b>Article 8</b> : Neuro-anatomical distribution of abnormal PrP in C57BL/6 mice allows to differentiate BSE agent from different origin when compared to scrapie agents.....	191
 <b>Discussion générale, conclusion et perspectives</b> .....	207
<b>Références bibliographiques</b> .....	220
<b>Annexes</b> (bilan sur les souches d'ESST).....	249



A Monsieur Jean Michel Verdier, Professeur des Universités, Montpellier II,

*Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce mémoire de thèse. Veuillez croire en mon profond respect et ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur François Schelcher, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

*Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce mémoire de thèse. Veuillez croire en ma sincère gratitude et à mon respect.*

A Monsieur Bruno Lina, Professeur des Universités, Laboratoire de Virologie à Lyon,

*Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Veuillez croire en ma gratitude ; respectueusement.*

A Madame le Docteur Corinne Lasmézas, chargée de recherche au Service de Neurovirologie au CEA, Fontenay-aux-Roses,

*Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Veuillez croire en ma sincère et respectueuse gratitude.*

A Madame le Docteur Anna Bencsik, chargée de recherche à l'AFSSA de Lyon,

*Je te suis très reconnaissant pour ton encadrement toujours très efficace et structuré, qui m'a permis d'acquérir une certaine rigueur scientifique. Je te remercie aussi pour la confiance que tu m'as témoignée en me laissant finaliser, en partie, ce travail de thèse. J'ai également apprécié tes qualités humaines ainsi que ton amitié.*

*Trouve ici l'expression de toute ma gratitude.*

A Monsieur le Docteur Thierry Baron, chef de l'unité Virologie ATNC à l'AFSSA de Lyon,

*Je te remercie de m'avoir accueilli dans ton laboratoire dans le cadre de ma Thèse d'exercice Vétérinaire, de mon DEA et de cette Thèse d'Université. Je te suis très reconnaissant pour ton appui scientifique, et pour m'avoir fait confiance, tant pour nos anciens problèmes dans l'animalerie que dans la gestion de mes expérimentations. Travailler avec toi m'a appris beaucoup et m'a permis d'évoluer.*

**J'adresse également tous mes remerciements les plus chaleureux à tous mes amis,**

*A tous mes colocataires de la villa de Sourcieux, Aurélie, Courage, Fram, Aurélie, Julien, Marie et Romain, en souvenir de ces cinq merveilleuses années, de ces soirées fantastiques, de notre fabuleuse ménagerie et de nos fameux fromages de chèvre.*

*A toute la bande de véto et associés, membres du Club de Sourcieux, Laf, Dodo, Vivi (et son petit dodo, déjà fêtard je crois), Romain, Doumé, Gnan, Roux, Freddy, Emeline et Aurore.*

*A Yann, Cédric, Georges, Julien, Mika, Aymeric et Denis, la bande de joyeux lurons toujours près pour la sortie du vendredi soir, du samedi soir, du mardi soir ! Et pour ces soirées barbecues au bord du lac de Miribel !*

*A Emma, toujours prête à faire la blonde ce qui nous amuse toujours beaucoup*

*A Gisèle que je n'oublie pas, perdue au fin fond de son labo Suisse.*

*A Isabelle, notre enfance, notre fabuleux trésor et autres fameuses trouvailles qui nous auront valu bon nombre d'emmm....!*

*A tous les immunologistes du CERVI, pour leur sympathie.*

**Je pense aussi à toutes les personnes du laboratoire,**

*A Monsieur le Docteur Didier Calavas, directeur de l'AFSSA de Lyon ; Je te remercie de l'intérêt que tu as toujours témoigné à l'égard de mon activité au laboratoire, pour tes encouragements et ta disponibilité.*

*A Carole, en souvenir de nos discussions sur toutes tes formes@, mais surtout pour ton amitié, ton aide et ton soutien.*

*A Michèle, qui a su me surprendre et gagner un tour de manège gratuit! Chat....*

*A Sandrine, pour nos discussions, tes conseils et tes encouragements toujours très constructifs.*

*A Latéfa, Emilie et Clément, dont l'arrivée et la motivation m'ont permis de me consacrer pleinement à ma fin de thèse et d'oublier un peu les suivis cliniques et sanitaires de l'animalerie. Vous avez su à vous trois faire le travail de cinq personnes tout en restant disponible et en faisant nettement évoluer notre structure. Encore Merci.*

*A Evelyne et Marie-Claude de la bibliothèque, pour leur sympathie et leur disponibilité.*

*A Gisèle, autrement connu sous le nom de l'ours-fred, gentleman-farmer-researcher (farmer ok, researcher ok, mais gentleman il y a encore un peu de travail...), pour ta sympathie et ton dynamisme. PS : ne tue plus de serpents !! Merci.*

*A notre équipe du Roller, non sponsorisée par l'AFSSA, Dodo facilement effrayée par une ombre, Anne-Gaëlle qui progresse sur ses roulettes et Eric qui va finir par s'acheter un casque !*

*A Véro, à qui j'aurai fait peur au moins une fois, mais si rappelles toi près du congé!*

*A Sabine, camarade de galère de thèse.*

*Et à tous les autres, Michel, François, Danièle D., Sylvie, Dominique, Vérane, Sébastien, Johann, Danièle M., Jérémy, Jean-Yves, Ali, Céline, Jean-Noël & Laila, Alexandre... pour leur sympathie.*

### Publications acceptées

**LEZMI S.** MARTIN S. SIMON S. COMOY E. BENCSIK A. DESLYS J. GRASSI J. JEFFREY M. BARON T. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie isolates and experimental BSE in sheep using Western blot and immunohistochemical methods. *Journal of Virology*, 2004,78, 3654-3662.

**LEZMI S.** BENCSIK A. MONKS E. PETIT T. BARON T. First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France – PrP<sup>Sc</sup> analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochemistry and cell biology*, 2003, 119, 415-422.

**LEZMI S.** BENCSIK A. BARON T. CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrP<sup>Sc</sup> accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2001, 82, 1-8.

BENCSIK A. **LEZMI S.** BARON T. Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen : a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. *Journal of neurovirology*, 2001, 7, 447-453.

CROZET C. BENCSIK A. FLAMANT F. **LEZMI S.** SAMARUT J. BARON T. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with experimental ovine BSE. *EMBO report*, 2001, 10, 952-956.

### Publications soumises

**LEZMI S.** RONZON F. BENCSIK A. RICHARD Y. GRASSI J. BARON T. PrP<sup>d</sup> Immuno-detection in organs of Lacaune sheep inoculated with French cattle BSE agent – influence of the genotype (PrP<sup>ARO/ARO</sup>, PrP<sup>PARR/ARR</sup>) and routes of inoculation on PrP<sup>d</sup> tissues targeting. Soumis à *American Journal of Pathology*.

MADEC JY. SIMON S. **LEZMI S.** BENCSIK A. GRASSI J. BARON T. Characterization of the PrP<sup>Sc</sup> accumulation in brain and lymphoid tissues of scrapied sheep using ELISA and immunohistochemistry. Soumis à *Journal of Virology Methods*.

### Publication en préparation

**LEZMI S.** BENCSIK A. BARON T. Neuro-anatomical distribution of abnormal PrP in C57BL mice allows to differentiate BSE agent from different origin when compared to scrapie agents. En préparation pour soumission à *Journal of Experimental Neurology and Experimental Pathology*.

---

<b>A</b>	: alanine
<b>ATNC</b>	: Agent transmissible non conventionnel
<b>C506M3</b>	: Souche de tremblante adaptée à la souris
<b>C57BL/6</b>	: Lignée murine sauvage
<b>CD1</b>	: Lignée murine sauvage
<b>CH1641</b>	: Isolat de tremblante expérimental
<b>DC</b>	: Cellules dendritiques
<b>ELISA</b>	: Enzyme linked immuno sorbent assay
<b>ESB</b>	: Encéphalopathie spongiforme bovine
<b>ESF</b>	: Encéphalopathie spongiforme féline
<b>ESST</b>	: Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible
<b>FDC</b>	: Follicular Dendritic Cells ; Les cellules folliculaires dendritiques sont des cellules résidentes des centres germinatifs des follicules lymphoïdes secondaires.
<b>FVB</b>	: Lignée murine sauvage
<b>GFAP</b>	: protéine gliofibrillaire acide
<b>GSS</b>	: Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
<b>H</b>	: Histidine
<b>HIV</b>	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>IFF</b>	: Insomnie Fatale Familiale
<b>IHC</b>	: Immunohistochimie
<b>IM</b>	: lignée murine sauvage
<b>KO</b>	: Knock-Out
<b>LB</b>	: Lymphocyte B
<b>LT</b>	: lymphocyte T
<b>MCJ</b>	: Maladie de Creutzfeldt-Jakob
<b>ME7</b>	: Souche de tremblante adaptée à la souris
<b>PK</b>	: Protéinase K
<b>PrP<sup>c</sup></b>	: Protéine prion cellulaire normale
<b>PrP<sup>d</sup></b>	: disease associated prion protein ; forme anormale de la protéine prion
<b>PrP<sup>sc</sup></b>	: Protéine prion pathologique, isoforme conformationnelle anormale de la PrP <sup>c</sup> ; le suffixe « sc » provenant du terme anglo-saxon « scrapie » qui désigne la forme prurigineuse de la tremblante du mouton.
<b>PrP<sup>res</sup></b>	: Protéine prion pathologique résistante (res) à la protéinase K (équivalant à PrP 27-30).
<b>PrP<sup>-/-</sup></b>	: Modèles KO pour le gène de la PrP
<b>PrP<sup>27-30</sup></b>	: Produit d'hydrolyse (27 à 30 KD) de la PrP <sup>sc</sup> par la protéinase K
<b>Q</b>	: Glutamine
<b>R</b>	: Arginine

<b>RIII</b>	: Lignée murine sauvage
<b>RAG<sup>-/-</sup></b>	: Modèle murin immunodéficient, KO pour le gène d'activation de et de recombinaison VDJ (immunoglobulines).
<b>RML</b>	: souche de tremblante adaptée à la souris (Rocky Mountain Laboratory)
<b>SAF</b>	: Scrapie Associated Fibrils
<b>SCID</b>	: Severe Combined Immune Deficient phenotype
<b>SDS</b>	: Sodium dodecyl sulfate
<b>SNC</b>	: Système nerveux central
<b>SSBP/1</b>	: Isolat de tremblante expérimental (Scrapie sheep brain pool/1)
<b>V</b>	: Valine
<b>VM</b>	: Lignée murine sauvage
<b>vMCJ</b>	: Variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob
<b>87V</b>	: Souche de tremblante adaptée à la souris
<b>Sc237</b>	: Souche de tremblante adaptée au hamster

**Figure 1** : Scrapie associated fibrils (SAF).

**Figure 2** : Structure secondaire et tertiaire de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>Sc</sup>.

**Figure 3** : Mode d'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> : « refolding model ».

**Figure 4** : Mode d'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> : « seeding model ».

**Figure 5** : Différentes hypothèses sur la nature de l'agent infectieux.

**Figure 6** : Structure de la PrP<sup>c</sup> humaine.

**Figure 7** : Formes de la PrP<sup>c</sup>.

**Figure 8** : Localisation de la PrP<sup>c</sup> dans le SNC de hamster sain.

**Figure 9** : Illustration du phénomène de barrière d'espèce.

**Figure 10** : Accumulation de l'infectiosité dans la rate et le SNC de souris après infection par voie périphérique d'une souche de tremblante.

**Figure 11** : Lymphocytes B et Maturation des FDCs.

**Figure 12** : Importance des FDCs exprimant la PrP<sup>c</sup> dans la neuro-invasion

**Figure 13** : Les plaques de Peyer, une très probable voie d'entrée de l'agent infectieux dans l'organisme.

**Figure 14** : Cinétique de la dissémination de la PrP<sup>res</sup> chez des souris infectées par voie orale avec la souche de tremblante C506M3.

**Figure 15** : Représentation des voies nerveuses de neuro-invasion chez le mouton atteint de tremblante.

**Figure 16** : Vacuolisation neuronale chez un mouton atteint de tremblante naturelle.

**Figure 17** : Dépilation dorso-lombaire chez un mouton atteint de tremblante.

**Figure 18** : Cinétique d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans les organes lymphoïdes et le SN chez des moutons atteints de tremblante.

**Figure 19** : Détection de la PrP<sup>Sc</sup> dans les plaques de Peyer de bovins expérimentalement infectés par l'ESB.

**Figure 20** : Dépilation dorso-lombaire chez un mouton expérimentalement infecté par l'ESB.

**Figure 21** : Cinétique d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans les organes lymphoïdes et le SN chez des moutons expérimentalement infectés par l'ESB.

**Figure 22** : Mesure des temps d'incubation dans différents modèles murins infectés par des agents d'ESST.

**Figure 23** : Profil lésionnel et typage de souche.

**Figure 24** : Influence de la voie d'inoculation sur le profil lésionnel.



**Figure 25** : Stabilité de différentes souches murines de tremblante après transmission à différents types murins.

**Figure 26** : Stabilité de différentes souches murines de tremblante après transmission au rat et au hamster.

**Figure 27** : Profils lésionnels de la souche ME7 : stabilité des souches de classe I.

**Figure 28** : Illustration de la non stabilité des souches de classe II.

**Figure 29** : Illustration du phénomène de rupture avec les souches de classe III.

**Figure 30** : Profils lésionnels obtenus dans différentes lignées murines avec la souche d'ESB.

**Figure 31 et 32** : Profils lésionnels obtenus dans différentes lignées murines après transmission croisées des souches 301c (ESB adaptée à la souris C57BL) et 301V (ESB adaptée à la souris VM).

**Figure 33** : Dépôts de PrP<sup>Sc</sup> dans l'hippocampe de souris infectées par différentes souches de tremblante.

**Figure 34** : Distribution neuro-anatomique des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> chez des souris infectées par l'ESB, le vCJD et un isolat de tremblante.

**Figure 35** : Distribution neuro-anatomique des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> chez des souris transgéniques infectées par un cas d'IFF et un cas familial de CJD.

**Figure 36** : Identification des différents types d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> chez le mouton infecté par la tremblante ou l'ESB.

**Figure 37** : Représentation graphiques des types d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> chez le mouton permettant d'identifier l'agent de l'ESB et différents isolats de tremblante.

**Figure 38** : Analyse des ratios de glycoforme dans différentes formes de CJD chez l'homme.

**Figure 39** : Illustration des quatre types électrophorétiques chez l'homme d'après la classification de Collinge.

**Figure 40** : Relation entre les types d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> visualisés en IHC et les types électrophorétiques chez l'homme.

**Figure 41** : Identification de la souche d'ESB dans différentes espèces par Western blot.

**Figure 42** : Variations profils électrophorétiques obtenus après transmission de cas de CJD un modèle de souris transgéniques exprimant la PrP<sup>C</sup> humaine.

**Figure 43 et 44** : Discrimination de l'ESB et de la tremblante chez les ovins par IHC grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre la zone de clivage de la PrP anormale par les protéases.

**Tableau 1** : Présentation des principaux modèles murins utilisés par caractériser le rôle du système immunitaire dans les maladies à prion.

**Tableau 2** : identification du gène SIP (scrapie incubation period) par mesure des périodes d'incubation chez des moutons de race Cheviot expérimentalement infectés avec l'isolat de tremblante SSBP/1.

**Tableau 3** : Différents génotypes rencontrés chez des moutons de race Texel en relation avec leur susceptibilité à la tremblante.

**Tableau 4** : Organes infectieux chez des moutons cliniquement atteints de tremblante naturelle.

**Tableau 5** : Organes infectieux de bovins expérimentalement infectés par l'ESB.

**Tableau 6** : Génotypes de moutons ayant développé une ESST suite à l'inoculation de l'agent de l'ESB.

**Tableau 7** : Sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> chez des moutons infectés par voie orale avec l'agent de l'ESB.

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), ou maladies à prion, sont des maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le kuru, et animales comme la tremblante des petits ruminants et l'encéphalopathie spongiforme bovine. Ces maladies, toujours mortelles, présentent une période d'incubation très longue et une atteinte du système nerveux central (SNC) se traduisant par des troubles sensitifs, comportementaux et moteurs. L'analyse histopathologique du SNC révèle la présence de lésions spongiformes qui correspondent à une vacuolisation des neurones au niveau des corps cellulaires et des prolongements nerveux. Ces lésions sont accompagnées de pertes neuronales et d'une réaction gliale au cours de laquelle les astrocytes et les cellules microgliales prolifèrent.

La nature des agents infectieux responsables de ces pathologies est encore mal connue, mais leurs propriétés inhabituelles de résistance aux procédés utilisés classiquement dans la désinfection et la stérilisation, ainsi que leurs caractères transmissibles, leur vaut parfois l'appellation « d'ATNC » pour Agents Transmissibles Non Conventionnels. Parmi les hypothèses proposées sur la nature de ces agents infectieux, la théorie du prion (proteinaceous infectious particle, PrP<sup>sc</sup>, scrapie) est la plus étayée, et présume de la nature exclusivement protéique de l'agent infectieux. Cette protéine (PrP<sup>sc</sup>), présentant une conformation anormale, serait ainsi infectieuse et induirait chez l'individu infecté une transconformation de la forme cellulaire normale de la protéine, la PrP<sup>c</sup>, qui est exprimée dans de nombreux tissus dont particulièrement le SNC. Cette hypothèse permet d'expliquer l'absence de réaction immunitaire spécifique. De part sa conformation anormale, la protéine est difficilement métabolisée et s'accumule principalement dans le SNC et parfois dans les organes lymphoïdes. La PrP<sup>sc</sup> est actuellement le seul marqueur spécifique connu de ces maladies ce qui est utilisé dans le diagnostic.

Les modes de contamination dans les maladies à prion peuvent être multiples, et certaines de ces affections comme la tremblante du mouton et la maladie du dépérissement chronique des cervidés sont contagieuses. Certaines de ces maladies, tel que le kuru, le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), l'encéphalopathie spongiforme du vison et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), semblent dues à des contaminations orales liées à la consommation de produits infectieux. Des contaminations iatrogènes ont aussi été décrites chez l'homme, liées notamment, à l'utilisation d'hormone de croissance extraite à partir de dérivés hypophysaires, ainsi que chez les petits ruminants à cause de préparations vaccinales contaminées. Il existe aussi chez l'homme des formes sporadiques, ainsi que des formes héréditaires se transmettant sous un mode autosomique dominant. L'importance de facteurs génétiques, contrôlant la susceptibilité à la maladie, la période d'incubation et la physiopathologie a également été mise en évidence chez l'homme dans les formes transmises (iatrogènes et vMCJ) et aussi chez l'animal comme dans la tremblante du

mouton ; ces derniers peuvent ainsi présenter une sensibilité ou une résistance à la tremblante naturelle.

En règle générale, lors d'une infection par voie orale, l'agent infectieux se réplique d'abord dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif puis gagne l'ensemble du système lymphoïde. Ce n'est que par la suite que l'agent gagne le SNC *via* les nerfs. Bien que toutes les maladies à prion ne présentent pas d'accumulation de prion dans les organes lymphoïdes, on observe cette particularité dans de nombreuses formes comme dans la tremblante des petits ruminants, le vMCJ chez l'homme, la maladie du dépérissement chronique des cervidés et chez les chats domestiques atteints d'encéphalopathie spongiforme féline (ESF).

Bien que certaines de ces pathologies animales, telle que la tremblante de mouton et de la chèvre, soient connues depuis longtemps, aucune transmission à l'homme n'a été mise en évidence. Depuis 1986, l'intérêt pour ces maladies a pris plus d'ampleur notamment avec la découverte des premiers cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), et l'apparition, dix ans plus tard, d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) chez des personnes jeunes. Ces deux maladies ont clairement été reliées grâce à différentes méthodes permettant de différencier les souches d'agent infectieux. L'analyse de la PrP anormale qui présente les mêmes propriétés biochimiques (profils électrophorétiques et ratios de glycoformes) a été un premier argument permettant de rapprocher ces maladies. Les expérimentations de transmission à la souris ont permis de conclure sur l'identité des deux maladies, les souris ayant présenté une maladie (durées d'incubation et lésions cérébrales) similaire par comparaison à des cas de tremblante et d'autres formes d'ESST humaines. De plus, la transmission de l'ESB au macaque a permis de mettre en évidence une signature pathologique très similaire à celle rencontrée chez l'homme confortant les résultats précédents.

D'autres espèces animales, comme certains félins et ruminants de parcs zoologiques, ont aussi été infectés par l'agent de l'ESB qui a été identifié par les mêmes méthodes. L'origine de ces pathologies semble liée à la consommation de bovins atteints d'ESB ou à l'utilisation de farines de viande dans l'alimentation des animaux. La contamination de ces farines a probablement eu lieu suite aux changements introduits dans les modes de fabrication au début des années 1980. Ce nouveau procédé aurait permis le recyclage et la dissémination de l'agent infectieux au sein des élevages bovins. Actuellement les politiques d'éradication de cette maladie connaissent un succès certain, notamment avec la suppression de l'utilisation des farines animales dans l'alimentation des animaux de rente. Par ailleurs, une autre source potentielle de contamination humaine est actuellement soulignée ; la susceptibilité des petits ruminants à l'agent de l'ESB ayant été démontrée

expérimentalement, notamment lors de contamination par voie orale, la dissémination de cet agent infectieux dans les troupeaux ovins et caprins est à envisager. En effet, l'utilisation de farines animales dans certains élevages a été une réalité. Cette perspective est d'autant plus inquiétante que la tremblante est une maladie contagieuse et qu'un phénomène similaire est à craindre avec la souche d'ESB. D'ailleurs, chez les ovins expérimentalement infectés par l'ESB, le développement de la maladie rappelle fortement celui de la tremblante, tant du point de vue de la clinique de la maladie qu'en ce qui concerne les sites d'accumulation de la PrP anormale et les types cellulaires impliqués. Bien que très similaires, ces deux maladies chez le mouton sont pourtant différenciables comme le montrent les premières études, portant sur l'analyse des sites de clivage de la PrP anormale par les protéases et les travaux de transmission de la maladie à la souris.

A ce jour, aucune preuve de la dissémination de l'agent de l'ESB dans les cheptels ovins et caprins n'a cependant été apportée bien qu'elle soit fortement suspectée. Le développement de méthodes permettant d'identifier cette souche d'ESB chez les ovins est donc important pour la santé publique.

Dans une première partie de notre travail, un aperçu sur les maladies à prion sera abordé concernant la nature de l'agent infectieux et leur physiopathologie. Ensuite, quelques exemples de maladies à prion seront présentés pour comprendre la complexité de ces affections et finalement la notion de souche sera exposée permettant d'envisager à la fois la multiplicité des souches d'agents infectieux et les méthodes d'identifications de ces souches.

Dans une deuxième partie, après avoir défini les objectifs de notre travail, nous exposerons les résultats de notre étude expérimentale. Dans un premier temps, nous présenterons les sites d'accumulation de la PrP anormale chez le mouton atteint de tremblante naturelle ou expérimentalement infecté par l'ESB ainsi que chez un guépard atteint d'ESF. Dans un deuxième temps, nous exposerons les résultats obtenus concernant l'identification de l'agent de l'ESB chez le mouton comparativement à des cas de tremblante par analyse des sites de clivage de la PrP anormale ainsi que par une méthode de typage de souche dans deux modèles murins de transmission de la maladie.

Enfin, nous discuterons de nos résultats et nous évoquerons les perspectives de ce travail.

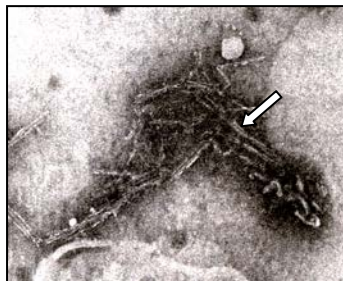
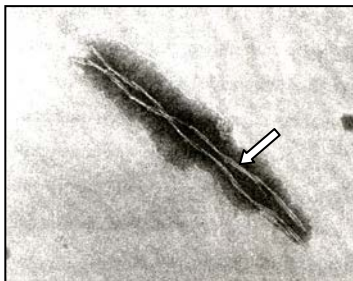
## I - Nature des agents infectieux - Approche physiopathologique des maladies à prions

### A- Nature des agents infectieux

#### 1- Inhabituelle résistance des agents infectieux : notion d'agent transmissible non conventionnel (ATNC)

La nature des agents infectieux responsables des maladies à prion n'est pas encore totalement certaine, et leurs propriétés inhabituelles de résistance aux procédés classiquement utilisés dans la désinfection et la stérilisation [Taylor 2002] permet de les classer sous le terme « ATNC » pour Agents Transmissibles Non Conventionnels.

Les études en chromatographie et filtration sur membranes ont montré que leur taille est estimée à 15 – 40 nm, compatible avec la taille de certains virus conventionnels (ex. : picornavirus, 20 à 30 nm) [Prusiner 1992]. En 1981, Merz réalise la première mise en évidence par microscopie électronique de structures fibrillaires de 150 nm de long sur 15 nm de diamètre associées à l'infectiosité (figure 1). Ces fibrilles, qu'elle nomme « Scrapie Associated Fibrils » (SAF), ne sont pas présentes naturellement dans les tissus infectieux et résultent des conditions de préparation des échantillons [Merz *et al.* 1981] [Merz *et al.* 1984] [Chaplin *et al.* 1998].



**Figure 1 : Scrapie associated fibrils (SAF)**

Visualisation par microscopie électronique des scrapie associated fibrils (SAF) extraites à partir d'un tronc cérébral d'un bovin atteint d'ESB (image de gauche, flèche) et d'un ovin atteint de tremblante naturelle (image de droite, flèche). [Chaplin, *et al.* 1998]

La résistance des ATNC à la chaleur est très importante [Dickinson *et al.* 1978] ; l'OMS recommande l'utilisation de l'autoclave à 136°C pendant 18 min. pour obtenir une inactivation compatible avec la sécurité en pratique médicale [Dormont 1998] ; la résistance de ces agents infectieux est aussi dépendante de la nature de la souche<sup>1</sup> : les souches de tremblante murine 22C, ME7 et 139A subissent une importante inactivation (totale pour 22C) lors d'un traitement à l'autoclave (126°C, 30 min) alors que la souche 301V (ESB murinisée) n'est que très partiellement inactivée [Taylor *et al.* 2002]. On peut remarquer que la souche 301V (ESB murine) présentent encore un pouvoir infectieux résiduel suite à un traitement thermique de 600°C en chaleur sèche [Brown *et al.* 2000b].

<sup>1</sup> Cf. définition de la notion de souche en troisième partie : « Identification des souches dans les maladies à prion »

Les rayonnements ont peu d'effet sur les ATNC : l'irradiation  $\gamma$  ou UV doit être massive pour induire un effet détectable [Latarjet *et al.* 1970] [Taylor 2000]. Les traitements d'une heure à température ambiante à l'acide formique pur, à la soude 1N ou à l'hypochlorite de sodium à 2% sont les seuls qui permettent d'obtenir une réduction significative du titre infectieux [Brown *et al.* 1984] [Taylor 2000]. Toutes les autres mesures classiquement utilisées en désinfection sont sans efficacité notable (aldéhydes, éthanol, chaleur sèche, solution d'eau oxygénée...). D'autres analyses ont montré que des méthodes de dénaturation ou de digestion enzymatique très poussées des protéines sont capables de réduire significativement le titre infectieux [Prusiner 1982] [Prusiner 1992].

L'ensemble de ces résultats laisse à penser que les ATNC constituent une nouvelle catégorie d'agents infectieux différents des virus ou des bactéries conventionnels. C'est Alper et Griffith qui, en 1966, proposent pour la première fois la nature exclusivement protéique des ATNC [Alper *et al.* 1966].

## **2 - Concept du prion : une protéine infectieuse**

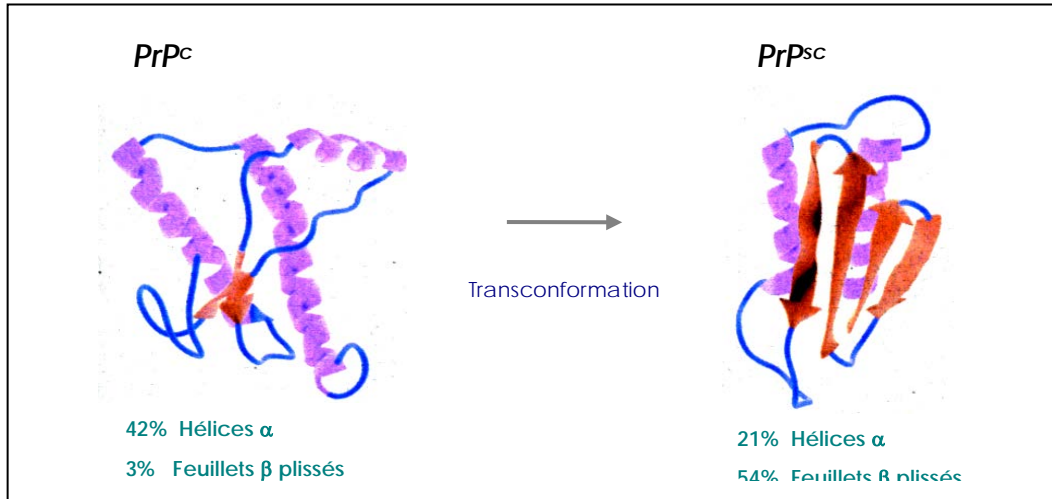
La démonstration par Prusiner de la sensibilité de l'agent de la tremblante aux procédés dénaturant les protéines (protéases, sodium dodécyl sulfate, thiocyanate de guanidium, phénol, urée...) et la mise en évidence de la résistance de l'agent à la plupart des procédures modifiant les acides nucléiques (irradiation UV à 254 nm) a conduit au concept du prion (proteïnaceous infectious particle) [Prusiner 1982] souvent nommé sous le terme PrP anormale (PrP<sup>res</sup> : forme résistante aux protéases, PrP<sup>sc</sup> : forme conformationnelle anormale, PrP<sup>d</sup> : disease associated PrP...).

La composition exacte de l'agent infectieux n'est pas connue même si la PrP<sup>res</sup> en est la principale composante [Prusiner 1982]. Les SAF présentent d'ailleurs une composition majoritaire de PrP<sup>sc</sup>. L'acquisition du caractère pathogène de la protéine prion serait liée à la transconformation de la PrP<sup>c</sup> (protéine prion cellulaire présente naturellement dans de nombreux tissus<sup>2</sup>) en PrP<sup>sc</sup> (isoforme anormale, sc : scrapie), selon la théorie de Prusiner. Des études biophysiques indiquent que la proportion de feuillets plissés  $\beta$  est nettement plus élevée dans la protéine pathologique que dans la protéine cellulaire. L'hypothèse d'une transition d'hélices  $\alpha$  en feuillets plissés  $\beta$  lors de l'acquisition de la forme pathologique a été proposée (figure 2) [Pan *et al.* 1993] [Cohen *et al.* 1999].

---

<sup>2</sup> Cf. paragraphe « La PrP cellulaire ».



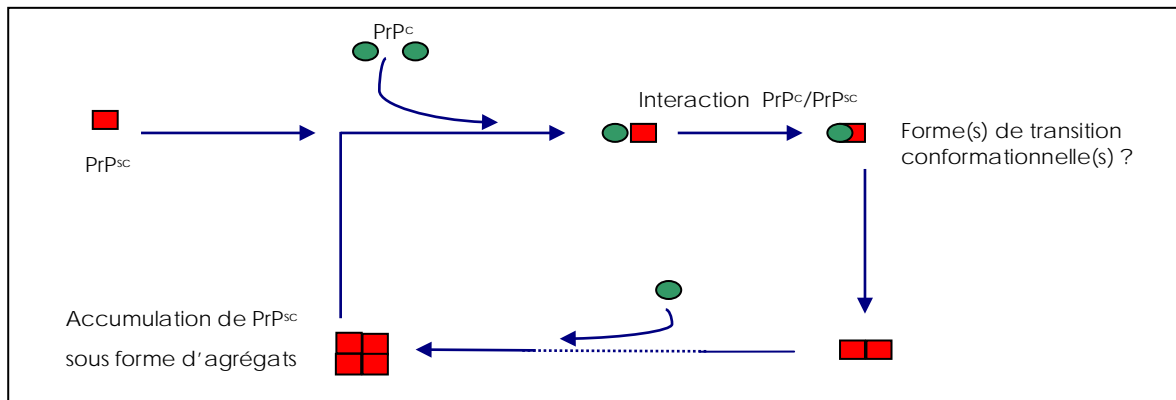


**Figure 2 : Structures tertiaires de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>sc</sup>**

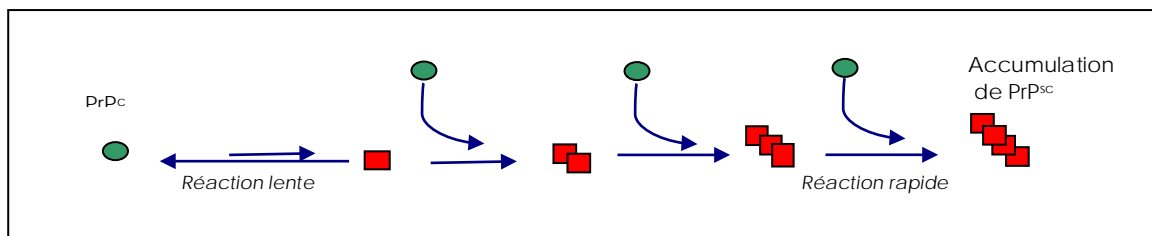
Modèle structural proposé par Prusiner et Cohen de transconformation de la protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>) en protéine prion anormale ou pathologique (PrP<sup>sc</sup>) ; le pourcentage de feuilletés étant plus important dans la forme anormale de la protéine que dans la forme cellulaire. [Cohen *et al.* 1999]

L'interaction de la PrP<sup>sc</sup> avec la PrP<sup>c</sup> pourrait être le facteur initiateur de la propagation de la PrP<sup>sc</sup>. Deux modèles de propagation ont été proposés (figure 3 et 4) [Aguzzi *et al.* 1997]. Expérimentalement, la PrP<sup>c</sup> de hamster peut être convertie *in vitro* en PrP<sup>sc</sup> dans un système acellulaire en présence de PrP anormale [Kocisko *et al.* 1994]. De même, la PrP<sup>sc</sup> est aussi capable de transconformer la PrP<sup>c</sup>, marquée au soufre 35, en une forme indistinguishable de la PrP<sup>sc</sup> lors d'un traitement à la protéinase K [Kocisko *et al.* 1996]. Dans cette dernière étude, l'utilisation de traitement dénaturant a aussi permis de montrer que cette transconformation nécessite la présence d'agrégats ordonnés de PrP<sup>sc</sup>. Ces propriétés ont permis de mettre au point une technique d'amplification de la PrP<sup>sc</sup> à partir de PrP<sup>c</sup>, rappelant l'utilisation de la PCR pour l'amplification d'ADN. Les agrégats de PrP<sup>sc</sup> sont scindés par sonication puis incubés en présence de PrP<sup>c</sup> ; des cycles successifs sont ainsi réalisés permettant d'amplifier de faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> [Soto *et al.* 2002].

Cependant, même si ces travaux semblent confirmer la théorie du prion, aucune publication n'indique que la PrP transconformée *in vitro* présente un pouvoir infectieux ; d'autres facteurs semblent donc déterminants [Hill *et al.* 1999a].



**Figure 3 : « Refolding model »** - La transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> pourrait être due à l'interaction des deux isoformes ; une haute barrière énergétique préviendrait la transconformation spontanée et expliquerait le processus exponentiel de l'accumulation de PrP<sup>sc</sup>. D'après [Aguzzi et al. 1997].



**Figure 4 : « Seeding model »** - La transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> pourrait être due à l'interaction des deux isoformes ; ce phénomène pourrait être considéré comme thermodynamiquement réversible. La PrP<sup>sc</sup> serait stabilisée du fait de ces propriétés d'agrégabilité ; la formation des premiers agrégats serait lente, puis beaucoup plus rapide expliquant l'aspect progressif de l'augmentation du taux de PrP<sup>sc</sup> au cours de la maladie. D'après [Aguzzi et al. 1997].

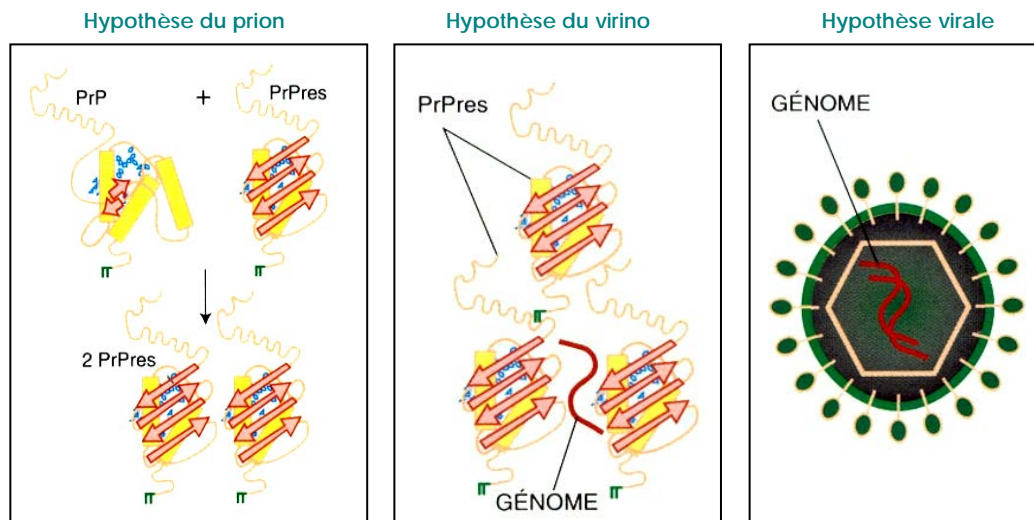
La transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> pourrait être dépendante d'autres facteurs tels que les protéines chaperonnes comme Hsp70, Hsp73 et Hsp 60 (heat shock protein) [Gauczynski et al. 2001a]. Une autre protéine encore inconnue (protéine X) semble aussi nécessaire dans ce changement de conformation. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant la PrP<sup>c</sup> humaine (et exprimant la PrP<sup>c</sup> murine) ne sont pas infectables par les prions humains, alors que des souris transgéniques exprimant une PrP<sup>c</sup> chimère humaine/murine le sont ; ces données confrontées à l'observation de la susceptibilité au prion humain de ces mêmes souris n'exprimant plus la PrP<sup>c</sup> murine, ont conduit les auteurs à suggérer que cette PrP<sup>c</sup> murine inhibe la transconformation de la PrP<sup>c</sup> humaine en une forme anormale et qu'un autre facteur X intervient directement en se fixant sur la partie C-terminale de la PrP<sup>c</sup> [Telling et al. 1995]. L'identification du site d'interaction de la PrP avec ce facteur X a été réalisée sur des modèles murins transgéniques exprimant une PrP<sup>c</sup> chimérique (humaine/souris). En fonction des séquences d'acides aminés choisies, l'infectabilité de ces souris change. Ainsi, le changement des acides aminés (aa) en position 167, 171 ou 218 de la PrP<sup>c</sup> humaine prévient la formation de PrP<sup>sc</sup> ce qui suggère que le site de fixation de la protéine X se trouverait dans cette région [Kaneko et al. 1997].

### 3 - Autres hypothèses sur la nature de l'agent infectieux

La théorie du prion est parfois remise en cause notamment à cause du fait que la PrP anormale produite *in vitro* n'est pas infectieuse [Hill et al. 1999a]. Il existe également certains modèles dans lesquels l'infectiosité n'est pas corrélée à la présence de PrP<sup>Sc</sup> détectable dans le SNC [Lasmézas et al. 1997] [Hill et al. 2000].

Plusieurs hypothèses ont été faites dans le passé sur la nature de l'agent infectieux : virus conventionnel ou non conventionnel, un acide nucléique masqué similaire aux viroïdes de végétaux, un polysaccharide anormal, un acide nucléique entouré de polysaccharides... (revue dans [Prusiner 1982]).

Certains auteurs ont aussi suggéré que l'agent infectieux pourrait être un virino, particule infectieuse qui serait constituée d'une information génétique propre très protégée (expliquant le caractère infectieux transmissible et la notion de souche), entourée de molécules appartenant à l'hôte (probablement la PrP anormale), rendant compte ainsi de l'absence de réponse immune spécifique (figure 5) [Oesch et al. 1985] [Hope 1994] [Deslys 1998].



**Figure 5 : Différentes hypothèses sur la nature de l'agent infectieux ;** hypothèse du **prion** : l'agent infectieux est une protéine dont la conformation est anormale. Hypothèse du **virino** ou holoprion : un acide nucléique serait hébergé au niveau du complexe protéique (PrP<sup>Sc</sup>). Hypothèse virale : un **virus** conventionnel serait l'agent infectieux, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> ne serait qu'un phénomène « parallèle » ; D'après [Deslys 1998].

La protéine prion anormale est donc actuellement le seul marqueur spécifique de l'agent infectieux et participe activement à la physiopathologie de ces maladies. Toutefois, plusieurs cas de transmission expérimentale d'ESST sans accumulation de PrP pathologique ont été rapportés. Ainsi, la mutation et la sur-expression, au codon 101, du gène de la PrP de souris conduit au développement d'une encéphalopathie spongiforme transmissible avec de très faibles niveaux d'accumulation de PrP<sup>Res</sup> [Hsiao et al. 1994]; des résultats similaires ont été

rapportés par une autre équipe [Manson *et al.* 2000]. D'autres travaux ont montré que la transmission de l'insomnie familiale fatale à des souris transgéniques exprimant la PrP<sup>c</sup> humaine, conduit au développement de lésions de spongiose caractéristiques sans accumulation de PrP anormale [Collinge *et al.* 1995].

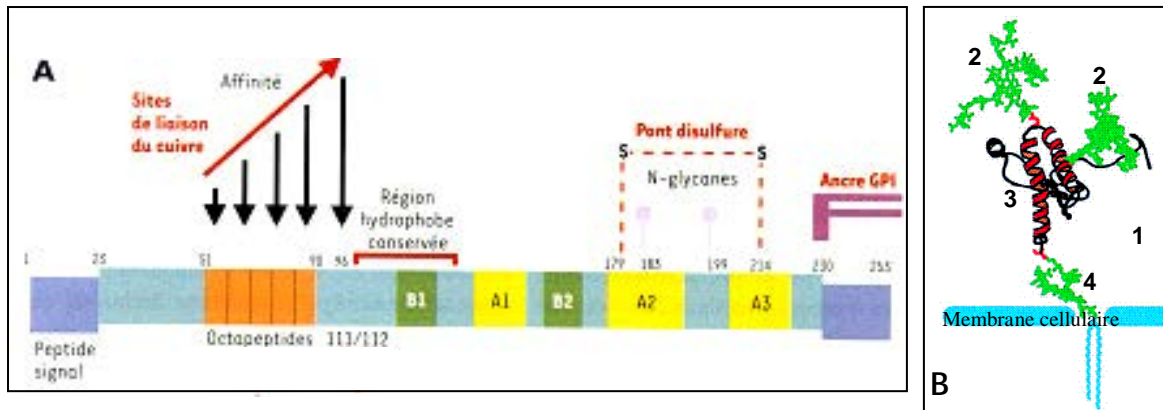
De même, la transmission de l'ESB à des souris C57BL/6 conduit parfois au développement de la maladie (signes cliniques caractéristiques) sans qu'aucune accumulation de PrP<sup>res</sup> ne soit détectée. De plus, l'infectiosité du SNC de ces souris a clairement été identifiée conduisant au développement de la maladie et à une accumulation de PrP<sup>res</sup>, lors de passages successifs chez le même type de souris [Lasmézas *et al.* 1997]. Dans ce contexte, plusieurs hypothèses sont à envisager quant au rôle de la PrP<sup>sc</sup> dans la maladie:

- ⇒ La PrP<sup>sc</sup> serait une protéine infectieuse qui pourrait présenter des états intermédiaires différents pas toujours détectables par les méthodes actuelles ;
- ⇒ La PrP<sup>sc</sup> ne serait pas le seul constituant de l'agent ;
- ⇒ La PrP<sup>sc</sup> ne serait pas l'agent mais est un facteur de virulence très important, les souris Knock-out pour le gène de la PrP n'étant pas infectables [Büeler *et al.* 1993];
- ⇒ La PrP<sup>sc</sup> ne serait pas l'agent infectieux et son accumulation ne serait qu'un phénomène secondaire.

## **B - La protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>)**

### **1 - Expression de la PrP<sup>c</sup>**

Chez les mammifères, le gène de la PrP code pour une protéine d'environ 250 acides aminés (aa) de poids moléculaire de 33 à 35 kDa qui contient différents domaines, incluant une séquence signal N-terminale, une série d'octapeptides répétés, un domaine central hydrophobe très conservé et une partie C-terminale hydrophobe qui est un signal pour l'addition d'une ancre glypiée (glycosyl phosphatidyl inositol, GPI) (figure 6) [Oesch *et al.* 1985]. La PrP<sup>c</sup>, synthétisée dans le réticulum endoplasmique, transite dans l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane cellulaire. Lors de ce transit, la protéine subit plusieurs modifications post traductionnelles : un clivage de la partie signal N-terminale, une addition de 2 chaînes d'oligosaccharides sur des résidus asparagine en position 181 et 197 chez l'homme et le hamster [Endo *et al.* 1989], la formation d'un pont disulfure et l'attachement d'une ancre GPI [Stahl *et al.* 1987] [Somerville *et al.* 1990] [Westaway *et al.* 2002] [Mangé *et al.* 2002].



**Figure 6 : Structure de la PrP<sup>c</sup> de l'homme.** **A** : La protéine possède deux séquences clivées au cours de sa maturation dans la cellule (peptide signal et site de fixation de l'ancre GPI). La protéine présente un pont disulfure et deux sites de glycosylation. La région des octapeptides présente de nombreux résidus histidine pouvant fixer le cuivre. Deux feuillets β sont compris entre les aa 128-131 et 161-164 (en vert) et trois hélices α entre les régions 144-156, 172-193 et 200-227 (en jaune).

**B** : Structure tertiaire de la protéine. 1 : extrémité N-terminale ; 2 : N-glycanes ; 3 : domaine globulaire ; 4 : ancre GPI. D'après [Mangé et al., 2002].

La PrP<sup>c</sup> peut se présenter sous trois formes : bi-glycosylée, mono-glycosylée et non-glycosylée. Des expérimentations *in vitro* induisant des altérations dans la glycosylation de la protéine modifient sa biosynthèse, son transport et altèrent ses propriétés biochimiques. Les mutations des 2 sites de glycosylations induisent une conformation anormale et causent une accumulation de la protéine dans le compartiment proximal et moyen de l'appareil de Golgi [Lehmann et al. 1997]. Cependant, des glycosylations correctes ne sont pas absolument nécessaires puisque le transport de la protéine au cours de la synthèse n'est pas altéré en présence d'inhibiteur de glycosylations (tunicamycine), et des quantités notables de PrP<sup>c</sup> sont retrouvées à la surface cellulaire [Lehmann et al. 1997]. Dans des cultures de levure exprimant une forme de PrP<sup>c</sup> cytoplasmique (pas de glycosylation possible car pas d'ancrage GPI) et dans des cultures de neuroblastome en présence de tunicamycine qui bloque les glycosylations, la PrP<sup>c</sup> acquiert des caractéristiques de la PrP<sup>sc</sup> (insolubilité et résistance partielle à la protéinase K). Les glycosylations pourraient donc prévenir la transconformation de la PrP<sup>c</sup> en une forme de type PrP<sup>sc</sup> [Ma et al. 1999].

La PrP<sup>c</sup> peut subir deux clivages au cours de son métabolisme. Le premier, « site A », se situe au niveau de l'ancrage GPI (phospholipases) et aboutit au relargage extracellulaire de la chaîne polypeptidique [Harris 2001]. Le second clivage de la PrP<sup>c</sup>, « site B » (aa 111/112), est situé au niveau d'une région de 16 aa hydrophobes (aa 111/134), domaine très conservé dans les différentes espèces, au niveau des vésicules d'endocytose [Harris 2001]. La signification biologique de ces clivages n'est pas encore connue.

D'une façon générale, la PrP<sup>c</sup> est une protéine cellulaire normale qui est exprimée principalement dans le système nerveux central. Cette expression débute tôt au cours de

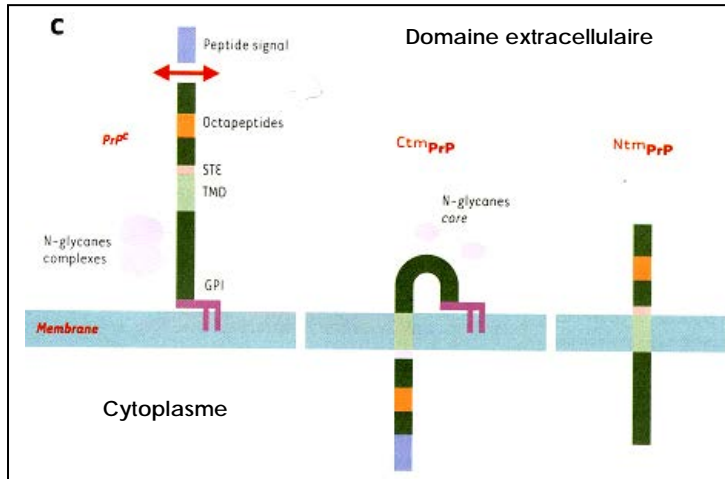
l'embryogénèse et augmente au cours du développement ; chez la souris, des transcrits sont détectés dans les tissus extra-embryonnaires dès le 6<sup>ème</sup> jour et il sont détectés dans tout le SNC à 13 jours [Manson *et al.* 1992] [Harris *et al.* 1993]. Chez l'adulte, dans le SNC, la PrP<sup>c</sup> est exprimée particulièrement dans le néocortex, dans les neurones de l'hippocampe, dans le striatum, et dans les cellules de Purkinje du cervelet [Sales *et al.* 1998] [Moya *et al.* 2000]. Au niveau cellulaire, la synthèse de la protéine a lieu principalement dans les neurones de l'hippocampe et du néocortex [Kretzschmar *et al.* 1986] [Kubosaki *et al.* 2000]. Une plus faible expression a aussi été mise en évidence dans les cellules gliales (astrocytes et microglie, oligodendrocytes) [Kretzschmar *et al.* 1986] [Moser *et al.* 1995] [Brown *et al.* 1998]. Dans les tissus périphériques, de nombreux types cellulaires expriment la PrP<sup>c</sup> : les lymphocytes [Mabbott *et al.* 1997], les cellules folliculaires dendritiques [Bencsik *et al.* 2000], les kératinocytes [Pammer *et al.* 1998], certaines cellules du tube digestif [Pammer *et al.* 2000], les tuniques musculaires myomètre de l'utérus [Kubosaki *et al.* 2000]. L'expression du gène de la PrP, identifiée par un gène rapporteur (green fluorescent protein) dans un modèle murin transgénique, a permis de confirmer que la PrP<sup>c</sup> est une protéine principalement exprimée dans le SNC mais dont l'expression est ubiquiste [Lemaire-Vieille *et al.* 2000].

Chez le mouton, la PrP<sup>c</sup> a été mise en évidence dans le SNC, la rate, les muscles, les poumons, le cœur, l'utérus, le placenta, les ganglions lymphatiques, l'épithélium intestinal, les glandes mammaires, les surrénales et les glandes salivaires [Horiuchi *et al.* 1995] [Kubosaki *et al.* 2000].

## **2 - Autres formes de PrP<sup>c</sup>, et identification d'une protéine PrP<sup>c</sup>-like : la protéine doppel**

D'autres formes de la PrP<sup>c</sup> ont été identifiées : une forme sécrétée <sup>sec</sup>PrP dans le milieu extra cellulaire [Hay *et al.* 1987] et deux formes transmembranaires. Il s'agit de la forme <sup>Ctm</sup>PrP et de la forme <sup>Ntm</sup>PrP qui possèdent un domaine transmembranaire correspondant à la séquence hydrophobe conservée de la PrP<sup>c</sup> entre les aa 111 et 134. La forme <sup>Ctm</sup>PrP est également fixée à la membrane cellulaire par une ancre GPI et possède encore la séquence peptide signal normalement clivée. Cette forme induit chez la souris une neurodégénérescence sans accumulation de PrP<sup>res</sup> [Hegde *et al.* 1998] [Stewart *et al.* 2001]. La forme <sup>Ntm</sup>PrP, uniquement décrite *in vitro*, présente une orientation inverse par rapport à la forme <sup>Ctm</sup>PrP et n'est ni glycosylée, ni glypiée [Hegde *et al.* 1998].

Il a été proposé que la forme <sup>Ctm</sup>PrP puisse être responsable de la neurodégénérescence observée dans le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS, mutation A117V) [Hegde *et al.* 1998] [Stewart *et al.* 2001]. Ces différentes formes de PrP<sup>c</sup> sont représentées dans la figure 7.

Figure 7 : Formes de la PrP<sup>c</sup>.

En plus de la forme membranaire, deux formes trans-membranaires sont décrites. La séquence TMD (trans membrane domain) qui est une région hydrophobe permet une relative stabilité. Seule la forme C<sup>tm</sup>PrP possède une ancre GPI, la forme N<sup>tm</sup>PrP (décrite seulement *in vitro*) étant orientée dans l'autre sens. D'après [Mangé *et al.* 2002].

La construction de différents modèles transgéniques knock-out (KO) pour le gène de la PrP a abouti à la création d'une lignée dont les animaux développent une ataxie accompagnée d'une dégénérescence des cellules de Purkinje [Sakaguchi *et al.* 1996]. Ces travaux ont permis de révéler la présence d'une protéine appartenant à la même famille que celle de la PrP, située sur le même chromosome à 16 Kb en aval du gène de la PrP, de 179 acides aminés, nommée Doppel (Dpl) [Moore *et al.* 1999]. Cette protéine est très faiblement exprimée dans le SNC par rapport à la PrP [Silverman *et al.* 2000]. Dans ce modèle KO, l'expression du gène Dpl est amplifiée du fait des modes de construction des souris KO. Cette sur-expression semble être à l'origine de l'ataxie tardive des souris, suggérant que Dpl possède des propriétés neurodégénératives [Moore *et al.* 1999] [Rossi *et al.* 2001]. La découverte de cette protéine ouvrait de nouvelles voies d'investigation. Cependant, les premières études portant sur l'identification d'un rôle de Dpl dans les maladies à prion ne sont pas en faveur de son implication [Mead *et al.* 2000] [Tuzi *et al.* 2002].

### 3 - Les fonctions de la PrP<sup>c</sup>

Les fonctions de la PrP<sup>c</sup> ne sont pas encore bien connues. Actuellement, plusieurs rôles de cette protéine sont proposés ; la fixation et/ou la régulation du métabolisme du cuivre, la protection contre le stress oxydatif et l'adhésion/signalisation cellulaire sont les principales hypothèses concernant sa fonction.

La détermination de la fonction de la PrP<sup>c</sup> a été envisagée par la construction de différents modèles murins Knock-Out (KO) pour le gène de la PrP. Deux lignées créées sont tout à fait viables et présentent un phénotype normal [Büeler *et al.* 1992] [Manson *et al.* 1994]. Ces souris présentent néanmoins une altération du rythme circadien, ce qui suggère que la PrP<sup>c</sup> pourrait jouer un rôle dans les états de veille/sommeil [Tobler *et al.* 1996], ce qui a depuis été partiellement remis en cause par la même équipe [Huber *et al.* 2002]. Des souris, dont le gène de la PrP est sous le contrôle d'un promoteur réprimant l'expression de la PrP<sup>c</sup> en présence de doxycycline, ont été rendues déficientes en PrP<sup>c</sup> une fois adultes par

administration de l'antibiotique, et n'ont pas présenté de troubles pendant plus d'un an et demi [Tremblay *et al.* 1998]. La PrP<sup>c</sup> ne semble donc pas jouer un rôle biologique fondamental et ses rôles pourraient être compensés par d'autres systèmes biologiques.

### **PrP<sup>c</sup> et métabolisme du cuivre**

Plusieurs observations récentes ont permis d'attribuer un rôle possible de la PrP<sup>c</sup> dans le métabolisme du cuivre. Il a été démontré que des fractions purifiées de PrP recombinante, tout comme des peptides synthétiques de PrP, fixent le cuivre dans la région des octapeptides répétés dans la partie N-terminale de la protéine [Brown *et al.* 1997] [Stöckel *et al.* 1998].

Dans les modèles KO pour la PrP<sup>c</sup>, les fractions membranaires des cellules du SNC, semblent contenir une concentration en cuivre réduite de 10 à 15 fois, sans que le taux en autres métaux ne soit modifié [Brown *et al.* 1997]. Ces résultats suggèrent que la PrP<sup>c</sup> pourrait être une protéine essentielle dans la fixation du cuivre dans le SNC. Certaines observations ont conduit à la supposition que la PrP<sup>c</sup> pourrait avoir un rôle dans la distribution du cuivre à certaines enzymes telles que les superoxydes dismutases comme SOD1 (superoxyde dismutase Cu/Zn) [Brown *et al.* 1997] [Brown *et al.* 2001] [Wong *et al.* 2001].

La PrP<sup>c</sup> pourrait cependant intervenir seulement dans les mécanismes de capture du Cu dans le milieu extra-cellulaire. Ainsi, la PrP<sup>c</sup> ne reste pas à la surface cellulaire mais subit des cycles successifs entre la surface cellulaire et le compartiment d'endocytose [Shyng *et al.* 1995]. Dans un modèle de culture de neuroblastome, ce cycle endocellulaire des molécules de PrP<sup>c</sup> est d'environ 60 minutes, et à chaque passage, 1 à 5% des molécules de PrP<sup>c</sup> sont clivées au site B [Harris 2001]. L'existence de ce cycle suggère un rôle de récepteur de la PrP<sup>c</sup> à un ligand extracellulaire. L'hypothèse de Pauly et Harris est que la PrP<sup>c</sup> capte le cuivre extracellulaire à la surface des cellules et le redistribue dans le compartiment d'endocytose dans lequel le cuivre est recapté par d'autres protéines du cytosol. Cette hypothèse a été corrélée par la mise en évidence de l'efficacité de capture de cuivre radioactif par des cultures de neuroblastomes en fonction du taux d'expression de la PrP<sup>c</sup> [Harris 2001] [Brown *et al.* 1999a].

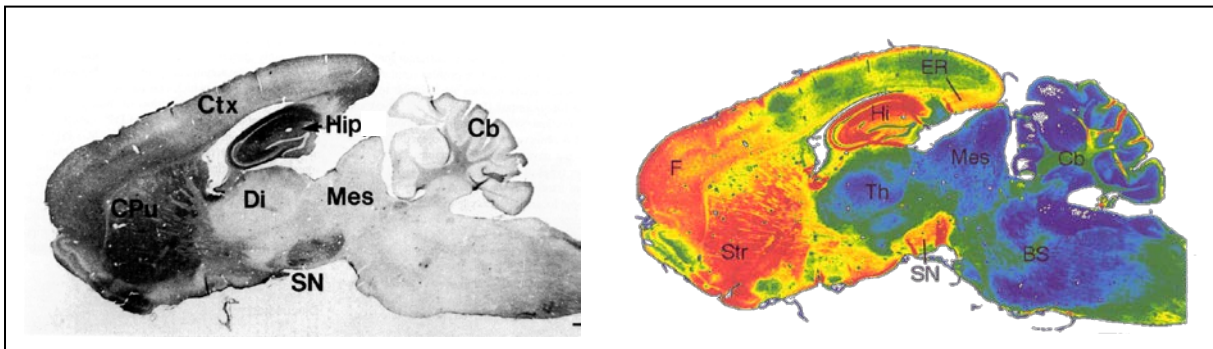
D'autres études ne semblent pas indiquer que la PrP<sup>c</sup> ait une role dans le métabolisme du cuivre. En effet, des taux similaires de cuivre ont été rapportés dans trois lignées murines exprimant respectivement 0, 1 ou 10 fois les taux normaux de PrP<sup>c</sup>. Aussi l'utilisation d'un isotope du cuivre, le Cu-64, a permis de montrer que l'activité enzymatique ainsi que les taux d'incorporation de ce marqueur dans la superoxyde dismutase Cu/Zn, étaient similaires chez les trois lignées de souris [Waggoner *et al.* 2000].



### PrP<sup>c</sup>, signalisation et adhésion cellulaire

Des fonctions de récepteur cellulaire, de transducteur de signal ou de régulation du flux membranaire ont été envisagées. Ainsi sur des modèles de culture de neurones portant sur la différenciation cellulaire, la PrP<sup>c</sup> semble permettre une activation de la tyrosine kinase Fyn au niveau des terminaisons neuronales [Mouillet-Richard *et al.* 2000]. Ces données sont corroborées par la mise en évidence d'importants taux de protéine-kinase et de PrP<sup>c</sup> dans les rafts, domaines membranaires riches en protéines à ancre GPI et kinases [Maekewa *et al.* 2003].

Une étude électrophysiologique portant sur des coupes d'hippocampe de souris KO pour le gène de la PrP est en faveur de l'implication de la PrP<sup>c</sup> dans la transmission synaptique [Collinge *et al.* 1994], ce qui est en accord avec la mise en évidence de l'expression de la PrP<sup>c</sup> dans les régions riches en synapses dans le SNC. La protéine est transportée dans les axones jusqu'aux terminaisons nerveuses [Borchelt *et al.* 1994] et les fractions membranaires présynaptiques sont enrichies en PrP<sup>c</sup> [Herms *et al.* 1999]. Ces résultats ont aussi été confirmés par microscopie électronique et par microscopie optique, où les immunomarquages de la PrP<sup>c</sup> sont principalement retrouvés, chez le rongeur, dans les champs synaptiques des bulbes olfactifs, des structures limbiques, du complexe striatonigral, et de la couche moléculaire du cervelet (figure 8) [Collinge *et al.* 1994] [Sales *et al.* 1998] [Herms *et al.* 1999] [Moya *et al.* 2000] [Sales *et al.* 2002].



**Figure 8 : Localisation de la PrP<sup>c</sup> dans un cerveau de hamster sain** (section sagittale montrant la distribution antéro-postérieure). Une immunoréactivité dense est observée dans l'hippocampe (Hi) ainsi que dans le cortex (Ctx) et le striatum (Str). Le gène de la PrP est moins fortement exprimé dans le mésencéphale (Mes), l'hypothalamus ou le cervelet (Cb). Les immunoréactivités sont représentées à l'aide d'une échelle de couleur où l'immunoréactivité la plus intense correspond à la couleur rouge. D'après [Sales *et al.*, 1998] [Moya *et al.*, 2000].

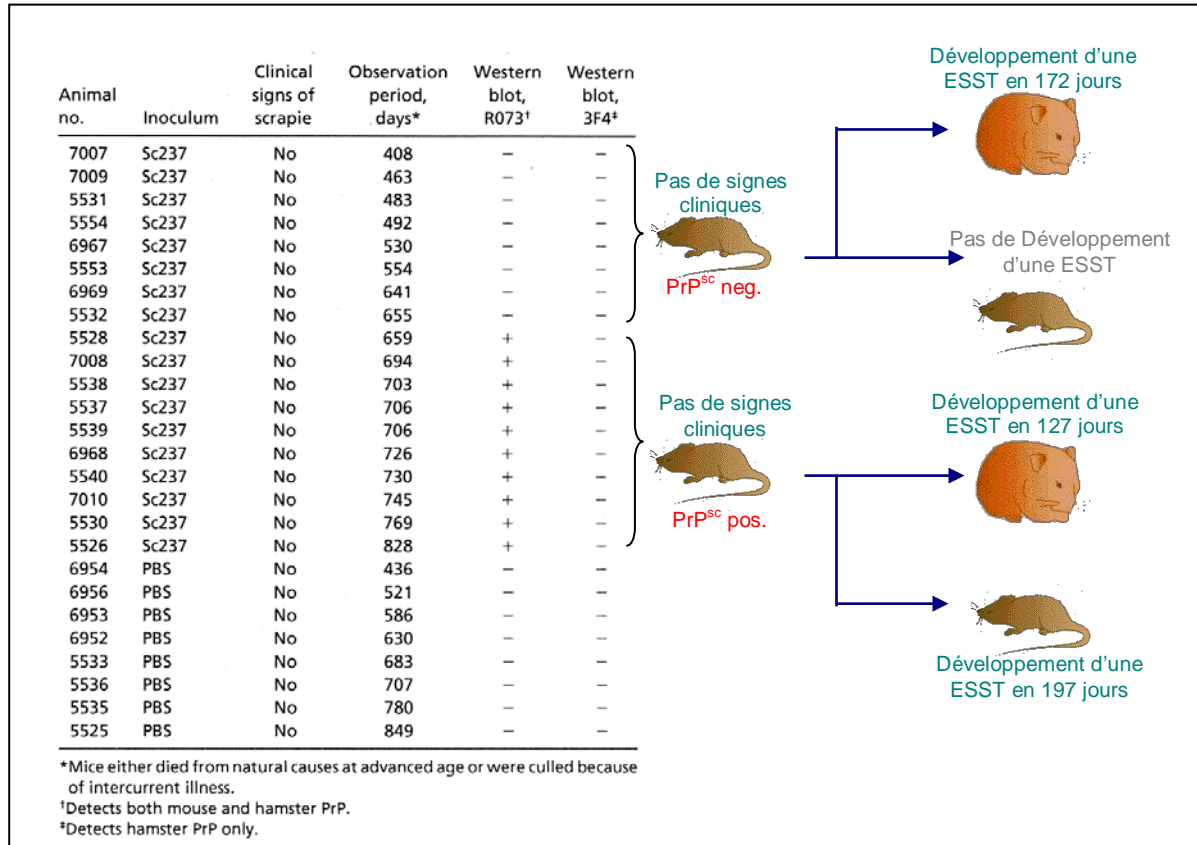
La PrP<sup>c</sup> interagit aussi avec différents constituants membranaires comme le LRP (Précurseur du récepteur à la laminine) et le LR (recepteur de la laminine) [Gauczynski *et al.* 2001b] [Simoneau *et al.* 2003]. Le LRP est le précurseur du récepteur de la laminine. Ce récepteur présente de forte propriété de fixation de la laminine qui est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'attachement, la mobilité, la différenciation et la croissance cellulaire. L'implication de ce LRP dans les infections à prion a été démontré *in vitro* ;

l'utilisation d'agent bloquant sa synthèse (ARN anti-sens) ou d'anticorps anti-LRP/LR dans des cultures de cellules infectées conduit à l'inhibition de l'accumulation de PrP<sup>sc</sup> [Leucht *et al.* 2003].

#### **4 - Importance de la PrP<sup>c</sup> dans les maladies à prion : un support moléculaire au phénomène de barrière d'espèce et aux maladies héréditaires humaines**

La PrP<sup>c</sup> joue un rôle fondamental dans le développement des affections à prion : les souris KO pour le gène de la PrP<sup>c</sup> ne sont pas sensibles à des souches de prion murine (même par inoculation IC) et ne portent pas non plus de trace d'infectiosité entre 2 et 25 semaines après inoculation [Büeler *et al.* 1993]. La restauration d'un allèle du gène induit chez ces souris une sensibilité à la maladie avec des temps d'incubation plus longs et des durées de maladie prolongées par rapport aux souris sauvages (deux allèles du gène). Ces résultats montrent non seulement que la PrP<sup>c</sup> est indispensable au développement de la maladie mais que son taux d'expression détermine en partie la période d'incubation [Büeler *et al.* 1993] [Manson *et al.* 1994].

La transmission d'une maladie à prion d'une espèce à l'autre n'est pas toujours possible : par exemple, la souris est sensible à l'agent de l'ESB mais pas le hamster [Bradley 1996]. Cette transmission, lorsqu'elle a lieu, conduit après plusieurs passages au sein d'une même espèce, à des temps d'incubation généralement plus courts qui se stabilisent fournissant des paramètres caractérisant l'agent infectieux dans cette nouvelle espèce. Ainsi, la transmission de la souche de tremblante expérimentale murine 302K (142 jours de temps d'incubation chez la souris) au hamster conduit à une maladie dont les temps d'incubation sont relativement longs (186 jours). Des passages successifs chez le hamster aboutissent à l'observation de temps d'incubation beaucoup plus courts (62 jours, souche alors nommée Sc237 ou 263K). De la même façon, si, au cours de ces passages successifs chez le hamster, une transmission est réalisée chez la souris, on observe alors des temps d'incubation beaucoup plus longs (minimum 302 jours et plus de 600 jours s'il y a eu plus de trois passages chez le hamster) [Kimberlin *et al.* 1989]. La transmission de la maladie du hamster à la souris est donc devenue très difficile suggérant une adaptation de l'agent infectieux à son nouvel hôte. Une étude récente de ce modèle montre d'ailleurs que de faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> sont accumulées dans le SNC des souris infectées par la souche 263K adaptée au hamster (premier passage) [Hill *et al.* 2000] (figure 9).



**Figure 9 : Illustration du phénomène de barrière d'espèces.** L'inoculation de souris CD-1 avec la souche de hamster Sc237 illustre le phénomène de barrière d'espèce. Seules les souris âgées présentent une faible accumulation de PrP anormale dans le SNC sans jamais développer de signes cliniques. L'inoculation de hamsters et de souris avec des extraits de cerveaux de souris qui ne présentent pas d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> conduit au développement d'une ESST uniquement chez les hamsters ; ces résultats suggèrent la persistance de la souche Sc237 chez les souris. Quant aux essais de transmission de la maladie à partir des souris plus âgées, ils révèlent une répllication de l'agent chez les souris montrant un véritable franchissement de la barrière d'espèce. D'après [Hill et al. 2000].

La démonstration que la PrP<sup>c</sup> est le facteur déterminant dans le phénomène de barrière d'espèce a été réalisée chez des souris transgéniques exprimant différentes quantités de PrP<sup>c</sup> de hamster. Ces souris inoculées avec la souche Sc237 de hamster ont ainsi présenté des durées d'incubation inversement proportionnelles aux taux de PrP<sup>c</sup> de hamster produits [Scott et al. 1989a]. D'autres résultats suggèrent l'existence d'un lien de causalité entre la barrière d'espèce et le changement conformationnel de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. Ainsi, l'inoculation de la souche Sc237 (entretenu sur hamster) à un modèle murin transgénique, exprimant une protéine prion chimère souris/hamster, conduit à l'obtention d'une nouvelle souche dont la PrP<sup>Sc</sup> diffère de la PrP<sup>Sc</sup> de la souche Sc237 par analyse conformationnelle. Quand cette nouvelle souche est de nouveau transmise au hamster, elle induit d'ailleurs une période d'incubation plus longue et une neuropathologie différente comparativement à la souche Sc237 [Peretz et al. 2002].

Des mutations sur le gène de la PrP peuvent aussi conduire au développement spontané de maladies à prion. Chez l'homme, il s'agit des formes héréditaires des maladies de Creutzfeldt-Jakob, du syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et de l'insomnie familiale fatale (IFF) qui se transmettent sous un mode autosomique dominant [Prusiner 1997] [Gambetti *et al.* 2003].

## C – Modes de dissémination de l'agent dans l'organisme : importance du système immunitaire et du système nerveux autonome

### 1- Importance du système immunitaire

Dès 1970, l'importance du système immunitaire (notamment la rate) lors d'infections à prion par voie périphérique était décrite chez la souris. En effet, la splénectomie permet de prolonger les périodes d'incubation après infection par voie intra-péritonéale [Fraser 1970]. L'identification des cellules impliquées a été en partie réalisée grâce à des méthodes d'irradiation et de reconstitution de moëlle osseuse [Fraser 1979c], associée à la mise en évidence d'importants titres infectieux dans la fraction stromale de la rate (mais pas dans la population lymphocytaire) ; ainsi, les cellules folliculaires dendritiques (FDCs) ont été suspectées pour la première fois comme jouant un rôle important dans ces maladies dans les modèles murins [Clarke *et al.* 1984]. L'implication du système lymphoïde est très précoce et l'infectiosité de la rate augmente bien avant que l'agent infectieux soit détectable dans le SNC (figure 10) [Kimberlin *et al.* 1979] [Bruce *et al.* 2000]. Cette infectiosité est mise en évidence dans la rate de souris une semaine après inoculation intra-péritonéale (IP) de souches de tremblante et augmente pendant 4 semaines pour atteindre un plateau jusqu'au stade terminal de la maladie [Kimberlin *et al.* 1979].

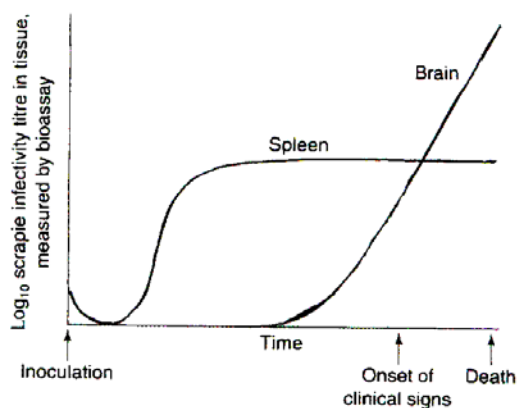


Figure 10 : Accumulation de l'infectiosité dans la rate et le cerveau de souris après inoculation par voie périphérique d'une souche de tremblante. L'infectiosité dans la rate augmente longtemps avant le début de la réplication de l'agent dans le SNC et l'apparition des signes cliniques. D'après [Kimberlin *et al.*, 1979] [Bruce *et al.*, 2000].

La présence de l'agent infectieux dans les organes lymphoïdes a aussi été mise en évidence chez le mouton atteint de tremblante (différents nœuds lymphatiques et intestins) [Hadlow *et al.* 1982], ainsi que chez la vache expérimentalement infectée par l'ESB (iléon qui est une structure riche en formations lymphoïdes) bien que de façon beaucoup plus limitée [Wells *et al.* 1994a].

Quant à l'accumulation de PrP anormale, elle a été mise en évidence dans le système lymphoïde de différentes espèces : chez la souris expérimentalement infectée par différentes souches et isolats de tremblante [Race *et al.* 1992b] [McBride *et al.* 1992], chez la plupart des moutons atteints de tremblante [Race *et al.* 1992a] [van Keulen *et al.* 1996], dans le vMCJ chez l'homme [Hill *et al.* 1997b], dans la maladie du dépérissement chronique des cervidés [Miller *et al.* 2002] [Sigurdson *et al.* 2002], chez le chat atteint d'encéphalopathie spongiforme féline (ESF) [Ryder *et al.* 2001] et chez les bovins oralement infectés par l'agent de l'ESB dans les plaques de Peyer de l'iléon uniquement [Terry *et al.* 2003]. Dans toutes ces maladies, la PrP anormale est détectée dans les follicules lymphoïdes secondaires, associée aux FDCs et aux macrophages à corps tingibles (TBMs, tingible body macrophages). Comme pour l'infectiosité, la PrP anormale est détectable très tôt dans la rate de souris expérimentalement infectées (2 semaines après inoculations intra-péritonéale ou intra-cérébrale) [Grathwohl *et al.* 1997] [Race *et al.* 1992a].

Le système lymphoréticulaire est donc clairement impliqué dans les ESST. Sa participation dans le phénomène de transmission de la maladie et dans la dissémination de l'agent dans l'organisme semble importante. Ceci a clairement été mis en évidence dans des modèles murins immunodéficients (Souris SCID, RAG<sup>-/-</sup>) qui ne sont que très peu infectables par voie périphérique, et tout à fait sensibles aux ATNC lorsque leur système immunitaire est reconstitué [Lasmézas *et al.* 1996a]. L'expression de la PrP<sup>c</sup> dans les tissus périphériques (autres que le SNC) est nécessaire à la neuro-invasion comme le montrent des expérimentations sur des souris n'exprimant pas la PrP<sup>c</sup> (KO pour le gène de la PrP), chez lesquelles des greffes intra-cérébrales de neurones sur-exprimant la PrP<sup>c</sup>, ne présentent pas d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> après inoculation intra-péritonéale (IP). Dans ces conditions d'inoculation, ces souris, qui ne développent jamais la maladie, aucune infectiosité n'est retrouvée dans le greffon cérébral, ni en périphérie dans les organes lymphoïdes [Brandner *et al.* 1996].

Le système immunitaire pourrait aussi jouer un rôle important lors de transmissions inter-espèces de la maladie. Ainsi, Bruce rapporte que certains isolats, comme l'ESB, ont été transmis plus facilement par voie intra-péritonéale (IP) que par voie intracérébrale (IC) à la souris lors d'un passage primaire [Bruce 1996b].

De plus, même si l'immunisation de souris KO pour le gène de la PrP conduit à la production de taux importants d'anticorps anti-PrP [Prusiner *et al.* 1993], l'immunisation de souris sauvages avec de la PrP d'une autre espèce conduit aussi à la production d'anticorps [Kacsak *et al.* 1987]. Ces données indiquent que le système immunitaire reconnaît la PrP d'une espèce différente et permet une réponse immune spécifique ; les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

jouent un rôle important dans cette réponse immunitaire en présentant différents peptides de la PrP via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) [Stoltze *et al.* 2003]. Le rôle joué par le système immunitaire dans le franchissement de cette barrière d'espèce pourrait donc être important ; son implication peut par conséquent permettre soit une adaptation de l'agent infectieux à son nouvel hôte par un système encore inconnu, soit simplement faciliter le transport de l'agent infectieux jusqu'aux sites immunitaires de première réplication.

## 2 - Identification des cellules immunes impliquées dans la dissémination périphérique de l'agent infectieux

Bien que les FDCs et les TBMs soient clairement impliqués dans l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup>, leur rôle dans la dissémination de l'agent infectieux dans l'organisme n'est pas pour autant établi. Ainsi plusieurs études ont été menées sur des modèles murins immunodéficients dans le but de clarifier les mécanismes physiopathologiques impliqués (tableau 1).

Modèles murins immunodéficients utilisés	Particularités
SCID (Severe Combined Immune Deficient phenotype)	Déficit en LT, LB et FDCs immatures. [Klein <i>et al.</i> 1997]
RAG-1 <sup>-/-</sup> (VDJ Recombination Activation Gene 1)	La mutation ne permet plus la recombinaison VDJ des Ig et des TCR. LT et LB immatures (FDC ?). [Klein <i>et al.</i> 1997]
RAG-2 <sup>-/-</sup> (VDJ Recombination Activation Gene 2)	Délétion d'une large partie du gène. LT et LB immatures (FDC ?). [Klein <i>et al.</i> 1997]
Arg <sup>-/-</sup>	Délétion du gène Rag-2 et pas de récepteurs aux interférons $\alpha$ $\beta$ $\gamma$ . Déficit en LT et LB. (FDC ?). [Klein <i>et al.</i> 1997].
$\mu$ MT	Pas de production d'Ig par les LB. LB immatures et LT normaux. [Klein <i>et al.</i> 1997].
t11 $\mu$ MT	Expression d'une seule classe d'Ig (IgM) dirigée contre une glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse. LB matures mais expriment seulement un type d'IgM. LT normaux. [Klein <i>et al.</i> 1997].
TNF-R1 <sup>-/-</sup>	Souris déficientes en récepteur au TNF. FDC immatures. LB et LT fonctionnels. [Klein <i>et al.</i> 1997].
CD4 <sup>-/-</sup> , CD8 <sup>-/-</sup> , B2- $\mu$ <sup>-/-</sup> , TCR <sup>-/-</sup> , et perforine <sup>-/-</sup>	déficients en LT. [Klein <i>et al.</i> 1997].

Tableau 1 : Présentation des différents modèles murins utilisés pour caractériser le rôle du système immunitaire dans les maladies à prion.

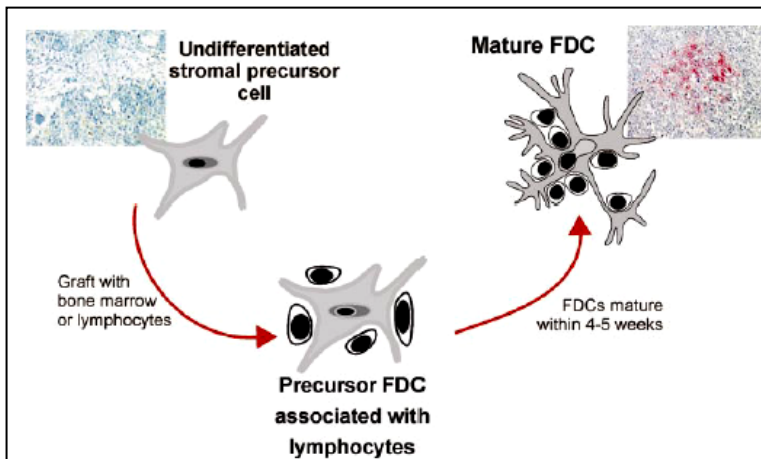
### Un rôle peu probable des lymphocytes T (LT) et des lymphocytes B (LB)

Les premières études portant sur l'effet de la thymectomie chez la souris dans le développement des maladies à prion, n'étaient pas en faveur de l'implication des lymphocytes T [Fraser *et al.* 1978]. Ce résultat a été confirmé plus tard, avec le développement de souris transgéniques déficientes en LT (CD4<sup>-/-</sup>, CD8<sup>-/-</sup>, B2- $\mu$ <sup>-/-</sup>, TCR<sup>-/-</sup>, et perforine<sup>-/-</sup>) qui restent aussi sensibles aux infections à prion que les souris sauvages lors d'inoculations périphériques [Klein *et al.* 1997] [Aguzzi *et al.* 1998]. Par conséquent, les LT ne sont pas impliqués dans le développement des infections à prion chez la souris.

L'utilisation de plusieurs modèles murins déficients en LB (souris : SCID, RAG-1<sup>-/-</sup>, RAG-2<sup>-/-</sup>, arg<sup>-/-</sup>, et  $\mu$ MT) a montré l'importance des LB dans l'accumulation de l'infectiosité dans la rate lors d'inoculations périphériques [Klein *et al.* 1997]. Cependant, ces données ont été remises en cause par d'autres équipes. En effet, ces souris déficientes en LB sont aussi indirectement déficientes en cellules folliculaires dendritiques (FDCs), les LB sécrétant différents facteurs comme le TNF $\alpha$ , la lymphotoxine  $\beta$  et l'interleukine-6, qui sont nécessaires à leur maturation. Ainsi, les résultats obtenus ne sont pas liés uniquement à l'absence de LB, mais également à d'autres populations cellulaires.

### Importance des Cellules Folliculaires Dendritiques (FDCs)

Les FDCs sont des cellules résidentes des formations lymphoïdes. Leur origine n'est pas connue, mais elle est non myéloïde. Ces cellules, radiorésistantes, ont un rôle fondamental dans la sélection clonale et la maturation des lymphocytes B [Lindhout *et al.* 1995].



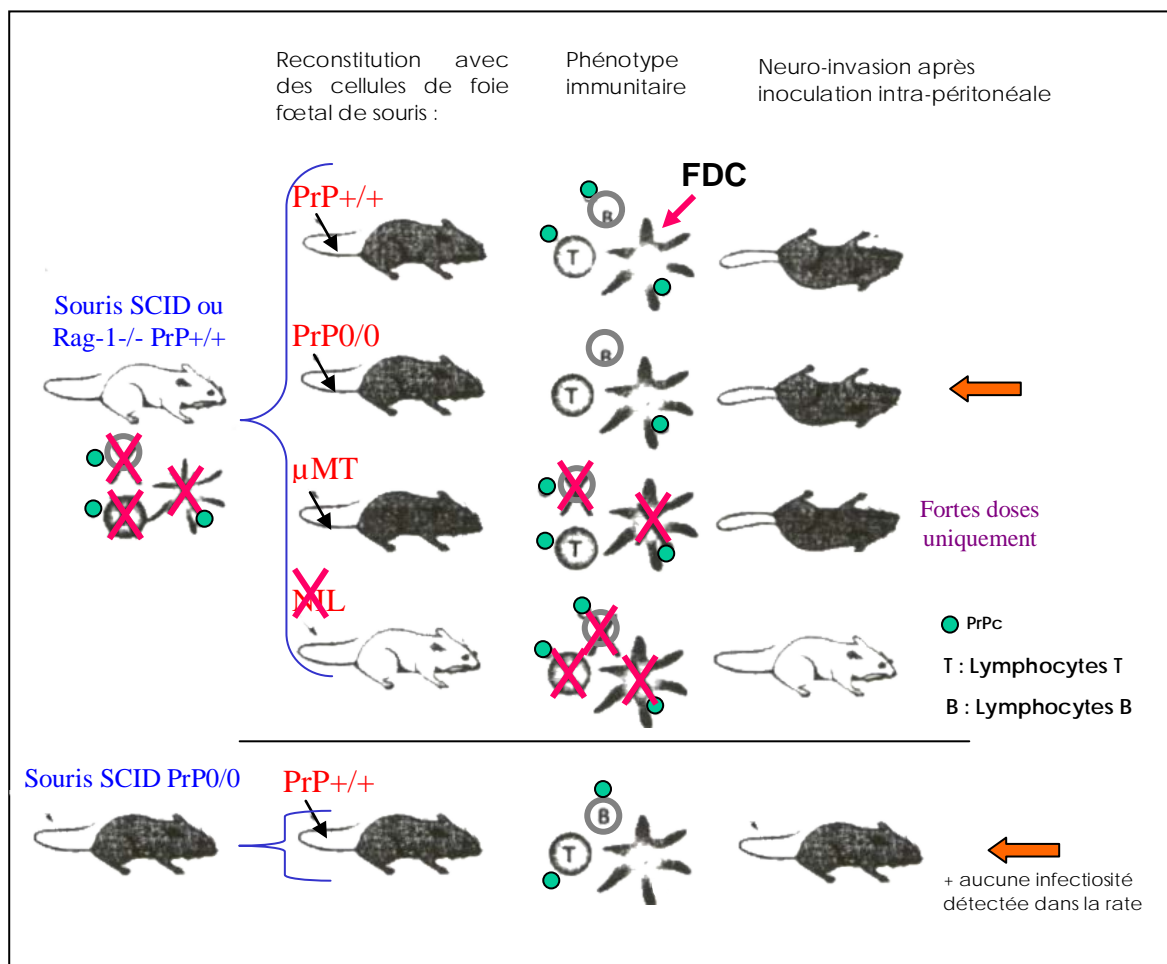
**Figure 11 : Lymphocytes B et maturation des FDCs.** Chez les souris Immuno-déficientes (SCID) les FDCs ne sont pas matures. Une greffe de moelle osseuse permet la reconstitution du compartiment myéloïde induisant l'apparition de lymphocytes qui stimulent alors la croissance et le développement des FDCs d'origine stromale. Détection des FDCs avec l'anticorps FDC-M1 (rouge). D'après [Mabbott *et al.* 2001]

Des souris déficientes en cytokines ou en récepteurs associés ont été utilisées pour distinguer les rôles différents des LB et FDCs dans les infections à prion. Des souris déficientes en TNF $\alpha$ , qui ne présentent pas de FDCs matures mais dont les LB sont capables de répondre à une stimulation antigénique, sont peu susceptibles à la maladie quand elles sont inoculées par voie périphérique suggérant le rôle important des FDCs dans la pathologie [Brown *et al.* 1999b] [Mabbott *et al.* 2000] [Mabbott *et al.* 2001a]. Ces résultats sont aussi corroborés par la mise en évidence de la faible susceptibilité à la maladie de souris dont la maturation des FDCs est bloquée par l'utilisation d'un anticorps anti-LT $\beta$ R (récepteur à la lymphotoxine  $\beta$ ) [Montrasio *et al.* 2000] [Mabbott *et al.* 2003]. Ces données sont en accord avec celles obtenues chez des souris TNF<sup>-/-</sup> qui sont également peu sensibles [Brown *et al.* 1999b].

Cependant, des résultats contradictoires sont rapportés par d'autres équipes ; des souris sans récepteur au TNF (TNF-R<sup>-/-</sup>) sont aussi susceptibles que des souris conventionnelles lors d'infection par voie périphérique [Klein *et al.* 1997]. De même, des souris n'exprimant pas de

lymphotoxine  $\beta$  ( $LT\beta^{-/-}$ ), qui n'ont pas de FDC matures (mais des LT et LB fonctionnels), sont toujours susceptibles à la maladie suite à une inoculation avec une souche murine de MCJ [Manuelidis *et al.* 2000].

Ces divergences sur l'implication directe des FDCs peuvent être dues à l'utilisation de différentes doses d'inoculum : les souris immunodéficientes utilisées qui présentent une résistance à l'infection par voie périphérique, peuvent devenir susceptibles si de fortes doses d'agent infectieux sont utilisées [Fraser *et al.* 1996] [Collinge *et al.* 1998]. De même, différentes souches d'agent infectieux sont utilisées dans ces expérimentations (ME7, RML, MCJ) et des variations liées aux souches employées sont très probables : chez l'homme, une accumulation de  $PrP^{Sc}$  a lieu dans les organes lymphoïdes seulement dans le cas du vMCJ (contamination orale) [Hill *et al.* 1997b], mais pas dans le Kuru (contamination orale), ni dans les cas sporadiques et iatrogéniques (contaminations centrale et périphérique) [Hill *et al.* 1999b].



**Figure 12 : Importance des FDCs exprimant la  $PrP^c$  dans la neuro-invasion.** Des souris SCID ou Rag<sup>-/-</sup> qui n'ont ni lymphocyte B ni lymphocyte T, non sensibles à l'inoculation de souche de tremblante murine par voie périphérique, redeviennent sensibles quand les compartiments des cellules du système immunitaire sont restaurés par des greffes de moelle osseuse de souris PrP<sup>+/+</sup>, PrP<sup>0/0</sup>,  $\mu$ MT. Aussi des souris avec des FDCs sans  $PrP^c$  et des LT et LB exprimant la  $PrP^c$  ne sont pas infectables. D'après [Brown *et al.* 1999b].



D'autres travaux utilisant des modèles transgéniques immunodéficients irradiés, et dont la moelle osseuse est reconstituée avec des cellules PrP<sup>+/+</sup> ou PrP<sup>-/-</sup> ont permis de montrer que les FDC exprimant la PrP<sup>c</sup> sont nécessaires au développement de la maladie suite à une infection par voie IP avec la souche ME7 [Brown *et al.* 1999b].

Des résultats différents ont été rapportés avec une autre souche de tremblante (RML) qui induit l'infectiosité de la rate chez des souris dont les FDCs expriment la PrP<sup>c</sup> (et pas les lymphocytes), mais qui induit aussi une accumulation de l'agent infectieux dans la rate sans que les FDC expriment la PrP<sup>c</sup> [Klein *et al.* 1998].

Il semble aussi que l'accumulation de l'agent infectieux puisse être différente en fonction des organes lymphoïdes étudiés : malgré l'absence de FDCs dans les ganglions lymphatiques, des souris immunodéficientes (TNF-R<sup>-/-</sup> et TNF<sup>-/-</sup>) ont présenté un titre infectieux important dans les nœuds lymphatiques mais pas dans la rate [Prinz *et al.* 2002].

Ces résultats discordants peuvent résulter soit de l'utilisation de souches différentes (comme indiqué précédemment) soit du fait que les déficiences immunitaires des modèles murins ne sont pas toutes équivalentes et que leur contrôle n'est pas absolu. De même, les marqueurs cellulaires utilisés ne permettent peut être pas d'identifier les cellules à tous les stades de leur développement et l'absence de marquage n'est pas obligatoirement corrélée à l'absence des cellules étudiées.

### ***Les Macrophages à corps tingible (TBMs) et l'élimination de l'agent infectieux***

Dans les centres germinatifs de souris infectées, les TBMs, qui régulent en partie l'activité du follicule lymphoïde secondaire, accumulent la PrP<sup>Sc</sup> dans leurs lysosomes [Jeffrey *et al.* 2000]. Cette accumulation suggère fortement que ces macrophages jouent un rôle dans la l'élimination de la PrP<sup>Sc</sup> et/ou de l'agent infectieux ; ceci a été démontré par déplétion chimique des macrophages, préalablement ou immédiatement après une infection IP, qui induit une accumulation plus importante de PrP<sup>Sc</sup> dans la rate [Beringue *et al.* 2000]. De plus, l'incubation de macrophages (2h à 37°C) en présence d'un homogénat de cerveau de souris infectée par une souche de tremblante (ME7), conduit à la détection d'une infectiosité associée de ces cellules (mesurée par transmission à la souris) ; comparativement, dans les mêmes conditions expérimentales, des cellules de rein ne présentent ces propriétés [Carp *et al.* 1981]. Chez le mouton, des travaux montrent que la PrP<sup>Sc</sup> est partiellement digérée dans les TBMs [Jeffrey *et al.* 2001a]. L'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> dans les TBMs provient de la phagocytose de prolongements cytoplasmiques des FDCs contenant la protéine anormale [Herrmann *et al.* 2003]. La dissémination de l'agent infectieux dans l'ensemble des structures immunitaires par les macrophages est peu probable car ces cellules sont actuellement considérées comme des cellules résidentes ne migrant pas.

### **Rôle des Cellules Dendritiques (DCs)**

Les cellules dendritiques, cellules d'origine myéloïde, sont des cellules différentes des FDCs. Ces DCs sont les seules cellules présentatrices d'antigènes pouvant induire une réponse immune primaire. Elles capturent les antigènes en périphérie et migrent dans les organes lymphoïdes principalement dans les zones LT situées en périphérie des centres germinatifs (site de formation et de sélection des LB par les FDCs et TBMs). Chez l'homme, certaines sous populations de DCs ont été identifiées dans les centres germinatifs [Banchereau *et al.* 2000]. D'importants titres infectieux ont été trouvés dans des DCs de la rate de souris infectées : l'inoculation de ces DCs infectieuses à des souris immunodéficientes (RAG-1<sup>-/-</sup>) a permis d'induire une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans la rate de ces souris suggérant un rôle éventuel des DCs dans la propagation périphérique de l'agent [Aucouturier *et al.* 2001]. De plus, il a été montré que les DCs peuvent acquérir de la PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* et *in vivo* après injection intra-intestinale [Huang *et al.* 2002]. Ces cellules semblent donc impliquées dans la prise en charge et le transport de l'agent infectieux jusqu'aux formations lymphoïdes. Pourtant, l'implication des DCs dans le transport et la dissémination de l'agent infectieux ne semble pas être fondamentale car certains auteurs rapportent que la voie intraveineuse (IV) est beaucoup plus efficace que la voie sous cutanée (SC) dans les modèles d'infection expérimentaux [Kimberlin *et al.* 1988]. Ces données ne sont pas en faveur de l'implication des DCs (capture de la PrP<sup>Sc</sup> et migration dans les organes lymphoïdes). En effet, l'induction par voie IV de réponses immunitaires à d'autres antigènes est peu efficace, les DCs n'ayant plus dans le sang leur capacités de capture d'antigènes, contrairement à des immunisations sous cutanées ou IP [Banchereau *et al.* 2000].

### **Autres facteurs impliqués**

Les FDCs captent les antigènes et les présentent à leur surface en formant des complexes immuns composés d'antigènes, d'anticorps et d'une protéine du complément : le facteur C3 permettant la sélection clonale des LB.

Le rôle éventuel d'immunoglobulines dans le développement des infections à prion a été écarté par la mise en évidence de l'infectabilité par voie périphérique de souris exprimant un très faible répertoire d'immunoglobulines dirigées contre une glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse (souris t11 $\mu$ MT) [Klein *et al.* 1997], ainsi que par la déplétion des immunoglobulines circulantes ou de leurs récepteurs [Klein *et al.* 2001].

L'implication d'un facteur du complément a aussi été suggérée par le fait que la déficience ou la déplétion en facteur C3 ou C1q induit une accumulation différée de PrP<sup>Sc</sup> dans la rate et prolonge significativement la période d'incubation après infection périphérique [Klein *et al.* 2001] [Mabbott *et al.* 2001b]. Dans ces expérimentations, il semble que la voie classique

d'activation du complément soit la plus impliquée dans l'activation du facteur C3 pendant une infection à prion.

### **3 - Voies d'entrées de l'agent infectieux dans le SNC : la neuro-invasion**

Bien qu'un faible niveau d'infectiosité du sang dans certains cas (cf. revue générale [Brown 2001]) et que l'implication de cellules et facteurs immunitaires aient été rapportés dans certains modèles expérimentaux, il n'y a aucune preuve de dissémination de l'infection par le sang depuis les tissus périphériques jusqu'au SNC. Les premières études expérimentales sur modèle murin portant sur la dissémination de l'agent infectieux dans l'organisme rapportent que, quelle que soit la voie d'inoculation périphérique (IV, IP, SC), la réplication de l'agent infectieux commence dans la rate et atteint un plateau, puis gagne la moelle épinière et le tronc cérébral [Kimberlin *et al.* 1979] pour ensuite se propager lentement (0,5 à 1mm/jour) dans le reste du SNC probablement par voie intra-axonale [Kimberlin *et al.* 1982].

D'une façon générale, lors d'une contamination par voie orale, les formations lymphoïdes associées au tube digestif sont les premiers sites d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> et de l'infectiosité [Hadlow *et al.* 1982] [Maignien *et al.* 1999] [Andreoletti *et al.* 2000] [Beekes 2000] [Heggebo *et al.* 2003]. Il semble que les premières cellules permettant la pénétration de l'agent infectieux soient les cellules M [Heppner *et al.* 2001]. Ces cellules épithéliales du tube digestif phagocyteraient l'agent infectieux présent dans le bol alimentaire facilitant son passage jusqu'aux centres germinatifs des plaques de Peyer (figure 13). En effet, des souris déficientes en LB, mais dont les plaques de Peyer présentent des cellules M normales, sont aussi sensibles aux infections par les prions par voie orale que les souris sauvages [Prinz *et al.* 2003]. Ces cellules sont des cellules présentatrices d'antigènes au même titre que les cellules dendritiques ou les macrophages [Kraehenbuhl *et al.* 2000]. Dans les études de cinétique de contamination de hamsters et de moutons par voie orale (expérimentale ou naturelle), la PrP<sup>sc</sup> est d'ailleurs retrouvée associée à certaines cellules du pôle apical des follicules lymphoïdes du tube digestif (iléon) et identifiées comme étant des cellules M et des macrophages [Andreoletti *et al.* 2000] [Beekes 2000].

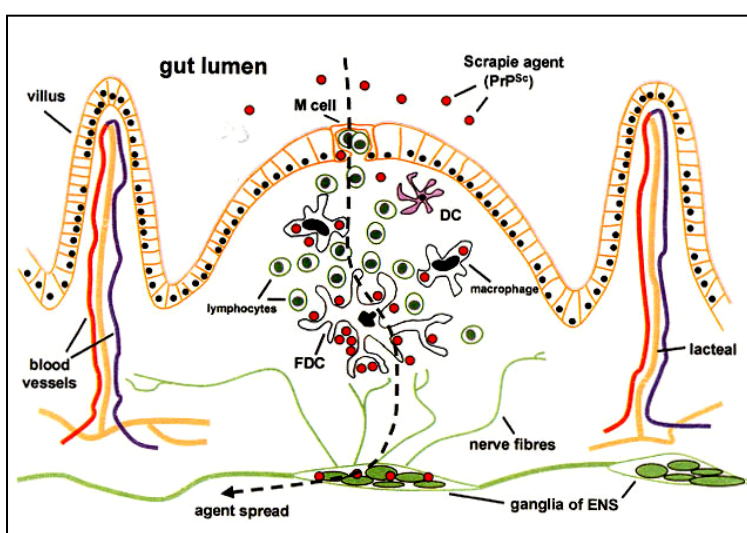


Figure 13 : Voie de dissémination possible de l'agent de la tremblante via les plaques de Peyer depuis la lumière intestinale après infection orale. L'agent serait capturé par les cellules épithéliales M ou par les cellules dendritiques (DC) puis gagnerait les FDC et les macrophages. La présence de terminaisons nerveuses à proximité permettrait une première neuro-invasion, l'agent gagnant ensuite les plexus du système nerveux entérique (ENS). D'après [Mabbott *et al.* 2001].

Dans les modèles expérimentaux murins et chez le hamster, la PrP<sup>Sc</sup> est détectée d'abord dans la plupart des formations lymphoïdes puis au niveau des plexus nerveux entériques (figure 14) [Maignien *et al.* 1999] [Beekes 2000]. Chez le hamster, le nerf vague a été clairement identifié comme voie de neuro-invasion depuis les organes viscéraux jusqu'à la moelle épinière thoracique et le tronc cérébral [Baldauf *et al.* 1997] [Beekes *et al.* 1998] [McBride *et al.* 2001].

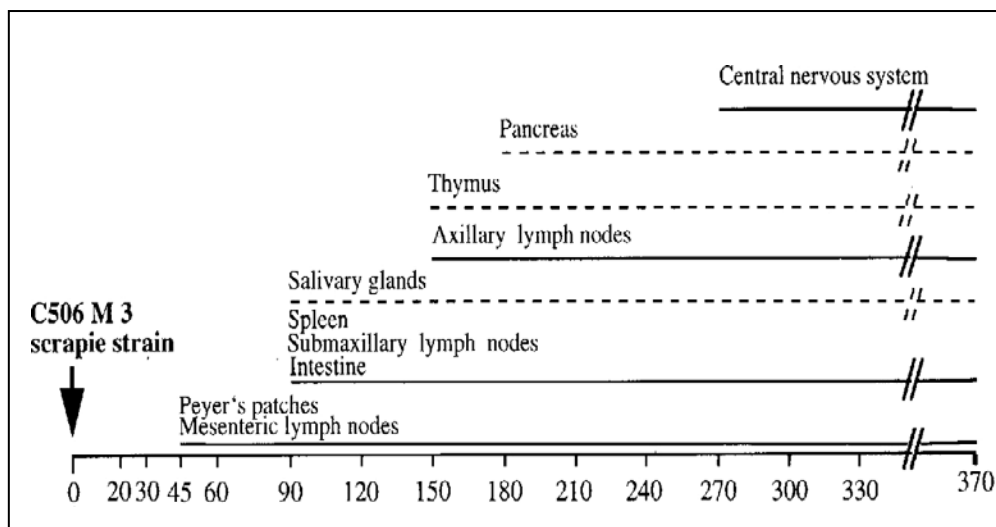


Figure 14 : Cinétique de l'accumulation de la PrP<sup>Res</sup> chez des souris infectées par voie orale avec la souche murine C506M3. Les lignes pleines correspondent à une détection continue de PrP<sup>Res</sup>, et les lignes en pointillés à une détection intermittente de PrP<sup>Res</sup>. D'après [Maignien *et al.* 1999].

Chez le mouton, des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> ont été mis en évidence dans les plexus nerveux entériques, d'abord au niveau de l'iléon, puis dans l'ensemble du tube digestif [van Keulen *et al.* 1999] [Andreoletti *et al.* 2000] [van Keulen *et al.* 2002b]. Au niveau du système nerveux central, la PrP<sup>Sc</sup> est détectée d'abord au niveau de la moelle épinière thoracique [van Keulen *et al.* 2000] et/ou au niveau du noyau parasympathique du nerf vague [van Keulen *et*

al. 2000] [Andreoletti *et al.* 2000] [Ersdal *et al.* 2003]; ces deux sites correspondent aux zones de projection des trajets nerveux du plexus coeliomésentérique (ou plexus solaire) qui innervent une partie des viscères abdominaux dont l'iléon (figure 15). Le système nerveux autonome pourrait ainsi véhiculer l'agent infectieux dans l'organisme. Cependant, en Norvège, plusieurs cas de tremblantes atypiques ont été rapportés chez des ovins de 6 ans environ qui présentent une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le cortex et le cervelet mais pas dans la région de l'obex. De plus, aucune accumulation de PrP<sup>Sc</sup> n'a été mise en évidence dans les formations lymphoïdes (tout comme dans certains cas d'hétérozygotie ARR, cf. page 48) [Besnestad *et al.* 2002]. Ces cas de tremblante constituent donc un phénotype particulier qui pourrait être dû au génotype des ovins (AHQ dans ces cas), à une nouvelle souche très particulière ou éventuellement à une forme sporadique ou héréditaire comme celles décrites chez l'homme.

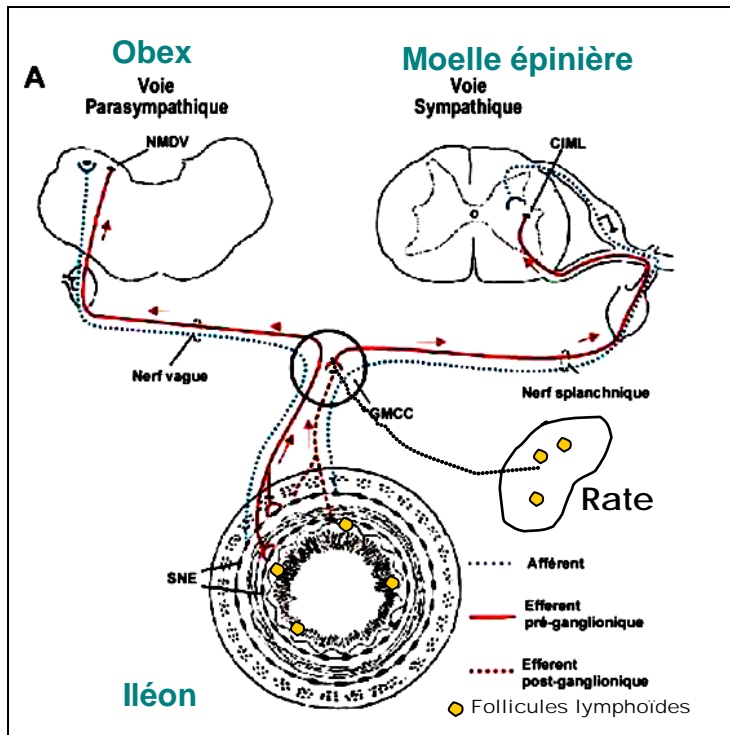


Figure 15 : Représentation schématique des voies probables de neuro-invasion de l'agent de la tremblante chez le mouton.

Depuis les formations lymphoïdes associées au tube digestif (amygdales et Plaques de Peyer) et/ou les autres formations lymphoïdes, l'agent infectieux gagne le SNC par le noyau moteur dorsal du nerf vague (NMDV) ainsi que par la colonne intermédiaire latérale de la moelle épinière thoracique (CIML).

SNE : système nerveux entérique  
GMCC : ganglion coeliomésentérique ou plexus solaire.  
D'après [van Keulen *et al.* 2002].

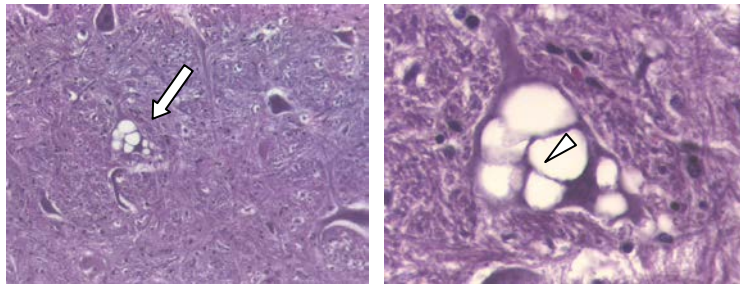
Il semble donc que dans les cas de tremblante classique, la voie nerveuse soit privilégiée dans la neuro-invasion. D'ailleurs, chez le mouton, des fibres nerveuses ont été détectées par immunohistochimie dans les zones LT près des centres germinatifs au niveau des plaques de Peyer ; l'analyse par microscopie électronique a même permis de révéler la présence de filets nerveux en contact direct avec les FDCs et les TMBs, suggérant fortement la possible pénétration de l'agent infectieux dans le système nerveux par ces sites de contact [Heggebo *et al.* 2003].

L'expression de la PrP<sup>c</sup> par les fibres nerveuses périphériques semble aussi être fondamentale pour la neuro-invasion dont la durée est corrélée au taux d'expression de la protéine [Glatzel *et al.* 2000]. Ainsi, la sympathectomie immunologique ou chimique induit des délais d'incubation beaucoup plus longs chez la souris [Glatzel *et al.* 2001]. Par opposition, l'utilisation de souris possédant des organes lymphoïdes hyper-innervés conduit à des durées d'incubations plus courtes et à un plus important titre infectieux dans la rate ce qui renforce l'hypothèse d'un transport de l'agent infectieux *via* les fibres nerveuses [Glatzel *et al.* 2001]. De plus, il a été montré que chez des souris transgéniques qui expriment la PrP<sup>c</sup> de hamster uniquement dans les neurones (promoteur NSE, neuron specific enolase) et qui ont été infectées par voie périphérique avec une souche infectieuse adaptée au hamster (263K), le rôle du système immunitaire semble être minime (voir nul) et que l'expression de la PrP<sup>c</sup> dans les nerfs périphériques est suffisante pour la neuro-invasion [Race *et al.* 2000]. Récemment, certains auteurs ont rapporté que l'inoculation intra-linguale de la souche HY chez le hamster conduit à une neuro-invasion très rapide *via* les nerfs périphériques jusqu'au noyau hypoglosse situé dans le tronc cérébral [Bartz *et al.* 2003]. La vitesse de propagation de la PrP<sup>Sc</sup> dans les nerfs périphériques (transport rétrograde) a été estimée à 3,3 mm/jours comme le montrent les expérimentations portant sur l'inoculation de prion dans le nerf sciatique de hamster [Bartz *et al.* 2002]. L'essentiel de ces données suggère un rôle important des fibres nerveuses périphériques dans la neuro-invasion. Les cellules de Schwann des gaines nerveuses périphériques pourraient avoir un rôle dans cette neuro-invasion [Follet *et al.* 2002].

En conclusion, l'implication du système immunitaire dans les maladies à prion lors d'infections périphériques est importante puisqu'elle semble permettre l'entrée de l'agent infectieux dans l'organisme ainsi que sa première phase de réplication. L'origine de la dissémination de l'agent dans l'ensemble des structures lymphoïdes n'est pas encore connue mais il semble que le système lymphoïde ne joue qu'un rôle d'amplification de l'agent infectieux en périphérie et que la neuro-invasion proprement dite soit plutôt le fait d'un transport neuronal *via* le système nerveux autonome, directement depuis le tube digestif ou depuis les autres formations lymphoïdes.

#### **4 - Neuropathologie : la mort neuronale**

Une fois que l'agent infectieux a gagné le SNC sa réplication se poursuit jusqu'à l'apparition des signes cliniques qui se traduisent par des troubles sensitifs, comportementaux et moteurs révélant une dégénérescence du tissu nerveux. L'origine de cette pathogénie et des lésions qui l'accompagnent (mort neuronale, vacuolisation, astrocytose) n'est pas totalement élucidée, mais il semble que l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> soit à l'origine des phénomènes neuropathologiques.



**Figure 16 : Vacuolisation neuronale chez un ovin atteint cliniquement de tremblante.** Seuls quelques neurones sont vacuolisés (flèche). A fort grossissement plusieurs vacuoles intra-neuronalles, séparées de fins septums très caractéristiques (tête de flèche), sont mises en évidence.

### **Approche physiopathologique de la mort neuronale en culture cellulaire**

L'activité cytotoxique de différents peptides de synthèse dérivés de la séquence de la protéine prion a été étudiée ; un seul peptide de la région 106-126 induit une apoptose de neurones d'hippocampe de rat en culture [Forloni *et al.* 1993]. Des études plus récentes ont révélé que le peptide le plus neurotoxique fait partie de la zone 112-126 de la protéine prion [Brown 2000]. Le peptide 106-126 présente des propriétés similaires à celles de la PrP<sup>Sc</sup> : adoptant spontanément une structure plissée  $\beta$ , il est capable de polymériser spontanément sous forme de fibrilles de 8 nm et présente des propriétés de biréfringence de type amyloïde mises en évidence par le Rouge Congo [Forloni *et al.* 1999]. L'effet du peptide nécessite la présence de cellules microgliales dans la culture ainsi que la présence de PrP<sup>C</sup> à la surface des cellules [Brown *et al.* 1998]. L'activité apoptogène de ce peptide semble donc indirecte et est probablement liée à la synthèse par les cellules microgliales de cytokines ou de facteurs neurotoxiques [Williams *et al.* 1997]. Ainsi, des neurones PrP<sup>-/-</sup> en cultures, mis en présence du peptide 106-126, n'entrent pas en apoptose ; si des astrocytes PrP<sup>+/+</sup> sont alors injectés dans la culture, les neurones PrP<sup>-/-</sup> meurent suite à un processus apoptotique [Brown 1999]. D'ailleurs, la PrP<sup>Sc</sup> pourrait être un facteur direct de la multiplication gliale : des cultures pures d'astrocytes murins mis en présence de PrP<sup>Sc</sup> s'activent avec une expression augmentée du gène de la GFAP (protéine acide gliofibrillaire) [Forloni *et al.* 1993]; cette activation est aussi induite par le peptide 106-126 [Forloni *et al.* 1999].

Ces données suggèrent donc que l'activation des cellules gliales par la PrP<sup>Sc</sup> conduit à la sécrétion de facteurs neurotoxiques induisant une mort neuronale par apoptose.

### **Approche physiopathologique de la mort neuronale sur modèles murins**

La mort neuronale et la spongiose s'accompagnent d'une réaction gliale, avec sur-expression du gène de la GFAP par les astrocytes. Cette réaction gliale se traduit par une

prolifération cellulaire et une augmentation du nombre des prolongements cellulaires. L'origine de l'activation de ces cellules gliales n'est pas connue mais la gliose pourrait donc bien être considérée comme un processus réactionnel vis à vis de l'accumulation de PrP<sup>sc</sup>. En effet, dans un modèle murin transgénique exprimant la PrP<sup>c</sup> de hamster uniquement dans les astrocytes, l'inoculation par voie IC d'une souche de tremblante adaptée au hamster conduit au développement de la maladie [Raeber *et al.* 1997]. Ces résultats confortent les observations faites dans les cultures cellulaires qui suggéraient que les astrocytes activés par la PrP<sup>sc</sup> sécrètent des facteurs neurotoxiques.

Il semble aussi que l'expression de la PrP<sup>c</sup>, soit par les neurones, soit par les cellules gliales, soit nécessaire à l'apparition des lésions de spongiose et à la mort neuronale. En effet chez des souris KO pour le gène de la PrP, inoculées par voie intra-cérébrale, des greffes de neurones embryonnaires de souris sur-exprimant le gène de la PrP présentent une spongiose et une accumulation de PrP<sup>sc</sup> strictement limitée au greffon, le reste du parenchyme neuronal restant parfaitement sain malgré la présence de PrP<sup>sc</sup> diffusée (faiblement) à distance du tissu greffé [Brandner *et al.* 1996].

#### **Autres mécanismes proposés**

D'autres mécanismes pouvant expliquer la mort neuronale ont été proposés. La production de souris transgéniques qui expriment la forme C<sup>tm</sup>PrP a abouti à l'apparition d'une maladie spontanée. Les signes de mort neuronale et de gliose sont caractéristiques, mais aucune accumulation de PrP<sup>sc</sup> n'est décrite [Hegde *et al.* 1998]. Une des hypothèses proposée par les auteurs serait que la C<sup>tm</sup>PrP s'accumulerait au niveau membranaire, la déstabiliserait et provoquerait ainsi un dysfonctionnement cellulaire majeur.

Dans un autre modèle de culture cellulaire, la production de PrP cytoplasmique sous contrôle d'un promoteur inductible induit un effet neurotoxique important [Ma *et al.* 2002a]. Cet effet neurotoxique est retrouvé dans les couches moléculaire et granulaire du cervelet chez un modèle murin transgénique exprimant une forme de PrP<sup>c</sup> cytoplasmique; cet effet neurotoxique est dépendant du nombre de copie du transgène [Ma *et al.* 2002b].

Une dernière hypothèse envisage que la perte de la capacité de capture du cuivre de la PrP<sup>c</sup> soit directement la cause de la mort neuronale. En effet, des souris transgéniques exprimant une PrP<sup>c</sup> sans région des octapeptides répétés (site de liaison au cuivre) présentent une ataxie qui disparaît lorsque la PrP<sup>c</sup> normale est de nouveau exprimée [Shmerling *et al.* 1998]. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec les données obtenues chez les souris KO pour le gène de la PrP qui ne présentent pas de pathologie spécifique [Büeler *et al.* 1992] [Manson *et al.* 1994].



## II – Approche comparative des caractéristiques de ces affections au travers de quelques exemples.

### A- La tremblante du mouton

#### 1- Description générale

Les premières descriptions de la tremblante chez les ovins remontent au dix-huitième et au dix-neuvième siècle. La première description a été effectuée en 1732 en Grande Bretagne (GB) [McGowan 1922]. En 1959, Leopoldt décrit la maladie en Allemagne [Detwiler 1992]. Depuis de nombreux pays ont déclaré la présence de la maladie, ce qui pourrait être dû aux nombreux échanges internationaux [Detwiler 1992] [Detwiler *et al.* 2003]. Ainsi, la distribution de la tremblante semble être mondiale mais d'importants efforts ont été faits en Australie et en Nouvelle Zélande pour l'éradiquer ; actuellement ces deux pays sont considérés indemnes contrairement au Canada et aux Etats Unis (EU) où la tremblante est devenue endémique. En France, la tremblante est devenue une maladie à déclaration obligatoire en juin 1996 [Ducrot *et al.* 1998].

Dans certains pays, le développement de la tremblante a été clairement associé à quelques troupeaux ou à des localisations géographiques et des types d'élevage. En particulier, après son apparition en Islande, la tremblante a été confinée à une partie limitée du nord pendant 70 ans. Ce n'est que par la suite que la maladie s'est répandue dans tout le pays [Sigurdarson 1991]. Entre 1920 et 1950, elle est devenue un problème majeur dans les troupeaux anglais causant des pertes financières très importantes dans certains troupeaux [Parry 1983]. Les implications économiques de la tremblante peuvent être importantes car elle peut présenter une prévalence de 10 à 20 % dans certains troupeaux [Detwiler 1992].

La tremblante touche indifféremment les animaux des deux sexes principalement entre 2 et 5 ans. Aux Etats Unis (EU), entre 1947 et 1991, 82 % des animaux atteints (779 cas), étaient âgés de 2 à 5 ans. Des données similaires ont été obtenues en Grande Bretagne (GB) [Detwiler 1992]. Les cas cliniques de tremblante sont rares avant l'âge de 18 mois, cependant quelques cas ont été rapportés en Islande chez des agneaux de 7 mois [Sigurdarson 1991]. Plusieurs observations relatent qu'une fois que la tremblante prend une forme endémique dans un troupeau, l'âge moyen de la mort tend à diminuer avec le temps. Ainsi les cas initiaux sont habituellement âgés de 4 à 5 ans puis apparaissent des cas sur des animaux plus jeunes (18 -24 mois). Ce phénomène a été décrit sur des troupeaux en GB [Foster *et al.* 1989], en France [Chatelain *et al.* 1989], en Islande [Sigurdarson 1991] et aux Etats Unis (EU) [Detwiler 1992]. Certains pensent que ce phénomène pourrait être dû à l'exposition de plus en plus importante des animaux à l'agent infectieux qui serait du à l'augmentation de la pression d'exposition mais ces études ne prennent pas en compte l'effet du génotype des animaux. En 1942, Chelle décrit le premier cas de tremblante chez la chèvre [Chelle 1942]. Par la suite, les descriptions des cas de tremblante naturelle chez la chèvre ont souvent été associées à

des cas de tremblante chez le mouton présents dans les mêmes exploitations bien que certains rapportent des cas sans liens apparents [Hourrigan *et al.* 1979] [Detwiler 1992] [Andrews 1998]. En GB, 6 cas de tremblante dans 2 troupeaux de mouflons ont été rapportés et des liens possibles de contamination par les ovins ont été envisagés [Wood *et al.* 1992].

Deux types de contamination iatrogène ont été rapportés chez des moutons. Le premier a été rapporté chez des ovins vaccinés contre le looping ill (plus de 1500 ovins contaminés) et le second chez des moutons et des chèvres vaccinés contre *Mycoplasma agalactiae* dans plusieurs troupeaux. La préparation des vaccins avait comporté dans les deux cas l'utilisation de SNC et/ou de rate de moutons qui étaient probablement atteints de tremblante naturelle [Gordon 1946] [Caramelli *et al.* 2001].

## **2 - Contagiosité de la tremblante**

Les modes de dissémination de l'agent infectieux dans les troupeaux atteints de tremblante ne sont pas totalement élucidés. Cependant le contact direct entre moutons semble être un facteur déterminant pour la dissémination de l'agent infectieux [Hopp *et al.* 2001]. Cependant, la transmission de l'infection par le sperme ou les ovules semble être que très peu impliquée comme l'indiquent certains travaux portant sur le transfert d'embryons [Foster *et al.* 1992] [Foote *et al.* 1993] [Wang *et al.* 2001]. Un mode de contamination et de dissémination de l'agent infectieux dans l'environnement a probablement lieu lors du part. En effet, l'infectiosité des membranes foetales a été démontrée [Pattison *et al.* 1972] [Pattison *et al.* 1974] ainsi que la présence de PrP<sup>Sc</sup> associée au placenta [Race *et al.* 1998] [Tuo *et al.* 2001] [Andreoletti *et al.* 2002]. Ainsi, l'agneau se contaminerait en ingérant des morceaux de placenta sur son pelage après la naissance. Cette dissémination de l'agent infectieux lors du part pourrait aussi être à l'origine de la contamination du milieu environnant: en Islande, la réintroduction de moutons sains dans des pâtures où plusieurs années auparavant des moutons atteints de tremblante y séjournaient, a conduit à la réapparition de la maladie dans le nouveau troupeau [Pallson 1979]. Ce mode de contamination de l'environnement, pouvant être à l'origine de la dissémination de la tremblante dans les troupeaux, est en accord avec l'efficacité de différents plans de lutte contre la maladie : abattage total et repeuplement après désinfection et vide sanitaire long des locaux, reconstitution d'un deuxième troupeau à partir d'agnelles séparées de leur mère dès la naissance et élimination immédiate des malades et des placentas [Ducrot *et al.* 1998].

La transmission horizontale de la maladie reste possible et des auteurs ont suggéré que certains vecteurs biologiques comme les vers parasites intestinaux, les acariens parasites cutanés et des larves de mouche pourraient participer à la dissémination de l'agent infectieux [Hourrigan *et al.* 1979]. Des larves de mouche (*Sarcophaga carnaria*) ont été élevées sur des cerveaux infectés de hamster ; 10 jours plus tard les pupes de ces larves ont

été ingérées par 4 hamsters dont deux ont développé une ESST au bout de 215 jours [Post et al. 1999] ; cependant la pertinence de cette expérimentation est relative notamment par rapport aux conditions naturelles d'élevage. Dans une autre étude, différents ectoparasites prélevés sur des moutons issus d'un troupeau atteint de tremblante ont été broyés et inoculés par voie IC à 71 souris ; 10 d'entre elles ont développé une ESST [Wisniewski et al. 1996]. Ces parasites peuvent donc être considérés comme d'éventuels réservoirs et des vecteurs potentiels de la maladie. Cette voie de contamination des ovins est en effet possible car l'isolat de tremblante expérimental SSPB/1 conduit au développement de la maladie assez rapidement (500 jours) lors d'infection par scarification cutanée chez le mouton [Foster et al. 1988].

### 3- Signes cliniques

La symptomatologie de la tremblante est caractérisée principalement par des troubles nerveux sensitifs et moteurs (ataxie, incoordination motrice), un changement de comportement, une posture anormale, du prurit et une perte de poids. Ces symptômes se développent progressivement jusqu'à la mort de l'animal [Pattison 1966] [Rocher 1993] [Onodera et al. 1994] [Healy et al. 2002] et peuvent être classés en différents groupes (troubles sensitifs, comportementaux et moteurs) [Capucchio et al. 2001].

Les premiers symptômes sont difficiles à mettre en évidence. La première période débute de façon insidieuse sans modifier l'état général ; l'animal ayant perdu son instinct grégaire, reste écarté du troupeau. On observe parfois un prurit qui s'installe progressivement au niveau de la tête et en région dorso-lombaire. Ce prurit s'étend ensuite à tout le corps, et l'animal se gratte vigoureusement ; la laine se feutre et des zones dépilées apparaissent. Certains animaux se mordillent ou se lèchent les membres. L'hyperexcitabilité apparaît parfois ; elle se traduit par une agitation anormale accompagnée de fuites subites sans motifs apparents. Des tremblements localisés à la tête peuvent être mis en évidence ; on observe aussi fréquemment des grincements de dents [Rocher 1993].



**Figure 17 : Mouton atteint de tremblante naturelle ayant développé un intense prurit en région dorso-lombaire provoquant une perte importante de laine.** Photo : Wells et Hawkins.

Les signes cliniques s'aggravent ensuite et une incoordination motrice se développe. L'état de l'animal se détériore, il maigrit, les tremblements sont fréquents ainsi que le grattage. Les troubles locomoteurs sont d'apparition tardive et se caractérisent par une démarche hésitante, accompagnée de trébuchements. On observe souvent une allure typique du mouton qui trotte avec les antérieurs et qui galope avec les postérieurs. Par la suite l'animal reste en décubitus. L'évolution est alors rapide et l'issue fatale.

L'apparition de l'ensemble des signes cliniques chez un mouton est rare. Ainsi la perte de poids n'est pas toujours observée et parfois une prise de poids est décrite. Aux Etats-Unis les moutons présentent généralement un prurit très discret, les tremblements et l'incoordination motrice étant beaucoup plus marqués [Detwiler 1992]. En Islande, les descriptions anciennes rapportent principalement des tremblements et de l'incoordination motrice ; depuis la fin des années 70, le prurit est décrit de plus en plus souvent et devient un signe clinique majeur [Sigurdarson 1991].

La durée de l'évolution clinique peut varier de 2 à 13 mois [Rocher 1993] mais est généralement comprise entre 1 et 6 mois [Detwiler 1992]. Un cas de tremblante présentant une période clinique de 2 semaines a aussi été rapporté [Joubert *et al.* 1972]. Une étude portant sur la mise en évidence des lésions neuronales chez des moutons trouvés morts semble indiquer qu'une mort soudaine sans signe clinique majeur peut avoir lieu dans certains cas [Clark 1991].

#### 4 - Susceptibilité génétique des moutons à la tremblante

Dans les années 1960, l'existence de susceptibilités génétiques différentes à la tremblante a été mise évidence. Le gène Sip (Scrapie Incubation Period) présente deux allèles désignés Sip<sup>sAsA</sup> et Sip<sup>pApA</sup> induisant respectivement une période d'incubation courte et longue, chez des moutons de race Cheviot, suite à des inoculations par différentes voies avec un pool d'extrait de cerveaux de moutons atteint de tremblante SSBP/1 (tableau 2) [Dickinson *et al.* 1968b].

Isolats de tremblante	Voies d'inoculation	Périodes d'incubation	
		Sip <sup>sAsA</sup> ou Sip <sup>sApA</sup>	Sip <sup>pApA</sup>
SSBP/1	Intra-cérébrale	197 +/- 7 jours	917 +/- 90 jours
	Sous-cutanée	313 +/- 9 jours	-
CH1641	Intra-cérébrale	595 +/- 122 jours	360 +/- 15 jours

Tableau 2 : Périodes d'incubation observées chez des moutons de race Cheviot expérimentalement infectés avec les isolats de tremblante SSBP/1 et CH1641. D'après [Dickinson *et al.* 1968b] [Foster *et al.* 1988].

La plupart des isolats de tremblante naturelle appartiennent au même groupe que SSBP/1 (groupe A) et induisent une période d'incubation courte chez les moutons Sip<sup>sAsA</sup>. Avec l'isolat de tremblante expérimental CH1641 (seul isolat décrit du groupe C), les périodes d'incubation sont plus courtes chez les moutons Sip<sup>pApA</sup> [Foster *et al.* 1988]. Dans le modèle d'infection utilisant la souche SSBP/1, aucune différence dans les périodes d'incubation n'est observée entre les homozygotes Sip<sup>sAsA</sup> et les hétérozygotes Sip<sup>sApA</sup>. L'allèle Sip<sup>sA</sup> exerce donc une influence dominante sur la période d'incubation chez les moutons Cheviot infectés avec

des isolats du groupe A. Par contre chez des moutons Swaledale, la dominance de l'allèle Sip<sup>sA</sup> est partielle et les périodes d'incubation chez les individus hétérozygotes Sip<sup>sAPA</sup> sont plus longues que chez les homozygotes Sip<sup>sAsA</sup> [Davies *et al.* 1985].

Plus tard, d'autres travaux ont montré que ce gène était étroitement lié au gène de la protéine prion [Hunter *et al.* 1989].

Les premiers travaux portant sur le polymorphisme génétique de la protéine prion ovine datent de 1990 [Goldmann *et al.* 1990] [Hunter *et al.* 1991]. Plusieurs mutations ont été identifiées sur le gène et actuellement on considère que les mutations en position 136 A/V (Alanine/Valine), 154 R/H (Arginine /Histidine) et 171 R/Q/H (Arginine/Glutamine/Histidine) sont déterminantes dans la sensibilité à la tremblante [Hunter *et al.* 1991] [Clouscard *et al.* 1995] [Hunter *et al.* 1996] avec une plus grande importance pour le codon 171 [Clouscard *et al.* 1995] [Hunter *et al.* 2000].

Dans les conditions naturelles, le génotype ARQ/ARQ est généralement le plus représenté dans les troupeaux [Hill *et al.* 1998] [Thorgeirsdottir *et al.* 1999] et confère une sensibilité à la tremblante tout comme le génotype VRQ/VRQ. Comparativement, l'homozygotie ARR/ARR correspond à une résistance importante à la maladie [Belt *et al.* 1995], bien qu'un cas de tremblante ait été décrit chez un mouton ARR/ARR de race Suffolk au Japon [Ikeda *et al.* 1995]. La sensibilité à la tremblante, qui est liée au génotype des moutons, semble aussi varier selon les races [Hill *et al.* 1998]. Dans la race Cheviot, les animaux VRQ/VRQ semblent être les plus sensibles alors que dans la race Suffolk le génotype le plus sensible est ARQ/ARQ [Westaway *et al.* 1994] [Hunter *et al.* 1996] [Hunter *et al.* 1997] ; ces observations pourraient être la conséquence d'une exposition différente à l'agent infectieux mais également à l'existence de souches différentes. Ainsi, la nature de l'agent infectieux est également importante : l'isolat SSBP/1 induit une maladie chez les moutons portant au moins un allèle VRQ mais n'en induit pas chez des moutons ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR alors que l'isolat de tremblante CH1641 affecte les animaux ARQ/ARQ [Hunter *et al.* 2000].

Il est donc difficile d'établir une liste exhaustive de la susceptibilité des moutons à la tremblante naturelle, en fonction du polymorphisme du gène de la PrP, car il existe une variabilité en fonction des races et des isolats de tremblante.

Génotypes	Cas par million
ARR/ARR	0
ARR/AHQ	0.3
AHQ/AHQ	5
ARR/ARQ	0.4
ARR/ARH	0
ARQ/AHQ	9
AHQ/ARH	0
ARH/ARH	2
ARQ/ARH	5
ARQ/ARQ	37
ARR/VRQ	6
AHQ/VRQ	0.7
ARQ/VRQ	225
ARH/VRQ	405
VRQ/VRQ	545

Tableau 3 :

Estimation de la susceptibilité des moutons à la tremblante en fonction du polymorphisme du gène de la PrP aux codons 136, 154, 171.

Le tableau présente le nombre de cas de tremblante par an et par million de mouton pour chaque génotype en GB, indépendamment des races et des isolats de tremblante. Données DEFRA 2001- National scrapie plan for Great Britain.

Toutefois, une étude en GB révèle que les génotypes les plus sensibles par rapport à la tremblante sont : VRQ/VRQ, ARQ/VRQ et ARH/VRQ (DEFRA - tableau ci-dessus). Le génotype ARQ/ARQ, qui est très représenté dans le cheptel ovin britannique, est associé à une sensibilité moindre à la tremblante. Cependant ces données ne prennent pas en compte la complexité liée aux races des animaux ce qui peut induire un biais important. En effet les moutons Cheviot ARQ/ARQ du NPU (Neuropathogenesis Unit) sont considérés comme résistants à l'isolat de tremblante SSBP/1 ainsi qu'à la tremblante naturelle [Hunter *et al.* 1996]. Différemment, les moutons de ce même génotype de race Romanov en France et de race Texel en GB sont sensibles à la maladie [Elsen *et al.* 1999] [Baylis *et al.* 2002].

Le génotype des moutons semble aussi contrôler la période d'incubation. Les moutons VRQ/VRQ atteints de tremblante meurent plus tôt que les moutons ARQ/VRQ et ARR/VRQ [Detwiler *et al.* 2003].

D'autres allèles (AHR et VRR) ont été récemment identifiés chez des moutons de race Texel, Nolana et Suffolk [Kutzer *et al.* 2002]. D'autres codons du gène de la PrP présentent un polymorphisme (112, 137, 138, 141, 151, 211) mais ils ne semblent pas être directement impliqués dans la susceptibilité à la maladie [Thorgeirsdottir *et al.* 1999] [Hunter *et al.* 2000] [Bossers *et al.* 2000].

### 5 - Sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> et de l'infectiosité chez les moutons

Chez le mouton atteint de tremblante (stade clinique) de nombreux organes accumulent de l'infectiosité, qui est testée par transmission à la souris ou à d'autres moutons [Pattison *et al.* 1962] [Pattison *et al.* 1974] [Hadlow *et al.* 1979] [Hadlow *et al.* 1980b] [Hadlow *et al.* 1982] [Onodera *et al.* 1993] [Race *et al.* 1998] [Groschup *et al.* 1996] [Hunter *et al.* 2002] (tableau 4).

Titre infectieux	Organes
Elevé	SNC (dont la rétine)
Moyen	lléon, colon proximal, rate, amygdales, nœuds lymphatiques
Faible	Surrénale, colon distal, LCR, muqueuse nasale, pancréas, nerf sciatique, placenta (titre infectieux inconnu), sang (titre infectieux inconnu), foie (traces), thymus (traces)
Non détecté	Fœtus, cœur, rein, ovaire, salive, glandes salivaires, vésicule séminale, testicules, thyroïde, muscle squelettique, utérus

Tableau 4 : Bilan indiquant les principaux organes infectieux chez des moutons cliniquement atteints de tremblante naturelle. D'après les études citées précédemment.

Hormis le liquide amniotique, les autres sécrétions et excréments chez le mouton et la chèvre atteints de tremblante n'ont pas présenté d'infectiosité (tableau 5). Il est important de remarquer que l'infectiosité de ces sécrétions a été étudiée par transmission à un faible nombre d'ovins ou de caprins et par transmission à la souris conventionnelle. Du fait de la barrière d'espèce, il pourrait être intéressant de tester l'infectiosité de ces échantillons par transmission à des souris transgéniques exprimant la PrP<sup>c</sup> ovine.

Excrétion Sécrétion	Origine		Détection		Résultat Nombre + / Nombre ov ou cp	Référence
	Espèce	Phase clinique	Espèce	Voie		
● Fèces	Ovin	-	Souris	IC	0/8	Hadlow 1982
	Ovin	?	Souris	IC	0/4	Hourrigan 1980
	Caprin	+	Souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	Caprin	+	Caprin	IC	0/1	Pattison 1961
	Caprin	+	Caprin	VO	0/?	Pattison 1964
● Salive	Ovin	+	Souris	IC	0/9	Hadlow 1982
	Ovin	?	Souris	IC	0/2	Hourrigan 1990
	Caprin	+	Caprin	IC	0/1	Pattison 1961
	Caprin	+	Caprin	VO	0/?	Pattison 1964
● Urine	Ovin	?	Souris	IC	0/4	Hourrigan 1990
	Caprin	+	Souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	Caprin	+	Caprin	IC	0/1	Pattison 1961
	Caprin	+	Caprin	IC	0/14	Pattison 1962
● Liquide amniotique	Ovin	?	Souris	IC	1/1	Hourrigan 1990
● Colostrum	Ovin	-	Souris	IC	0/1	Hadlow 1982
	Ovin	?	Souris	IC	0/3	Hourrigan 1990
● Lait	Ovin	?	Souris	IC	0/6	Hourrigan 1990
	Caprin	+	Souris	IC	0/3	Hadlow 1980
	Caprin	+	Caprin	IC	0/1	Pattison 1961
● Sperme	Ovin	?	Souris	IC	0/21	Hourrigan 1990

Tableau 5 : Infectiosité des sécrétions et excréments issues d'ovins et de caprins infectés par l'agent de la tremblante. D'après [Schelcher *et al.* 2002].

L'accumulation de PrP<sup>sc</sup> a été identifiée dans le SNC, dans les nœuds lymphatiques, la rate [Ikegami *et al.* 1991] [Race *et al.* 1992a], les formations lymphoïdes de la membrane nictitante [O'Rourke *et al.* 1998], les plaques de Peyer [Andreoletti *et al.* 2000] [Heggebo *et al.* 2000]. De même, la PrP<sup>sc</sup> a été mise en évidence dans le placenta [Race *et al.* 1998] [Jeffrey *et al.* 2001b] [Andreoletti *et al.* 2002], le système nerveux entérique (plexus sous-muqueux et musculaires) [van Keulen *et al.* 1999] et différents ganglions du système nerveux autonome ainsi que dans certains nerfs périphériques (associés aux axones) [Groschup *et al.* 1999], dans la rétine et les surrénales [Jeffrey *et al.* 2001b].

Cette distribution de la PrP<sup>sc</sup> n'est toutefois pas toujours aussi systématique. La présence du codon ARR (ARR/VRQ ; ARR/ARQ) semble être associé une accumulation de PrP<sup>sc</sup> uniquement dans le système nerveux et pas dans les organes lymphoïdes [Somerville *et al.* 1997] [van Keulen *et al.* 1996] [Andreoletti *et al.* 2000] ; mais cette particularité semble aussi dépendante de la nature de l'agent infectieux car des moutons VRQ/ARR inoculés avec l'isolat de tremblante SSBP/1, par voie IC ou IP, ont présenté une accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans la rate [Somerville *et al.* 1997]. Par contre, l'isolat CH1641 inoculé par voie IC à des moutons AHQ/AHQ et ARQ/AHQ a induit une accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans le SNC mais pas dans la rate [Somerville *et al.* 1997]. Il semble donc que le génotype, la nature de l'agent infectieux et la voie d'infection soient des facteurs déterminant dans la distribution de la PrP anormale chez le mouton.

Les premiers sites de détection de la PrP<sup>sc</sup> ont été identifiés chez des agneaux, provenant d'un troupeau infecté, au niveau des plaques de Peyer vers l'âge de 2 mois [Andreoletti *et al.* 2000]. Dans le même temps, les autres formations lymphoïdes associées au tube digestif ont présenté une accumulation de PrP<sup>sc</sup>. Ce n'est que chez des animaux de 9 mois que des traces de PrP<sup>sc</sup> ont été détectées simultanément dans le système nerveux entérique et dans le SNC au niveau du noyau dorsal du nerf vague [Andreoletti *et al.* 2000] (figure 18). Chez des agneaux expérimentalement infectés par voie orale avec un isolat de tremblante, la PrP<sup>sc</sup> a été détectée dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif, à partir de 5 semaines post inoculation chez les animaux de génotype VXQ/VXQ et VXQ/AXQ [Heggebo *et al.* 2003].



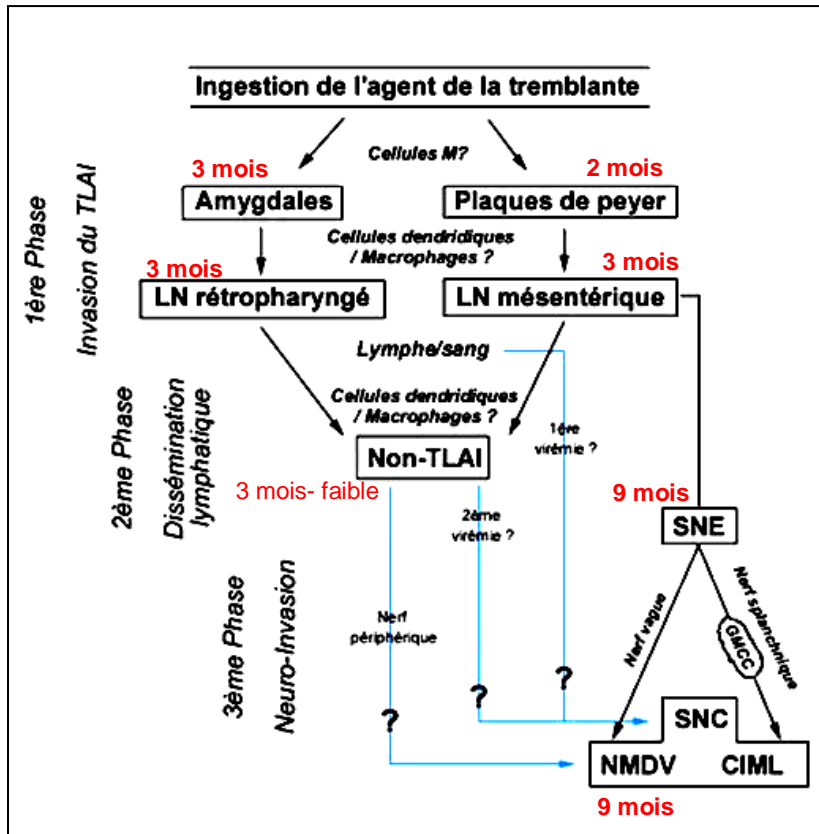


Figure 18 :  
Détection de la PrP<sup>sc</sup> chez des moutons provenant d'un troupeau naturellement infecté par la tremblante.

Des dépôts de PrP<sup>sc</sup> ont été détectés chez des agneaux âgés de deux à trois mois dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif. La PrP<sup>sc</sup> est ensuite détectée simultanément dans le système nerveux entérique (SNE) et dans le système nerveux central (SNC) chez des animaux âgés de 9 mois.

Non-TLAI : tissu lymphoïde non associé au tube digestif.  
NMDV : noyau dorsal du vague  
CIML : colonne intermédiaire latérale (moëlle épinière)  
GMCC : plexus solaire

D'après [Andreoletti et al. 2000].

## 6 – Tremblante des petits ruminants et MCJ chez l'homme

La possibilité de transmission de la tremblante à l'homme semble relativement faible comme le suggère les données épidémiologiques. Deux études rapportent que la distribution régionale des cas de MCJ sont sans aucune relation avec la localisation de troupeaux de moutons infectés par la tremblante ou de la destination commerciale de ces animaux depuis des régions où la tremblante est endémique [Chatelain et al. 1981] [Brown et al. 1987]. Cependant dans une autre étude, une incidence plus élevée de la maladie de Creutzfeldt-Jakob a été notée chez les immigrants algériens et tunisiens en France ; ces cas peuvent être soit dus à une sensibilité génétique particulière soit à des habitudes alimentaires différentes. On peut noter ainsi que, parmi les populations nord africaines chez lesquelles une incidence plus élevée de cas familiaux de MCJ a été mise en évidence, notamment en Israël, la consommation de cervelles de moutons, avait été suspectée comme une source de contamination potentielle [Alter et al. 1976] [Herzberg et al. 1974]. Cependant des études génétiques ont révélé qu'il s'agissait de formes de MCJ héréditaires [Goldgaber et al. 1989]. En Australie, pays déclaré indemne de tremblante, ainsi qu'au Japon qui ne déclara son premier cas de tremblante qu'en 1981 [Shinagawa et al. 1985], la prévalence des cas sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est comparable à celle du reste du monde.

D'un point de vue expérimental, l'agent de la maladie de Creutzfeldt-Jakob a cependant pu être transmis à la chèvre [Hadlow et al. 1980a] et Gibbs rapporte que l'agent de la

tremblante a pu être transmis par voie orale au primate non-humain (singe écureuil) [Gibbs *et al.* 1980]. A cet égard, des inoculations de souris C57BL/6 avec un cas de tremblante et un cas de MCJ sporadique, ont induit des profils lésionnels très similaires. Ces résultats ont conduit les auteurs à penser que certaines souches qui affectent les humains ont éventuellement une origine commune avec la tremblante [Lasmézas *et al.* 2001].

## **B – L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)**

### **1- Généralités**

L'encéphalopathie spongiforme bovine ou « maladie de la vache folle », a été décrite pour la première fois en 1986 en GB qui comptabilisait en septembre 2002, 182802 cas confirmés [Weih *et al.* 2001]. Depuis, cette maladie a été identifiée dans de nombreux pays européens<sup>3</sup> dont la Suisse, le Portugal, l'Irlande, l'Espagne, l'Allemagne...Quant à la France, elle comptabilisait, au mois de novembre 2003, 870 cas [Morignat *et al.* 2002]. D'autres pays comme le Japon (9 cas), Israël (1 cas) et le Canada (1 cas) ont aussi déclarés des cas d'ESB [Weih *et al.* 2001]. Les îles Malouines et l'Oman et le Canada ont aussi déclarés des cas d'animaux importés.

En France, depuis 1990, l'ESB est devenue une maladie à déclaration obligatoire et l'utilisation de farines de viande et d'os dans l'alimentation des ruminants est interdite (donc avant la première description d'un cas français d'ESB en 1991). Différents réseaux de surveillance de la maladie ont été mis en place et en 2001 le dépistage systématique à l'abattoir devient obligatoire chez les animaux de plus de 30 mois ; l'âge de ce dépistage a ensuite été abaissé à 24 mois au mois de juillet de la même année. D'après les données épidémiologiques, il semble que le nombre de cas d'ESB en France tende à diminuer, la fréquence des cas dits « naïfs <sup>4</sup> et super-naïfs <sup>5</sup> » étant elle aussi en diminution [Ducrot *et al.* 2003].

L'origine de l'épizootie d'ESB en Europe est liée à l'utilisation de farines de viandes contaminées dans l'alimentation des bovins, notamment depuis l'abaissement des températures de stérilisation associé à la suppression de l'extraction lipidique, instaurés pour des raisons de coût et de sécurité (emploi massif de solvants organiques inflammables) [Wilesmith *et al.* 1988] [Wyatt *et al.* 1991a]. Ce nouveau procédé aurait permis le recyclage et la dissémination de l'agent infectieux au sein des élevages britanniques.

Cependant, l'origine même de l'agent infectieux n'est toujours pas connue : l'origine ovine de l'ESB est probable puisque des expérimentations ont montré la susceptibilité des bovins à l'agent de la tremblante naturelle ; des inoculations (sous-cutanées, intracérébrales, et orales

---

<sup>3</sup> [www.oieint/fr/info/fr-esbmonde.htm](http://www.oieint/fr/info/fr-esbmonde.htm)

<sup>4</sup> Cas nés après la mise en place de l'interdiction de l'utilisation des farines animales pour l'alimentation des ruminants en 1990.

pour chaque bovin) d'homogénats de cerveau de mouton et de chèvre atteints de tremblante ont conduit à l'apparition d'une encéphalopathie spongiforme chez 3 bovins sur 10. Cependant la clinique et la neuropathologie de ces animaux était différente de l'ESB « classique » [Clark *et al.* 1995]. L'hypothèse d'une forme sporadique rare d'ESST chez les bovins, similaire à la forme de la MCJsp chez l'homme, est aussi envisageable comme cela a été suggéré par certains auteurs [Marsh *et al.* 1991].

D'autres espèces de ruminants ont été atteintes par l'agent de l'ESB, notamment dans les parcs zoologiques européens (grand kudu, nyala, oryx d'Arabie, élan, mouflon, bison...), contaminées semble-t-il par de farines de viande et d'os [Bruce *et al.* 1997]. D'autres espèces ont aussi été affectées telles que des félins mais également l'homme (cf. chapitre suivant, ESF et vMCJ).

L'agent de l'ESB a pu être transmis expérimentalement à différents singes (macaque, tamarin, lémurins) [Lasmézas *et al.* 1996b] [Bradley 1996] [Bons *et al.* 1999], aux petits ruminants [Foster *et al.* 1993] au porc par voie parentérale uniquement (IC+IP+IV simultanément) [Ryder *et al.* 2000] et à la souris [Fraser *et al.* 1988] mais pas au poulet ni au hamster [Bradley 1996].

## **2 - Signes cliniques**

L'ESB est une maladie neurodégénérative caractérisée par une longue période d'incubation (4 à 5 ans en moyenne) et par l'apparition de symptômes nerveux sensitifs et moteurs évoluant vers une mort inéluctable.

L'animal montre tout d'abord des troubles du comportement (nervosité et crainte). On décrit aussi une hyperexcitabilité (réactions exacerbées aux stimulations sonores et tactiles), des myoclonies, une ataxie et une hypermétrie. Pendant la phase clinique, l'animal perd son instinct grégaire, chute fréquemment, tremble, maigrit, puis reste en décubitus. La durée d'évolution de la maladie est variable après l'apparition des signes cliniques ; elle varie de 7 jours à plusieurs mois (6 à 8 semaines dans la majorité des cas) jusqu'à l'euthanasie [Wilesmith *et al.* 1988] [Scott *et al.* 1989b]. Une récente étude montre qu'il est assez difficile d'établir un diagnostic de l'ESB basé sur l'observation des signes cliniques [Cazeau *et al.* 2002].

## **3 - Susceptibilité génétique et contagiosité de l'ESB**

Il n'existe pas d'arguments en faveur d'une grande variabilité de sensibilité génétique à l'agent de l'ESB chez les bovins. Ainsi, le gène de la PrP bovine n'est pas caractérisé un grand polymorphisme : seules des variations du nombre de répétition des octapeptides a été

---

<sup>5</sup> Cas nés après le retrait des tissus à risques dans la fabrication des farines animales, 1996.

rapporté [Goldmann *et al.* 1991] sans qu'aucune implication sur la sensibilité à la maladie ne soit mise en évidence.

La contagiosité de l'ESB entre bovins n'a pas été décrite et seule la contamination par des aliments infectés semble être à l'origine de tous les cas [Wilesmith *et al.* 1991]. La transmission verticale est quant à elle peu probable. Certaines études rapportent toutefois que les bovins nés de mères ayant développé la maladie, présentent un risque supérieur de développer la maladie (10 % si la mère a développé la maladie dans les six mois après le part %) [Wilesmith *et al.* 2000] (8% si la mère a développé la maladie dans les 23 mois après le part) [Donnelly 1998]. Ces données peuvent mettre en évidence une éventuelle contamination verticale mais pourraient aussi être dues à une exposition similaire des jeunes à des aliments contaminés.

#### 4 - Infectiosité de différents tissus - Sites d'accumulations de la PrP<sup>Sc</sup>

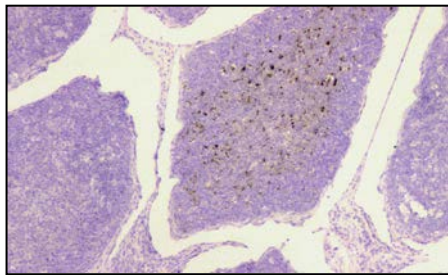
Tissue	Infectivity	Tissue	Infectivity
<b>Neural:</b>		<b>Lymphoreticular:</b>	
→ Brain: frontal cortex, caudal medulla	+, +	Spleen	-
Pituitary	-	Thymus (cervical)	-
Cerebrospinal fluid	-	Tonsil	-
Dura	N.D.	Submandibular lymph node	-
→ Spinal cord: C2-C3, T10-T11, L3-L4	+, +, +	Retropharyngeal lymph node	-
Nodose ganglia	-	Bronchial-mediastinal lymph node	-
Dorsal root ganglia: C3-C6, T5-T8	+	Hepatic lymph node	-
Trigeminal ganglia	+	Mesenteric lymph node	-
Stellate ganglia	-	Prescapular lymph node	-
Sciatic nerve	-	Popliteal lymph node	-
Facial nerve	-	<b>Other:</b>	
Phrenic nerve	-	Kidney	-
Radial nerve	N.D.	Urine	-
Semitendinosus muscle	N.D.	Adrenal	N.D.
Diaphragmatic muscle	N.D.	Lung (left caudal lobe)	-
Triceps muscle	-	Nasal mucosa (midturbinate)	-
Masseter muscle	N.D.	Pericardium	-
Sternocephalicus muscle	-	Heart (left ventricle/ septum)	-
Longissimus dorsi muscle	-	Mitral valve	-
		Aorta	-
<b>Alimentary:</b>		Blood (buffy coat)	-
Tongue (dorsum, include mucosa)	-	Blood (serum)	N.D.
Submandibular salivary gland	-	Blood (clot)	N.D.
Parotid salivary gland	-	→ Bone marrow (sternum)	+
Cranial esophagus	N.D.	Collaen (Achilles tendon)	-
Rumen	-	Skin	-
Omasum	N.D.	Bone (femoral diaphysis)	-
Abomasum (pyloric)	-		
Duodenum	-		
→ Distal ileum (inc. Peyer's patches)	+		
Spiral colon	-		
Faeces*	-		
Pancreas	-		
Liver	-		

Tableau 5 : Résumé des résultats concernant la mesure de l'infectiosité de tissus de bovins expérimentalement infectés par l'ESB (infection orale) par transmission à la souris (IC + IP). + : positif ; - : négatif ; nd : not done ; d'après « Report on TSE infectivity distribution in ruminant tissues (decembre 2001) European Commission ». G.Wells.

Chez les bovins cliniquement atteints, les premiers travaux montrent que seul le SNC est porteur de l'infectiosité. Le placenta, différents nœuds lymphatiques, la rate, la mamelle et le lait ne transmettent pas la maladie à la souris [Middleton *et al.* 1993]. Seul l'iléon a montré une infectiosité et uniquement chez des bovins expérimentalement infectés par voie orale [Wells *et al.* 1994a]. Les données récentes concernant l'infectiosité des tissus des bovins naturellement atteints sont similaires à celles obtenues chez des bovins expérimentalement infectés (voir tableau 5).

L'évaluation de l'infectiosité d'un organe par transmission à la souris est cependant limitée par le phénomène de barrière d'espèce. C'est pourquoi dans les dernières expérimentations, l'infectiosité des tissus est testée par inoculation de tissus de bovins infectés à d'autres bovins. Les premiers résultats disponibles sont similaires à ceux précédemment décrits mais ils rapportent en plus une infectiosité des amygdales [Report on TSE infectivity distribution in ruminant tissues (december 2001) European Commission. G.Wells].

L'accumulation de la PrP anormale a été décrite dans le SNC (cerveau, moelle épinière, rétine) [Wells *et al.* 1994b], dans l'iléon de bovins expérimentalement infectés au niveau des plaques de Peyer à partir de six mois après inoculation (non systématique et transitoire), et parfois dans les plexus nerveux entériques associés (38 et 40 mois post inoculation sur deux animaux) [Terry *et al.* 2003].



**Figure 19 :**  
Détection de la PrP<sup>sc</sup> dans l'iléon de bovins expérimentalement infectés par l'ESB. L'accumulation touche quelques plaques de Peyer (marquage brun-noir). [Terry *et al.* 2003]

## **C - L'encéphalopathie spongiforme bovine transmise expérimentalement aux ovins**

### **1 - Présentation des études portant sur la transmission de l'ESB au mouton**

Les premières transmissions de l'ESB au mouton et à la chèvre ont été initiées en juin 1988 au NPU (Neuro Pathogenesis Unit) à Edinburgh (9 moutons inoculés par voie IC, 10 infectés par voie orale) [Foster *et al.* 1993] [Foster *et al.* 2001a]. En 1998, de nouvelles séries d'expérimentations ont été lancées et 60 moutons de race Romney ont été infectés. Un an après, 60 autres moutons de race Suffolk, nés en Nouvelle-Zélande, ont aussi été infectés par l'agent de l'ESB [Danny Matthews, communication personnelle].

Dans une expérimentation ayant pour but d'évaluer le sensibilité génétique de moutons à l'ESB inoculée par voie IC, des groupes de moutons Suffolk, Cheviot et Poll Dorset (provenant de Nouvelle-Zélande) présentant six génotypes différents (10 VRQ/VRQ, 10 VRQ/ARQ, x VRQ/ARR, 19 ARQ/ARQ, x ARQ/ARR et 19 ARR/ARR) ont été inoculés [Houston *et al.* 2003d].

Une approche portant sur la cinétique de l'infection de l'ESB a aussi été réalisée : 63 moutons de race Romney (21 ARQ/ARQ, 21 ARQ/ARR et 21 ARR/ARR) ont été infectés oralement avec 5 g de cerveau de vache atteinte par l'ESB [Jeffrey *et al.* 2001c].

Aussi, 24 moutons ARQ/ARQ (Cheviot de Nouvelle-Zélande) ont été transfusés avec du sang provenant de moutons atteints d'ESB (7 buffy coat et 17 sang total). Quelques moutons ont été inoculés par voie intraveineuse avec des extraits de cerveau de bovins atteints d'ESB [Houston *et al.* 2000] [Hunter *et al.* 2002].

Aux Pays-Bas, 8 moutons de race Texel (ARQ/ARQ) et 1 ARR/ARR ont été inoculés par voie orale [van Keulen *et al.* 2002a].

En France, plusieurs ovins ont été expérimentalement infectés par l'ESB mais actuellement une seule publication rapporte la transmission de la maladie chez une brebis de race Lacaune, ARQ/ARQ, infectée par voie intra-péritonéale [Baron *et al.* 2000].

Ainsi, des moutons de race Cheviot, Romney, Suffolk, Poll dorset, Lacaune et Texel ont été utilisés dans l'ensemble de ces expérimentations.

## 2 - Susceptibilité génétique des moutons à l'ESB

Il semble que les moutons de génotype AxQ/AxQ (ARQ/ARQ ; AHQ/AHQ) soient les plus sensibles à l'agent de l'ESB par comparaison à d'autres génotypes (ARQ/ARR, VRQ/ARR ARR/ARR et même VRQ/VRQ) [Foster *et al.* 2001a] [Jeffrey *et al.* 2001c] [Hunter *et al.* 2002] [Houston *et al.* 2003d] (tableau 6).

Génotypes	Voies d'inoculations et nombre de moutons atteints / nb inoculés (dose inoculum)	Durées de survie	Références
ARR/ARR	3-IC/19 (0.05g) 0-OR/21 (5g)	1008 à 1127 jours *Pas de trace de PrP <sup>sc</sup> après 2100 J	[Houston <i>et al.</i> 2003d] [Jeffrey <i>et al.</i> 2001c]
ARR/AHQ	1-IC/1 (0.05g)	2353 jours	[Foster <i>et al.</i> 2001a]
AHQ/AHQ	1-IC/1 (0.05g) 1-T/? 4-OR/5 (5g)	440 jours 536 jours 553 à 935 jours	[Foster <i>et al.</i> 2001a] [Hunter <i>et al.</i> 2002] [Foster <i>et al.</i> 2001b]
ARR/ARQ	2-IC/3 (0.05g) 0-OR/21 (5g)	1886 à 1923 jours *Pas de trace de PrP <sup>sc</sup> après 2100 J	[Foster <i>et al.</i> 2001a] [Jeffrey <i>et al.</i> 2001c]
ARR/ARRH			
ARQ/AHQ	1-IC/1 (0.05g) 1-OR/1 (0.5g) 0-OR/2 (5g)	487 jours 734 jours Pas de signes cliniques à 1631 jours	[Foster <i>et al.</i> 2001a] [Foster <i>et al.</i> 2001a] [Foster <i>et al.</i> 2001b]
AHQ/ARRH			
ARRH/ARRH			
ARQ/ARRH			
ARQ/ARQ	2-IC/? 17-IC/19 (0.05g) 3-OR/5 (5g) 1-T/24 1-IP/1 (0.5g)	495 et 504 jours 495 à 671 jours 596 à 1073 jours 610 jours 672 jours	[Hunter <i>et al.</i> 2002] [Houston <i>et al.</i> 2003d] [Foster <i>et al.</i> 2001b] [Hunter <i>et al.</i> 2002] [Baron <i>et al.</i> 2000]
ARR/VRQ	1-IC/2 (0.05g) 1-OR/2 (0.5g)	1874 jours 1945 jours	[Foster <i>et al.</i> 2001a] [Foster <i>et al.</i> 2001a]
AHQ/VRQ			
ARQ/VRQ	1-IC/1 (0.05g) 2-IC/10 (0.05g)	880 jours 881 à 1092 jours	[Foster <i>et al.</i> 2001a] [Houston <i>et al.</i> 2003d]
ARRH/VRQ			
VRQ/VRQ	4-IC/10 (0.05g)	881 à 1092 jours	[Houston <i>et al.</i> 2003d]

**Tableau 6 : Détails des expérimentations concernant la transmission de l'ESB aux ovins.**

IC : intra cérébrale ; T : transfusion ; OR : orale ; IP : intra-péritonéale. Les doses d'inocula correspondent à une quantité de cerveau de vache atteinte d'ESB.

3-IC/19 signifie que 3 moutons sur 19 ont développé la maladie après infection IC.

Le nombre de moutons inoculés n'est pas toujours disponible.

\* mouton n'ayant pas développé de signes cliniques et qui ont été sacrifiés dans le but de rechercher des traces de PrP<sup>sc</sup>.

Les susceptibilités des moutons à la tremblante et à l'ESB peuvent donc être différentes, le génotype AHQ/AHQ, qui confère une relative résistance à la tremblante, induit une importante sensibilité à l'ESB. De même les animaux de génotype VRQ/VRQ ne sont pas les plus sensibles à l'ESB (bien que généralement plus sensibles à la tremblante) et seulement 4 moutons sur 10 ont développé la maladie avec des périodes d'incubation plus longues que pour les animaux ARQ/ARQ inoculés par la même voie [Houston *et al.* 2003d].

Cependant, ce n'est pas le seul facteur déterminant car des moutons ARQ/ARQ et AHQ/AHQ infectés par voie orale ont développé la maladie en 500 à 1000 jours environ alors que d'autres n'ont pas montré de signes cliniques au bout de 1333 jours post inoculation [Foster *et al.* 2001b]. Inoculés par voie orale, 21 moutons ARQ/ARR et 21 moutons ARR/ARR n'ont pas développé la maladie ni présenté d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans le SNC et organes périphériques au bout de 2100 jours post inoculation [Jeffrey *et al.* 2001c]. Cependant parmi 19 moutons ARR/ARR, considérés comme hautement résistants à la tremblante, inoculés par voie IC avec l'agent de l'ESB, trois animaux ont développé la maladie au bout de 1008, 1124 et 1127 jours (comparativement 17/19 ARQ/ARQ ont développé la maladie en 18 mois en moyenne) [Houston *et al.* 2003d]. La sensibilité des moutons ARR/ARR n'est pas pour autant établie lors de contamination par voie orale. En effet, chez le porc, la transmission expérimentale de l'ESB (ayant conduit à la maladie) n'a été observée que par voie parentérale mais pas par voie orale [Ryder *et al.* 2000].

On peut noter que les animaux de génotype ARQ/ARR ou VRQ/ARR infectés par voie orale ou intra-cérébrale n'ont pas développé de signes cliniques [Jeffrey *et al.* 2001c] [Houston *et al.* 2003d], suggérant une relative résistance à l'agent de l'ESB.

Dans les modèles de conversion *in vitro* de la PrP anormale, la transformation de la protéine prion cellulaire ovine, PrP<sup>c</sup><sub>ARQ</sub>, aboutit à la formation d'une conformation pathologique en présence de PrP<sup>ESB</sup>. Les taux de conversion obtenus dans cette expérimentation sont trois fois plus importants avec de la protéine prion cellulaire ARQ qu'avec la protéine VRQ [Raymond *et al.* 1997], ce qui est en accord avec les données de transmission de la maladie au mouton. Cependant, les expérimentations similaires concernant la transconformation de la PrP<sup>c</sup><sub>ARR</sub> dans une forme pathologique avaient été infructueuses, à la fois avec la tremblante et l'ESB [Raymond *et al.* 1997]. Ces données ne sont pas corrélées aux observations faites chez des moutons ARR/ARR qui, infectés par voie IC avec l'agent de l'ESB, développent la maladie avec une accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans le SNC [Houston *et al.* 2003d].

En résumé, il semble donc que les moutons ARQ/ARQ et AHQ/AHQ soient les plus sensibles à l'agent de l'ESB ce qui pourrait être expliqué, au moins en partie, par le fait que les codons 136, 154 et 171 de la PrP<sup>c</sup> bovine sont respectivement A, R et Q et que seulement 5 acides aminés de la PrP<sup>c</sup> diffèrent entre les deux espèces (sans compter le nombre de répétition des octapeptides).

### **3 – Doses infectieuses et estimation d'une potentielle épidémie dans les troupeaux**

Les doses infectantes utilisées dans ces expérimentations ont été de 0,5 g et de 5 g de cerveau de vache atteinte d'ESB pour les infections par voie orale. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur la dose minimale infectante concernant de passage de l'ESB aux ovins. Aussi d'autres expérimentations similaires sont actuellement en cours pour lesquelles des doses de 0,0005g à 5g d'homogénats de cerveau de vache atteintes d'ESB ont été utilisées [Schreuder *et al.* 2003].

L'utilisation des farines de viandes et d'os dans l'élevage des petits ruminants est loin d'être systématique. Cependant, dans certains types d'élevage, comme ceux destinés à la production de lait et de viande, l'utilisation de farine a été une réalité. Certains auteurs estiment que dans ces élevages un mouton consomme environ un kilogramme de farine par saison [Schreuder *et al.* 2003]. Au pic de l'épidémie d'ESB au Royaume-Uni en 1990, 10 à 1500 moutons peuvent avoir été infectés par cet agent infectieux [Kao *et al.* 2002].

L'estimation de la sensibilité relative des moutons, en fonction de leur génotype et des voies d'inoculation, est aussi difficile à estimer. Avec les données actuelles certaines études rapportent que 33 à 84% des moutons au Royaume-Uni sont génétiquement sensibles à l'agent de l'ESB (contamination par voie orale) [Krebs *et al.* 2002] [Ferguson *et al.* 2002] [Baylis 2002].



#### 4- Signes cliniques

Trois publications décrivent les signes cliniques chez des moutons expérimentalement infectés par l'ESB par différentes voies (orale, intra-péritonéale, intraveineuse, intra-cérébrale et suite à une transfusion de mouton à mouton) [Foster *et al.* 2001a] [Baron *et al.* 2000] [Houston *et al.* 2003a].



Figure 20 : Mouton de race Lacaune expérimentalement infecté par l'ESB ayant développé un intense prurit en région dorso-lombaire. Photo AFSSA.

La première étude rapporte une période clinique d'une semaine avec une ataxie prédominante et pas de prurit [Foster *et al.* 2001a]. La seconde, portant sur un seul mouton, a permis d'observer un intense prurit, une ataxie importante pendant une période de plus de trois mois, ce qui est plus typique de la tremblante [Baron *et al.* 2000].

Enfin, la dernière étude porte sur 28 moutons ; la durée moyenne de la période clinique est d'environ trois mois pendant laquelle les différents signes cliniques de tremblante sont observés [Houston *et al.* 2003a].

Cependant il semble que l'apparition soudaine d'ataxie et l'absence de prurit soit fréquente lors d'infection par l'agent de l'ESB (en comparaison avec l'isolat de tremblante SSBP/1) [Houston *et al.* 2003a]. La discrimination de l'ESB ovine et de la tremblante semble toutefois impossible par l'analyse des signes cliniques et de leur durée.

#### 5 – Tissus infectieux et sites d'accumulation de la PrP anormale

Chez les moutons expérimentalement infectés par l'ESB, l'infectiosité a été détectée dans la rate, le SNC et le sang (seuls tissus testés) par transmission à la souris et au mouton [Foster *et al.* 1996] [Hunter *et al.* 2002]. L'accumulation de PrP<sup>sc</sup> a été mise en évidence dans le système nerveux central [Foster *et al.* 2001a], les organes lymphoïdes (rate, amygdale, plaques de Peyer, nœuds lymphatiques) et dans le système nerveux entérique [Foster *et al.* 2001b] [Jeffrey *et al.* 2001c] (tableau 7).

La cinétique d'apparition de la PrP dans les organes, suite à une contamination par voie orale, rappelle fortement celle observée dans la tremblante. En effet, la PrP<sup>sc</sup> est détectée d'abord dans les formations lymphoïdes associées au tube digestif, puis le système nerveux

entérique et le SNC au niveau du noyau dorsal du nerf vague et au niveau de la moëlle épinière thoracique [Jeffrey *et al.* 2001c] (figure 21).

Cependant, les dates d'apparition des premiers dépôts de PrP anormale sont plus tardives lors d'une infection par l'ESB que dans des cas de tremblante [Andreoletti *et al.* 2000] [Heggebo *et al.* 2003] ce qui peut-être traduit par une adaptation partielle de l'agent de l'ESB chez les ovins (premier passage). Il serait intéressant de réaliser des transmissions successives de l'ESB chez le mouton afin d'identifier ses caractéristiques après adaptation de la souche. Une accumulation plus importante de PrP anormale et une neuro-invasion plus rapide pourraient être alors observées.

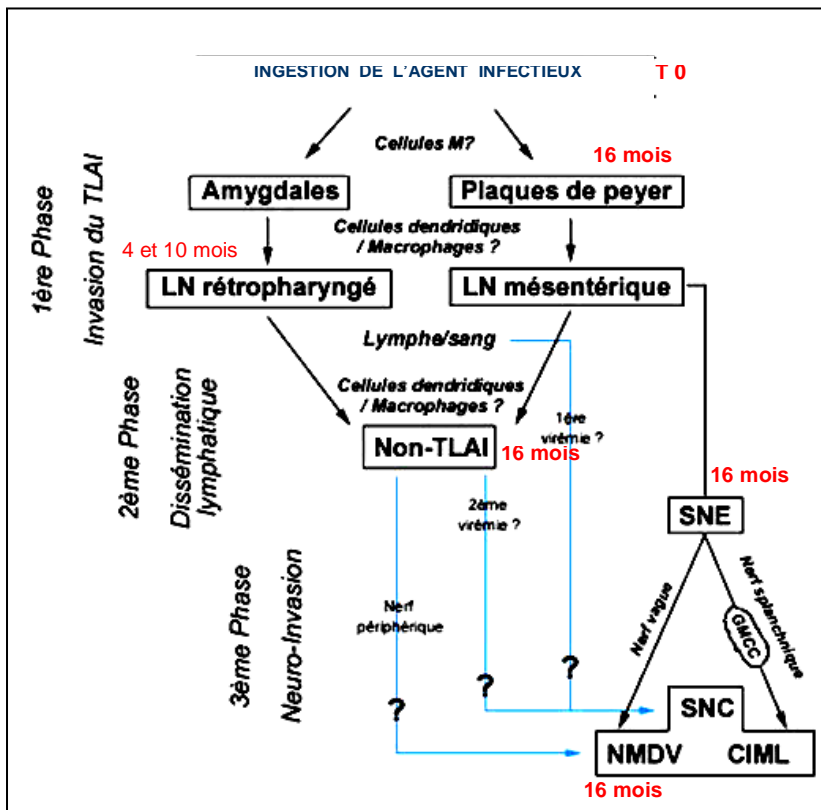


Figure 21 :

Cinétique de détection de la PrP anormale dans différents organes de moutons Romney ARQ/ARQ expérimentalement infectés par l'agent de l'ESB. En rouge : date de détection de la PrP anormale.

L'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> a été clairement mise en évidence dans les plaques de Peyer à partir de 16 mois et des traces de PrP ont été détectés dans le SNC à la même période.

Deux moutons ont présenté des traces d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le nœud lymphatique rétropharyngé à 4 et 10 mois post infection.

D'après [Jeffrey *et al.* 2001c]. Schéma d'après [van Keulen *et al.* 2002b]

Animal no.:	1	2	3	4	5	6	7
Sex/incubation period (days):	F 553	M 593	F 596	F 629	F 761	F 935	F 1073
Brain	++	++	++	++	++	++	++
Spinal cord							
Cervical	ND	ND	+	+	+	++	++
Thoracic	++	++	++	++	++	ND	++
Lumbar	ND	ND	++	++	++	ND	+ / ++
Dorsal root ganglia							
Cervical	ND	ND	-	-	-	ND	+
Thoracic	ND	ND	-	-	(+)	ND	-
Lumbar	ND	ND	ND	-	(+)	ND	-
Retina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	(+)
Vagus nerve	ND	-	(+)	-	+	-	(+)
Radial nerve	-	-	-	-	-	-	-
Sciatic nerve	-	-	-	-	-	-	-
Coeliac ganglia	ND	ND	ND	+	ND	ND	+
Stellate ganglia	ND	ND	ND	-	ND	ND	-
Nodose ganglia	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
Lung	ND	-	ND	-	-	-	-
Heart	ND	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	(+)
Liver	-	-	ND	-	-	-	-
Spleen	ND	-	(+)	ND	(+)	(+)	+
Thymus	ND	ND	-	-	-	-	-
Nictitating membrane	ND	ND	-	-	(+)	ND	+
Tonsil	++	++	+	++	++	++	++
Peyer's patches	ND	ND	+	+	ND	+	+
Retropharyngeal lymph node	+	+	ND	++	++	++	++
Submandibular lymph node	+	+	+	+	+	++	(+)
Mammary lymph node	ND	ND	(+)	++	(+)	+	+
Bronchial-mediastinal lymph node	+	-	+	+	+	(+)	ND
Prefemoral lymph node	ND	ND	(+)	+	+	+	(+)
Mesenteric lymph node	+	(+)	+	+	+	+	+
Ileo-caecal lymph node	++	+	ND	++	ND	ND	++
Prescapular lymph node	+	(+)	+	+	+	+	(+)
Hepatic lymph node	ND	ND	ND	ND	ND	++	+
Parotid salivary gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Submandibular salivary gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Rumen	-	-	-	-	-	-	-
Omasum	ND	-	-	-	-	-	-
Abomasum	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum	(+)PP	-	(+)	-	(+)	+PP	+
Jejunum (35%)	ND	ND	ND	(+)	(+)	(+)	(+)
Jejunum (70%)	ND	ND	ND	(+)	(+)	(+)PP	(+)
Distal ileum	-	-	+PP	(+)	(+)	(+)	+PP
Caecum	ND	ND	ND	ND	ND	+PP	+PP
Pancreas	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Uterus	-	ND	-	-	-	-	-
Ovary	-	ND	-	-	-	-	-
Skin	ND	ND	ND	ND	-	-	-
Semitendinosus muscle	ND	ND	ND	-	ND	ND	-
Longissimus dorsi muscle	ND	ND	ND	-	ND	-	-
Diaphragmatic muscle	ND	ND	ND	-	ND	-	-
Foetal brain/spleen	ND	ND	ND	ND	- (1 mth)	ND	-
Cotyledon	ND	ND	ND	ND	-	ND	-

Tableau 7 : Sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> chez des moutons infectés par voie orale avec l'ESB (stade terminal de la maladie). ND : pas testé ; - négatif ; (+) : marginal ; + : clairement présent ; ++ : forte accumulation ; PP plaques de Peyer. D'après [Foster et al. 2001b]

Cette accumulation de PrP<sup>sc</sup> peut être dépendante de la voie d'inoculation : les sites d'accumulation de PrP sont beaucoup plus restreints (dans les organes lymphoïdes) si l'inoculation de l'agent de l'ESB a été faite en IC ou par transfusion sanguine comparativement à la voie orale. Ainsi, chez deux moutons ARQ/ARQ, ayant développé la

maladie en 500 jours suite à une inoculation par voie intra-cérébrale, aucune accumulation de PrP anormale n'a été détectée dans les amygdales, le nœud lymphatique mésentérique, les plaques de Peyer et la rate comparativement à des moutons ARQ/ARQ et AHQ/AHQ infectés par voie orale qui ont présenté une forte accumulation de prion dans tous ces organes [Hunter *et al.* 2002].

Chez les moutons de génotype ARQ/ARR et ARR/ARR inoculés par voie orale et sacrifiés au bout de 2100 jours [Jeffrey *et al.* 2001c], aucune infectiosité n'a été rapportée à ce jour dans le SNC ni dans les organes périphériques [Schreuder *et al.* 2003].

## **D - L'encéphalopathie spongiforme féline (ESF)**

### **1 - Description de la maladie**

Les premiers cas d'encéphalopathie spongiforme féline ont été identifiés en avril 1990 chez 5 chats domestiques en GB [Wyatt *et al.* 1991a]. Au total, 88 cas de FSE chez des chats domestiques ont été identifiés en GB [Ryder *et al.* 2001], un en Norvège [Bratberg *et al.* 1995], un en Irlande, deux en Suisse et un au Liechtenstein [Casamayor Palleja *et al.* 2002]. D'autres espèces de félin ont aussi été atteintes dans les parcs zoologiques : 9 guépards (premier cas en 1992), 3 pumas (premier cas en 1990), 3 ocelots (premier cas en 1994), 2 tigres (premier cas en 1996), 2 lions (premier cas en 1998) et un cougar [Peet *et al.* 1992] [Willoughby *et al.* 1992] [Casamayor Palleja *et al.* 2002].

L'origine de cette pathologie est sans doute liée à l'agent de l'ESB comme le montrent les études portant sur l'identification des souches par transmission à la souris ; cependant cette conclusion n'a été basée que sur l'étude d'un seul cas de FSE chez un chat domestique [Fraser *et al.* 1994].

### **2 - Signes cliniques**

Une étude portant sur 5 chats atteints d'ESF décrit les principaux signes cliniques observés. Les symptômes majeurs sont l'ataxie, touchant particulièrement le train postérieur et qui se traduit par une démarche accroupie, des modifications du comportement (agressivité ou timidité), l'hyperesthésie, des hochements de tête, des fasciculations musculaires, du ptyalisme, et du mâchonnement [Wyatt *et al.* 1991b] [Pearson *et al.* 1992]. Chez le guépard, des signes cliniques similaires sont aussi décrits [Baron *et al.* 1997]. La durée des signes cliniques est d'environ 3 à 8 semaines chez le chat et 8 à 10 semaines chez le guépard [Wyatt *et al.* 1991b] [Peet *et al.* 1992] [Baron *et al.* 1997].

Un cas particulier d'ESF, apparu simultanément à un cas de MCJsp. chez son propriétaire, a été répertorié. D'après les auteurs, les signes cliniques observés et les propriétés biochimiques de la PrP anormale étaient différents de ceux rapportés dans les autres cas d'ESF ; ils suggèrent ainsi une éventuelle transmission horizontale entre le chat et le patient [Zanusso *et*

al. 1998]. Cependant, aucune caractérisation de la souche sur souris, qui permettrait de conclure sur cette hypothèse, n'a été décrite pour ce cas particulier.

### **3 - Sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup>**

L'accumulation de PrP anormale a été décrite dans le SNC. Elle se présente sous forme intra-neuronale et ponctuée dans le neuropile chez le puma [Willoughby *et al.* 1992], chez le chat domestique [Bratberg *et al.* 1995] et chez le guépard [Baron *et al.* 1997].

Dans les organes périphériques, une seule étude chez des chats atteints de FSE, rapporte la présence de PrP anormale dans les formations lymphoïdes, les plexus nerveux myentériques, et dans les glomérules rénaux [Ryder *et al.* 2001]. La présence de la PrP anormale dans les glomérules rénaux est discutée par les auteurs car un signal positif a aussi été détecté dans certains cas témoins négatifs. Néanmoins, les auteurs ont considéré le marquage obtenu comme spécifique quand il est associé à une neuropathologie caractéristique de la maladie.

## **E - Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) chez l'homme**

### **1- Description de la maladie**

Le réseau de surveillance de la maladie de Creutzfeldt-Jakob a été mis en place en 1990 en GB dans le but de mettre en évidence une éventuelle transmission de l'ESB à la population humaine [Will *et al.* 1996]. En avril 1996, les premiers cas d'une nouvelle forme de MCJ ont été décrits par les britanniques qui déclaraient 10 cas de MCJ atypiques (variant MCJ) survenus en 1994 et 1995 chez de jeunes patients (moyenne d'âge inférieure à 30 ans). Les signes cliniques du vMCJ sont relativement bien stéréotypés et sont caractérisés, pendant une première phase de 6 mois environ, par l'apparition de symptômes psychiatriques prédominants. La dépression, l'anxiété et la présence d'un malaise sont les symptômes les plus fréquemment observés. La phase psychiatrique est suivie par l'apparition d'une ataxie cérébelleuse et de mouvements involontaires qui incluent une chorée, de la dystonie, des myoclonies et des déficits cognitifs. De la dysphagie, ainsi que des symptômes pyramidaux peuvent apparaître. Dans les derniers stades de la maladie, le mutisme se développe bien que la communication avec le malade puisse durer assez longtemps [Zeidler *et al.* 1997] [Will *et al.* 1999].

Le temps écoulé entre la déclaration clinique de la maladie et le décès est d'environ 14 mois au lieu de 4, en moyenne, pour une MCJsp. Le plus grand nombre de cas a été détecté chez des individus âgés de 26 à 29 ans bien qu'un cas de vMCJ ait été rapporté chez un homme de 74 ans [Lorains *et al.* 2001].

Le diagnostic de la maladie est établi chez l'homme sur la base de l'observation des signes cliniques accompagnée par une IRM du SNC qui montre un fort signal caractéristique dans

l'aire thalamique postérieure. Ainsi la classification diagnostique permet d'identifier ces cas comme « cas de vMCJ probables » (sans analyse neuropathologique). A ce jour, cette approche permet d'avoir une sensibilité importante et une spécificité de 100% [Ward *et al.* 2003]. Le diagnostic de certitude des cas de vMCJ repose sur l'examen neuropathologique, caractérisé par une atteinte spongiforme, une perte neuronale, une prolifération astrocytaire et microgliale, la présence de plaques florides et l'accumulation de PrP anormale [Ironsides *et al.* 1997] [Ironsides *et al.* 2000a]. La présence de ces nombreuses plaques florides est considérée comme caractéristique du vMCJ chez l'homme comparativement aux autres ESST humaines. D'ailleurs, elles ont été décrites chez des singes expérimentalement infectés par l'agent de l'ESB [Lasmézas *et al.* 1996b]. Cependant, de façon générale, leur présence ne signe pas pour autant la présence de l'agent de l'ESB : elle ont aussi été décrites avec la souche de tremblante murine 111A [Fraser 1979b], dans la maladie du dépérissement chronique des cervidés [Williams *et al.* 1993], dans quelques cas de MCJ iatrogéniques suite à des greffes de dure mère au Japon [Shimizu *et al.* 1999]. Une autre caractéristique du vMCJ (comparativement aux autres maladies humaines) est l'accumulation de PrP anormale dans les organes lymphoïdes, notamment dans les amygdales [Hill *et al.* 1997b]. Cependant une accumulation de PrP anormale a aussi été décrite récemment dans la rate de patients atteints de MCJsp [Glatzel *et al.* 2003].

## **2- Approche épidémiologique et origine de la maladie**

En mai 2003, le nombre de cas de cette affection était de 136 en GB, 6 en France, 1 en Irlande, 1 à Hong-Kong et 1 au Canada auxquels s'ajoutent 4 suspicions : 2 en Italie, 1 en Hongrie et 1 aux EU [Weber 2003]. Les modèles prédictifs du nombre de futurs cas de vMCJ sont très imprécis et certains ont estimé que l'épidémie serait de 63 cas à plus de 136000 cas [Ghani *et al.* 2000] bien que ces chiffres aient été revus à la baisse par d'autres équipes [Alperovitch *et al.* 2002]. Certains auteurs pensent même qu'il n'y aura pas plus de 400 cas [Valleron *et al.* 2001].

Cette estimation est d'autant plus difficile que tous les cas actuels de vMCJ sont homozygotes méthionine au codon 129 du gène de la PrP et que l'influence de ce codon sur les périodes d'incubation est décrite dans les cas de MCJ iatrogéniques suite à un traitement à l'hormone de croissance [Brown *et al.* 2000a]. Ainsi, des cas exprimant la valine à ce codon pourront probablement être identifiés dans le futur et un possible changement phénotypique de la maladie doit être pris en compte (durée de la période clinique par exemple) [Ward *et al.* 2003].

La difficulté de prévoir le nombre de futur cas de vMCJ est liée aux incertitudes concernant les durées d'incubation de la maladie, la dose minimale infectante et l'existence ou non d'un portage asymptomatique, l'effet de doses répétées, et l'existence éventuelle d'autres facteurs de réceptivité de l'hôte autres que la gène de la PrP.

Ces cas de vMCJ répertoriés ont été clairement reliés à l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Ainsi, des études portant sur l'analyse des souches d'ATNC isolées sur des cas d'ESB et de vMCJ ont montré des similitudes confortant l'hypothèse de transmissibilité de l'ESB à l'homme [Bruce *et al.* 1997]. De plus les propriétés moléculaires de la PrP anormale sont globalement similaires dans ces deux pathologies [Hill *et al.* 1997a] [Collinge *et al.* 1996]. Aussi la transmission de l'ESB, par voie IC, au macaque a induit l'apparition de plaques florides rappelant celles décrites chez les patients atteints de vMCJ [Lasmézas *et al.* 1996b].

### **3 - Sites d'accumulation de la PrP anormale chez les patients atteints de vMCJ**

Chez l'homme, une accumulation de PrP anormale a été mise en évidence dans le SNC (du cortex frontal jusque dans la moelle épinière), dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes (rate, amygdales, tissu lymphoïde associé au tube digestif et nœuds lymphatiques) [Hill *et al.* 1999b].

Une accumulation de PrP anormale a aussi été détectée dans les ganglions des racines dorsales de la moelle épinière, dans le ganglion trigéminal, dans la rétine et la partie proximale du nerf optique, dans le rectum, la surrénale et dans le thymus (chez un seul patient) [Wadsworth *et al.* 2001] [Head *et al.* 2003] [Ward *et al.* 2003]. Les études sur les nerfs périphériques sensoriels, moteurs et du système nerveux autonome n'ont pas permis de conclure sur la présence ou non de la PrP<sup>Sc</sup> et d'autres investigations sont actuellement en cours [Ward *et al.* 2003].

Cette importante distribution périphérique de PrP<sup>Sc</sup>, décrite uniquement dans le cas du vMCJ, illustre la complexité de la relation « hôte infecté/souche ». En effet, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans les tissus lymphoïdes n'est pas observée dans les cas sporadiques, iatrogéniques et héréditaires de MCJ [Hill *et al.* 1999b]. De même, dans le cas du Kuru, lié à une contamination par voie orale comme dans le cas du vMCJ, aucune présence de PrP<sup>Sc</sup> dans les tissus lymphoïdes n'est décrite ce qui exclut en partie un éventuel biais lié à la voie de contamination.

L'importante distribution périphérique de la PrP anormale dans les tissus périphériques dans le cas du vMCJ, pose le problème du risque de transmission iatrogénique de la maladie (transfusions, greffes, décontamination du matériel chirurgical ...). Ce problème est d'autant plus à prendre en considération que chez les moutons infectés par l'ESB, qui montrent une distribution tissulaire de PrP<sup>Sc</sup> comparable à celle observée dans le cas du vMCJ, une transmission de la maladie a été constatée suite à une transfusion sanguine à un ovin sain [Houston *et al.* 2000].

Dans le cas du vMCJ, la présence de PrP<sup>Sc</sup> dans les organes lymphoïde offre aussi des possibilités de diagnostic par biopsie des amygdales par exemple [Hill *et al.* 1997b]. Cette

approche permet aussi d'envisager des études rétrospectives sur les amygdales et les appendices disponibles dans les banques d'organes [Ironsides et al. 2000b] [Ghani et al. 2000]. Une étude rapporte en effet qu'une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> a été observée dans l'appendice d'un patient prélevée deux ans avant l'apparition des signes cliniques [Hilton et al. 2002]. Les premières données obtenues à partir de ces études rétrospectives ont révélé la présence de PrP<sup>Sc</sup> dans un appendice sur 8318 échantillons testés. Les auteurs ont considéré que leur échantillonnage était représentatif de la population âgée de 10 à 50 ans et ont ainsi évalué que 120 personnes par million d'habitant de cette tranche d'âge ont été contaminées entre 1995 et 1999 en GB [Hilton et al. 2002].

## **F – Autres ESST animales**

### ***L'encéphalopathie spongiforme du vison d'élevage***

Un premier cas d'encéphalopathie spongiforme du vison a été décrit en 1965 [Hartsough et al. 1965]. Cette encéphalopathie a décimé certains élevages dans les pays Baltes, au Canada et aux Etats Unis (EU). La maladie apparaît insidieusement avec un changement comportemental (agressivité) des animaux. On remarque une baisse de l'appétit puis en quelques jours une ataxie locomotrice et des tremblements. L'animal mord tous les objets à sa portée et se mutilé sévèrement. La mort survient entre 2 et 7 semaines après le début des signes cliniques [Hadlow et al. 1968]. En règle générale l'encéphalopathie spongiforme du vison semble surtout être la conséquence d'une alimentation à base de carcasses de moutons atteints de tremblante [Hadlow et al. 1968]. Cependant, la transmission de l'ESB au vison a été obtenue par inoculation intracérébrale de cerveau de bovins atteints d'ESB mais aussi lors de contamination expérimentale par voie orale à un autre groupe de vison. Toutefois les signes cliniques observés chez ces visons étaient différents de ceux décrits dans le passé [Robinson et al. 1994]. En 1985, une contamination de visons d'élevage ayant consommé des carcasses de vaches laitière a été identifiée, conduisant les auteurs à penser qu'il pouvait exister des cas d'encéphalopathie spongiforme transmissible non détectés chez les bovins aux EU [Marsh et al. 1991].

### ***La maladie du dépérissement chronique des cervidés***

La maladie du dépérissement chronique des cervidés, ou Chronic wasting disease (CWD), touche différentes espèces de cervidés aux EU : *Odocoileus hemionus* (mule deer), *O. virginianus* (white-tailed deer) et *Cervus elaphus nelsoni* (Rocky mountain elk). Cette maladie concerne à la fois les animaux élevés en captivité et les animaux sauvages [Williams et al. 2002]. L'origine de cette maladie reste incertaine mais il semble que les premiers foyers proviennent du Colorado et du Wyoming [Miller et al. 2000]. La première description de cette pathologie remonte à 1978 [Williams et al. 1980]. Depuis la maladie a été identifiée dans



différents états et au Canada [Williams *et al.* 2002]. D'autres espèces de ruminants (antilopes, mouflon, chèvre des montagnes...) en contact naturel avec des troupeaux de cervidés atteints, ne semblent pas développer la maladie [Williams *et al.* 2002].

Tout comme la tremblante, cette pathologie est contagieuse et semble se propager latéralement avec une efficacité notable [Williams *et al.* 1992] [Miller *et al.* 2003]. L'accumulation de PrP<sup>sc</sup> au niveau des plaques de Peyer dans l'intestin suggère que l'infection des animaux peut se faire par voie orale [Sigurdson *et al.* 2001] [Sigurdson *et al.* 2002] [Williams *et al.* 2002]. La prévalence de la maladie dans les populations de cervidés captifs peut atteindre 90% chez des animaux de plus de deux ans [Williams *et al.* 1980] et elle reste la principale cause de mortalité adulte dans certaines fermes [Peters *et al.* 2000] [Williams *et al.* 2002]. Les animaux atteints sont généralement âgés 2 à 7 ans et la période d'incubation estimée après infection orale est de 23 mois pour *Odocoileus hemionus* (mule deer) et de 12 à 34 mois pour *Cervus elaphus nelsoni* (Rocky mountain elk) [Williams *et al.* 2002].

Comme dans la tremblante du mouton, de nombreux organes accumulent de la PrP<sup>sc</sup>. Ainsi, le SNC, les organes lymphoïdes, les plexus nerveux entériques, le nerf vague, le plexus brachial, le nerf sciatique et les îlots de Langerhans du pancréas ont clairement été identifiés comme des sites possibles d'accumulation de la PrP anormale [Sigurdson *et al.* 2001] [Sigurdson *et al.* 2002].

### **III – Identification des souches d’agent infectieux dans les maladies à prion**

Les premières descriptions de formes différentes de tremblante chez le mouton ont été faites par Stockman en 1926 qui décrivait deux formes cliniques, l’une de type « nervous » (nerveuse), l’autre de type « itching » (démangeaisons) [Pattison 1966]. Ce n’est que bien plus tard, en 1961, que Pattison et Milson rapportent l’existence de deux formes de tremblante chez la chèvre ; une forme « drowsy » (nerveuse) qui est caractérisée par une profonde dépression et une forme « scratching » (démangeaisons) qui présente une hyperexcitabilité et du prurit [Pattison 1988]. Ces premières observations ont suggéré l’existence de différents types d’agent infectieux dans la tremblante des petits ruminants.

Actuellement, les méthodes de caractérisation de ces agents infectieux sont multiples et reposent sur l’analyse des lésions caractéristiques de ces pathologies et sur l’analyse du seul marqueur spécifique, la PrP anormale. Cependant, la transmission à la souris, l’analyse des périodes d’incubation et l’analyse des lésions du SNC est, historiquement, la méthode de référence. Cette approche, portant sur la transmission d’isolats (agent infectieux non caractérisé) à la souris, a permis de définir la notion de souche d’ESST qui repose sur la caractérisation complète de la maladie induite chez les rongeurs après plusieurs transmissions successives et après clonage (transmission après dilution limite de l’inoculum).

#### **A - Caractérisation des agents infectieux par analyse des lésions cérébrales chez l’hôte infecté**

Chez les ovins atteints de tremblante naturelle, les lésions de spongiose peuvent être très variables et semblent dépendre de la race des animaux [Zlotnik 1958] mais aussi de l’âge auquel l’animal est mort de la maladie [Wood *et al.* 1997]. Une étude portant sur des moutons atteints de tremblante naturelle ou expérimentalement infectés par l’isolat SSBP/1, de 5 races et de 4 génotypes différents, montre qu’il existe des variations importantes entre les moutons. Ces variations, qui semblent être dues au génotype et à la race des animaux, mais aussi à la nature de l’agent infectieux, ont conduit les auteurs à relativiser les possibilités d’identification des isolats/souches de tremblante par cette méthode [BegaraMcGorum *et al.* 2002]. Une autre étude, montre que différents phénotypes neuropathologiques peuvent être distingués dans différents troupeaux de moutons ARQ/ARQ atteints de tremblante. Cependant, il est difficile de distinguer l’agent de l’ESB chez des moutons expérimentalement infectés de ces cas de tremblante naturelle. En effet, chez des ovins de génotype ARQ/ARQ, expérimentalement infectés par l’ESB, les profils lésionnels obtenus sont très proches de ceux de cas de tremblante chez des moutons de même génotype [Ligios *et al.* 2002].

Chez les bovins atteints d’ESB, l’étude des lésions cérébrales montre une grande uniformité. Ainsi, les profils observés dans les cas d’ESB chez des bovins au RU sont très similaires [Wells *et*

*al.* 1995] [Simmons *et al.* 1996] et des profils identiques ont été décrits dans des cas d'ESB au Japon [Kimura *et al.* 2002], au Portugal [Orge *et al.* 2000], en Espagne [Badiola *et al.* 2002] suggérant qu'une seule souche d'ESB est incriminée. Cependant, un nouveau phénotype a été récemment identifié chez deux bovins en Italie, suggérant la possibilité d'existence d'une ou d'autres souches plus minoritaires.

L'utilisation de cette méthode d'identification des souches d'agent infectieux chez l'hôte d'origine ne permet cependant pas de comparer des souches chez différentes espèces atteintes ; en effet le développement des lésions de spongiose dépend à la fois de la souche d'agent infectieux mais aussi des critères d'hôtes : une même souche n'induit pas la même neuropathologie chez deux espèces différentes. La transmission à des modèles murins permet donc de s'affranchir des facteurs d'hôte et de comparer les souches d'agent infectieux provenant d'espèces différentes.

## **B - Caractérisation des souches sur modèles murins : le modèle de référence**

Suite à la description en 1961, de Pattison et Milson de deux types de tremblante chez la chèvre, Chandler teste la sensibilité de trois lignées de souris à ces deux isolats de tremblante [Chandler 1961] [Pattison *et al.* 1961]. Quelques mois plus tard, les souris inoculées avec la souche « Drowsy » développent une encéphalopathie spongiforme transmissible alors que la maladie ne se développe que beaucoup plus tard chez les souris inoculées avec l'isolat de type « Scratching », confirmant finalement l'existence de deux types d'agent infectieux [Chandler 1961] [Chandler 1963].

L'étude de transmissions de différents isolats de tremblante à différentes lignées murines a permis de mettre en évidence des variations de périodes d'incubation, de signes cliniques et de lésions neuronales. En général, lors de transmissions successives à une lignée de souris, ces critères se stabilisent et sont alors représentatifs d'une souche donnée dans un modèle murin donné [Fraser *et al.* 1968].

### **1- Signes cliniques et périodes d'incubation chez la souris**

L'inoculation des souris avec un homogénat de cerveau infecté peut se faire par voie intracérébrale (IC) ou par voie périphérique (intra-péritonéale (IP) généralement). Certains isolats, comme ceux de l'ESB, ont été transmis parfois plus facilement par voie IP que par voie IC lors d'un premier passage à la souris ; c'est pourquoi, pour optimiser les chances de transmission de la maladie, les souris sont inoculées simultanément par voie IC et par voie IP [Bruce 1996b].

Une fois inoculées, les souris sont régulièrement suivies. Le comportement des animaux est évalué systématiquement et enregistré sous les termes « non affectée » (pas de signes cliniques), « possiblement affectée » (signes cliniques frustrés) ou « affectée » (signes cliniques

clairement identifiés) [Dickinson *et al.* 1968a]. Les signes cliniques généralement observés sont l'inactivité ou une hyperactivité, un pelage ébouriffé, un dos voûté, une queue rigide, une ataxie, une démarche vacillante accompagnée d'une incoordination motrice, une paralysie flasque du train postérieur, du prurit et parfois une obésité en phase pré-clinique [Thackray *et al.* 2002] [Carp *et al.* 1991] [Kim *et al.* 1988] [Dickinson *et al.* 1968a]. Ces symptômes n'apparaissent pas forcément tous et certains peuvent être plus ou moins caractéristiques d'une souche donnée. Ainsi, la souche ME7, qui induit parfois une incontinence urinaire [Dickinson *et al.* 1968a], provoque une inactivité prononcée et une faible coordination motrice pendant les phases d'activité [Dickinson *et al.* 1969a] ; comparativement, la souche 22C induit chez les souris une forte incoordination motrice et un comportement actif normal [Dickinson *et al.* 1969a]. Une étude systématique automatisée permet aussi de différencier de façon précoce des souches grâce à l'étude de l'activité circadienne : des souris inoculées avec la souche 301C (ESB sur C57BL) montrent une très importante baisse d'activité, bien avant l'apparition des signes cliniques caractéristiques, contrairement à des souris inoculées avec les souches ME7 et 139A [DellOmo *et al.* 2002].

La période d'incubation est définie par la période séparant le jour de l'inoculation et l'euthanasie de l'animal (ou mort naturelle). Cette euthanasie est réalisée soit après l'observation de signes cliniques caractéristiques (« souris affectées ») pendant au moins trois semaines consécutives, soit à un stade plus avancé de la maladie (*in extremis*) si l'animal a présenté des phases de rémission transitoires [Dickinson *et al.* 1968a]. Ce système de score des signes cliniques semble efficace dans la plupart des expérimentations. Cependant, certaines souris, comme les VM, sont généralement moins actives que les autres lignées murines et la mesure de l'activité peut être alors plus difficile [Dickinson *et al.* 1968a].

La période d'incubation peut aussi dépendre du sexe des souris inoculées. Dans différents modèles murins infectés avec l'agent de l'ESB (premier passage, IC), les mâles C57BL ont développé la maladie environ 280 jours avant les femelles [Abiola *et al.* 2002] ; ce phénomène avait déjà été décrit avec de nombreuses souches de tremblante mais les différences n'étaient que d'environ 20 jours au maximum avec des périodes d'incubation plus longues chez les mâles [Outram 1976].

## **2 – Importance des facteurs génétiques sur la période d'incubation chez la souris – isolement des souches d'ESST**

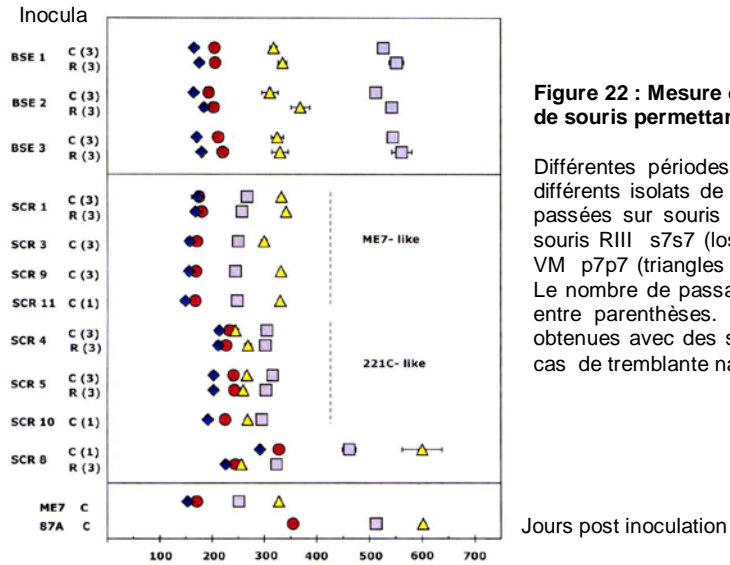
Les ESST sont causées par un agent infectieux dont la réplication est sous le contrôle génétique de l'hôte [Dickinson *et al.* 1968a]. Chez la souris, le gène *Sinc* (scrapie incubation) de l'hôte exerce une influence majeure sur la période d'incubation après infection avec différentes souches de tremblante. C'est l'étude de la sensibilité de différentes lignées murines à la souche de tremblante ME7 qui a permis de mettre en évidence l'existence de ce déterminisme génétique [Dickinson *et al.* 1968a] [Dickinson *et al.* 1969b]. Deux allèles de

ce gène ont été identifiés, et désignés sous les termes de *s7* et *p7*. Ils impliquent respectivement une courte (*short*) ou une longue (*prolonged*) période d'incubation avec la souche ME7.

En 1966, une lignée murine albinos (VM, *p7p7*), développée au Moredun Research Institute à Edinburgh, montre cependant une plus grande sensibilité à la souche 22A comparativement à des souris C57BL (*s7s7*) inoculées avec ce même agent. Cette observation a révélé à la fois l'existence de souches d'un autre type, différentes de ME7, qui se répliquent plus facilement chez des souris *p7p7*, mais aussi l'intrication des facteurs d'hôtes et des agents infectieux dans ces maladies [Dickinson *et al.* 1979].

D'autres études ont permis de montrer que ce gène *Sinc* code pour la protéine prion. Les souris *s7s7* expriment la PrP<sup>a</sup> alors que les souris *p7p7* expriment la PrP<sup>b</sup>. Ces protéines diffèrent uniquement par deux acides aminés (PrP<sup>a</sup>: 108 leucine, 189 thréonine; PrP<sup>b</sup>: 108 phénylalanine, 189 valine) [Westaway *et al.* 1987] [Hunter *et al.* 1992].

Pour caractériser une (ou des) souche(s) présente(s) dans un isolat, celui-ci est inoculé à des lots de souris C57BL (*s7s7*), RIII (*s7s7*), VM (*p7p7*) et C57BL x VM F1 (*s7p7*). La durée des périodes d'incubation peut varier en fonction des souches inoculées à des souris de type *s7s7* ou *p7p7* et à des souris hétérozygotes [Bruce 1996b]. C'est la comparaison des périodes d'incubation relatives entre les différentes expérimentations qui caractérise en partie les souches [Dickinson *et al.* 1979]; ainsi, en ce qui concerne l'ESB, des périodes d'incubation « courtes » sont observées chez des souris RIII et successivement plus longues chez les C57BL, VM et C57BLxVM; des résultats différents sont obtenus avec d'autres souches et isolats de tremblante (figure 22). Cependant, le génotype *s7* ou *p7* des souris ne contrôle pas à lui seul la transmission d'une souche ainsi que sa période d'incubation: des souris de génotype *s7s7*, comme les C57BL ou les RIII, ont 100 jours de différence dans leur période d'incubation suite à l'inoculation IC de l'ESB [Bruce *et al.* 1994a] [Fraser *et al.* 1992]. Cette différence de périodes d'incubation observée au premier passage s'amenuise lors des passages successifs chez une même lignée murine, mais aussi lors de transmissions croisées entre les RIII et C57BL [Bruce 1993] [Bruce *et al.* 1994a] [Bruce *et al.* 2002].



**Figure 22 : Mesure des temps d'incubation chez différents types de souris permettant de différencier des agents d'ESST**

Différentes périodes d'incubation chez des souris inoculées avec différents isolats de tremblante du mouton et d'ESB préalablement passées sur souris *Sinc s7s7*. Chaque isolat a été testé sur des souris RIII s7s7 (losanges bleus), C57BL s7s7 (cercles rouges), VM p7p7 (triangles jaunes) et C57BL x VM s7p7 (carrés violets). Le nombre de passage sur C57BL (C) et sur RIII (R) est indiqué entre parenthèses. Ces résultats sont comparés à des données obtenues avec des souches caractérisées (ME7 et 87A) isolées de cas de tremblante naturelle. D'après [Bruce *et al.* 2002].

En ce qui concerne les souches de tremblante, elles peuvent induire des périodes d'incubation plus courtes chez des souris de génotype s7, comparativement à des souris de génotype p7, mais ce phénomène peut être inversé pour d'autres souches.

Finalement, environ 14 souches de tremblante ont été isolées, la plupart provenant d'un seul mélange de trois cerveaux de moutons (1 Cheviot et 2 Cheviot x Border Leicester) atteints de tremblante disponible en 1955 : SSBP/1 (scrapie sheep brain pool/1) [Dickinson *et al.* 1979]. De ce mélange ont été isolées et caractérisées sur souris les souches, 139A, 22A, 22C, 79A, 22F, RML, 22H, 79V, 87V et 22L. De ce pool de cerveau (SSBP/1) plusieurs souches ont aussi été isolées et entretenues chez le hamster : 263K (aussi nommée Sc237), 431K, 302K et 139H (voir bilan sur les souches en annexe). A partir de cas de tremblante naturelle, trois souches sont cependant plus fréquemment isolées : ME7 et 87A sur souris de génotype s7s7, et 87V sur souris p7p7 [Bruce *et al.* 2002]. Récemment, une nouvelle souche, 221C, a été isolée à partir de 4 isolats, entre 1989 et 1994, sur des moutons de races différentes atteints de tremblante [Bruce *et al.* 2002].

Ces résultats révèlent l'existence possible d'un grand nombre de souches isolées à partir d'un pool de trois cerveaux de moutons atteints de tremblante. Cependant de nombreux passages sur moutons, chèvres, rats et hamsters ont été réalisés lors de ces expérimentations ; on peut ainsi considérer que l'obtention de toutes ces souches est un résultat artéfactuel de laboratoire. En effet, les résultats obtenus sur l'analyse de la stabilité des souches suite à une transmission de la souris à une autre espèce comme le rat ou le hamster montrent que de nouvelles souches peuvent être obtenues (cf. paragraphe stabilité des souches). De plus, cette hypothèse est étayée par l'obtention de résultats similaires sur un modèle murin transgénique exprimant une protéine prion chimère souris/hamster. Dans ce modèle, l'inoculation de la souche Sc237 (entretenu sur hamster) conduit à l'obtention d'une

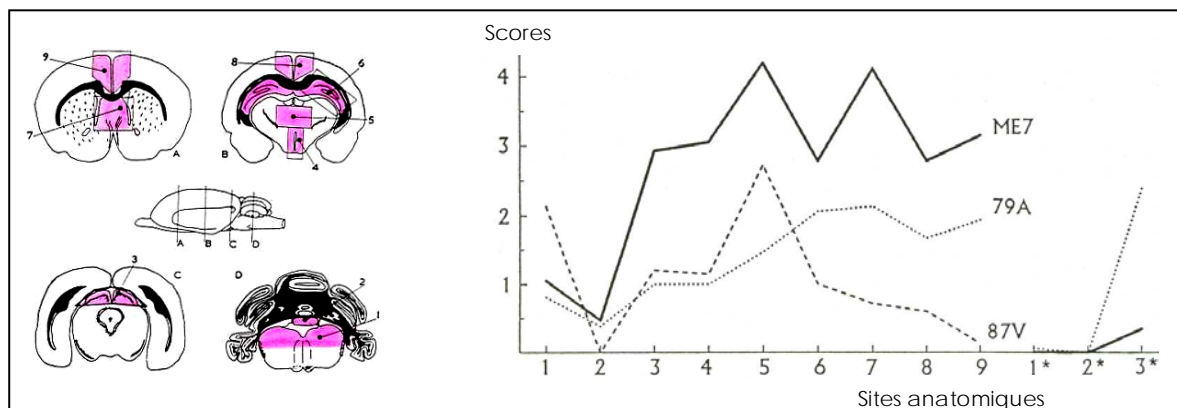
nouvelle souche différente [Peretz *et al.* 2002]. Toutefois, une coexistence d'au moins deux souches dans un même isolat de tremblante naturelle a été suggérée [Bruce *et al.* 2002].

### 3 - Lésions neuropathologiques – définition du profil lésionnel

Les premières études concernant la neuropathologie des infections à prion incluent, entre autre, l'analyse comparée de l'intensité des lésions médullaires dans des cas de tremblante naturelle [Zlotnik 1958]. Ces données ont permis de mettre en place un système d'analyse similaire dans des modèles expérimentaux murins [Fraser *et al.* 1968].

L'analyse des lésions de vacuolisation dans le SNC de souris infectées par différentes souches a permis d'identifier différents sites anatomiques variablement atteints. Sur des coupes frontales du SNC de 7  $\mu\text{m}$  colorées à l'hématoxyline/éosine, la spongiose est recherchée : (1) partie dorsale de la moëlle allongée, (2) le cortex au niveau du quatrième ventricule, (3) la partie corticale des collicules supérieurs, (4) l'hypothalamus, (5) le thalamus, (6) l'hippocampe, (7) le septum, (8) le cortex frontal en regard du corps calleux au niveau de l'hippocampe, (9) le cortex frontal en regard du noyau septal [Fraser *et al.* 1968]. Dans la substance blanche, trois sites sont aussi analysés : (1\*) dans le cervelet, (2\*) dans les collicules et (3\*) dans le thalamus (figure 23).

Pour chacune de ces aires anatomiques, un score compris entre 0 et 5 est attribué en fonction du degré d'atteinte spongiforme. Le score 0 correspond à l'absence de vacuoles, 1 à quelques vacuoles, 2 à quelques vacuoles uniformément dispersées, 3 à un nombre modéré de vacuoles uniformément dispersées, 4 à de nombreuses vacuoles avec quelques confluences et 5 à une dense vacuolisation avec beaucoup de confluence [Fraser *et al.* 1968]. Les scores ainsi déterminés sont reportés sur un graphique : cette représentation constitue le « profil lésionnel ». La constitution finale du profil lésionnel résulte d'une moyenne pour chaque site anatomique des scores obtenus dans le SNC d'un lot de souris sacrifiées au stade final de la maladie.



**Figure 23 : Profil lésionnel et typage de souche :** les sites anatomiques de référence (violet) sont numérotés puis associés à un score de 0 à 5 proportionnel au degré de vacuolisation dans la substance grise ; les sites 1\*- 3\* correspondent à des aires vacuolisées de la substance blanche. La représentation graphique constitue le profil lésionnel typique d'une souche donnée ; les profils de trois souches de tremblante (ME7, 87V, 79A) transmises à des souris VM sont illustrés ci dessus. D'après [Bruce 1996a] et [Dickinson *et al.* 1968a].

La vacuolisation peut toucher la substance grise, mais aussi la substance blanche. Cette atteinte est à la fois dépendante de l'agent infectieux et du fond génétique de l'hôte ; ainsi, la souche 22L induit une très forte vacuolisation de la substance grise chez des souris RIII et une forte vacuolisation de la substance blanche chez des souris VM [Fraser 1979a]. Avec la souche ME7, la vacuolisation de la substance blanche est le plus souvent non existante ou rare ; parfois, elle peut être au contraire très importante, ce qui semble dépendre du génotype du donneur (inoculum), de l'hôte, du sexe de l'hôte et de la voie d'inoculation [Fraser 1976]. D'autres souches comme 139A ou 79A produisent d'importantes lésions dans la substance blanche chez toutes les lignées de souris étudiées, contrairement à 22C qui n'en induit jamais [Fraser 1976]. Dans certains modèles expérimentaux murins de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, d'importantes lésions de la substance blanche sont observables dans le cervelet, le pont et la moelle épinière [Tateishi 1996].

Outre les lésions de vacuolisation, des dépôts de type amyloïde peuvent être mis en évidence dans le système nerveux central des souris infectées. Ces dépôts peuvent être de type variable : sous forme de plaques (indistinctes, amorphes, stellaires, géantes), sous forme diffuse ou péri-vasculaires [Bruce *et al.* 1975]. La formation de ces plaques amyloïdes dépend à la fois de la souche considérée, de la lignée murine ainsi que de son génotype (s7ou p7) [Bruce *et al.* 1976] [McBride *et al.* 1988]. Leur présence dans un site neuro-anatomique donné dépend aussi de la voie d'inoculation [Bruce 1981]. Ainsi, certaines souches comme 87A et 87V induisent la formation de nombreuses plaques amyloïdes [Bruce *et al.* 1976] [Bruce 1981]. D'autres comme 111A produisent des plaques amyloïdes entourées d'une couronne de vacuoles appelées « plaques florides » [Bruce *et al.* 1976]. D'autres souches comme 139A et 79A n'en produisent jamais [McBride *et al.* 1988].

#### **4 – Les limites de la méthode d'identification des souches par transmission à la souris**

##### ***Transmissibilité de la maladie et barrière d'espèces***

Certains isolats de tremblante ne sont pas transmissibles à la souris, tel que CH1641 qui est entretenu sur mouton [Dickinson *et al.* 1979] [Foster *et al.* 1988] ainsi que d'autres isolats de tremblante naturelle [Bruce 1996b] [Bruce *et al.* 2002]. Cette particularité montre qu'il existe probablement d'autres souches inconnues, 'non caractérisables' sur modèles murins car non transmissibles. De la même façon, plusieurs expérimentations ont révélé l'absence de lésions caractéristiques chez certaines souris inoculées avec l'agent de l'ESB lors d'un premier et deuxième passage en dépit de la mise en évidence de l'agent infectieux chez ces mêmes souris (C57BL/6) [Lasmézas *et al.* 1997]. Néanmoins, d'autres travaux montrent une transmission de 100% lors d'un premier passage sur la souris (C57BL) [Fraser *et al.* 1992]. L'absence de lésions caractéristiques a aussi été rapportée chez des souris et chez des



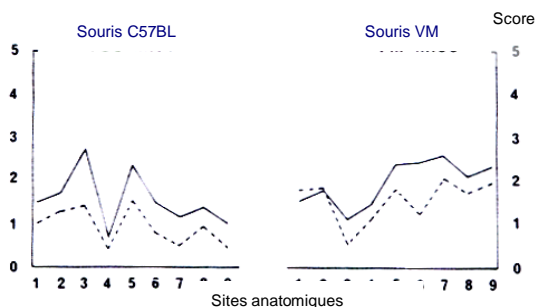
visons, malgré la présence de signes cliniques caractéristiques [Fraser 1979a] [Marsh *et al.* 1976].

### **Variabilité individuelle des lésions de vacuolisation**

Certains auteurs rapportent qu'en ce qui concerne la tremblante, la transmission à la souris (premier passage) conduit à l'obtention de profils lésionnels qui peuvent être très différents dans un même lot de souris (grande variabilité individuelle). Lors du deuxième passage, ces variations individuelles semblent disparaître et les profils obtenus sont beaucoup plus homogènes même si les inocula du deuxième passage sont issus de souris ayant présenté des profils différents en premier passage [Ryder, communication personnelle]. Ce résultat peut correspondre à l'isolement de souches différentes et à la sélection lors du deuxième passage de la souche la plus adaptée ou à une variabilité individuelle d'expression de la maladie qui n'est pas reliée à l'existence de plusieurs souches. Seule la transmission d'inocula à des dilutions limites (clonage) peut apporter des éléments de réponses.

### **Importance de la voie d'inoculation**

La voie d'inoculation joue un rôle important pour le typage de souche. Une étude comparative d'infections avec la souche 139A inoculée par voie IC ou IP montre des profils lésionnels similaires ; cependant l'intensité des lésions de vacuolisation est plus faible lors d'une infection par voie périphérique pour ce modèle de tremblante [Cole *et al.* 1985]. Ce phénomène a aussi été observé avec d'autres souches [Fraser 1976] [Outram 1976]. Cependant, certaines souches comme 22A peuvent induire des profils lésionnels très similaires suite à des inoculations IP ou IC sur des souris C57BL alors qu'ils sont relativement différents chez des souris VM comme l'illustre la figure 24 [Fraser 1976].



**Figure 24 : Profils lésionnels et voie d'inoculation**  
Profils lésionnels obtenus chez des souris C57BL et VM inoculées avec la souche 22A suite à des inoculations intracérébrales (traits pleins) ou intrapéritonéales (pointillés). D'après [Fraser *et al.* 1976].

Dans d'autres modèles expérimentaux qui utilisent les souches Chandler et 302K, des différences similaires ont aussi été observées suite à des inoculations IP ou IC [Kimberlin *et al.* 1978].

De la même façon, le site d'inoculation intracérébrale peut modifier les propriétés d'une souche donnée comme l'ont montré Kim et ses collaborateurs [Kim *et al.* 1987]. Des souris

C57BL ont été inoculées de façon stéréotaxique avec les souches de tremblante 139A, ME7 et 22L. Pour toutes ces souches, des différences significatives ont été observées dans les durées d'incubation et les temps de survie : par exemple, pour ME7, une différence de 36 jours dans le temps de survie a été mise en évidence en fonction du site d'inoculation (cortex cérébral ou cervelet). De même des différences majeures dans les sites de vacuolisation ont été observées avec la souche 22L : si l'inoculation a lieu dans le cervelet, les lésions de vacuolisation sont limitées à cette structure alors qu'elle produit une vacuolisation plus généralisée dans le reste du SNC si elle est inoculée dans le cortex cérébral. Malgré ces différences, les titres infectieux sont les mêmes dans le cortex, le cervelet et la moelle, indépendamment du lieu d'injection (cervelet ou cortex cérébral) [Kim *et al.* 1987].

### **Stabilité relative des souches**

La plupart des souches sont généralement stables après plusieurs passages chez la souris. Sept souches (ME7, 22A, 22C, 22L, 79A, 87V et 139A) ont clairement présenté des caractéristiques stables après plus de 10 passages chez les souris de génotype approprié [Cf. bilan sur les souches en annexe]. Cependant plusieurs exemples montrent que les souches peuvent avoir une stabilité très relative. Certaines souches comme 87A présentent une certaine stabilité si elles sont inoculées à faible dose sur des souris *s7s7* mais elles peuvent changer subitement au cours des passages successifs (cf. paragraphe Classification des souches, classe III). Cette souche 87A a été isolée à différentes reprises à partir de plusieurs cas de tremblante naturelle et ce phénomène a toujours eu lieu [Bruce 1996b]. Différemment, une autre souche, 111A, isolée d'un cas de tremblante naturelle n'a étrangement pas induit de réduction du temps d'incubation après plus de 4 passages chez la souris qui ne développe pas de signes cliniques après plus de 700 jours d'incubation [Bruce *et al.* 1976].

La relative stabilité des souches peut aussi être approchée par transmissions croisées entre différents types de souris ou par transmission à d'autres espèces. Certaines souches, comme ME7 et 22C, stabilisées après plusieurs passages sur des souris *s7s7* (clonées), et 139A, non stabilisée (non clonée) sur des souris *s7s7*, n'ont jamais changé après passage sur des souris de génotype *p7p7*. Différemment, d'autres souches comme 22C, non stabilisée sur souris *s7s7*, ou 22A stabilisée ou non sur souris *p7p7*, ont changé après passage sur souris de génotype différent. Ces changements semblent dus soit à la coexistence de souches soit à un effet 'modification - mutation' induit par l'hôte.

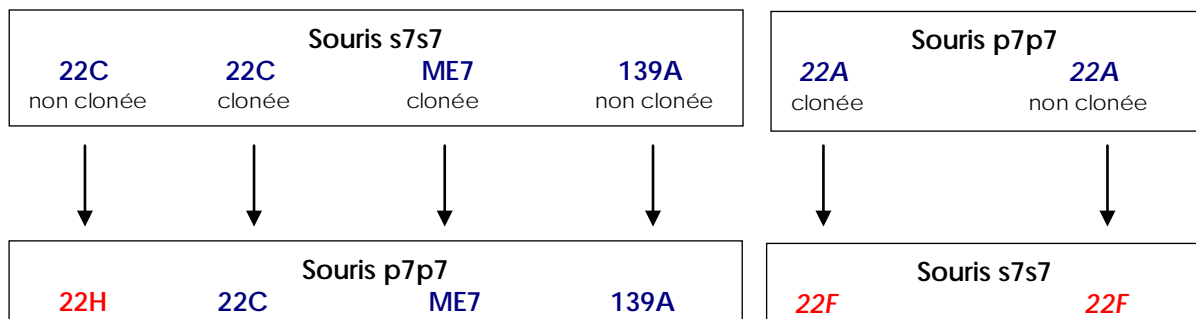
### **Coexistence de souches dans un même isolat**

Quand la souche 22C non clonée sur souris *s7s7* (premier passage) est transmise à des souris *p7p7*, un changement graduel apparaît après plusieurs passages et donne une nouvelle

souche, 22H. Ce changement de propriété n'apparaît pas si la souche 22C est clonée sur souris s7s7 avant d'être transmise aux souris p7p7, ce qui semble indiquer que le changement observé n'est pas dû au nouvel hôte mais plutôt à la coexistence des deux souches dans l'isolat de départ (cf. figure 25) [Bruce 1993]. Cette coexistence de souches dans un même isolat de tremblante a récemment été observée. En effet, chez des souris inoculées avec un isolat de tremblante, deux types de profil lésionnels ont été obtenus [Bruce et al. 2002].

### Effet 'modification – mutation' induit par l'hôte

Cette constatation a été faite après étude de la transmission de 22A stabilisée (clonée sur souris p7p7) à des souris de génotype s7s7. Contrairement à ce qui a été observé avec la souche 22C clonée, la souche 22A clonée n'est pas stable et change graduellement après plusieurs passages produisant une nouvelle souche, 22F. Cette nouvelle souche 22F semble donc être générée depuis 22A sur un nouveau type de souris présentant un génotype différent (figure 25). Le même changement a été observé avec 16 lignées murines différentes présentant un génotype s7s7 ; cependant le nombre de passages nécessaire pour obtenir une stabilisation de la nouvelle souche 22F varie considérablement d'une lignée à l'autre. Ces observations laissent penser que ces changements sont dus à une sélection graduelle d'une souche mutante, 22F, qui induit d'ailleurs une période d'incubation plus courte que la souche parentale 22A chez les souris du nouveau génotype [Bruce 1993] [Bruce 1996a].

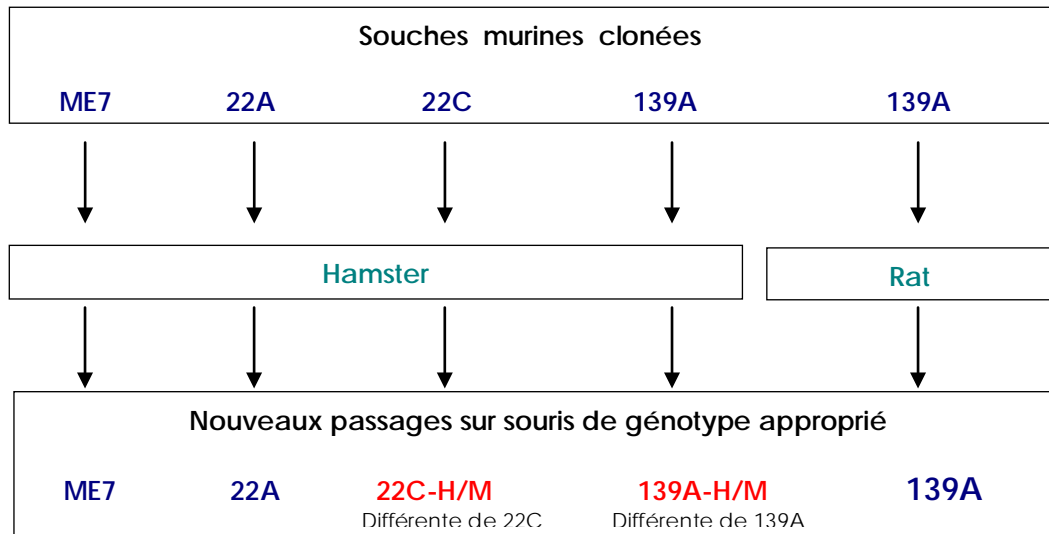


**Figure 25 : Relative stabilité des souches en fonction des lignées murines utilisées**

La transmission de souches de tremblante entretenues sur souris s7s7 ou p7p7 peut conduire ou non à la mise en évidence de nouvelles souches après transmission à des souris de génotypes différents. D'après [Bruce 1993].

Cet effet 'modification – mutation' peut être aussi observé par l'étude de la transmission des souches chez d'autres espèces animales [Pattison et al. 1968]. Kimberlin et collaborateurs ont passé une série de souches murines sur le rat et le hamster et avant de les transmettre de nouveau à la souris pour les caractériser permettant de mettre en évidence d'éventuelles modifications des souches [Kimberlin et al. 1987] [Kimberlin et al. 1989]. Les souches ME7 et 22A clonées n'ont pas été modifiées après plusieurs passages chez le rat et le hamster. De la même façon, la souche 139A clonée n'a pas subi de modifications suite à son passage sur le rat. Par contre, les propriétés des souches 139A clonée et 22C clonée sont systématiquement

changées lors de passages sur le hamster et donnent de nouvelles souches stables chez la souris (figure 26).

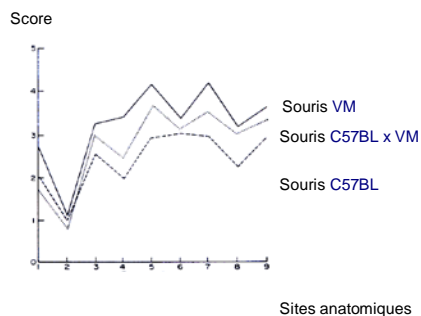


**Figure 26 : Transmission de souches de tremblante clonées au rat ou au hamster.** Cette transmission peut conduire ou non à l'isolement de nouvelles souches. D'après [Bruce 1993].

## 5 - Proposition d'une classification des souches

Les souches de tremblante peuvent être classées en trois groupes sur des bases de transmissibilité à différents types de souris et de stabilité après transmissions croisées entre différentes lignées murines [Bruce *et al.* 1987].

Les souches de **classe I** sont des souches du type ME7, 22C et 139A qui présentent des caractéristiques biologiques stables indépendamment des génotypes des souris inoculées (type s7 ou p7) sur lesquelles sont entretenues ces souches [Dickinson *et al.* 1979].

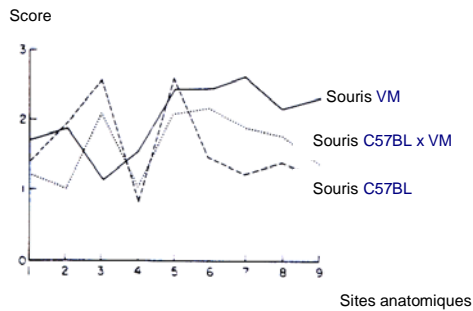


**Figure 27 :** Profils lésionnels obtenus sur différentes lignées murines inoculées (IC) avec la souche ME7. D'après [Fraser *et al.* 1973].

Cependant cette « grande stabilité » n'est pas toujours observée. Ainsi, la vacuolisation de la substance blanche est généralement absente avec ce type d'agent mais elle peut parfois être sévère et semble dépendre du génotype du donneur, du receveur et du sexe du

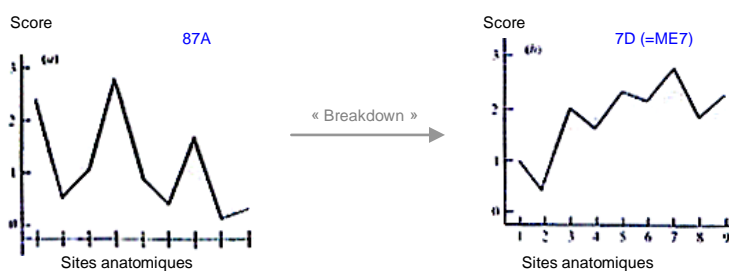
receveur. Chez les souris BALB/c les mêmes observations ont été faites et l'importance de la voie d'inoculation (IP ou IC) a de plus été mise en évidence [Fraser 1976].

Les souches de **classe II** comme 22A ou 22F possèdent des caractéristiques biologiques stables si elles sont entretenues sur des souris de génotype (s7 ou p7) identique à celui des souris sur lesquelles elles ont été isolées. Cependant, elles changent graduellement de caractéristiques si elles sont entretenues sur des souris de génotypes différents.



**Figure 28 :**  
Profils lésionnels obtenus sur différentes lignées murines inoculées (IC) avec la souche 22A. D'après [Fraser et Dickinson 1973].

Les souches de **classe III** (31a, 51C, 87A, 125A, 138A, 153A) peuvent, après plusieurs passages sur la souris, présenter des caractéristiques biologiques soudainement changées indépendamment du génotype des souris sur lesquelles elles sont entretenues. Les souches de classe III induisent des périodes d'incubation similaires, induisent la production de nombreuses plaques amyloïdes et une fréquence importante de vacuolisation asymétrique dans le système nerveux central. Le phénomène de « rupture (breakdown) » qui caractérise ces souches est défini par une soudaine diminution de la période d'incubation au cours d'un passage à un autre, accompagnée par un changement très marqué de la neuropathologie (cf. figure 29) [Bruce *et al.* 1987]. Ce changement soudain apparaît généralement entre le deuxième et le septième passage et concerne de 40% à la totalité du lot des souris d'une expérimentation. La nouvelle souche, désignée sous le terme 7D, est caractérisée par une période d'incubation plus courte, une plus faible production de plaques amyloïdes et un profil lésionnel plus étendu. Toutes ces données rapprochent la souche 7D de ME7 qui sont parfois considérées comme identiques. Aussi, il est probable que toutes ces souches de classe III représentent une seule et même souche [Bruce *et al.* 1987].

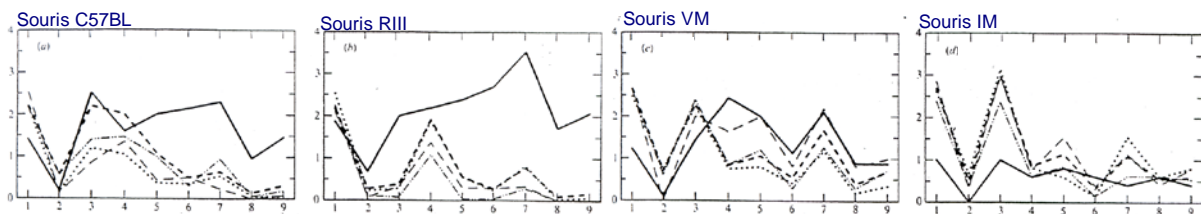


**Figure 29 :**  
**Illustration du phénomène de « rupture » :**  
Profils lésionnels obtenus sur souris C57BL inoculées avec la souche 87A. Dans le lot, chez certaines souris, une autre souche, 7D identique à ME7 est parfois isolée. D'après [Bruce *et al.* 1987].

Ce phénomène de « rupture » est dose dépendant, comme cela a été montré avec la souche 87A. En effet, l'apparition de cette rupture est d'autant plus fréquente que les doses d'inoculum sont importantes : il apparaît chez toutes les souris avec un inoculum dosé à  $10^{-1}$  par voie IC, chez 40% à  $10^{-2}$  et chez 15% des animaux à  $10^{-3}$  [Bruce *et al.* 1987].

## 6 - Souche(s) d'encéphalopathie spongiforme bovine

Parmi toutes les souches connues et caractérisées sur modèles murins, celle de l'ESB, montre une très forte stabilité. En effet, les profils lésionnels obtenus à partir d'espèces expérimentalement infectées (souris, mouton, porc, chèvre, primate non humain) ou suspectées d'être atteintes par l'agent de l'ESB (nyala, grand kudu, chat, homme), montrent une grande uniformité [Bruce *et al.* 1994a] [Bruce *et al.* 1997] [Lasmézas *et al.* 2001], et se distinguent des souches de tremblante décrites ou des cas de MCJsp [Bruce *et al.* 1997] [Lasmézas *et al.* 2001] [Bruce *et al.* 2002].



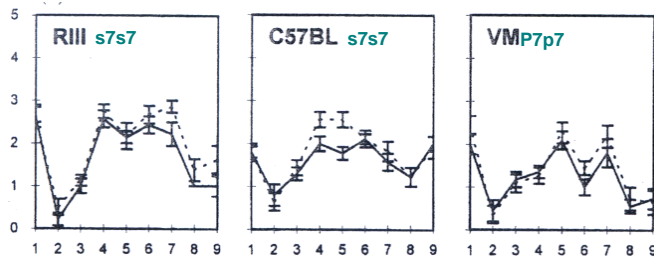
**Figure 30 : Profils lésionnels obtenus sur différentes lignées murines inoculées avec un cas de tremblante naturelle (trait plein) ou avec quatre cas d'ESB (pointillés) (passage primaire). D'après Fraser 1992.**

Entre 1963 et 1994, 35 moutons et 2 chèvres atteints de tremblante, 2 visons atteints d'EST et un cervidé atteint de CWD ont fait l'objet de transmissions à la souris ; les profils lésionnels obtenus ont toujours été différents de ceux observés dans le cas de l'ESB [Bruce *et al.* 1997].

La stabilité de l'ESB, lors de transmission expérimentale au macaque (premier passage) ou lors de transmission naturelle à l'homme, ne semble cependant pas absolue. En effet, la transmission à la souris (C57BL/6) de ces deux maladies induit un polymorphisme lésionnel dans l'hippocampe accompagné d'une plus sévère vacuolisation comparativement à des souris inoculées avec de l'ESB bovine. Suite à un deuxième passage chez le macaque, la transmission à la souris induit une plus grande homogénéité des profils lésionnels, les souris présentant des lésions importantes de l'hippocampe (signature hippocampique). Ceci semble signer l'évolution ou l'adaptation de l'agent de l'ESB chez les primates [Lasmézas *et al.* 2001].

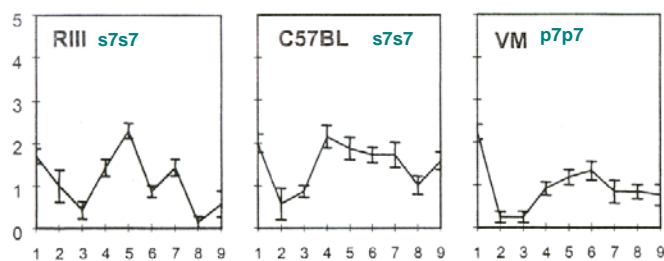
Etrangement, les profils lésionnels obtenus par Bruce et collaborateurs sur différents types de souris après transmissions de l'ESB divergent de ceux obtenus par Fraser en 1992 (figures 30, 31

et 32). Ces différences illustrent peut être une évolution des lignées murines utilisées qui ne développent pas la pathologie de la même manière que les souris employées en 1992 par Fraser. Par ailleurs, l'hypothèse de l'existence de plusieurs souches d'ESB peut être aussi envisagée.



**Figure 31 :**  
Profils lésionnels obtenus sur souris RIII, C57BL et VM après transmission de la souche 301C (ESB adaptée à la souris Sinc s7s7).

Pointillés : 301C adaptée à la C57BL  
Traits pleins : 301C adaptée à la RIII.  
D'après [Bruce *et al.* 2002]



**Figure 32 :**  
Profils lésionnels obtenus sur souris RIII, C57BL et VM après transmission de la souche 301V (ESB adaptée à la souris Sinc p7p7).  
D'après [Bruce *et al.* 2002]

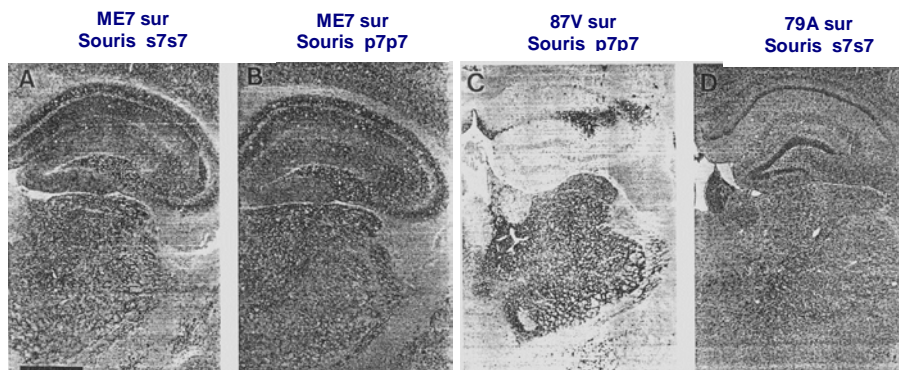
Cette existence de souches différentes d'ESB est en partie suggérée par l'équipe écossaise qui décrit la mise en évidence de deux souches, 301C (sur souris Sinc s7s7) et 301V (sur souris Sinc p7p7) isolées systématiquement des cas d'ESB testés [Bruce *et al.* 2002]. Il est généralement admis qu'il n'existe une souche majoritaire stable d'ESB comme le montre les résultats précédemment décrits. Cependant la transmission de 301V sur RIII ou 301C sur VM ne conduit pas à des profils similaires dans chaque lignée murine comme l'illustrent les profils des figures 31 et 32. Il est donc possible que l'ESB transmise à une espèce X n'induisse pas un profil lésionnel similaire à 301C sur souris s7s7 ou à 301V sur souris p7p7 et qu'elle soit de ce fait non reconnue par cette méthode de typage des souches. De même, d'autres travaux indiquent que la transmission de l'ESB à des modèles murins transgéniques exprimant la PrP<sup>c</sup> humaine, peut conduire à l'obtention de deux signatures pathologiques différentes suggérant l'existence d'au moins deux souches [Asante *et al.* 2002].

Cependant, il est aussi probable que les souris p7p7 exercent une influence majeure sur la souche inoculée ; il n'existerait donc qu'une seule souche d'ESB qui serait modifiée après passage sur souris p7p7 comme c'est le cas avec la souche 22A qui donne 22F sur souris s7s7 [Bruce 1993]. L'ESB pourrait de ce fait être classée parmi les souches de classe II.

## C - Identification des souches par analyse du seul marqueur spécifique de la maladie : la protéine prion anormale

### 1 - Analyse neuro-anatomique des sites d'accumulation de la PrP anormale

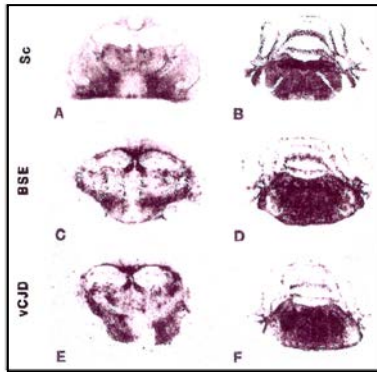
La transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> joue un rôle fondamental dans la pathogénie des infections à prion. Cette transconformation aboutit à l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> notamment dans le SNC [McKinley *et al.* 1983]. Cette accumulation de PrP<sup>sc</sup> peut être visualisée *in situ* par immunohistochimie (IHC), histoblot et PET-blot (Paraffine Embedded Tissue - blot). Cette analyse des dépôts de PrP anormale a été partiellement réalisée sur des souches isolées sur modèles murins par les équipes du Royaume Uni. Ainsi, les souches 87V, ME7, 22A et 79A ont présenté des profils d'accumulation de PrP anormale différents les uns par rapport aux autres (observation des profils dans l'hippocampe) [Bruce *et al.* 1989] [Bruce *et al.* 1994b] [Manson *et al.* 1992]. La souche ME7 (souche de classe I), qui induit des profils lésionnels similaires sur des souris de génotype s7s7 ou p7p7, induit de la même façon une accumulation de PrP anormale identique chez les deux types de souris [Bruce *et al.* 1994b]. Aussi des profils différents ont été obtenus avec les souches 87V et 79A chez les souris p7p7 ou s7s7 [Bruce 1993]. Dans ces modèles, l'accumulation de PrP anormale est corrélée à la vacuolisation [Bruce *et al.* 1989] [Bruce *et al.* 1994b].



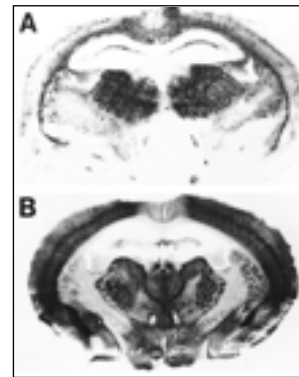
**Figure 33 : Distribution neuro-anatomique de la PrP<sup>sc</sup> au niveau de l'hippocampe de souris infectées par des souches de tremblante (immunohistochimie). (ME7, 87V, 79A). [Bruce *et al.* 1994b]**

Ces variabilités d'accumulation de PrP anormale sont retrouvées chez différents modèles murins transgéniques infectés permettant de différencier des souches chez le hamster [DeArmond *et al.* 1987] [DeArmond *et al.* 1993], d'identifier l'agent de l'ESB chez les patients atteints du vMCJ (figure 34) [Scott *et al.* 1999], ainsi que différentes formes d'ESST chez l'homme (MCJsp, insomnie fatale familiale...) (figure 35) [Mastrianni *et al.* 2001] [Prusiner 1998].



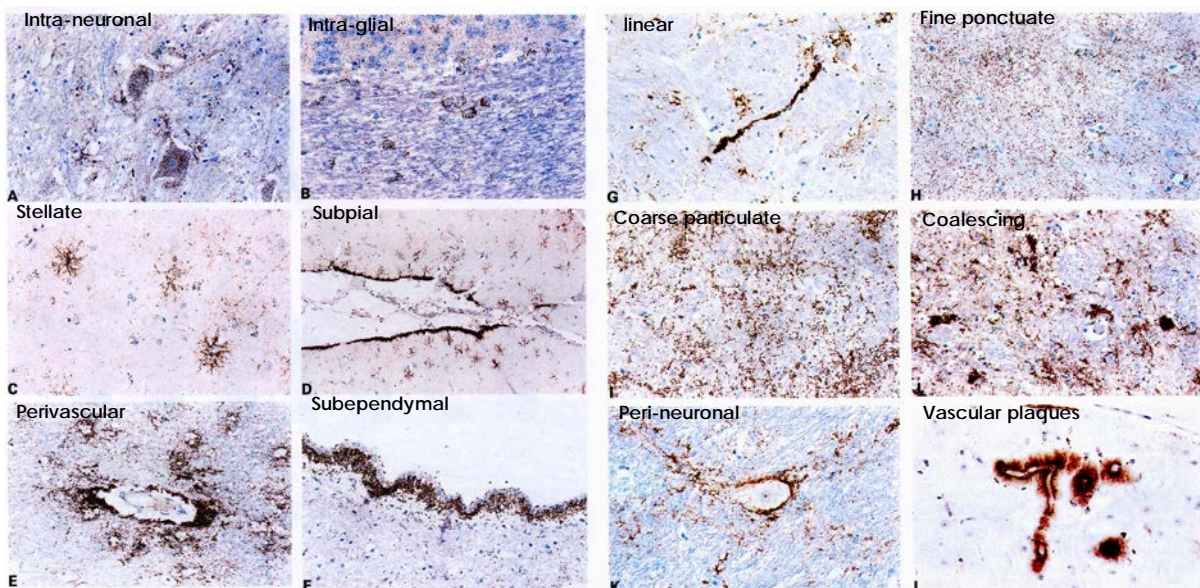


**Figure 34** : Distribution neuro-anatomique de la PrP<sup>res</sup> (histoblot) sur deux sections transversales de cerveaux de souris Tg(bovPrP) révélant une grande similitude entre les animaux inoculés avec l'agent de l'ESB et celui du vMCJ comparativement à un cas de tremblante (sc). D'après [Scott *et al.* 1999].



**Figure 35** : Distribution neuro-anatomique de la PrP<sup>res</sup> (histoblot) sur une section transversale de cerveaux de souris Tg(Mhu2M) infectées avec l'agent d'un cas d'IFF (A) et un cas de familial de MCJ (E200K) (B). D'après [Prusiner 1998]

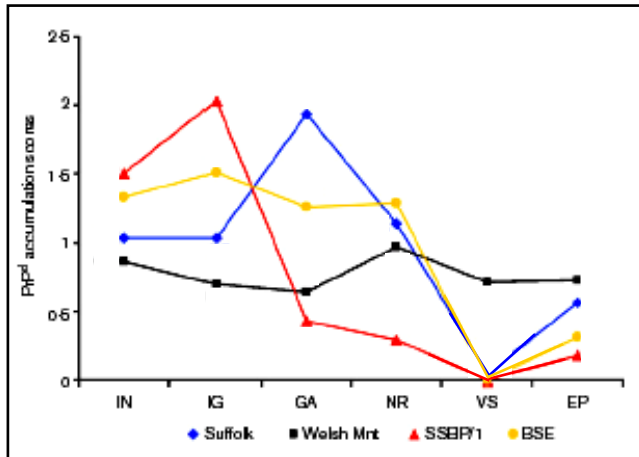
Chez le mouton atteint de tremblante, une analyse neuro-anatomique et cellulaire des dépôts de PrP anormale (figure 36) permet de distinguer différents isolats de tremblante [Gonzalez *et al.* 2002].



**Figure 36** : Identification des types d'accumulation de PrP anormale chez le mouton atteint de tremblante ou expérimentalement infecté par l'ESB. D'après [Gonzalez *et al.* 2002]

Pour cela, chez des moutons cliniquement atteints, des immunomarquages de la PrP anormale sont réalisés sur 7 sites anatomiques du SNC avec différents anticorps anti-prion (P4, 505, 521 et R486). Pour chaque anticorps utilisé, les différents types de marquage obtenus sont quantifiés (à l'œil) en fonction de leur localisation cellulaire et tissulaire : intra-neuronal (IN), intra-glial (IG), associé aux astrocytes (AA) (stellaire, subpial, perivascular), dans le neuropile (NR) (lineaire, périneuronal, ponctué fin, grossier particulaire et coalescent), en plaque vasculaire (VS) et épendymaire (EP). Sur l'ensemble des sites étudiés, la moyenne des

scores obtenus en fonction des types de marquages est comparée entre tous les anticorps utilisés. Les scores les plus importants – détection de la plus grande quantité de PrP de chaque type – sont représentés sur un graphique qui permet de différencier différents isolats de tremblante de l'ESB chez les ovins comme illustré sur la figure 37 [Gonzalez *et al.* 2003].



**Figure 37 : Identification de l'ESB ovine par analyse des types cellulaires accumulant la PrP<sup>Sc</sup>**

Représentation graphique de la détection optimale de la PrP anormale en fonction des différents types tissulaires et cellulaires permettant de distinguer l'ESB, de l'isolat expérimental SSBP/1 et de différents cas de tremblante chez le mouton.

IN : intraneuronal ; IG : intragial ; NR : neuropile ; VS : vasculaire ; EP : épendymaire  
D'après [Gonzalez *et al.* 2003]

### Limites de la méthode

La principale limite de la méthode repose sur la lourdeur méthodologique qui nécessite de la réalisation des immunomarquages de la PrP anormale. De plus, l'analyse des données peut être parfois très lourde surtout en ce qui concerne la méthodologie employée par Gonzalez pour le typage des isolats chez le mouton.

En outre, plusieurs cas de transmission d'ESST sans qu'aucune accumulation de PrP anormale ne soit détectée ont été rapportés [Lasmézas *et al.* 1997] [Hill *et al.* 2000], ou avec des taux très faibles de PrP [Hsiao *et al.* 1994] [Manson *et al.* 2000].

## 2 - Résistance aux protéases

La détection de la PrP anormale peut être réalisée par Western blot. Les différentes masses moléculaires observées après électrophorèse sont en partie dues au nombre de glycosylation sur la PrP<sup>c</sup>. Ces glycosylations sur des résidus asparagine sont aux positions 180 et 196 de la protéine [Endo *et al.* 1989]. Trois formes sont donc observées : bi-glycosylée, mono-glycosylée et non-glycosylée [Bolton *et al.* 1982] [Oesch *et al.* 1985].

La résistance aux protéases de la PrP anormale est mesurée par la détectabilité de la PrP<sup>Sc</sup> en WB après traitement plus ou moins long à la protéinase K (PK). Cette résistance est variable en fonction des souches : ME7 et 87V sont plus résistantes que la souche 139A dont la détectabilité diminue plus rapidement après un traitement à la PK [Kuczius *et al.* 1999]. L'effet du génotype de l'hôte sur lequel sont entretenues ces souches est peu marqué si ce n'est pour une seule souche étudiée, 22A [Kuczius *et al.* 1999]. Les souches 87V et l'ESB (301C

et 301C passée sur souris VM) présentent des profils électrophorétiques très similaires mais ne montrent pas la même résistance à la protéinase K, la PrP<sup>ESB</sup> étant remarquablement moins résistante [Kuczius *et al.* 1999].

Les variations de résistance à la protéinase K observées avec les différentes souches de prion se retrouvent sur des isolats de tremblante naturelle de différentes origines [Kuczius *et al.* 1999] [Horiuchi *et al.* 2002]. Certains rapportent que des isolats présentant une grande résistance à la PK ne se transmettent pas ou peu à la souris, et les isolats présentant une faible résistance à la PK se transmettent relativement bien à la souris [Horiuchi *et al.* 2002].

Chez le hamster infecté soit avec la forme DY (drowsy) soit avec la forme HY (hyper) issues de l'encéphalopathie spongiforme du vison, des différences de résistance à la PK ont aussi été décrites : la PrP anormale de la forme DY est plus sensible à l'action de la protéase que celle de la forme HY [Bessen *et al.* 1992].

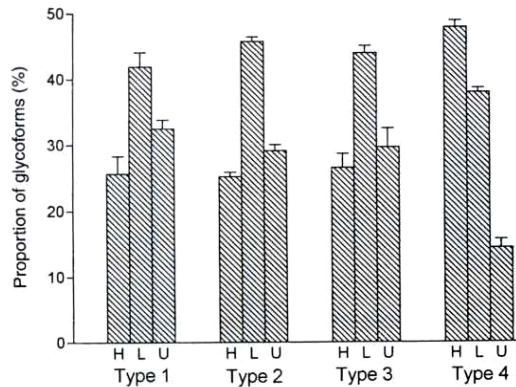
### 3 - Analyse des ratios de glycoformes

Par analyse en Western blot, trois formes de PrP sont observées : bi-glycosylée, mono-glycosylée et non-glycosylée. Les quantités relatives des formes de PrP sont mesurées par densitométrie sur des immunoblots.

L'analyse comparée des ratios de glycoformes permet de différencier diverses de souches de tremblante murine [Somerville *et al.* 1997] [Kuczius *et al.* 1998]. Quatre glycotypes différents sont rapportés : certaines souches, comme 79A et Chandler, ont un profil similaire aux cas de MCJsp chez l'homme (bande mono glycosylée égale à plus de 50% du signal). D'autres souches, comme 87V, présentent une bande bi-glycosylée de plus de 70%, différemment de la plupart des souches de tremblante qui montrent pour cette bande moins de 55% du signal. En ce qui concerne l'ESB, la forme bi-glycosylée représente 50-65% du signal ce qui la rapproche de la souche 87V dont elle est difficilement discernable du fait que ces deux souches présentent aussi une bande non-glycosylée de faible poids moléculaire (environ 19 kDa) [Groschup *et al.* 2000]. Cette particularité du profil de glycotype de la souche ESB a été retrouvée dans le vMCJ, chez le chat atteint d'ESF, et chez le macaque, la souris et le mouton expérimentalement infectés par cet agent [Collinge *et al.* 1996] [Hill *et al.* 1997a] [Hill *et al.* 1998] [Hope *et al.* 1999] [Baron *et al.* 2000] [Stack *et al.* 2002].

Chez l'homme, différents types électrophorétiques ont permis de classer les formes humaines de MCJ en 4 types principaux (description récente de nouveaux sous types [Hill *et al.* 2003]) (classification de l'équipe de Collinge) ou en trois types (classification de l'équipe de Parchi-Gambetti). Un seul type, le type 4 « de Collinge », caractéristique du variant MCJ, peut être différencié des autres par analyse des glycotypes. En effet, il montre des ratios de glycoformes similaires à ceux retrouvés dans l'ESB. Les autres types étant indiscernables par

cette méthode les uns des autres (figure 38) [Collinge *et al.* 1996] [Parchi *et al.* 1996] [Parchi *et al.* 1999].



**Figure 38 :**  
Analyse des ratios de glycoformes dans différentes formes de MCJ chez l'homme selon Collinge. Seul le type 4, caractéristique du vMCJ se différencie par cette méthode.

H (high) : bande bi-glycosylée  
L (low) : bande mono-glycosylée  
U (un-) : Bande non-glycosylée  
D'après [Collinge *et al.* 1996].

Le développement récent de l'électrophorèse bidimensionnelle dans les maladies à prion ouvre de nouvelles voies d'investigations pour la caractérisation biochimique des souches [Castagna *et al.* 2002]. Ainsi des cas de MCJsp présentant des expressions phénotypiques différentes ont pu aussi être différenciés biochimiquement par cette méthode qui permet d'identifier des sous populations de glycotype, ce qui n'est pas possible avec un Western blot classique [Zanusso *et al.* 2002].

En ce qui concerne les moutons atteints de tremblante naturelle ou expérimentalement infectés avec l'isolat CH1641, les ratios de glycoformes sont relativement homogènes, l'intensité de la bande bi-glycosylée représentant environ 55% du signal. Un isolat de tremblante expérimental, SSPB/1, se distingue cependant avec un signal pour cette bande de 45 % [Stack *et al.* 2002]. Un cas particulier de transmission iatrogénique de tremblante à des ovins et des caprins a été décrit [Caramelli *et al.* 2001]; chez certains de ces animaux infectés, la bande bi-glycosylée représente environ 80 % du signal (cas présentant une bande supplémentaire atypique de 17 kDa) [Zanusso *et al.* 2003].

Comparativement, l'ESB chez les bovins est difficilement discernable des cas de tremblante par cette méthode pour laquelle la bande bi-glycosylée représente 60 % du signal [Baron *et al.* 1999] [Stack *et al.* 2002]. L'ESB ovine induit quant à elle un signal d'environ 60 % pour la bande bi-glycosylée [Stack *et al.* 2002] [Baron *et al.* 2000]. On peut noter que les profils obtenus dans les cas d'ESB chez les bovins sont très différents de ceux obtenus chez des bovins expérimentalement infectés avec un isolat de tremblante. Chez ces derniers, la bande biglycosylée présente un pourcentage similaire à celle obtenue dans des cas de tremblante ovine [Race *et al.* 2002].

La maladie du dépérissement chronique des cervidés, ou Chronic wasting disease (CWD), affecte différents cervidés sauvages ou captifs des E.U. - *Odocoileus hemionus* (mule deer),

*O. virginianus* (white-tailed deer) et *Cervus elaphus nelsoni* (Rocky mountain elk) - [Williams et al. 2002]. L'analyse par Western blot de la PrP anormale révèle un signal plus important pour la forme bi-glycosylée. Aussi des variations individuelles ont été identifiées plus particulièrement chez *Odocoileus hemionus* suggérant l'existence possible de différentes souches [Race et al. 2002].

### **Limites de la méthode**

D'un point de vue méthodologique, le facteur limitant principal, rencontré dans cette méthode d'analyse de souches est l'absence de standardisation de la méthode. En effet, l'utilisation d'anticorps différents peut conduire à l'obtention de ratios de glycoforme variables sur un même échantillon [Betemps et al. 2001]. Ainsi chez le mouton, les ratios de glycoformes sont différents avec les anticorps 6H4 ou P4 ; l'anticorps P4 induisant un signal plus fort que 6H4 pour la bande bi-glycosylée [Stack et al. 2002].

L'analyse des souches ou des isolats par glycotypage, après passage sur souris peut être modifiée en fonction du génotype du modèle murin utilisé : la souche Chandler est relativement stable si elle est entretenue sur souris CD1 ou C57BL, mais l'ESB montre des profils plutôt non-uniformes quand elle est entretenue sur C57BL, RIII ou VM95 [Groschup et al. 2000]. Ce phénomène a été décrit dans une autre étude qui montre que des souris FVB ou C57BL inoculées avec l'agent de l'ESB montrent une accumulation de PrP anormale majoritairement bi-glycosylée caractéristique de l'ESB. Cependant des souris SJL et RIIS inoculées avec le même inoculum produisent une PrP anormale majoritairement monoglycosylée ; ce type d'accumulation de PrP étant toujours retrouvé lors de transmissions successives à ces mêmes souris [Asante et al. 2002]. Ce phénomène suggère que la transmission de l'ESB à d'autres espèces peut produire une pathologie différente de celle rencontrée habituellement.

Aussi, les profils obtenus avec la souche RML sont différents s'ils sont obtenus après infection d'une culture cellulaire ou si le mélange se fait avec un lysat cellulaire de ces mêmes cultures. Ceci démontre que la cellule peut influencer les profils de glycoformes ; cependant ces données ne sont pas retrouvées avec les souches 22L, ME7 ou 87V ce qui pourrait être expliqué par des voies de métabolisation de la PrP anormale différentes lors de l'infection par ces différentes souches [Vorberg et al. 2002].

L'analyse comparée de différents sites neuro-anatomiques (rétine/nerf optique ; substance blanche/substance grise) révèle aussi des variations dans les profils de glycotype (souche 139A et ME7) qui peuvent d'ailleurs changer au cours des différents stades de la maladie [RusselakisCarneiro et al. 2002]. Ce phénomène pourrait être expliqué par la propagation

plus rapide de l'infection dans des cellules qui expriment la forme non-glycosylée de la PrP<sup>c</sup> [Taraboulos *et al.* 1990].

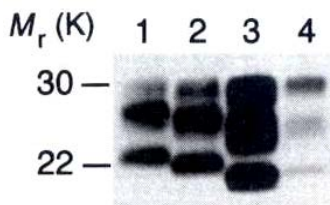
#### 4 - Analyse des sites de clivage de la PrP anormale

##### Profils électrophorétiques après digestion à la protéinase K

Dès 1985, des différences dans le poids moléculaire des fragments non glycosylés de la PrP<sup>Pres</sup> (suite à une digestion par PK) ont été identifiées. Ainsi, la souche de tremblante 87V présentait un poids moléculaire de la forme non-glycosylée d'environ 19 kDa, la plus grande partie des souches présentant un poids moléculaire de ce fragment d'environ 21 kDa [Kascsak *et al.* 1985].

Des différences similaires ont par la suite été identifiées dans les deux formes d'encéphalopathies spongiformes chez le hamster doré après transmission d'une EST du vison : dans la forme « hyper, HY », la PrP anormale présente un poids moléculaire plus élevé que la PrP anormale de la forme « drowsy, DY » [Bessen *et al.* 1992]. Un séquençage de la partie N-terminale de la protéine a été réalisé pour évaluer ces différences de 1 à 2 kDa observées après migration électrophorétique suite à un traitement à la PK entre ces deux souches : un site majeur de clivage de la PrP a été identifié en position Gly-92 (avec deux autres sites moins fréquents en Gln-98 et Lys-101) pour la forme DY alors que dans la forme HY, plusieurs sites de clivage ont été identifiés dans la région des octapeptides aux positions 55, 80, 90 et 98 [Bessen *et al.* 1994].

Chez l'homme, trois masses moléculaires sont généralement décrites pour la bande non glycosylée : 21, 20 ou 19 kDa (figure 39) [Collinge *et al.* 1996]. D'autres équipes ne décrivent que deux poids moléculaires différents pour la forme non glycosylée (21 ou 19 kDa) [Parchi *et al.* 1996] [Parchi *et al.* 1999] [Cardone *et al.* 1999]. L'analyse combinée du poids moléculaire de la bande non-glycosylée et du ratio de glycoforme permet donc de distinguer trois ou quatre types de MCJ : [type 1 et 2 de Collinge = type 1 Parchi ; type 3 de Collinge = type 2a de Parchi ; type 4 de Collinge = type 2b de Parchi].



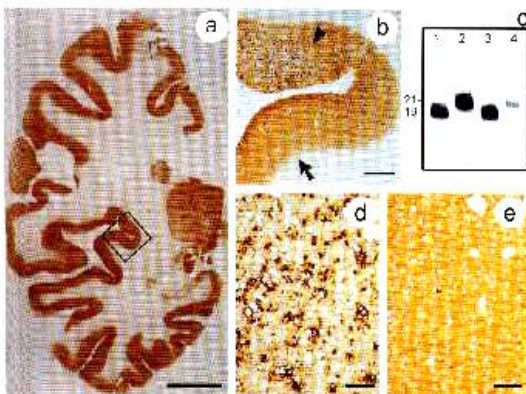
**Figure 39 : Différents profils électrophorétiques chez l'homme**

Profils électrophorétiques de la PrP<sup>Sc</sup> obtenus après digestion à la PK de cas sporadiques de MCJ (colonne 1 et 2), iatrogénique (colonne 3) et du variant MCJ (colonne 4) illustrant respectivement les différents types électrophorétiques chez l'homme : types 1, 2, 3 et 4. D'après [Collinge *et al.* 1996].

Le type 1 de Collinge est toujours associé à des cas de MCJ<sub>sp</sub> et à des cas iatrogènes présentant un génotype Méthionine/Méthionine (M/M) au codon 129 du gène de la PrP. Le type 2 est associé aux cas de MCJ présentant un génotype MM, M/Valine (V) ou V/V au

codon 129. Le type 3 est rencontré dans des cas iatrogènes, alors que le type 4 n'est décrit que dans les cas de vMCJ [Collinge *et al.* 1996]. Une récente étude confirme que ces types sont clairement associés au polymorphisme du codon 129 du gène de la PrP, à la durée de la maladie et au phénotype neuropathologique [Hill *et al.* 2003]. Aussi, un autre type a été identifié (type 6, M/M) suggérant l'existence de sous types multiples dans les cas de MCJsp [Hill *et al.* 2003]

Chez l'homme, mis à part le cas du vMCJ lié à l'ESB, l'existence réelle de souches différentes correspondant aux différents types de MCJsp n'est pas certaine. En effet, Puoti décrit plusieurs cas de MCJsp où chez un même patient, une accumulation de PrP anormale des deux types (21 ou 19 kDa) soit dans les mêmes régions cérébrales soit dans des régions différentes a été identifiée ; ces variations ne semblent pas corrélées au génotype du codon 129 [Puoti *et al.* 1999]. Ces deux formes électrophorétiques de PrP sont associées à différents types d'accumulation de la PrP visualisée en IHC ; le type 1 (21 kDa) est associé à une accumulation diffuse de la PrP (de type synaptique) et le type 2 (19 kDa) est strictement associé à des dépôts péri-vasculaires et sous forme de plaques correspondant aux zones cérébrales les plus vacuolisées (figure 40) [Puoti *et al.* 1999].



**Figure 40 : Corrélation entre les formes d'accumulation de la PrP<sup>Sc</sup> et les types électrophorétiques.**

Immunohistochimie de la PrP anormale chez un patient atteint de spMCJ présentant deux formes d'accumulation de la PrP anormale (a, b), soit sous forme de plaque (d) soit sous forme diffuse (e). L'analyse en Western-blot (c) de deux régions différentes du cerveau de ce patient révèle l'existence de deux formes non glycosylées de 21 ou 19 kDa (colonnes 1 et 2) ; comparativement deux autres patients accumulant soit une forme de 21 soit une forme de 19 kDa (colonnes 3 et 4). D'après [Puoti *et al.* 1999].

Dans les souches de tremblante caractérisées sur modèles murins, seules les souches 87V et l'ESB (301C – 301V) montrent une forme non-glycosylée de plus faible poids moléculaire (environ 19 kDa) [Kascsak *et al.* 1985] [Collinge *et al.* 1996]. La plus grande partie des souches présente un poids moléculaire de ce fragment d'environ 21 kDa. Ces souches sont donc caractérisées par des sites distincts de clivage à la PK. L'approche de la localisation des sites de clivage peut-être réalisée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre différentes régions de la protéine prion. Ainsi, l'anticorps 3B5 dirigé contre la région des octapeptides de la PrP (aa 79-92 de la PrP humaine) permet de différencier l'ESB des autres souches de tremblante chez des souris C57BL, RIII ou tg20 infectées expérimentalement. L'anticorps ne réagit pas avec la PrP<sup>ESB</sup> mais réagit très bien avec la PrP anormale d'autres souches de tremblante comme 22A ME7, Chandler et étrangement avec 87V qui montre comme l'ESB un plus faible poids

moléculaire de la bande non-glycosylée [Groschup *et al.* 2000]. Cette particularité de 87V pourrait être due à un site de clivage de la PrP légèrement différent de celui de la PrP<sup>ESB</sup>, permettant une réactivité avec l'anticorps. Certains résultats montrent aussi que la séquence de la PrP de l'hôte peut avoir un impact sur le site de clivage par la PK : quand l'ESB et les autres souches de tremblante sont entretenues sur souris VM (génotype différent des autres lignées murines précédentes : p7p7), l'anticorps 3B5 réagit alors contre la PrP<sup>res</sup> de toutes les souches de tremblante y compris celle de l'ESB [Groschup *et al.* 2000].

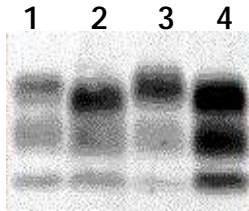
Chez le mouton atteint de tremblante naturelle, des études ont montré que le traitement à la PK conduit à l'obtention d'un fragment non-glycosylé de « haut poids moléculaire » comparativement à des cas d'ESB ovine expérimentaux qui présentent un fragment de plus faible poids moléculaire [Hill *et al.* 1998] [Hope *et al.* 1999] [Baron *et al.* 2000] [Stack *et al.* 2002]. Cependant, l'obtention d'un plus faible poids moléculaire de la bande non glycosylée a été décrite dans d'autres études dans des cas de tremblante expérimentaux chez le mouton [Hill *et al.* 1998] [Hope *et al.* 1999]. Une souche particulière, CH1641, isolée d'un cas de tremblante naturelle chez un mouton Cheviot en 1971 en GB [Foster *et al.* 1988], montre un poids moléculaire de la bande non glycosylée similaire à celui trouvé dans l'ESB ovine [Hope *et al.* 1999] [Baron *et al.* 2000]. L'analyse fine du poids moléculaire de ce fragment révèle tout de même une faible différence [Stack *et al.* 2002]. De plus, l'analyse des ratios de glycoformes est différente entre CH1641 et l'ESB ovine [Stack *et al.* 2002]. Dans le cas particulier de transmissions iatrogènes de tremblante à des ovins et des caprins [Caramelli *et al.* 2001], certains animaux infectés ont présenté une bande supplémentaire atypique de 17 kDa (en plus des trois formes habituellement décrites en WB) [Zanusso *et al.* 2003] ; cette bande qui révèle l'existence de plus petits fragments de PrP anormale, pourrait être due, selon les auteurs, à l'absence de la région des octapeptides dans cette fraction de PrP.

La détermination du site de clivage peut aussi être abordée chez les ovins grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre la région proche du site de clivage. La comparaison du signal obtenu avec l'utilisation d'un anticorps comme 6H4 (reconnaissant un épitope de la partie résistante de la PrP) et de l'anticorps P4 (épitope proche du site de clivage par la PK, 89-104 de la PrP ovine) permet ainsi d'obtenir des signaux comparables dans les cas de tremblante naturelle. Par contre, une très nette diminution du signal est observée avec l'isolat CH1641, l'ESB ovine, et l'ESB chez les bovins (ces trois cas présentant une bande non glycosylée plus basse) [Stack *et al.* 2002].

L'ESB, qui montre de fortes potentialités dans le franchissement des barrières d'espèces, et qui a été identifiée dans le vMCJ et dans d'autres espèces animales, transmise expérimentalement au macaque, à la souris, au porc et au mouton (cf précédemment)



présente en WB, dans toutes ces espèces une bande non-glycosylée de faible poids moléculaire (environ 19kDa) (figure 41) [Collinge *et al.* 1996] [Hill *et al.* 1997a] [Hill *et al.* 1998] [Hope *et al.* 1999] [Baron *et al.* 2000] [Stack *et al.* 2002].



**Figure 41 : Profils électrophorétiques et identification de la souche d'ESB dans différentes espèces**

Western-Blot illustrant les profils similaires de migration de la PrP résistante à la protéinase K issue d'un cerveau de vache atteinte d'ESB (1), de souris FVB inoculées avec l'extrait utilisé en 1(2), de vMCJ (3), de souris FVB inoculées avec l'extrait utilisé en 3 (4).

Les profils de migration de la PrP<sup>res</sup> sont similaires. D'après [Hill *et al.* 1997a].

### **Limites de la méthode**

D'un point de vue méthodologique, plusieurs traitements chimiques peuvent induire des variations de la mobilité électrophorétique de la PrP<sup>res</sup>. Ainsi, l'utilisation de chélateurs de cations (EDTA), avant traitement à la PK, induit un changement de migration électrophorétique de la PrP<sup>res</sup> dans les cas de MCJ type 1 et 2, mais pas des types 3 et 4 (classification de Collinge) [Wadsworth *et al.* 1999]. De la même façon, l'extraction de la PrP<sup>res</sup> en milieu acide ou basique peut induire, dans certains types de MCJ et dans des cas de tremblante naturelle, des modifications de la masse moléculaire apparente de la PrP<sup>res</sup> [Zanusso *et al.* 2001] [Zanusso *et al.* 2003]. L'utilisation de l'acide phosphotungstique, utilisé pour précipiter la PrP anormale, avant le traitement à la PK, induit une augmentation de la taille des fragments de PrP<sup>res</sup> dans des cas de vMCJ, ce qui semble indiquer une moindre action de l'enzyme sur la PrP anormale lors de ces extractions [Wadsworth *et al.* 2001]. Aussi la standardisation des méthodes de mesures est difficile à mettre en place, et seules des différences de poids moléculaires peuvent être mesurées entre les échantillons testés.

La nature des échantillons peut aussi induire des variations de profils électrophorétiques : chez l'homme (vMCJ) comme chez le mouton atteint de tremblante, les profils obtenus sur les organes lymphoïdes sont différents de ceux réalisés sur le SNC [Hill *et al.* 1997b] [Madec *et al.* 2000].

Ce critère d'identification de la souche d'ESB lors de transmissions inter-espèces est, tout comme le critère d'identification par ratio de glycoformes, à prendre avec circonspection. En effet, des passages inter-espèces (ou dans différents génotypes d'une même espèce) de souches clonées peuvent conduire à l'isolement de nouvelles souches, totalement différentes biologiquement. Ce phénomène ne peut être exclu en ce qui concerne la souche ESB. Ceci peut être en partie illustré par certaines données de l'équipe de Collinge qui montrent que l'agent de l'ESB peut se transmettre à des lignées murines transgéniques (huPrPMM129) et se développer phénotypiquement soit comme le variant MCJ soit comme des cas de MCJsp ; ces souris inoculées avec l'ESB peuvent produire un profil

électrophorétique de type 2 (20 kDa) ou de type 4 (19 kDa) [Asante *et al.* 2002]. Ceci avait déjà été observé dans d'autres lignées murines transgéniques (huPrPVV129), qui produisaient des types électrophorétiques différents de ceux des inocula de cas de MCJsp [Collinge *et al.* 1996] (figure 42). Ce phénomène n'est pas observé dans d'autres modèles transgéniques qui propagent le même type électrophorétique que l'inoculum de départ (cas naturels de tremblante ou ESB ovine) [Crozet *et al.* 2001b] [Crozet *et al.* 2001a].

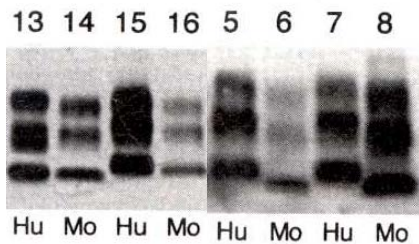


Figure 42 : Transmission du MCJ à des souris Tg(huPrP) - Profils électrophorétiques

(13) : MCJ iatrogénique type 3 produit chez la souris un type 3 (14)  
 (15) : MCJ iatrogénique type 2 produit chez la souris un type 2 (16)  
 (5) : MCJ iatrogénique type 1 produit chez la souris un type 2 (6)  
 (7) : spMCJ type 1 produit chez la souris un type 2 (8)  
 D'après [Collinge *et al.* 1996.]

### Analyse du métabolisme de la PrP anormale par les cellules

En plus de l'analyse du profil électrophorétique, l'identification d'une infection par l'ESB chez le mouton peut aussi être réalisée par une approche immunohistochimique centrée sur l'analyse des voies de métabolisation de la PrP anormale dans les cellules présentant une activité de phagocytose. Ainsi, en utilisant des anticorps dirigés contre la partie limitant la zone de clivage à la PK, une plus grande dégradation de la PrP<sup>ESB</sup> peut être mise en évidence comparativement à la PrP<sup>sc</sup> de cas de tremblante (la partie résistante de la PrP<sup>ESB</sup> étant plus courte que celle de la PrP<sup>sc</sup>, cf. profils électrophorétiques). Cette particularité physiopathologique a été identifiée dans les macrophages des centres germinatifs des follicules lymphoïdes (TMB : tingible body macrophages) (figure 43), dans des cellules gliales et dans certains neurones (vésicules d'endocytose) du SNC (figure 44) [Jeffrey *et al.* 2001a].

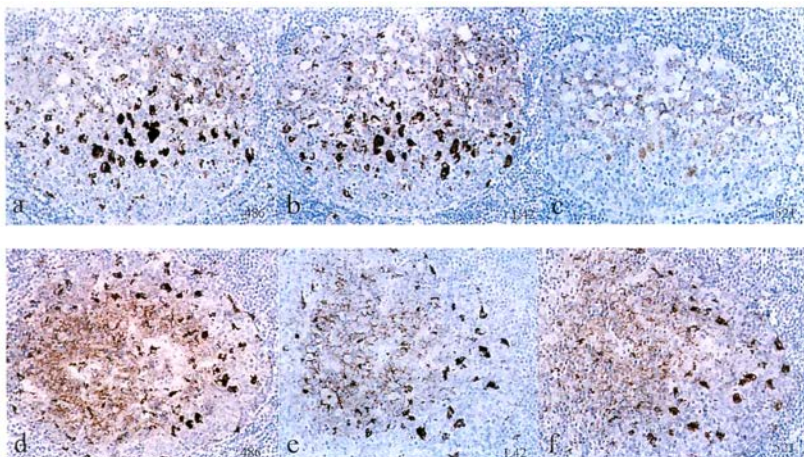


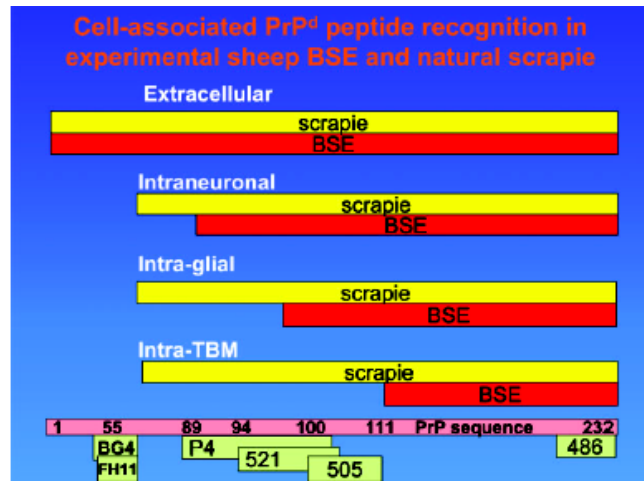
Figure 43 : Immunomarquages de la PrP anormale sur des coupes d'organes lymphoïdes de moutons atteints de tremblante (en bas) ou expérimentalement infectés par l'ESB (en haut). L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie résistante de la PrP anormale révèle une accumulation de PrP dans les macrophages (marquage en gros grains) (a, b, d, e). Par contre, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie proche de la zone de clivage de la PrP<sup>ESB</sup> par la PK montre que les macrophages (TMBs) digèrent plus la PrP<sup>ESB</sup> que la PrP<sup>sc</sup> (c, f), ce qui permet de différencier les deux types d'infection. D'après [Jeffrey *et al.* 2001a].

**Figure 44 : Identification des sites de clivage de la PrP anormale par les cellules**

Diagramme schématique représentant les épitopes reconnus par différents anticorps sur la protéine prion ovine (rose).

L'accumulation de la PrP chez les moutons peut se faire sous forme native, ou sous différentes formes tronquées.

L'utilisation des anticorps P4, 521 et 505 permet de mettre en évidence des différences dans le processus de dégradation de la PrP<sup>sc</sup> dans trois types cellulaires chez des moutons infectés par la tremblante (jaune) ou par l'ESB (rouge).  
D'après [Jeffrey *et al.* 2003]



### **Limites de la méthode**

L'identification de l'ESB par cette méthode n'est pas certaine, car il existe une souche de tremblante expérimentale, CH1641, qui est caractérisée par un profil électrophorétique proche de celui de l'ESB, et qui est difficilement discernable sur ces critères d'analyse de poids moléculaire [Hope *et al.* 1999] [Baron *et al.* 2000]. L'analyse des processus de métabolisation de la PrP anormale chez des moutons infectés par cette souche (CH1641) n'a pas été décrite mais il est probable qu'elle se rapproche de celle de l'ESB ovine. Seule une analyse fine du site de clivage pourrait peut-être permettre de différencier ces deux souches étant donné qu'une faible différence de poids moléculaire a tout de même été observée en Western-blot [Stack *et al.* 2002].

Aussi en cas de co-infection par l'agent de l'ESB et par une souche de tremblante 'classique', dans l'hypothèse d'une réelle co-existence des deux souches, l'ESB serait masquée par la tremblante du fait que seule l'absence de marquage de la PrP<sup>ESB</sup> permet d'identifier cette souche (figure 44).

De plus cette approche a été décrite très récemment et peu de données sont disponibles actuellement, le nombre d'échantillons testés étant très limité.

### **5 - Analyse immuno-conformationnelle de la PrP anormale (CDI – conformation dependant immuno-assay)**

Dans ce type d'approche, la PrP<sup>sc</sup> est identifiée sur le principe par des différences d'affinité d'un anticorps pour la PrP<sup>sc</sup> et la PrP<sup>c</sup> dénaturées ou non [Safar *et al.* 1998]. En fait l'immunoréactivité de la PrP<sup>sc</sup> est augmentée lors de la dénaturation. Dans ce test, les quantités des deux isoformes de la PrP sont évaluées ainsi que l'affinité de l'anticorps pour son épitope dans des conditions dénaturées ou non.

L'analyse du rapport des affinités d'un anticorps anti-PrP pour son ligand (PrP) dénaturé ou non permet aussi de différencier différentes souches chez le hamster. Ainsi, le test permet de

mettre en évidence différentes conformations de la PrP<sup>sc</sup> associées à différentes caractéristiques de souches. Certaines souches qui présentent la même durée d'incubation et des profils électrophorétiques identiques (HY et Sc237 par exemple) peuvent être différenciées par cette méthode. Cette analyse semble indiquer que la PrP anormale supporte l'information de souche par sa conformation secondaire et tertiaire [Safar *et al.* 2000].

Cette méthode est potentiellement un outil utile qui permettrait de distinguer la PrP anormale issue de vMCJ comparativement à des cas de MCJsp et aussi l'ESB ovine de différentes souches de tremblante. Cependant, l'existence d'une grande variabilité des propriétés des souches et des isolats de tremblante, ne permettra probablement pas de distinguer facilement l'ESB ovine de cas de tremblante.

## **Conclusion**

Les paramètres qui permettent de distinguer les souches peuvent être classés en deux catégories :

### *Données Qualitatives*

- 1 - Signes Cliniques
- 2 - Distribution des lésions de vacuolisation dans le SNC
- 3 - Distribution de l'accumulation de la PrP anormale dans le SNC
- 4 - Analyse des sites de clivage de la PrP anormale
- 5 - Analyse conformationnelle de la PrP anormale

### *Données Quantitatives*

- 1 - Durées d'incubation après inoculation sur modèle animal
- 2 - Résistance de la PrP anormale aux traitements physico-chimiques et aux protéases
- 3 - Analyse des ratios de glycoformes
- 4 - Titrage de l'agent l'infectieux

En plus de son intérêt pour le diagnostic, l'analyse de la PrP anormale offre de nombreuses possibilités d'investigations permettant d'aborder la notion de souche. Cependant, ces méthodes restent très complémentaires les unes des autres étant donné qu'elles sont de développement relativement récent, et qu'elles sont généralement mal standardisées.

Leurs utilisations présentent néanmoins un intérêt majeur puisqu'elles permettent de s'affranchir du temps relativement long nécessaire au typage de souche sur modèle murin. Ainsi des analyses peuvent être effectuées rapidement sur un grand nombre d'échantillons. Dans le cadre de la recherche de l'agent de l'ESB dans les troupeaux de petits ruminants par exemple, la détection d'une signature de type ESB sur un échantillon par une de ces

méthodes nécessiterait cependant l'inoculation à des modèles murins pour pouvoir caractériser définitivement la (les) nature(s) de la souche(s) présente(s) dans l'isolat étudié.

Les premières transmissions de l'ESB au mouton, initiées en 1988 à Edimbourg par Foster et ses collaborateurs, démontrèrent la sensibilité des ovins à cet agent infectieux. En 1996, les premiers cas du vMCJ ont été décrits et le lien avec l'ESB a clairement été identifié par différentes équipes. Dès lors, la question des éventuelles sources de contamination humaine a été posée, notamment en ce qui concerne les troupeaux ovins suspectés d'avoir pu être infectés par des farines de viande contaminées. L'identification de l'agent de l'ESB chez le mouton nécessite donc la mise en place de modèles expérimentaux afin de caractériser et de comprendre la physiopathologie de la maladie chez les ovins.

Dès 1997, le laboratoire de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Lyon a initié le développement d'un modèle d'ESB ovine expérimental. Quatre brebis de race Lacaune ont été infectées par l'agent de l'ESB. Deux ovins présentant un génotype connu pour induire une sensibilité à la tremblante naturelle (Pr<sup>PARQ/ARO</sup>), et deux autres de génotype conférant une importante résistance à la tremblante (Pr<sup>PARR/ARR</sup>) ont été inoculés par voie périphérique avec un extrait de cerveau de vache française atteinte d'ESB.

Dans ce travail, **le premier objectif** a été de caractériser, notamment par immunohistochimie, chez ces moutons expérimentalement infectés par l'ESB, les sites d'accumulation de la PrP anormale dans le SNC mais aussi dans les organes périphériques comparativement à des ovins atteints de tremblante naturelle. Cette approche permet à la fois d'aborder les caractéristiques physiopathologiques de la maladie (types cellulaires impliqués, voies de dissémination de l'agent...), de mettre en évidence les tissus potentiellement infectieux et d'identifier éventuellement des particularités permettant de différencier les deux pathologies.

Par ailleurs, nous avons étudié les sites d'accumulation de la PrP anormale chez un guépard atteint d'encéphalopathie spongiforme féline. L'étude de cette maladie, considérée comme étant liée à l'ESB, nous a permis de considérer un autre exemple de transmission inter-espèces de cet agent infectieux.

**Le deuxième objectif** du travail a été de mettre en place des méthodes permettant d'identifier l'agent de l'ESB chez les ovins comparativement à des cas de tremblante. Pour cela deux approches ont été utilisées.

La première approche a consisté à analyser les sites de clivage de la protéine prion anormale par les protéases, chez les moutons infectés par l'ESB et chez des moutons atteints

de tremblante naturelle. Cette étude a été réalisée *in situ* par immunohistochimie en collaboration avec l'équipe du Dr M. Jeffrey, et également par des méthodes biochimiques.

La deuxième approche a été d'évaluer si l'identification de la souche d'ESB chez différentes espèces (mouton, guépard et vache) pouvait être réalisée par analyse neuro-anatomique des dépôts de PrP anormale chez des souris C57BL/6 expérimentalement infectées. Un autre modèle murin transgénique exprimant la PrP<sup>C</sup> de mouton, développé par le Dr Crozet, a également été utilisé pour la caractérisation de l'ESB-ovine.

# Article 1

---

## **Distribution of the disease-associated prion protein (PrP<sup>d</sup>) in sheep infected with French cattle BSE agent – influence of the genotype (ARQ/ARQ, ARR/ARR) on PrP<sup>d</sup> tissues targeting.**

STÉPHANE LEZMI, FRÉDÉRIC RONZON, ANNA BENCSIK, ALEXANDRE BEDIN,  
DIDIER CALAVAS, YVES RICHARD, JACQUES GRASSI, THIERRY BARON

Article soumis à *American Journal of Pathology* (en 2004)

Accepté en 2006 dans *Acta Bio Pol*

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez les bovins est une maladie à prion transmissible à l'homme et expérimentalement au mouton, notamment par voie orale. L'existence d'ESB dans les troupeaux de mouton est dès lors une possibilité.

Pour étudier la pathologie de l'ESB chez le mouton, quatre brebis de race Lacaune, de génotype ARQ/ARQ ou ARR/ARR, ont été infectées avec cet agent. De nombreux tissus de ces moutons ont été analysés par immunohistochimie, ELISA et Western blot dans le but de détecter la PrP anormale, marqueur spécifique de l'infection.

Les deux brebis de génotype ARQ/ARQ ont développé des signes cliniques et ont montré une large distribution de PrP anormale dans le système nerveux et dans le système lymphoïde qui présentait, entre autre, un type inhabituel d'accumulation de prion. D'autres organes comme la trachée, les nerfs périphériques moteurs, et la surrénale ont aussi présenté une accumulation de PrP anormale, contrairement à d'autres organes comme les muscles.

Des traces de PrP anormale ont aussi été détectées, sans ambiguïtés, dans l'intestin d'un mouton ARR/ARR, sacrifié deux ans post inoculation. Notre étude, et celle de Houston [Houston *et al.* 2003], démontrent clairement la possible transmission de l'ESB à des ovins de génotype ARR/ARR, remettant en question de la résistance de ces ovins aux prions et posant la question d'éventuels porteurs de la maladie.



## PrP<sup>d</sup> accumulation in organs of ARQ/ARQ sheep experimentally infected with BSE by peripheral routes

Stéphane Lezmi<sup>1</sup>\*, Frédéric Ronzon<sup>1</sup>\*, Anna Bencsik<sup>1</sup>, Alexandre Bedin<sup>1</sup>, Didier Calavas<sup>1</sup>, Yves Richard<sup>2</sup>, Stéphanie Simon<sup>3</sup>, Jacques Grassi<sup>3</sup> and Thierry Baron<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Lyon cedex 07, France; <sup>2</sup>Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy L'Etoile, France; <sup>3</sup>CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Gif sur Yvette cedex, France; ✉e-mail: t.baron@lyon.afssa.fr

Received: 01 February, 2006; revised: 04 May, 2006; accepted: 16 May, 2006  
available on-line: 12 June, 2006

To study the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy infection in small ruminants, two Lacaune sheep with the AA136RR154QQ171 and one with the AA136RR154RR171 genotype for the prion protein, were inoculated with a brain homogenate from a French cattle BSE case by peripheral routes. Sheep with the ARQ/ARQ genotype are considered as susceptible to prion diseases contrary to those with the ARR/ARR genotype. The accumulation of disease-associated prion protein (PrP<sup>d</sup>) was analysed by biochemical and immunohistochemical methods. No PrP<sup>d</sup> accumulation was detected in samples from the ARR/ARR sheep 2 years post inoculation. In the two ARQ/ARQ sheep that had scrapie-like clinical symptoms, PrP<sup>d</sup> was found in the central, sympathetic and enteric nervous systems and in lymphoid organs. Remarkably, PrP<sup>d</sup> was also detected in some muscle types as well as in all peripheral nerves that had not been reported previously thus revealing a widespread distribution of BSE-associated PrP<sup>d</sup> in sheep tissues.

**Keywords:** ovine BSE, prion, scrapie, sheep

### INTRODUCTION

The bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent, linked to the variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans (Bruce *et al.*, 1997), has been experimentally transmitted to sheep (Foster *et al.*, 1993), without clinical distinction from natural scrapie. The possible presence of this agent within sheep flocks used for human consumption is therefore of considerable concern. It has recently been demonstrated in France that a major risk factor for introduction of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in a flock is linked to the use of proprietary concentrates and milk replacers (Philippe *et al.*, 2005), which have been implicated in the BSE epidemic in cattle (Wilesmith *et al.*, 1992). Furthermore, the BSE agent was recently identified in a naturally infected French goat (Eloit *et al.*, 2005) and this reinforces the possible presence of the BSE agent in the sheep and goat flocks.

In sheep, the development of prion disease is complex and depends on several factors such as the genotype and breed of animals as well as the nature of the infectious agent. Thus, polymorphism of the prion protein PrP gene that predominantly determines scrapie or BSE susceptibility are linked to variations of codons 136, 154 and 171. The V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>/V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotypes are associated with a very high susceptibility to scrapie (Hunter, 1997) whereas the ARR/ARR animals are more resistant to scrapie (Hunter, 2003) even though cases of scrapie have been reported in this genotype (Ikeda *et al.*, 1995; Buschmann *et al.*, 2004). The ARQ/ARQ genotype, largely represented in flocks, and associated with scrapie susceptibility, would lead to an increased susceptibility to BSE (Houston & Gravenor, 2003).

To study the pathogenesis of BSE in small ruminants, Lacaune sheep were inoculated with the BSE agent. The accumulation of the disease-associ-

\*Contributed equally to this work.

**Abbreviations:** BSE, bovine spongiform encephalopathy; CNS, central nervous system; DAB, diaminobenzidine; dpi, days post infection; IHC, immunohistochemistry; mAb, monoclonal antibody; PrP<sup>d</sup>, disease-associated prion protein; recPrP, recombinant prion protein; TSE, transmissible spongiform encephalopathy.

ated prion protein, PrP<sup>d</sup>, the most specific marker of the disease (Bolton *et al.*, 1982), was investigated using three complementary methods that allowed us to obtain both qualitative and quantitative results (Madec *et al.*, 2004) allowing the identification of the tissues that may represent a risk for consumption.

## MATERIAL AND METHODS

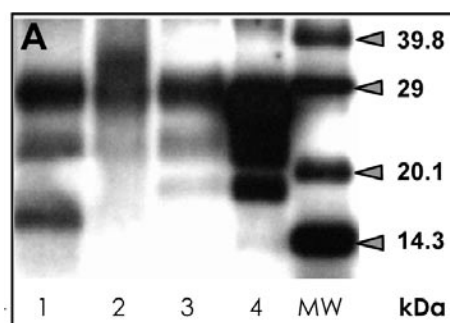
**Animals.** In our study, two ARQ/ARQ Lacaune sheep were inoculated either by intra-peritoneal (SB1 sheep) or intra-splenic (SB3 sheep) routes with brain homogenate from a French BSE-affected cow. One sheep naturally died at 672 days post inoculation (dpi) and the other was euthanized 1444 dpi. Both sheep had clinical signs of neurological disorders and had molecular characteristics of PrP<sup>d</sup> consistent with BSE infection (Houston & Gravenor, 2003; Lezmi *et al.*, 2004). The other Lacaune sheep with the ARR/ARR genotype (SB2) was inoculated by the intra-peritoneal route and was sacrificed at 673 dpi.

Samples from healthy sheep 2 years of age having the ARR/ARR and ARR/ARQ genotypes were used as negative controls. The negative status of these animals was confirmed by checking the absence of PrP<sup>d</sup> in the central nervous system (CNS) and tonsils.

**Immunohistochemistry (IHC).** IHC allowing the identification of PrP<sup>d</sup> at the cellular level with high sensitivity was performed as described in previous studies (Lezmi *et al.*, 2003); PrP<sup>d</sup> deposits appeared *in situ* as brown or black deposits using DAB alone or intensified with NiCl<sub>2</sub>.

**Western-blot (WB).** Following a WB procedure previously described (Biacabe *et al.*, 2004), PrP<sup>d</sup> detection was performed using anti-PrP mAbs Bar233 and peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Associates). This method has the advantage of identifying with high specificity the proteinase K resistant form of PrP<sup>d</sup>. However, the Western Blot analysis is less sensitive than the ELISA method, and as all samples were not in sufficient quantities for both biochemical analysis, samples were tested by ELISA in priority, as this method allows quantification of PrP<sup>d</sup>.

**ELISA.** ELISA was performed with the extraction kit 'Platelia BSE Bio-Rad' currently used for TSE diagnosis (Grassi *et al.*, 2001). For each plate an internal standard was used, i.e. ovine recombinant prion (r<sup>ec</sup>PrP) purified as previously described (Betemps & Baron, 2001). ELISA detection was performed using SAF34 anti-PrP mAbs as capture antibodies and acetylcholinesterase-conjugated Bar224 anti-PrP mAbs as a tracer.



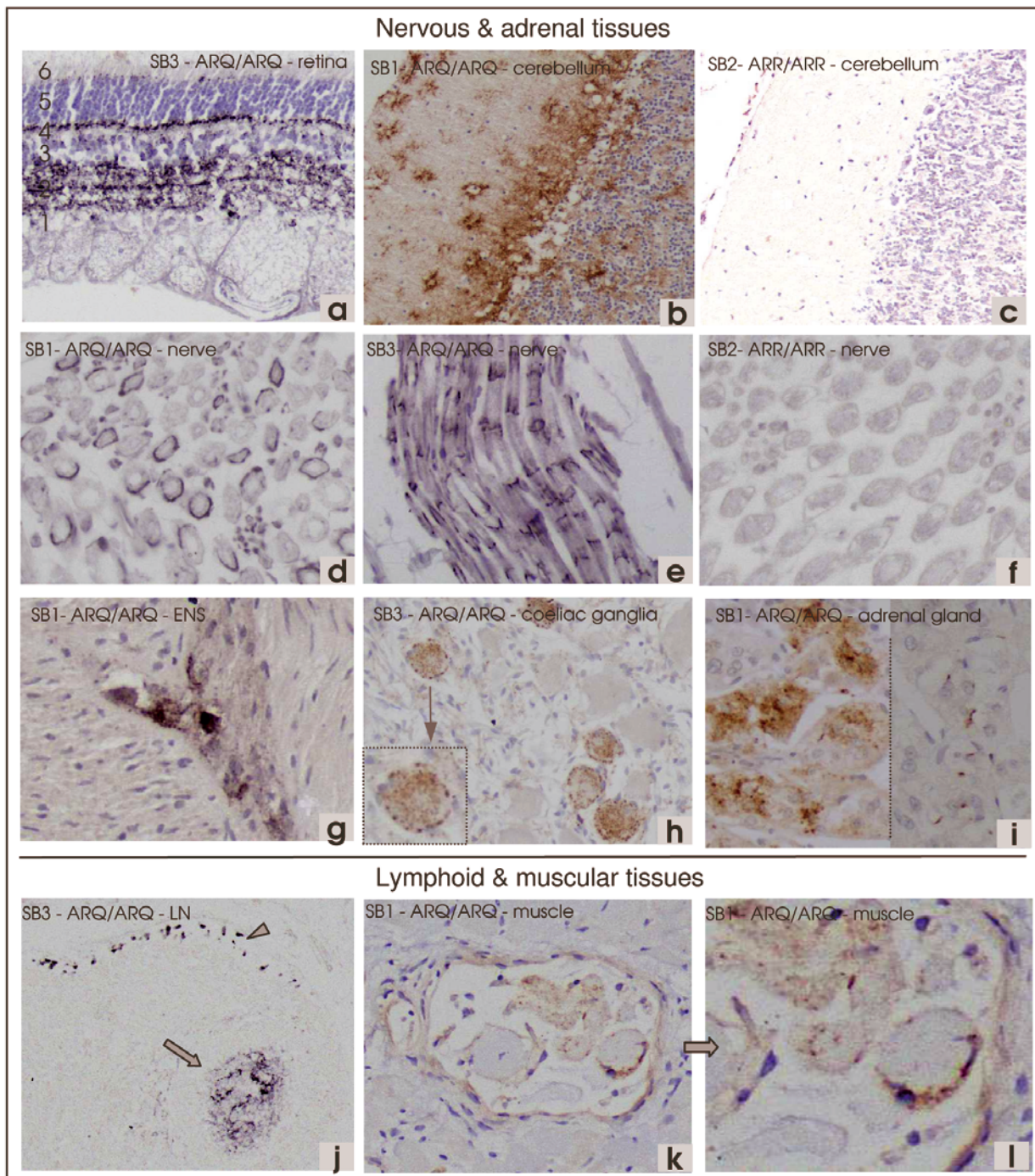
**Figure 1. Detection of PrP<sup>d</sup> by Western blot – ARQ/ARQ sheep.**

Representative pattern of PrP<sup>d</sup> observed in different tissues. Lanes 1 and 2: mandibular and iliac-medial lymph nodes, respectively; lane 3: adrenal gland; lane 4: cortex. All homogenates were prepared from sheep SB3. MW, molecular mass.

## RESULTS AND DISCUSSION

For all samples analysed from the ARR/ARR sheep, no PrP<sup>d</sup> was detected by any of the three PrP<sup>d</sup> detection methods used (Table 1). This result correlates with the higher genetic resistance to TSE associated with this genotype naturally affected with scrapie (Elsen *et al.*, 1999) or orally infected with the BSE agent (Jeffrey *et al.*, 2001). However, resistance of the ARR/ARR sheep challenged with TSE infection is not considered complete since natural scrapie cases have been reported in sheep with this genotype (Ikeda *et al.*, 1995; Buschmann *et al.*, 2004; French surveillance program, unpublished data). Furthermore, BSE has been transmitted to ARR/ARR sheep by the intra-cerebral route (Houston *et al.*, 2003).

In both ARQ/ARQ sheep, the CNS (including retina), the lymphoid system and the autonomous nervous system were identified by each method as major sites of PrP<sup>d</sup> accumulation (Table 1, Fig. 1) and were also described earlier by other groups in experimentally BSE affected sheep (Foster *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2001) as well as in naturally scrapie-affected sheep (van Keulen *et al.*, 1999; Jeffrey *et al.*, 2001). In the CNS, the quantities of abnormal PrP, expressed as equivalent in r<sup>ec</sup>PrP, were estimated by ELISA at up to 13000 ng/g of brainstem tissue. Comparatively, the levels found in 13 ARQ/ARQ or ARQ/VRQ sheep clinically affected with natural scrapie averaged 40000 ± 20000 ng of PrP<sup>d</sup>/g of CNS tissues. Lymphoid organs accumulated lower levels of PrP<sup>d</sup> and large quantities of material were required to detect a signal by Western blot in the mandibular or iliac medial lymph nodes (LN) of SB3 (Fig. 1). In the spleen of SB1 and SB3, 46 and 2 ng equivalent of PrP<sup>d</sup>/g of tissue were detected, respectively. In the ileum, 232 ng equivalent of PrP<sup>d</sup>/g of tissue was detected and correlated with a higher number and size of germinal centres when compared to spleen or iliac lymph nodes. The mean quantity of PrP<sup>d</sup> in the CNS was 187- and



**Figure 2. Immunodetection of PrP<sup>d</sup> in various tissues.**

PrP<sup>d</sup> accumulation was detected in the retina (a, black deposits,  $\times 200$ ) and in the cerebellum of both ARQ/ARQ sheep (b, brown deposits,  $\times 400$ ,  $\times 200$ ) but not in the ARR/ARR sheep (c). PrP<sup>d</sup> was also detected in the ARQ/ARQ sheep in sciatic nerve (d–e, black deposits,  $\times 400$ ,  $\times 200$ ) but neither in the ARR/ARR sheep nor in healthy controls (f,  $\times 200$ ). In the enteric nervous system of ARQ/ARQ sheep, PrP<sup>d</sup> was detected associated to neurons (g, black deposits,  $\times 200$ ) as well as in the coeliac ganglia in which intra and peri-neuronal PrP<sup>d</sup> deposits were visualized (h, brown deposits,  $\times 200$ ; higher magnification in the inset). In the adrenal gland, two types of PrP<sup>d</sup> accumulation were observed, dense intracellular and synaptic-like (i, brown deposits,  $\times 400$ ). In lymph nodes, the PrP<sup>d</sup> accumulation was mainly detected in germinal centers (arrow) (j, black deposits,  $\times 100$ ). In the muscle PrP<sup>d</sup> accumulation was observed associated to neuro-muscular spindle (k–l, brown deposits,  $\times 100$  and  $\times 400$ ).

36-fold greater than the quantities determined respectively in spleen and in the intestine.

Qualitatively, different types of PrP<sup>d</sup> deposits in the brain were identified from the frontal cor-

tex to the lumbar spinal cord. These PrP<sup>d</sup> deposits were mainly identical to those previously identified in scrapie- or BSE-affected sheep (Ryder *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002). In the retina, PrP<sup>d</sup> accumula-

**Table 1. Detection of PrP<sup>d</sup> by immunohistochemistry (IHC), ELISA and Western blot (WB).**

For ELISA measurements, samples were stated positive or negative by reference to a cut-off value calculated as the mean of the measurements made on the negative controls plus 3-fold the value of the standard deviation calculated on negative controls. A "grey area" was defined between the value of the cut off and the mean of the negative controls plus 2-fold the value of the standard variation (Table 1, '+/-' results). PrP<sup>d</sup> accumulation was also quantified (values in brackets, ng/g of tissue). For each plate, at least three negative controls chosen in function of the studied tissue were deposited in duplicate.

Samples	SB1 ARQ/ARQ				SB3 ARQ/ARQ				SB2 ARR/ARR			
	IHC	ELISA	WB	Con.	IHC	ELISA	WB	Con.	IHC	ELISA	WB	Con.
<b>CNS</b>												
Frontal cortex	+++	+ (4526)	++++	++++	+++	+	++++	++++	-	-	nt	-
Cerebellum	+++	+	++++	++++	+++	+(5372)	++++	++++	-	-	nt	-
Brain stem	++++	+	++++	++++	++++	+(13266)	++++	++++	-	-	nt	-
Cervical sp. cord	+++	+(2959)	++++	++++	+++	+(2081)	++++	++++	-	-	nt	-
Thoracic sp. cord	+++	+(1172)	++++	++++	+++	+(2439)	++++	++++	-	-	nt	-
Lumbar sp. cord	+++	+(4819)	++++	++++	+++	+(4002)	++++	++++	-	-	nt	-
<b>Lymphoid organs</b>												
Tonsils	++	na	++	++	++	+(107)	na	++	-	na	-	-
Soft palate	na	na	na	na	++	na	na	++	na	na	na	-
Retropharyngeal LN	++	na	na	++	+	-	nt	+	-	na	na	-
Mandibular LN	+	+/-	-	+	+	+(2 ± 1)	+	+	-	-	nt	-
Thoracic LN	+	na	na	+	na	na	na	+	na	na	na	-
Mediastinal LN	+	-	nt	+	+	-	nt	+	-	-	nt	-
Ruminal LN	na	na	na	na	+	na	na	+	na	na	na	-
Ileal LN	+	na	na	+	-	+(5)	nt	+	-	na	na	-
Caecal LN	+	na	na	+	+	-	-	+	-	-	nt	-
Spiral colon LN	+	+(1 ± 0)	nt	+	-	+/-	nt	+/-	na	-	nt	-
Ilio-femoral LN	+	+/-	nt	+	+	na	na	+	-	-	nt	-
Iliac-medial LN	-	-	nt	-	+	+(12)	+/-	+	-	-	nt	-
Spleen	+/++	+(46)	+	++	+	+(2)	-	+	-	-	nt	-
Prescapular LN	+	+(12)	+	+	+	na	na	+	-	-	nt	-
Precurral LN	na	na	na	na	+	+(5)	+/-	+	-	na	na	-
Popliteal LN	+	+(2 ± 1)	-	+	+	+(25)	+/-	+	-	-	nt	-
<b>Digestive tract</b>												
Oesophagus ENS	na	na	na	na	-	-	nt	-	na	na	na	-
Rumen ENS	na	na	na	na	-	-	nt	-	na	na	na	-
Reticulum ENS	na	na	na	na	-	-	nt	-	na	na	na	-
Omasum ENS	na	na	na	na	-	-	nt	-	na	na	na	-
Abomasum ENS	na	na	na	na	+	-	nt	+	na	na	na	-
Duodenum ENS	+	-	-	+	-	-	nt	-	-	-	nt	-
Jejunum ENS	na	na	na	na	-	-	nt	+	-	na	na	-
Ileum ENS	+	+	+	+	+	-	nt	+	nt	nt	nt	-
Ileum PP	++	+(232)	+	++	+	-	nt	+	nt	nt	nt	-
Ileo-caecum ENS	+	na	na	+	+	na	na	+	-	na	na	-
Ileo-caecum PP	++	na	na	++	++	na	na	++	-	na	na	-
Caecum ENS	+	+/-	+/-	+	-	-	nt	-	nt	nt	nt	-
Spiral colon ENS	+	+	+/-	+	-	-	nt	-	-	nt	nt	-
Spiral colon PP	+	+(12)	+/-	+	na	na	nt	-	-	nt	nt	-
Rectum ENS	-	na	na	-	-	-	nt	-	na	na	na	-
<b>Per. Nerv. Syst.</b>												
Cervical.Cra.gg	++	na	na	++	+	na	na	+	-	na	na	-
Coeliac ganglia	++	na	na	++	+	na	na	+	-	na	na	-
Sympathic gg	na	na	na	na	+/-	na	na	+/-	-	na	na	-
Vagus nerve	+/-	-	-	+/-	+/-	-	nt	+/-	-	na	na	-
Splanchnic nerve	+/-	na	na	+/-	+/-	na	na	+/-	-	na	na	-
Sciatic nerve	+	-	-	+	+	-	nt	+	-	-	nt	-
Brachial plexus	+	-	nt	+	+	-	nt	+	-	-	nt	-
Lingual nerve	na	na	na	na	+	+(2)	nt	+	na	na	na	-
Phrenic nerve	na	na	na	na	na	na	na	na	-	na	na	-

Eyes														
Aqueous humour	na	+	(35)	nt	+	na	na	na	na	-	nt	-		
Cornea	-	-		nt	-	-	+/-	nt	+/-	-	na	na	-	
Lens	-	-		-	-	-	-	-	-	-	na	na	-	
Iris	-	-		nt	-	-	+/-	-	+/-	-	na	na	-	
Optic nerve	-	-		nt	-	-	-	nt	-	-	na	na	-	
Retina	+++	+	(7)	nt	+++	+++	+	(15)	-	+++	-	na	na	-
Vitreous humour	na	+	(29)	-	+	na	-	-	-	na	-	nt	-	
Other samples														
Adrenal gland	++	+	(111)	+	++	+	+	(53)	+	+	-	-	nt	-
Urinary bladder	na	na		na	-	-	-	nt	-	na	na	na	na	-
Carotid	na	na		na	-	-	-	nt	-	na	na	na	na	-
Gallbladder	na	na		na	-	-	-	na	na	-	na	na	na	-
Heart, auricle	-	na		na	-	-	-	na	na	-	na	na	na	-
Heart, ventricle	-	-		-	-	-	-	nt	-	-	na	na	na	-
Kidney	-	-		nt	-	-	-	nt	-	-	-	nt	nt	-
Liver	-	-		-	-	-	-	nt	-	-	-	nt	nt	-
Lung	-	na		na	-	-	-	nt	-	-	na	na	na	-
Mouth mucosa	na	na		na	-	-	na	na	-	na	na	na	na	-
Ovary	na	na		na	-	-	-	nt	-	-	na	na	na	-
Pancreas	na	na		na	-	-	-	nt	-	na	na	na	na	-
Salivary gland	-	na		na	-	-	-	nt	-	-	na	na	na	-
Skin	-	na		na	-	-	-	nt	-	na	na	na	na	-
Skin lesion	-	na		na	-	na	na	na	-	na	na	na	na	-
Striated muscles	+	-		nt	+	+	-	nt	+	nt	nt	nt	nt	-
Thyroid	na	na		na	-	-	-	nt	-	na	na	na	na	-
Tongue	+	na		na	+	+	-	nt	+	na	na	na	na	-
Trachea	na	na		na	-	-	+	(21)	nt	+	na	na	na	-
Uterus	na	na		na	-	-	-	nt	-	-	na	na	na	-

The intensity of PrP<sup>d</sup> immunolabelling was estimated for IHC and Western blot (WB) according to the scoring: - no labelling; +/- trace of light labelling; + light labelling; ++ moderate labelling; +++ intense labelling; and ++++ very strong labelling. Basing on the results obtained with the different methods, a final conclusion (con.) was proposed for each tissue on the presence of PrP<sup>d</sup>. CNS, central nervous system; ENS, enteric nervous system; PP, Peyer's patches; gg, ganglia; sp. cord, spinal cord; nt, not tested; na, not available; +\*, PrP<sup>d</sup> accumulation in under-capsular area in some lymph nodes (LN).

tion was mainly detected in the ganglionic layer (1), intern (2) and extern (4) plexiform layers (numbers corresponding to the different layers in the retina, Fig. 2a). Interestingly, in the enteric nervous system of ARQ/ARQ sheep, PrP<sup>d</sup> was detected associated with neurons (Fig. 2g) as well as in the coeliac ganglia in which intra- and peri-neuronal PrP<sup>d</sup> deposits were visualized (Fig. 2h). In the adrenal gland, two types of PrP<sup>d</sup> accumulation were observed as dense intracellular or synaptic-like deposits (Fig. 2i).

In lymphoid organs, PrP<sup>d</sup> was detected in germinal centres of secondary lymphoid follicles, in follicular dendritic cells and in tingible body macrophages (Fig. 2j). PrP<sup>d</sup> was also detected in cells with a morphology consistent with macrophages in the subcapsular sinus of some lymph nodes (Fig. 2j, arrowhead, Table 1\*). These observations are in agreement with previous results obtained both in sheep naturally affected with scrapie (Jeffrey *et al.*, 2000; Lezmi *et al.*, 2001; Ersdal *et al.*, 2005) and in experimentally BSE-infected sheep (Lezmi *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2001). Interestingly, not all germinal centres were labelled for PrP<sup>d</sup>; this partial absence of labelling in germinal centres (as in tonsils) was not observed in samples from 13 natural scrapie-infected

sheep in which all lymphoid germinal centres were positively labelled for PrP<sup>d</sup>. This agreed with data describing an early and systematic immune system involvement in lambs affected with scrapie (Andreoletti *et al.*, 2000) which was not a feature of BSE agent infection in sheep during the first passage (Jeffrey *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005).

In our study, as opposed to previous published results, in both ARQ/ARQ sheep, PrP<sup>d</sup> was detected by IHC in all motor nerves and associated with Schwann's cells (Fig. 2d, e). PrP<sup>d</sup> deposits were similarly detected in all other tissue samples containing peripheral nerves, most notably in nerves in muscle samples. This observation was not reported in other studies with sheep BSE (Foster *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2001). However, we observed the same type of deposits in two other sheep (ARQ/VRQ) naturally affected with scrapie (not shown) and two previous articles report similar data in sheep with natural scrapie (Groschup *et al.*, 1999; Archer *et al.*, 2004).

PrP<sup>d</sup> presence was also identified in striated muscles for both ARQ/ARQ sheep. These deposits were associated with neuromuscular spindles that are highly innervated structures made of groups

of myocytes surrounded by a thin fibrous capsule (Fig. 2k, l) and are a specialized subset of myocytes implicated in proprioception. In the tongue of sheep, the accumulation of PrP<sup>d</sup> in these structures was less evident. Only one study reported the PrP<sup>d</sup> presence in the muscle of sheep affected with scrapie using IHC and ELISA (Andreoletti *et al.*, 2004). Here, sampling and analysis of different muscles were not systematic and thus the ELISA/IHC results were not correlated. However, the accumulation in muscle tissue of PrP<sup>d</sup> in sheep affected with scrapie is not systematic (Andreoletti *et al.*, 2004). Recently, pathological prion protein was detected in muscles of hamsters and mice infected with rodent-adapted BSE or vCJD (Thomzig *et al.*, 2006). Previously, other studies failed to detect prion in nerves and muscles of BSE- or scrapie-infected sheep (Foster *et al.*, 2001; Hamir *et al.*, 2004) possibly relying on the use of different pre-treatments and antibodies.

In conclusion, we have shown that the inoculation of the BSE agent of French origin by peripheral routes to Lacaune sheep lead to the development of the clinical disease only in ARQ/ARQ sheep. The distribution of PrP<sup>d</sup> in ARQ/ARQ sheep infected with BSE was very similar to that described in natural scrapie. Overall, we demonstrated for the first time the presence of PrP<sup>d</sup> in muscles and nerves of sheep infected experimentally with BSE agent, which stresses the potential risk for humans related to consumption of sheep products from sheep naturally infected with BSE.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Dr. Thomas Hodge (Sanofi-Aventis) for critical evaluation of the English, Dr. Francis Barillet (INRA) for providing the Lacaune sheep and Dr. Martin Jeffrey (VLA, UK) for helpful suggestions.

Frédéric Ronzon was supported by national grants from GIS "Infections à Prions". Stéphane Lezmi was financially supported by a grant from Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). This work was financially supported by a national grant from GIS "Infections à Prions".

### REFERENCES

- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, vanKeulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F (2000) Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* **81**: 3115–3126.
- Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbiere F, Ferre P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F (2004) PrP<sup>Sc</sup> accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* **10**: 591–593.
- Archer F, Bachelin C, Andreoletti O, Besnard N, Perrot G, Langevin C, Le Dur A, Vilette D, Van Evercooren A, Vilotte J, Laude H (2004) Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection. *J Virol* **78**: 482–490.
- Betemps D, Baron T (2001) Molecular specificities of antibodies against ovine and murine recombinant prion proteins. *Biochem Biophys Res Comm* **281**: 101–108.
- Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Reports* **5**: 110–115.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309–1311.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttle A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmission to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 498–501.
- Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup M (2004) Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol* **85**: 2727–2733.
- Eloit M, Adjou K, Coulpier M, Fontaine J, Hamel R, Lill T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe A, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte J, Comoy E, Deslys J, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P (2005) BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec* **156**: 523–524.
- Elsen J-M, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andréoletti O, Eychenne F, Vu Tien Khang J, Poivey J-P, Lantier F, Laplanche J-L (1999) Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* **144**: 431–445.
- Ersdal C, Ulvund M, Espenes A, Benestad S, Sarradin P, Landsverk T (2005) Mapping PrP<sup>Sc</sup> propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol* **42**: 258–274.
- Foster JD, Hope J, Fraser H (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Record* **133**: 339–341.
- Foster JD, Parnham DW, Hunter N, Bruce M (2001) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol* **82**: 2319–2326.
- Gonzalez L, Martin S, BegaraMcGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, Jeffrey M (2002) Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol* **126**: 17–29.
- Grassi J, Comoy E, Simon S, Créminon C, Frobert Y, Trapman S, Schimmel H, Hawkins SAC, Moynagh J, Deslys JP, Wells GAH (2001) Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet Record* **149**: 577–582.
- Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Hardt M, Hainfellner JA, Budka H (1999) Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* **98**: 453–457.
- Hamir A, Miller J, Cutlip R (2004) Failure to detect prion protein (PrPres) by immunohistochemistry in striated muscle tissues of animals experimentally inoculated with agents of transmissible spongiform encephalopathy. *Vet Pathol* **41**: 78–81.

- Houston EF, Gravenor MB (2003) Clinical signs in sheep experimentally infected with Scrapie and BSE. *Vet. Record* **152**: 333–334.
- Houston F, Goldmann W, Chong A, Jeffrey M, González L, Foster J, Parnham D, Hunter N (2003) BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* **423**: 98.
- Hunter N (1997) PrP genetics in sheep and the application for scrapie and BSE. *Trends Microbiol* **5**: 331–334.
- Hunter N (2003) Scrapie and experimental BSE in sheep. *Brit Med Bull* **66**: 171–183.
- Ikeda T, Horiuchi M, Ishiguro N, Muramatsu Y, Uwe GG, Shinagawa M (1995) Amino acid polymorphisms of PrP with references to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J Gen Virol* **76**: 2577–2581.
- Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL (2000) Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol* (suppl): 23–38.
- Jeffrey M, Ryder S, Martin S, Hawkins SAC, Terry L, Berthelin Baker C, Bellworthy SJ (2001) Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol* **124**: 280–289.
- Lezmi S, Bencsik A, Baron T (2001) CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrP<sup>sc</sup> accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Vet Immunol Immunopathol* **82**: 1–8.
- Lezmi S, Bencsik A, Monks E, Petit T, Baron T (2003) First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP<sup>sc</sup> analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochem Cell Biol* **119**: 415–422.
- Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys JP, Grassi J, Jeffrey M, Baron T (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. *J Virol* **78**: 3654–3662.
- Madec J, Simon S, Lezmi S, Bencsik A, Grassi J, Baron T (2004) Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock. *J Gen Virol* **85**: (Pt 11) 3483–3486.
- Philippe S, Ducrot C, Roy P, Remontet L, Jarrige N, Calavas D (2005) Sheep feed and scrapie, France. *Emerg Infect Dis* **11**: 1274–129.
- Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA (2001) Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Record* **148**: 7–13.
- Thomzig A, Cardone F, Kruger D, Pocchiari M, Brown P, Beekes M (2006) Pathological prion protein in muscles of hamsters and mice infected with rodent-adapted BSE or vCJD. *J Gen Virol* **87**: 251–254.
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM, Smits MA (1999) Scrapie-associated prion protein in the gastro-intestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* **121**: 55–63.
- Wilesmith JW, Ryan JBM, Hueston WD (1992) Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sc* **52**: 325–331.

## Article 2

---

### **First case of Feline Spongiform Encephalopathy in a captive cheetah born in France - PrPsc analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland.**

STEPHANE LEZMI, ANNA BENCSIK, EGIN MONKS, THIERRY PETIT, THIERRY BARON

Histochemistry Cell Biology, 2003, vol. 119, pp 415-422

Au cours de notre travail, il a été possible d'étudier le premier cas d'encéphalopathie spongiforme féline chez un guépard né en France. De nombreux prélèvements avaient été réalisés par le vétérinaire responsable avant même que le diagnostic de l'ESF soit posé ; ceci dans le cadre d'autres études qui ont pour but de mieux caractériser les pathologies dans cette espèce qui présente d'importantes difficultés de reproduction.

L'étude de ce cas présente un intérêt certain notamment car l'ESF est une pathologie à prion qui affecte des espèces félines domestiques ou captives et qui a clairement été reliée à l'encéphalopathie spongiforme bovine [Fraser *et al.* 1994]. Comme les sites d'accumulation de PrP anormale sont dépendants de la nature de l'agent infectieux mais aussi de la voie d'inoculation et de l'espèce infectée, l'analyse de la répartition des dépôts de PrP permet d'envisager l'implication potentielle de nouveaux tissus ou organes dans les maladies à prion.

Dans notre étude, la recherche des sites d'accumulation de la PrP anormale a été réalisée par immunohistochimie dans 27 tissus différents. Différents anticorps anti-prion ont été utilisés pour visualiser les dépôts de PrP *in situ*. Ainsi une accumulation de PrP anormale a été détectée dans le SNC (cortex, cervelet, tronc cérébral, moelle épinière, rétine) dans les nerfs périphériques et dans les organes lymphoïdes. Aucune accumulation de PrP anormale n'a été visualisée dans le système nerveux entérique, dans le pancréas et dans le muscle.

Par contre, une accumulation de prion a été détectée dans la zone fasciculée et réticulaire de la glande surrénale ainsi que dans certains glomérules rénaux posant la question d'une possible excrétion de prion. L'innervation sympathique de ces organes a été étudiée et comparée aux dépôts de PrP anormale. Nos résultats suggèrent que l'agent infectieux pourrait potentiellement gagner les différents tissus par les voies nerveuses et hématogènes.

La méthode de PET-blot a aussi été utilisée pour s'assurer de la présence de PrP anormale dans le cervelet, les surrénales et le rein (voir résultats complémentaires).



Stephane Lezmi · Anna Bencsik · Eoin Monks ·  
Thierry Petit · Thierry Baron

## First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP<sup>Sc</sup> analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland

Accepted: 31 March 2003 / Published online: 1 May 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** Feline spongiform encephalopathy (FSE), affecting domestic and captive feline species, is a prion disease considered to be related to bovine spongiform encephalopathy. Here we report an immunohistological analysis of the first FSE-affected cheetah born in France. The duration of clinical signs, of which ataxia was the main one, was about 8 weeks. The distribution of abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) was studied by immunohistochemistry within 27 different tissues. Different antibodies were used to visualise abnormal PrP deposits in situ. PrP<sup>Sc</sup> accumulation was detected in the central nervous system (cerebral cortex, cerebellum, brain stem, spinal cord, retina), in peripheral nerves and in lymphoid organs. PrP<sup>Sc</sup> deposits were not observed within the enteric nervous system nor in several other organs, such as pancreas, ovary, liver and muscle. More interestingly, unusual PrP<sup>Sc</sup> deposits were observed within the zona fasciculata/reticularis of the adrenal gland and within some glomeruli of the kidney raising the question of possible PrP<sup>Sc</sup> excretion. The sympathetic innervation of these two organs was visualised and compared to the distribution of PrP<sup>Sc</sup> deposits. Our results suggest the possibility that the infectious agent is spread by both haematogenous and nervous pathways.

**Keywords** BSE · FSE · Noradrenergic system · Prion · vCJD

S. Lezmi (✉) · A. Bencsik · T. Baron  
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA),  
Unité de Virologie - ATNC,  
31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France  
e-mail: s.lezmi@lyon.afssa.fr  
Tel.: +33-4-78726543  
Fax: +33-4-78619145

E. Monks  
Department of Agriculture and Food Veterinary Research  
Laboratory, Dublin, Ireland

T. Petit  
Zoo de la Palmyre,  
17570 Les Mathes, BP08, France

### Introduction

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are neurodegenerative diseases including scrapie in sheep and goats, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Kuru in humans, and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle (Prusiner 1997b). Although the precise nature of the infectious agent of these diseases is uncertain, an abnormal protease resistant isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of a host cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) copurifies with infectivity in the infected tissues (Bolton et al. 1982). This modified protein (PrP<sup>Sc</sup>) is considered to be the major component, if not the only one, of the infectious agent (Prusiner 1982) and can be detected by immunohistochemistry to diagnose a TSE (Bell 1996; Bell et al. 1997; Debeer et al. 2001).

From 1986, new TSEs have been described: BSE in cattle (Wells et al. 1987) and other ruminants from zoos (Prusiner 1997a) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in human (Hill et al. 1997). Similarly, feline spongiform encephalopathy (FSE) was first reported in the UK in 1990 (Wyatt et al. 1991). Up until 2001, 87 cases of FSE had been reported in domestic cats in UK (Ryder et al. 2001), one in Norway (Bratberg et al. 1995), one in Northern Ireland, one in Switzerland and one in Liechtenstein. Since 1990, other feline species were diagnosed with FSE in zoos: nine cases in cheetah, three pumas, three ocelots, two tigers, two lions as well as in one cougar (Peet and Curran 1992; Willoughby et al. 1992) (DEFRA).

The origin of the occurrence of FSE cases was assessed by strain typing analysis (incubation period and distribution of brain lesions) on mice inoculated with brain homogenates from affected cats and cows (Fraser et al. 1994) and also by western blotting comparisons of the abnormal prion protein from FSE, BSE and vCJD cases (Collinge et al. 1996). All the results supported the idea that FSE, like vCJD, was related to the BSE agent.

Despite the similarities between the pathologies of these TSEs, it is interesting to note that important differences exist in the targeting of tissues accumulating

abnormal PrP. Beside the usual brain targeting, peripheral accumulation of PrP<sup>Sc</sup> has not been described in naturally occurring BSE in cattle (Somerville et al. 1997) in contrast to cats affected with FSE or to humans with vCJD (Wadsworth et al. 2001). Indeed in affected cats (Ryder et al. 2001), as well as in scrapie, PrP<sup>Sc</sup> is detected in lymphoid organs (van Keulen et al. 1996; Lezmi et al. 2001) and in the autonomous nervous system (van Keulen et al. 1999; Bencsik et al. 2001). This inconstant peripheral accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in different species probably reflects the strain of the infectious agent too, as illustrated by the occurrence of PrP<sup>Sc</sup> in lymphoid organs in vCJD but not in Kuru despite a probable similar route of infection (Hill et al. 1999). These variations would also be dependent on the way of inoculation as illustrated in sheep infected with BSE via oral, intravenous or intracerebral routes that lead to different targeting of PrP<sup>Sc</sup> accumulation sites (Hunter et al. 2002).

These observations encouraged us to study PrP<sup>Sc</sup> distribution in various tissues that might show particularities related to both host species and strain of agent. Thus, in the present FSE case, found in a 9-year-old cheetah (*Acinonyx jubatus*), reared from its birth in the La Palmyre zoo in France, we had the opportunity to study PrP<sup>Sc</sup> distribution in 27 different tissue sites. It confirmed PrP<sup>Sc</sup> accumulation in central nervous system, in peripheral nerves and in lymphoid organs. Unexpectedly, PrP<sup>Sc</sup> was also detected in the zona fasciculata/reticularis of the adrenal gland and in some glomeruli of the kidney. Possible explanations for the presence of PrP<sup>Sc</sup> in these two organs are discussed.

## Materials and methods

### Clinical FSE suspicion

A 9-year-old captive female cheetah (*Acinonyx jubatus*), born in 1992 and reared in the French zoo "La Palmyre", presented neurological signs with ataxia which became worse despite treatments with anti-inflammatory drugs. Hypersalivation was also observed and associated to an eosinophilic stomatitis as revealed by a biopsy examination. Serological evidence for feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, feline calicivirus, feline herpes virus and *Chlamydomydia felis/psittaci* was absent. Loss of weight occurred although the appetite of the animal remained good. No biochemical abnormalities were found in either blood or cerebrospinal fluid samples. The duration of the clinical signs was about 8 weeks, in which hyperaesthesia was observed in the last couple of weeks. The animal was finally euthanased when ataxia became permanent. An autopsy was carried out in the zoo and small tissue samples (1×1 cm) of different organs were fixed in 10% formalin. A diagnosis of FSE was made on the basis of PrP<sup>Sc</sup> detection by western blot in a frozen brain stem sample as described in a previous FSE case in cheetah born in the UK (Baron et al. 1997).

### Sample preparation

The 27 different tissues (Table 1) of the affected cheetah taken at the autopsy were routinely embedded in paraffin. To ensure adhesion, sections (5 µm) were collected onto pretreated glass

**Table 1** Results of immunohistochemical staining (IHC) for abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>; SAF84 Mab) in all tissues analysed. + Positive staining, – no staining. (ENS Enteric nervous system)

Tissues samples	PrP <sup>Sc</sup> IHC
Cerebral cortex	+
Brain stem	+
Cerebellum	+
Cervical spinal cord	+
Thoracic spinal cord	+
Lumbar spinal cord	+
Retina	+
Brachial plexus	+
Oesophagus (ENS)	–
Stomach (ENS)	–
Small intestine (ENS)	–
Large intestine (ENS)	–
Mesenteric lymph node	+
Mandibular lymph node	+
Popliteal lymph node	+
Spleen	–
Adrenal gland	+
Kidney	+
Bladder	–
Liver	–
Nasal mucosa	–
Ovary and uterus	–
Pancreas	–
Salivary gland	–
Striated muscle	–
Thyroid gland	–

slides (StarFrost; Fischer Scientific, Pittsburgh, Pa., USA) and dried overnight at 55°C.

Samples of adrenal gland and kidney from a sheep naturally affected with scrapie and presenting a susceptible genotype to the disease (AV136RR154QQ171 of the PrP gene) (Hunter et al. 1996; Elsen et al. 1999) were used as reference tissues. These samples were fixed and embedded in paraffin following the same procedures as described above.

### PrP<sup>Sc</sup> analysis

Rehydrated sections were used for PrP<sup>Sc</sup> immunohistochemical analysis using SAF84 monoclonal antibody (Mab) which recognises an epitope equivalent to HuPrP 160–170 (kindly provided by Dr. J. Grassi, CEA Saclay, France; distributed by SPI-Bio) and following a procedure previously described (Bencsik et al. 2001; Lezmi et al. 2001). Briefly, this involved a combination of formic acid, hydrated autoclaving and proteinase K treatments of the sections. These treatments served to enhance the immunostaining of disease specific PrP<sup>Sc</sup> while suppressing that of PrP<sup>C</sup>, the normal cellular prion protein (Bell et al. 1997). Bound antibodies were labelled by means of a commercial immunoperoxidase technique (Vector Elite ABC) and finally peroxidase was revealed by immersing the sections in AEC (red deposits), in DAB (brown deposits) or DAB intensified with NiCl<sub>2</sub> (Biosys) giving black deposits. Slides were counterstained with Mayer's haematoxylin.

### Immunohistochemical controls

The omission of the primary antibody (SAF84) was used to detect the presence of non-specific immunostaining in each tissue. Additionally, an irrelevant antibody (monoclonal mouse anti-vimentin; Dako) was used on PrP<sup>Sc</sup>-positive tissues after the same pretreatments. With these protocols we checked that no non-disease-specific PrP<sup>Sc</sup>-like staining was obtained on tissue samples. In addition to SAF84, three different Mabs recognising different

**Table 2** Detection of abnormal PrP within the kidney and adrenal gland. Spinal cord and liver were used from this cheetah as positive and negative controls, respectively

Anti-prion Mabs	Spinal cord	Liver	Kidney	Adrenal gland
4F2 hu 79–92	+	–	+	+
SAF15 hu 79–92	+	–	+	+
12F10 hu 142–160	+	–	+	+
SAF84 hu 160–170	+	–	+	+

portions of the PrP (Table 2) were used on those tissues that had shown an unexpected PrP<sup>sc</sup> staining. Samples of liver and spinal cord from the cheetah were used as negative and positive controls, respectively (Table 2).

#### Tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry

Noradrenergic fibres of the autonomous nerve system were identified using a rabbit polyclonal antibody against TH (Institut Jacques Boy, France), the rate limiting enzyme in the synthesis of noradrenaline (Björklund and Hökfelt 1985). The complete procedure has been described in a previous paper (Bencsik et al. 2001).

## Results

### Nervous system

Cerebellar vacuolation seen after haematoxylin/eosin staining (Fig. 1a) was associated with pathological PrP<sup>sc</sup> detected by immunohistochemistry in the granular and molecular layers of the cerebellum (Fig. 1b, brown deposits). The PrP<sup>sc</sup> accumulation was intense and diffusely distributed within the granular layer. The molecular layer presented less accumulation of PrP<sup>sc</sup> which was also diffuse as in the granular layer (Fig. 1b, brown deposits).

Within the cerebral cortex abnormal PrP<sup>sc</sup> deposits were detected, mostly within the internal pyramidal layer V (data not shown). Immunostained neurones sometimes presented PrP<sup>sc</sup> deposits associated to nervous cell processes (data not shown).

In the brain stem, as well as in the spinal cord, grey matter was also clearly labelled, widespread fine and particulate deposits being seen within the neuropil of the dorsal and ventral horns (Fig. 1c, black deposits). At higher magnification, heavy coarsely granular PrP<sup>sc</sup> deposits were seen in the cytoplasm of neuronal cell bodies and associated to nervous cell processes (Fig. 1d, black deposits).

PrP<sup>sc</sup> was also detected in some but not all axons of nerves emerging from the lumbar spinal cord (Fig. 1e, black deposits). PrP<sup>sc</sup> staining was also seen with similar intensity in the brachial plexus within some axons (Fig. 1f, black deposits).

Within the retina (Fig. 1g), the stratum ganglionare, the stratum plexiform internum and externum presented strong PrP<sup>sc</sup> accumulation. A weaker staining was also observed in the inner nuclear layer and in the rod and cone layers.

The analysis of the autonomous nervous system did not reveal PrP<sup>sc</sup> accumulation within the enteric nervous system (Table 1).

### Lymphoid system

Within the lymph nodes, a dendritic type of PrP<sup>sc</sup> immunostaining was observed in secondary lymphoid follicles (Fig. 1h, red deposits). In the spleen sample it was not possible to detect PrP<sup>sc</sup> as an insufficient number of lymphoid follicles was observed in the available material. In the sample of small intestine Peyer's patches could not be found.

### Other peripheral tissues

The results of PrP<sup>sc</sup> immunohistochemical analysis in other peripheral tissues is summarised in Table 1. Among these, PrP<sup>sc</sup> deposits were detected within both kidney and adrenal gland.

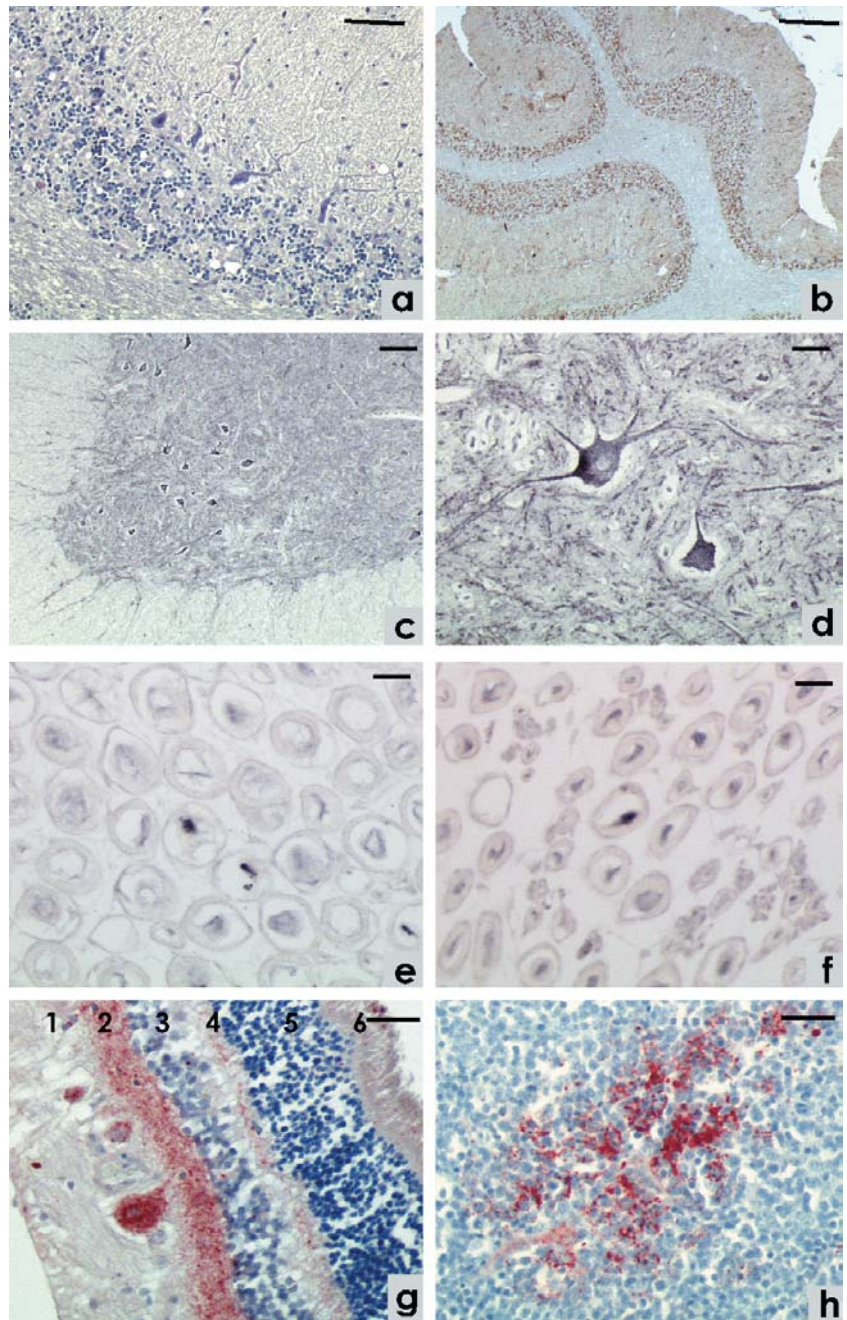
The analysis of the adrenal gland showed PrP<sup>sc</sup> accumulation (Fig. 2d, black deposits), obvious in the zona fasciculata and the zona reticularis. The two zona showed differences in the appearance of PrP<sup>sc</sup> immunolabelling: more membranous in the zona fasciculata (Fig. 2e, brown deposits) and cytoplasmic in the zona reticularis (Fig. 2f, brown deposits). A very weak staining was also observed in the medulla (data not shown). These results were attested by use of three anti-prion Mabs (Table 2), all of which showed a similar staining pattern to that of SAF84.

By contrast, in the adrenal gland of a scrapie-affected sheep, intense PrP<sup>sc</sup> immunolabelling was observable only within the medulla (Fig. 2g, black deposits) and often near the cells around venules and capillaries (data not shown).

In the cheetah, sympathetic nerve endings, investigated using TH immunohistochemistry, were located in the capsule of the adrenal gland. Noradrenergic endings were revealed in the zona glomerulosa and within the superior part of the zona fasciculata (Fig. 2a, brown deposits). The other parts of the zona fasciculata and reticularis presented no TH nerve endings (Fig. 2b). With regard to the medulla, a strong TH immunostaining was detected (Fig. 2c, brown deposits). In sheep, a similar distribution of TH labelling was observed within the adrenal gland (data not shown).

In the kidney, intense PrP<sup>sc</sup> immunolabelling was seen in a small percentage of glomeruli (10 labelled in ca 250 observable in the sample) within the cortical and juxtamedullary regions (Fig. 2h, brown deposits). A similar pattern was also seen in sections immunostained using the three other anti-prion Mabs (Table 2). In the

**Fig. 1a–h** Nervous and lymphoid abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) targeting. Cerebellar vacuolisation (**a**, haematoxylin/eosin staining; *bar* 100  $\mu$ m) was associated with PrP immunoreactivity within the molecular layer and granular layer of the cerebellum (**b**, brown deposits; *bar* 210  $\mu$ m). PrP<sup>Sc</sup> was detected using SAF84 monoclonal antibody (Mab) in the grey matter of the spinal cord (**c**, black deposits; *bar* 70  $\mu$ m). At the cellular level, granular deposits were detected within the cytoplasm of neurones and in the neuropil (**d**; *bar* 20  $\mu$ m). Some axons of nerves emerging from the spinal cord (**e**, black deposits; *bar* 8  $\mu$ m) and of the brachial plexus arm (**f**; *bar* 8  $\mu$ m) presented PrP<sup>Sc</sup> accumulation. In the retina PrP<sup>Sc</sup> accumulation (**g**, red deposits; *bar* 17  $\mu$ m) was detected the stratum ganglionare (1), stratum plexiform internum (2) and externum (4) and sometimes in the rod and cone layer (6), in the inner nuclear layer (3) but not in the outer nuclear layer (5). In lymph nodes (**h**, red deposits; *bar* 20  $\mu$ m) PrP<sup>Sc</sup> was detected in secondary lymphoid follicles



kidney of a scrapie affected sheep, no PrP<sup>Sc</sup> immunostaining was seen.

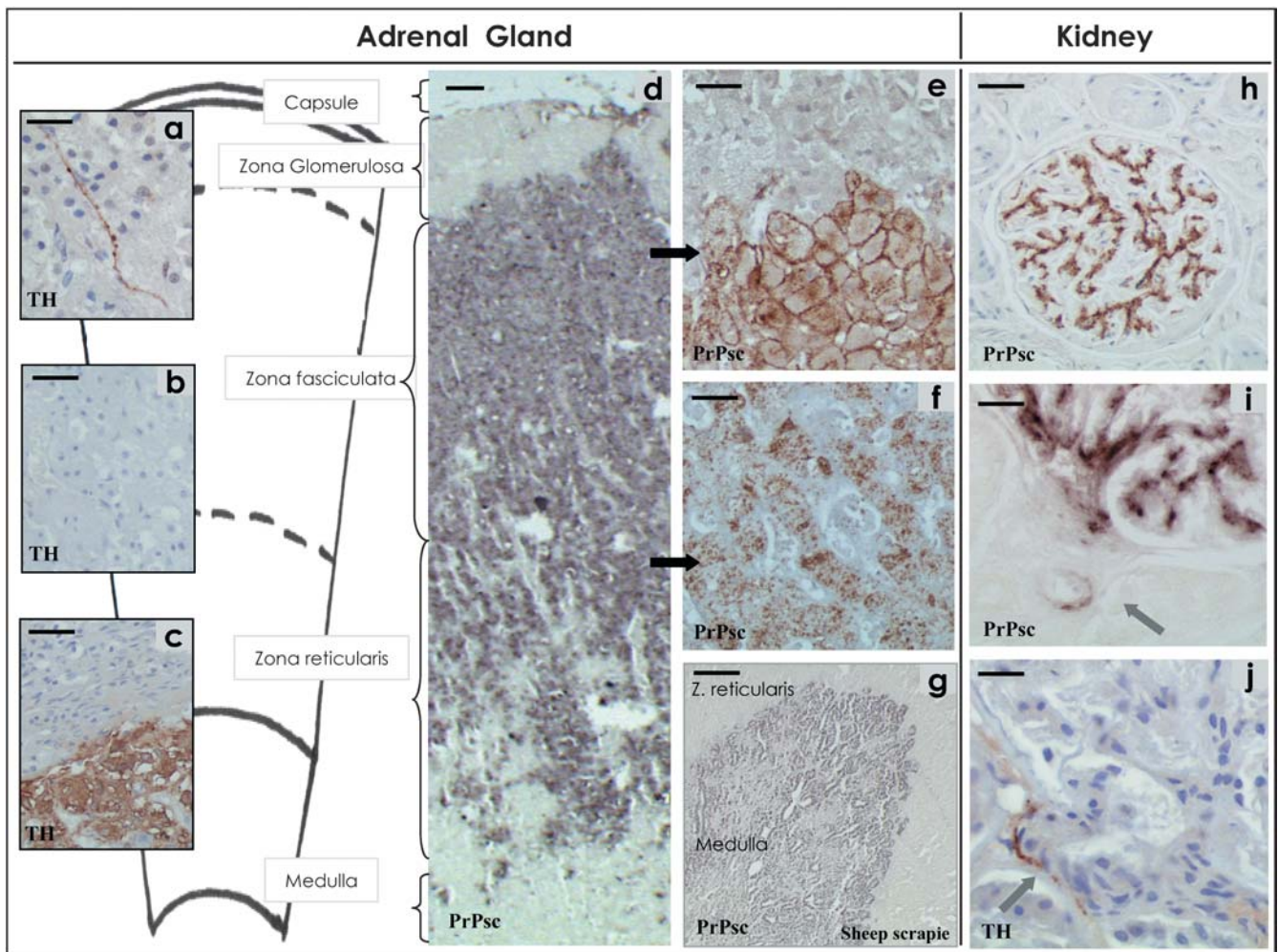
Beside the few PrP<sup>Sc</sup> labelled glomeruli, other PrP<sup>Sc</sup> deposits appeared around arterioles of some glomeruli (Fig. 2i, *arrow*, black deposits). Sympathetic nerve endings were located around blood vessels within all the renal tissue and particularly near glomeruli around the same arterioles that it was observed onto adjacent sections (Fig. 2j, *arrow*, brown deposits).

#### Immunohistochemical controls

No PrP<sup>Sc</sup>-like immunolabelling was seen, in any of these tissues, when the primary PrP antibody was omitted or when it was replaced by an irrelevant antibody (monoclonal mouse anti-vimentin).

#### Discussion

The clinical presentation with ataxia, a neurological sign invariably reported in previous FSE studies, along with the finding of cerebellar vacuolation, lead us to suspect a



**Fig. 2a–j** Tyrosine hydroxylase (*TH*) innervation and PrP<sup>sc</sup> deposits in the adrenal gland and in the kidney. The adrenal gland is organised in four major layers of which the zona glomerulosa (**a**; bar 10  $\mu$ m) and medulla (**c**; bar 20  $\mu$ m) contained TH labelling (brown staining) differently to zona reticularis (**b**; bar 20  $\mu$ m). In the cheetah, PrP<sup>sc</sup> detected with Mab SAF84, was observed mainly in the zona fasciculata and reticularis (**d**, dark deposits; bar 90  $\mu$ m) and weakly in the medulla. At higher magnification, types of deposits were different in zona fasciculata (**e**, brown deposits; bar

20  $\mu$ m) and zona reticularis (**f**, brown deposits; bar 20  $\mu$ m). In comparison, in adrenal gland of scrapie affected sheep, PrP<sup>sc</sup> accumulation was only observed in the medulla (**g**, black deposits; bar 75  $\mu$ m). In the kidney of the affected cheetah, PrP<sup>sc</sup> was detected in some glomeruli (**h**, brown deposits; bar 40  $\mu$ m). PrP<sup>sc</sup> accumulation was sometimes detected close to arterioles (**i**, dark deposits, arrow; bar 8  $\mu$ m) where TH endings were also detected (**j**, arrow, brown deposits; bar 8  $\mu$ m)

prion disease and this was finally established with the detection of PrP<sup>sc</sup> within the CNS. Among the other signs described here, locomotion abnormalities and hypersalivation have also been reported in domestic cat with FSE (Wyatt et al. 1991). However, in our case the hypersalivation may have been due to an eosinophilic stomatitis. Signs of hyperaesthesia, frequently described in other FSE cases (Wyatt et al. 1991; Baron et al. 1997), were present only in the end stages of the disease. The duration of the clinical signs was about 8 weeks which is within the range already described in domestic cats (from 3 to 8 weeks; Wyatt et al. 1991) and in other cheetah cases affected with FSE (from 8 to 10 weeks; Peet and Curran 1992; Baron et al. 1997).

The PrP<sup>sc</sup> pattern, at the cellular level, within the brain stem and the spinal cord was similar to that described in

another FSE-affected cheetah (Baron et al. 1997), in puma (Willoughby et al. 1992) and in domestic cats (cited in (Bratberg et al. 1995)). The use of different Mabs recognising different regions of the PrP sequence could help to characterise PrP immunostaining in intensity and type of deposits (Kovacs et al. 2002). Here these PrP Mabs always revealed the same PrP<sup>sc</sup> deposits although with different intensities, strongest results being obtained with SAF84.

In the retina, PrP<sup>sc</sup> was detected in both the inner and outer plexiform layers as has been observed in scrapie-affected sheep (Jeffrey et al. 2001) and in humans affected with sCJD and vCJD (Head et al. 2003). These layers are known to contain numerous synaptic junctions (Wolfgang 1995) and PrP<sup>sc</sup> deposition may lead to functional alterations such as those described in some

CJD-affected humans showing visual disturbances (Katz et al. 2000). Also, a retinal cytotoxic effect of 106–126 peptide of PrP was demonstrated *in vivo* in a rodent model (Ettaiche et al. 2000). However, no major visual abnormality was observed in this cheetah, although evidence for its existence may have been masked by ataxia.

In the other nervous system tissues, PrP<sup>sc</sup> accumulation was clearly demonstrated in some axons of motor nerves of the cheetah indicating a possible route of dissemination of the infectious agent within the body. Similar results were described in rodent models (Glatzel and Aguzzi 2000) as well as in naturally occurring scrapie (Groschup et al. 1996), in which infectivity was found in several motor nerves. It was not possible to detect PrP<sup>sc</sup> deposits in the enteric nervous system of the cheetah affected with FSE. This is in contrast to reports in the cat (Ryder et al. 2001), in scrapie-affected sheep (van Keulen et al. 1999, 2000) and in rodent models (Beekes et al. 1996; McBride et al. 2001).

The immune system was checked through the analysis of different lymphoid tissue samples. Most of them contained PrP<sup>sc</sup> as it was described in domestic cats affected with FSE (Ryder et al. 2001). The dendritic pattern of immunolabelling suggested that follicular dendritic cells (FDCs) were the main site of PrP<sup>sc</sup> deposition. This is in agreement with reports in humans affected with vCJD (Hill et al. 1999) as well as in scrapie in sheep (van Keulen et al. 1996; Lezmi et al. 2001) and in rodent models affected with TSEs (Jeffrey et al. 2000). The spleen did not show any PrP<sup>sc</sup> accumulation; however the sample did not contain secondary lymphoid follicles and thus no area with mature FDCs.

Among the other organs examined (Table 1), PrP<sup>sc</sup> was detected in only two, namely the kidney and the adrenal gland. This latter finding was unexpected as PrP<sup>sc</sup> positivity has not been reported in the adrenal glands of FSE-affected domestic cats (Ryder et al. 2001) although it has been described in sheep with scrapie (Jeffrey et al. 2001), in deer with chronic wasting disease (Sigurdson et al. 2001) and in humans affected with vCJD (Wadsworth et al. 2001). The adrenal gland of the single scrapie sheep examined in this study was also found to contain PrP<sup>sc</sup> but with a distribution pattern significantly different from that of the cheetah as only medulla was implicated. These differences between cheetah and sheep may be the result of a species effect or may be an effect of agent strain, or both, or may simply reflect alternative modes of agent spread within the organ.

In sheep scrapie, the sympathetic nervous system has been implicated as a site of PrP<sup>sc</sup> accumulation, suggesting a role as carrier of infectious particles (Bencsik et al. 2001) and the pattern of PrP<sup>sc</sup> immunostaining in the adrenal medulla is suggestive of the fine processes of nerve endings. The TH immunostaining data showed that the sympathetic innervation of adrenal gland is similar between sheep and cheetah, strong in the medulla, weak in the zona glomerulosa and absent in the zona reticularis. Thus, the implication of sympathetic nerves in the spread

of PrP<sup>sc</sup> within the adrenal gland of the cheetah is in doubt as these two last regions, poor in TH processes, are the richer in the PrP<sup>sc</sup> accumulation. These areas synthesise different hormones, the secretions of which are controlled in large part by the hypothalamic–pituitary axis via adrenocorticotrophic hormone (ACTH; Guyton and Hall 2000). In sheep affected with scrapie as well as in rodent model affected with TSEs, adrenal gland enlargement (Kim et al. 1988; Schelcher et al. 1999) and a hypercorticism syndrome, associated with increased ACTH secretion, has been reported (Schelcher et al. 1999; Gayraud et al. 2000). Thus, as has been suggested for scrapie (Schelcher et al. 1999), determination of cortisol metabolite concentrations in plasma or urine might usefully be considered in future cases where cheetah FSE is suspected, as it might offer a non-invasive aid to diagnosis.

Interestingly, we describe the accumulation of PrP<sup>sc</sup> in some glomeruli of the kidney of a cheetah affected with FSE. The pathological significance of these deposits is not clear in part because a recent study reported this observation not only in cats affected with FSE but also in a control case (Ryder et al. 2001). Anyway, in our case, this renal accumulation may indicate a haematogenous way of spread of infectious/PrP<sup>sc</sup> particles and showed the possibility of a PrP<sup>sc</sup> accumulation in the basement membrane that ultrafilters the plasma. However, the glomerular filter is relatively impermeable to plasma proteins as the basement membrane prevents their filtration, in part because of its strong negative electrical charges (Guyton and Hall 2000). But in some cases, as for instance in hypercorticism, proteins are able to pass through the glomerular filtrate. In a recent study it has been demonstrated that in hamsters, cattle and humans suffering from TSE, a form of PrP<sup>sc</sup> was found in urine (Shaked et al. 2001) suggesting that PrP<sup>sc</sup> is able to go through the filtrate of the kidney.

On the other hand the sympathetic nervous system, which is well represented in the kidney and which allows a physiologic control of glomerular filtration (Guyton and Hall 2000), is potentially involved in renal PrP<sup>sc</sup> accumulation. In our study some PrP<sup>sc</sup> deposits were observed in arterioles of glomeruli, in which labelling of sympathetic nerves was also seen thus sustaining this possible hypothesis.

The study of this FSE case revealed PrP<sup>sc</sup> deposition in nervous and also in lymphoid tissues such as in lymph nodes, thus demonstrating the interest of biopsies to provide an antemortem diagnosis in future suspected cases as it was proposed in sheep affected with scrapie by third eyelid biopsy (O'Rourke et al. 2002). Interestingly PrP<sup>sc</sup> accumulation was also detected in kidney and adrenal gland raising questions of physiopathological considerations as PrP<sup>sc</sup>/infectious particles spread. These considerations are important as reproductive difficulties in cheetah commonly lead to exchanges between zoos and thus lead to a potential dissemination of the infectious agent. Further investigations, such as inoculation to mice, need to be carried out in order to clarify the status of these organs with regard to infectivity.

**Acknowledgements** This work was supported in parts by grants from the "Programme National de Recherches sur les ESST et les Prions". Stéphane Lezmi was financially supported by a grant from Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). We gratefully acknowledge Dr. R. Pariaut (Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France) for helpful discussions.

## References

- Baron T, Belli P, Madec JY, Moutou F, Vitaud C, Savey M (1997) Spongiform encephalopathy in an imported cheetah in France. *Vet Rec* 141:270–271
- Beekes M, Baldauf E, Diringer H (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77:1925–1934
- Bell JE (1996) Neuropathological diagnosis of human prion disease. PrP immunocytochemical techniques. In: Baker HRRM (ed) *Prion disease*. Humana, Totowa, pp 59–83
- Bell JE, Gentleman SM, Ironside JW, McCardle L, Lantos PL, Doey L, Lowe J, Fergusson J, Luthert P, McQuaid S, Allen IV (1997) Prion protein immunocytochemistry: UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:26–35
- Bencsik A, Lezmi S, Baron T (2001) Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: A possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. *J. Neurovirol.* 7:447–453.
- Björklund A, Hökfelt T (1985) *Handbook of chemical neuroanatomy—Classical transmitters in the CNS*. Amsterdam, Elsevier.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309–1311
- Bratberg B, Ueland K, Wells G (1995) Feline spongiform encephalopathy in a cat in Norway. *Vet Rec* 136:444
- Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383:685–690
- Deber SOS, Baron TGM, Bencsik AA (2001) Immunohistochemistry of PrPsc within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. *J Histochem Cytochem* 49:1519–1524
- Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andréoletti O, Eychenne F, Vu Tien Khang J, Poivey JP, Lantier F, Laplanche J-L (1999) Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* 144:431–445
- Ettaiche M, Pichot R, Vincent JP, Chabry J (2000) In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106–126. *J Biol Chem* 275:36487–36490
- Fraser H, Pearson GR, McConnell I, Bruce ME, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ (1994) Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 134:449–449
- Gayraud V, Picard-Hagen N, Grino M, Sauze N, Grandjean C, Galea J, Andreoletti O, Schelcher F, Toutain PL (2000) Major hypercorticism is an endocrine feature of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology* 141:988–994
- Glatzel M, Aguzzi A (2000) PrPC expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* 81:2813–2821
- Groschup M, Weiland F, Straub O, Pfaff E (1996) Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis* 3:191–195
- Guyton M, Hall J (2000) *Textbook of medical physiology*, 10th edn. Saunders, Philadelphia
- Head MW, Northcott V, Rennison K, Ritchie D, McCardle L, Bunn TJR, McLennan NF, Ironside JW, Tullo AB, Bonshek RE (2003) Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:342–346
- Hill A, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448–450
- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A (1999) Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353:183–189
- Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* 141:809–824
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83:2897–2905
- Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL (2000) Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol* 23–38
- Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, BegaraMcGorum I, Gonzalez L (2001) Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol* 125:48–57
- Katz BJ, Warner JE, Digre KB, Creel DJ (2000) Selective loss of the electroretinogram B-wave in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuroophthalmol* 20:116–118
- Keulen LJM van, Schreuder BEC, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld JPM (1996) Immunohistochemical detection of prion in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 34:1228–1231
- Keulen LJM van, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM, Smits MA (1999) Scrapie-associated prion protein in the gastro-intestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* 121:55–63
- Keulen LJM van, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM, Smits MA (2000) Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol* 57–71
- Kim Y, Carp R, Callahan S, Wisniewski H (1988) Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *Proc Soc Exp Biol Med* 189:21–27
- Kovacs GG, Head MW, Hegyi I, Bunn TJ, Flicker H, Hainfellner JA, McCardle L, Laszlo L, Jarius C, Ironside JW, Budka H (2002) Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol* 12:1–11
- Lezmi S, Bencsik A, Baron T (2001) CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrPsc accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 82:1–8
- McBride PA, SchulzSchaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75:9320–9327
- O'Rourke KI, Duncan JV, Logan JR, Anderson AK, Norden DK, Williams ES, Combs BA, Stobart RH, Moss GE, Sutton DL (2002) Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:966–971
- Peet R, Curran J (1992) Spongiform encephalopathy in an imported cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Aust Vet J* 69:171
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136–144
- Prusiner SB (1997a) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278:245–251
- Prusiner SB (1997b) Transmissible encephalopathies (prion diseases). *Structural biology and genetics of prions*. *J Neurovirol* 3:S21
- Ryder SJ, Wells GAH, Bradshaw JM, Pearson GR (2001) Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 148:437–441
- Schelcher F, Picard-Hagen N, Laroute V, Gayraud V, Popot MA, Andreoletti O, Toutain PL (1999) Corticoid concentrations are increased in the plasma and urine of ewes with naturally occurring scrapie. *Endocrinology* 140:2422–2425

- Shaked GM, Shaked Y, KarivInbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R (2001) A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Cell* 276:31479–31482
- Sigurdson CJ, Spraker TR, Miller MW, Oesch B, Hoover EA (2001) PrPCWD in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *J Gen Virol* 82:2327–2334
- Somerville RA, Birkett CR, Farquhar CF, Hunter N, Goldmann W, Dornan J, Grover D, Hennion RM, Percy C, Foster J, Jeffrey M (1997) Immunodetection of PrPsc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol* 78:2389–2396
- Wadsworth JDF, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358:171–180
- Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419–420
- Willoughby D, Kelly D, Lyon D, Wells G (1992) Spongiform encephalopathy in a captive puma. *Vet Rec* 131:431–434
- Wolfgang K (1995) *Atlas d'histologie*, 2nd edn. Médecine-Sciences Flammarion, Paris
- Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GAH, Wilesmith JW (1991) Naturally occurring scrapie-like encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* 129:233–236



**CORRESPONDENCE**

**Open Access**

# Is the presence of abnormal prion protein in the renal glomeruli of feline species presenting with FSE authentic?

Stéphane Lezmi, Thierry GM Baron, Anna A Bencsik\*

## Abstract

In a recent paper written by Hilbe et al (*BMC vet res*, 2009), the nature and specificity of the prion protein deposition in the kidney of feline species affected with feline spongiform encephalopathy (FSE) were clearly considered doubtful. This article was brought to our attention because we published several years ago an immunodetection of abnormal prion protein in the kidney of a cheetah affected with FSE. At this time we were convinced of its specificity but without having all the possibilities to demonstrate it. As previously published by another group, the presence of abnormal prion protein in some renal glomeruli in domestic cats affected with FSE is indeed generally considered as doubtful mainly because of low intensity detected in this organ and because control kidneys from safe animals present also a weak prion immunolabelling. Here we come back on these studies and thought it would be helpful to relay our last data to the readers of *BMC Vet res* for future reference on this subject. Here we come back on our material as it is possible to study and demonstrate the specificity of prion immunodetection using the PET-Blot method (Paraffin Embedded Tissue - Blot). It is admitted that this method allows detecting the Proteinase K (PK) resistant form of the abnormal prion protein (PrPres) without any confusion with unspecific immunoreaction. We re-analysed the kidney tissue versus adrenal gland and brain samples from the same cheetah affected with TSE using this PET-Blot method. The PET-Blot analysis revealed specific PrPres detection within the brain, adrenal gland and some glomeruli of the kidney, with a complete identicalness compared to our previous detection using immunohistochemistry. In conclusion, these new data enable us to confirm with assurance the presence of specific abnormal prion protein in the adrenal gland and in the kidney of the cheetah affected with FSE. It also emphasizes the usefulness for the re-examination of any available tissue blocks with the PET-Blot method as a sensitive complementary tool in case of doubtful PrP IHC results.

## Introduction

In a recent article relating to feline spongiform encephalopathy (FSE) in cats, the authors described the distribution of abnormal prion protein in different tissues detected using immunohistochemistry (IHC) method [1]. They described labelling of glomerular structures in the kidney of the affected cats with FSE as well as in control healthy cats using two anti-prion antibodies. Similar features were described in another study published earlier [2] and in which some control cats were also reported with traces of labelling in some glomerular structures of the kidney. With regard to these results,

the presence of abnormal prion proteins in some renal glomeruli in feline species affected with FSE was considered doubtful by these authors and a non specific binding of antibody highly suspected.

Interestingly, we also reported in a previous work [3] the accumulation of deposits of prion protein in various organs of a cheetah affected with FSE. In that study we illustrated a dense accumulation of prion protein in some glomeruli of the kidney and also unexpected prion deposits in the cortex of the adrenal gland. Even if we used four different anti-prion antibodies to characterise these prion deposits, and also because we did not have the opportunity to test a kidney and adrenal gland from a healthy control cheetah at that time, the hypothesis of a non specific antibody binding could not be completely ruled out. Recently, we reported 2 other FSE cases in

\* Correspondence: [anna.bencsik@anses.fr](mailto:anna.bencsik@anses.fr)

French agency for food, environmental and occupational health safety (Anses) Unité ATNC, 31, avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France

cheetahs, remarkable for the reason that they may represent a first probable case of maternal transmission of FSE [4]. However, in these cases, kidneys as well as adrenal glands were not available. To get rid of the question of the specificity of our observation in adrenal gland and kidneys described in our article of 2003, it is possible today to evaluate the specificity of the abnormal prion protein using the PET-blot method (Paraffin Embedded Tissue - Blot). This method offers indeed a greater specificity when compared to IHC [5], because during the PET-Blot process, a severe proteinase K treatment is applied that leads to complete digestion of cellular form of the prion as well as other proteins present in the tissues. Thus, only the PrP resistant form to PK digestion (the PrP form usually considered to be detected by western blot method) remains detectable, assuring the specificity of the detection. This method has already proved to be a highly sensitive and specific method to study different prion diseases in different species such as human TSEs [6-8], cattle BSE [5], sheep scrapie cases [9], experimental BSE and scrapie in mice [10], in hamster [11,12]. In addition it has been used with similar sensitivity to study PrPres in numerous peripheral tissues in humans [13] or such as placenta, muscle, skin in the sheep species [14-16]. In that context PET-Blot technique appeared as an excellent method for the detection of the regional distribution of the PK resistant PrP in the central and peripheral tissues from TSE affected humans and animals. We thus performed this PET-Blot analysis on the cerebellum, adrenal gland and kidney of the cheetah affected with FSE reported in our article published in 2003, in order to demonstrate the specificity of PrPres accumulation in these tissues.

### Materials and methods

The tissue samples were the same as those used in our previous study in which the tissue preparation is described in detail [3]. To visualize *in situ* the resistant form of abnormal PrP (PrP<sup>res</sup>), after digestion with high concentration of proteinase K (PK), the PET-blot method was also used as previously described [10]. Brain sections at the level of the obex from sheep affected or not with scrapie were used as positive and negative tissue control respectively. Concisely, paraffin sections of 5 µm were cut from cerebellum, adrenal gland and kidney paraffin blocks and collected onto 0.45 µm pore nitrocellulose membranes. The membranes were dewaxed and dried at room temperature (RT). After wetting with TBST (10 mM Tris HCl, pH 7.8; 100 mM NaCl; 0.05% Tween 20) enzymatic digestion was performed using 250 µg/ml PK in a buffer made of 10 mM Tris HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.1% Brij 35, for 8 hours at 55°C, so that only PK resistant protein (PrP<sup>res</sup>) would be detectable. Membranes were treated

with guanidine isothiocyanate (3 M, 10 min), then thoroughly washed in TBST. Immunodetection was performed after pre-incubation in blocking solution (skimmed milk diluted at 0.2% in TBST). The monoclonal antibody used was SAF84 (1/2500) for a night at room temperature. A phosphatase alkaline coupled anti-mouse antibody was used as secondary antibody (1/500, 37°C, 45 min). Before revelation, the pH was adjusted to 9 by incubating membranes in NTM buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Finally NBT/BCIP was used to visualize the reaction product (dark-blue deposits). PET-blot membranes were assessed using a stereo-microscope (Olympus, France) coupled to an image analysis workstation Explora Nova, La Rochelle, France. Immunohistochemical detection of the pathological form of the prion protein (PrP<sup>d</sup> for disease-related) was performed using the SAF84 monoclonal antibody as published previously [4]. A peroxidase-labelled avidin-biotin complex was applied to amplify the signal. The presence of PrP<sup>d</sup> was revealed using DAB intensified with chloride nickel giving dark deposits. The absence of detection of PrP<sup>res</sup> in the obex of scrapie-free sheep combined with the presence of PrP<sup>res</sup> seen in the obex of the scrapied sheep allowed to validate the PET-Blot procedure (data not shown).

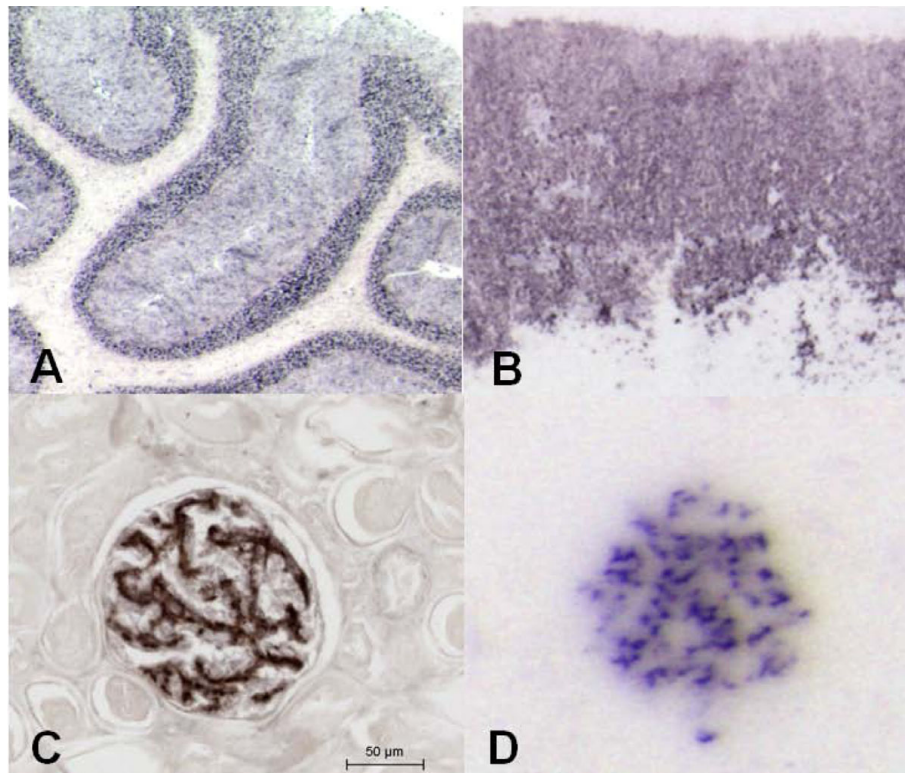
### Results

#### PET-Blot analysis reveals specific PrPres detection

The abnormal form of prion protein characterized by its resistance to PK digestion was detected with high intensity in each sample analysed. When compared to our IHC results [3] we clearly identify on PET-blot an identical distribution of abnormal prion protein in the different layers of the cerebellum (figure 1 A) in the cheetah affected with FSE. As an internal control, the absence of PrPres deposition was also confirmed in the white matter of the cerebellum (figure 1 A). Similarly, an intense abnormal prion deposition was visualized in the cortex of the adrenal gland, in the zona fasciculata and zona reticularis as previously reported (figure 1B). In the kidney some glomeruli were also densely labelled (figure 1D) reproducing the glomerular labelling observed by IHC observable here as dark deposits of DAB intensified using chloride nickel (figure 1C).

### Discussion

These new results enable us to confirm confidently the presence of specific abnormal prion protein in the adrenal gland and in the kidney of the cheetah affected with FSE. This question is important because it becomes evidenced that urine may sustain transmission of certain forms of the transmissible spongiform encephalopathy (TSE) diseases, such as hamsters carrying infectious particles. More recently the kidney was found to



**Figure 1** PET-Blot analyses substantiate the specific PrPres detection in the kidney of cheetah with FSE. PET-Blot analysis allows to reveal the presence of PrPres (dark deposits) in the cerebellum (A) as well as in the adrenal gland (zona fasciculata and reticularis) (B). In the kidney from a cheetah with FSE, using immunohistochemistry, PrPsc is detected in glomerules (C), the specificity of this intense labeling can be attested by the presence of the pathological form defined by its resistance to an enzymatic digestion (PrPres) detected using the PET-Blot method (D).

accumulate abnormal PrP in other species too such as sheep [17,18], and the urinary secretion of pathological form of PrP is seriously considered [19,20]. Even if the origin of the production of this infectious prion particles are not yet clearly identified, the specific detection of PrPres within the glomeruli of the kidney of cheetah with FSE is in total accordance with this point.

The present study shows that the use of the PET-blot method would have been very interesting to test to clarify the presence of prion in the kidney of affected cats with FSE as well as in controls. This approach could have also a great interest in the characterization of the PrP staining observed in the adrenal gland. In the study of Hilbe et al [1], the adrenal gland staining was reported as being weak and only in the medulla, on the contrary to our finding in the cheetah FSE in which the staining was very weak in the medulla and particularly intense in the zona fasciculata and reticularis [3]. Thus it would be motivating to validate also the specificity of their labelling using the PET-Blot analysis, still because cats and cheetahs are not belonging to the same species, the tissue targeting of PrPsc deposition may be different.

Finally, the data reported here demonstrate the specificity of the detection of abnormal prion protein in the kidney as well as in adrenal gland in cheetah affected with FSE. It also emphasizes the need for the re-examination of available tissue blocks with the PET-Blot method as a sensitive complementary tool in case of doubtful PrP IHC results.

#### Authors' contributions

AB conceived and designed the study, SL performed the PET-Blot experiments, AB and SL analyzed the data and wrote the paper. TB had overall responsibility as head unit. All co-authors have read and approved the final manuscript.

Received: 1 April 2010 Accepted: 4 August 2010

Published: 4 August 2010

#### References

1. Hilbe MM, Soldati GG, Zlinszky KK, Wunderlin SS, Ehrensperger FF: Immunohistochemical study of PrP(Sc) distribution in neural and extraneural tissues of two cats with feline spongiform encephalopathy. *BMC Vet Res* 2009, **5**:11.
2. Ryder SJ, Wells GA, Bradshaw JM, Pearson GR: Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 2001, **148**(14):437-441.
3. Lezmi S, Bencsik A, Monks E, Petit T, Baron T: First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrP(sc)

- analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochem Cell Biol* 2003, **119**(5):415-422.
- Bencsik A, Debeer S, Petit T, Baron T: Possible case of maternal transmission of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah. *PLoS One* 2009, **4**(9):e6929.
  - Schulz-Schaeffer WJ, Fatzner R, Vandeveld M, Kretzschmar HA: Detection of PrPsc in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol* 2000, **16**(Supplément):173-180.
  - Bergstrom AL, Heegaard PM, Dyrbye H, Lind P, Laursen H: Localization of disease-related PrP in Danish patients with different subtypes of prion disease. *Clin Neuropathol* 2009, **28**(5):321-332.
  - Peden AH, Ritchie DL, Head MW, Ironside JW: Detection and localization of PrPsc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 2006, **168**(3):927-935.
  - Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA: The Paraffin-Embedded Tissue Blot Detects PrPsc Early in the Incubation Time in Prion Disease. *Am J Pathol* 2000, **156**(1):51-56.
  - Wemheuer WM, Benestad SL, Wrede A, Wemheuer WE, Brenig B, Bratberg B, Schulz-Schaeffer WJ: Detection of classical and atypical/Nor98 scrapie by the paraffin-embedded tissue blot method. *Vet Rec* 2009, **164**(22):677-681.
  - Lezmi S, Bencsik A, Baron T: PET-blot analysis contributes to BSE strain recognition in C57Bl/6 mice. *J Histochem Cytochem* 2006, **54**(10):1087-1094.
  - McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringner H, Kretzschmar HA, Beekes M: Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 2001, **75**(19):9320-9327.
  - Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Kratzel C, Mai J, Beekes M: Preclinical deposition of pathological prion protein PrPsc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* 2004, **113**(10):1465-1472.
  - Ritchie DL, Head MW, Ironside JW: Advances in the detection of prion protein in peripheral tissues of variant Creutzfeldt-Jakob disease patients using paraffin-embedded tissue blotting. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004, **30**:360-368.
  - Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbiere F, Ferre P, Foucras G, et al: PrPsc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* 2004, **10**(6):591-593.
  - Lacroux C, Corbiere F, Tabouret G, Lugan S, Costes P, Mathey J, Delmas JM, Weisbecker JL, Foucras G, Cassard H, et al: Dynamics and genetics of PrPsc placental accumulation in sheep. *J Gen Virol* 2007, **88**(Pt 3):1056-1061.
  - Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Wrede A, Wemheuer W, Brenig B, Kratzel C, Lemmer K, Beekes M: Accumulation of pathological prion protein PrPsc in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog* 2007, **3**(5):e66.
  - Ligios C, Cancedda GM, Margalith I, Santucci C, Madau L, Maestrone C, Basagni M, Saba M, Heikenwalder M: Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS One* 2007, **2**(9):e859.
  - Siso S, Jeffrey M, Steele P, McGovern G, Martin S, Finlayson J, Chianini F, Gonzalez L: Occurrence and cellular localization of PrPd in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation. *J Pathol* 2008, **215**(2):126-134.
  - Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C: Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett* 2008, **582**(21-22):3161-3166.
  - Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG: Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(9):1406-1412.

doi:10.1186/1746-6148-6-41

**Cite this article as:** Lezmi et al.: Is the presence of abnormal prion protein in the renal glomeruli of feline species presenting with FSE authentic?. *BMC Veterinary Research* 2010 **6**:41.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## Article 3

---

### **CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrP<sup>sc</sup> accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep**

STÉPHANE LEZMI, ANNA BENCSIK, THIERRY BARON

*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, vol.82, pp1-8

La tremblante naturelle comme le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et les modèles murins infectés par des souches de tremblante, sont des maladies neurodégénératives fatales. L'agent responsable de ces pathologies est étroitement associé à la PrP<sup>sc</sup>, isoforme anormale de la protéine prion cellulaire. Avant d'affecter le SNC, l'agent infectieux envahit et se réplique dans les organes lymphoïdes comme la rate, les amygdales et les nœuds lymphatiques. Les cellules folliculaires dendritiques (FDCs) sont probablement le site de réplication dans les organes lymphoïdes chez le mouton comme cela a été démontré dans les modèles expérimentaux murins infectés par certaines souches de tremblante. Chez le mouton, des anticorps spécifiques reconnaissant les FDC manquent. Le CNA42, un anticorps pouvant identifier les FDC chez l'homme, a été utilisé pour localiser ces cellules chez le mouton. De plus comme les prétraitements nécessaires à la détection de la PrP<sup>sc</sup> altèrent peu l'antigène reconnu par le CNA42, il a été possible de démontrer par double marquage que les FDC accumulent la PrP<sup>sc</sup> dans la rate de moutons atteints de tremblante. Ainsi cet anticorps représente un outil d'intérêt pour l'identification des FDC et de leurs rôles physiopathologiques au cours de la maladie chez les ovins.

# CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrPsc accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep

Stéphane Lezmi<sup>\*</sup>, Anna Bencsik, Thierry Baron

*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité de Virologie,  
ATNC, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France*

Received 5 December 2000; received in revised form 25 April 2001; accepted 25 April 2001

---

## Abstract

Natural scrapie, new variant Creutzfeldt-Jakob disease and murine experimental transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are fatal neurodegenerative disorders. The agent responsible for these diseases is closely related to PrPsc, an abnormal isoform of the cellular prion protein. Before reaching the brain, it invades and replicates in lymphoid organs such as spleen, tonsils and lymph nodes. Follicular dendritic cells (FDC) may support the prion replication in lymphoid tissues of sheep as shown in murine models infected with scrapie. In sheep, specific antibodies recognising FDC are lacking. The CNA42 mAb, directed against human FDC was used to identify these cells in sheep spleen. As well as showing that the pre-treatments needed for immunohistochemical detection of PrPsc did not prevent labelling by the CNA42 mAb, accumulation of PrPsc in FDC of spleens of scrapie affected sheep was demonstrated using a double immunolabelling strategy. Thus, the CNA42 antibody represents a suitable tool to identify FDC and investigate their role in natural sheep scrapie. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* CNA42 mAb; Follicular dendritic cells (FDC); Lymphoid tissue; Prion; Scrapie; Sheep

---

## 1. Introduction

The transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are neurodegenerative disorders which include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, scrapie in sheep and goats or bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle. Within lymphatic tissues, the germinal centre micro-environment has been more particularly incriminated in peripheral TSE agent replication with the implication of follicular dendritic cells (FDC) that also play a critical

---

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +33-478-72-65-43; fax: +33-478-61-91-45.  
*E-mail address:* s.lezmi@caramail.com (S. Lezmi).

role for neuroinvasion in scrapie murine models (Kitamoto et al., 1991; Aguzzi, 1997; Brown et al., 1999; Klein et al., 1997; Raeber et al., 1999a,b; Sy and Gambetti, 1999; Bruce et al., 2000). In these experimental scrapie models, it was possible to identify precisely FDC using specific monoclonal antibodies (FDC-M1, FDC-M2) (Kosco et al., 1992; Brown et al., 1999), but in naturally occurring scrapie, FDC were incriminated as PrPsc accumulating cells only on the basis of morphological and histological criteria of PrPsc deposits within the germinal centres (van Keulen et al., 1996). Here, we checked the possibility to use the CNA42 monoclonal antibody that recognises a 120 kDa antigen expressed on human FDC (Delsol et al., 1993). This antibody has been previously shown to be able to identify FDC population in other species such as calf, dog, and lambs (Raymond et al., 1997; Bencsik et al., 2000). In the present study, we have more particularly analysed the suitability between FDC identification using the CNA42 mAb and the pre-treatments required for PrPsc detection in human and sheep spleen samples.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Tissues*

Spleens from three sheep (3-year-old) with severe symptoms of scrapie, with a susceptible genotype to the disease (AV136RR154QQ171) (Bossers et al., 1996; Hunter et al., 1996; Elsen et al., 1999) were fixed in 10% buffered formalin for a week. As a control, the spleen of a healthy sheep, with a genotype known as resistant to scrapie (AA136RR154RR171) (Bossers et al., 1996; Hunter et al., 1996; Elsen et al., 1999) was immersed in buffered 10% formalin. Once fixed, samples were rinsed for a week in cold phosphate buffer (PBS 0.1 M, pH 7.4) then routinely dehydrated and embedded in paraffin. To ensure adhesion, sections (5  $\mu$ m) of spleen were collected onto pre-treated glass slides (Polylysin or StarFrost, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) and baked overnight at 57°C. Human spleen samples were used as controls for CNA42 labelling of FDC (courtesy of N. Kopp, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Lyon, France). These human samples were first immersed in formic acid (98%) for 1 h in order to re-produce the routinely applied treatment used in vCJD suspicion, then fixed in 10% formalin.

### *2.2. Antibodies*

PrPsc in the scrapie affected sheep was detected using 4F2 (Hu PrP 79–92) monoclonal antibody (kindly provided by J. Grassi SPI/CEA, Saclay, France) (Krasemann et al., 1996).

The follicular dendritic cell (FDC) population of the spleen was identified using a monoclonal antibody, CNA42 (culture supernatant) (courtesy of G. Delsol, CHU Purpan Toulouse, France) (Raymond et al., 1997).

### *2.3. Immunostaining procedure*

The slides were de-waxed and re-hydrated in water, then used for immunohistochemical analysis. Every step was done at room temperature. For PrPsc detection and to

assess the specificity of pathological PrPsc immunostaining several pre-treatments were necessary. Hydrated autoclaving (immersed in PBS 0.1 M pH 7.4, 15 min at 121°C in a pressure cooker), combined with an immersion for 15 min in 98% formic acid (Merck), proteinase K treatment (Roche, 20 µg/ml in PBS 0.1 M, pH 7.4, 37°C, for 15 min), or guanidium thiocyanate (Sigma, 4 M, for 60 min, at room temperature) were applied to spleen sections and led to the detection of the PrPsc form solely (van Keulen et al., 1996). For the FDC immunodetection slides were first treated in PBS (0.1 M pH 7.4) for 20 min at 450 W in a micro-wave oven in order to enhance the staining by unmasking epitopes of FDC.

Once pre-treatments applied, endogenous peroxidase activity was inhibited with 10 min incubation in 3% hydrogen peroxide in PBS 0.1 M. Unspecific antigenic sites were blocked by a 30 min step in blocking reagent (Roche). Then the sections were incubated overnight with the primary antibody (4F2 1/200; CNA42 undiluted culture supernatant). The spleen sections were rinsed before the detection of the primary antibody using the ABC system (Vector), using first the biotinylated anti-mouse antibody (Zymed) (30 min) then a peroxidase-labelled avidin–biotin complex (ABC) (30 min). These steps were followed by a 5 min wash in PBS 0.1 M and finally peroxidase was revealed by immersing the sections in aminoethylcarbazole solution (AEC, Dako) giving red deposits or in DAB intensified with NiCl<sub>2</sub> (Biosys) giving black deposits.

#### 2.4. Double staining procedure

To identify the nature of PrP expressing cells, we developed a double immunostaining procedure using 4F2 and CNA42 mAb, allowing the simultaneous detection of PrPsc and FDC, by modulating the pre-treatments sequence (4 min in formic acid and 10 min in PK instead of 15 min for each and maintaining the hydrated autoclaving step, 15 min at 121°C). Following the first immunohistochemistry procedure, the second one was performed, beginning with a new blocking step (Roche–Boehringer). The procedure applied was the same as described above. To reveal the histological organisation of the spleen, a very weak staining was obtained using aqueous haematoxylin. Finally, slides were mounted with Crystal Mount medium and observed under a microscope coupled to an image analysis workstation (Biocom, Les Ulis, France).

#### 2.5. Controls

The specificity of the double immunohistochemical labelling procedure was evaluated using healthy sheep spleen as well as the human spleen sample. On these samples, we checked that only CNA42 immunolabelling was observable and that the second immunostaining step did not generate any additional reaction due to possible remnant peroxidase activity from the first incubation enzyme. In addition, on scrapie sheep spleen, the non-specific binding was studied omitting each time the primary antibody (4F2 or CNA42). In these double labelling control experiments, we checked that in each case only one type of staining was obtained.



### 3. Results

#### 3.1. PrPsc in spleen of scrapie affected sheep

No labelling was found in the spleen of healthy sheep with genotype known as resistant to scrapie (Fig. 1A). In the spleen of scrapie affected sheep, PrPsc was detectable within the secondary lymphoid follicles (Fig. 1B and C), in the germinal center, but never in cortical areas, red pulp, nor in blood vessels. PrPsc staining appeared as fine deposits covering the cytoplasm of the cells. Some labelled cells contained phagocytosed debris (Fig. 1C

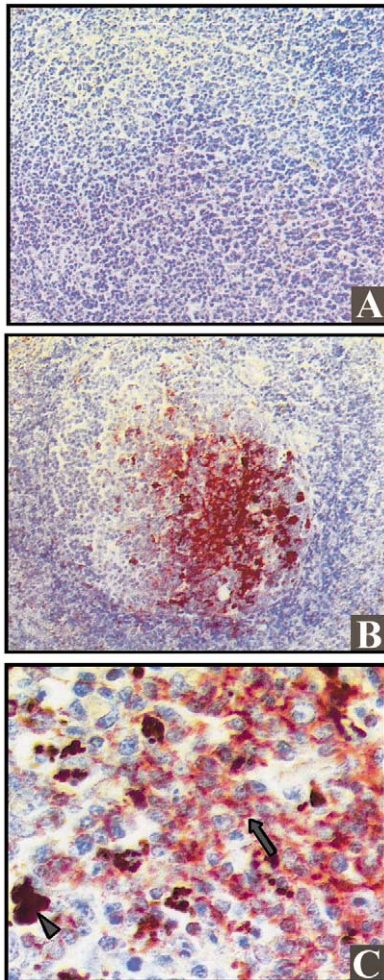


Fig. 1. In contrast to the spleen of a healthy sheep (A, 100 $\times$ ) in scrapie affected sheep, PrPsc immunoreactivity was detected using 4F2 antibody within the germinal centers of secondary lymphoid follicles (B, 100 $\times$ ). The immunostaining depicted in a dendritic shape and many cell processes (C, arrow, 200 $\times$ ) and in more dense deposits evident in the peripheral area of the germinal centers (C, arrowhead, 200 $\times$ ).

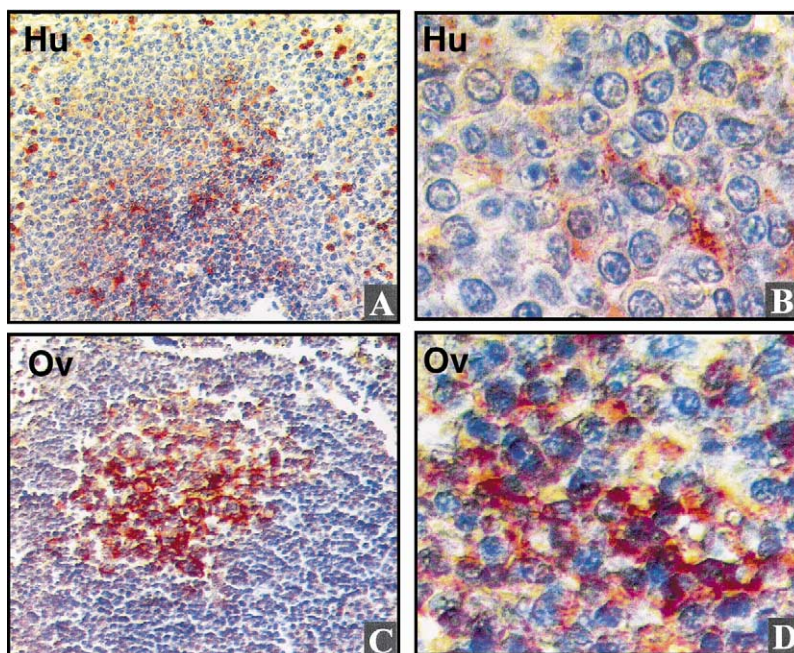


Fig. 2. The FDC were identified using CNA42 mAb in both human (Hu) spleen (A, 100 $\times$ ; B, 400 $\times$ ) and ovine (Ov) spleen (C, 100 $\times$ ; D, 400 $\times$ ) within the germinal centers of secondary lymphoid follicles. At a higher magnification, the dendritic shape was observed in the two species (B, D).

arrowhead), the other cells exhibited a dendritic shape (Fig. 1C arrow). The specificity of PrP immunostaining was checked: sections in which the primary antibody was omitted and replaced by a normal mouse serum did not show any background staining.

### 3.2. In the spleen, PrPsc is associated with FDC

The FDC were identified using the CNA42 antibody. In both human and sheep spleen, identically pre-treated with formic acid, FDC immunostained with CNA42 were detected

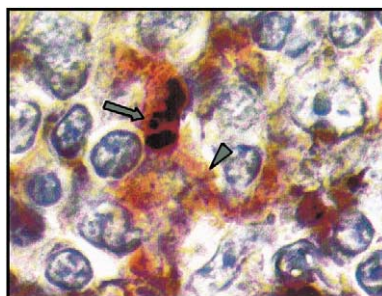


Fig. 3. Double labelling experiment showing that FDC identified using CNA42 mAb (red deposits, arrowhead, 600 $\times$ ) accumulated PrPsc stained with 4F2 mAb (black deposits, arrow).

within the germinal centers of all secondary lymphoid follicles (Fig. 2A and C). The FDC staining consisted in a dendritic morphology (Fig. 2B and D). The pattern of the immunolabelling was cytoplasmic, more intense along the cell membrane, re-drawing many cell processes associated with neighbouring lymphocytes. No FDC labelling was seen in the red pulp or in the blood vessels area; some round cells outside of the germinal centers of both human and sheep samples were also labelled.

Using double labelling experiments in the spleen of scrapie affected sheep, dendritic cells labelled with the CNA42 antibody, within all germinal centers, contained PrPsc deposits (Fig. 3). Cross-reactivity controls were performed to evaluate the binding of second biotinylated anti-mouse antibody to the primary antibody used (first 4F2 immunolabelling) which was non-existent. In spleen of healthy sheep as in human spleen, no PrPsc labelling was detected in FDC identified with the CNA42 antibody in these double immunolabelling experiments.

#### **4. Discussion**

In transmissible spongiform encephalopathies (TSE), prion replication occurs in the lymphoid system in sheep affected with scrapie as well as in murine models of experimental scrapie (Race and Ernst, 1992; O'Rourke et al., 1998; Raeber et al., 1999a; Bruce et al., 2000). Several lines of evidence argue for a key role for FDC, as well as an involvement of B lymphocytes in these murine models (McBride et al., 1992; Klein et al., 1997). In natural diseases, the precise cell types involved in this lymphoreticular prion replication remains poorly documented, especially in natural scrapie in which FDC identification was only based on the localisation and shape of PrPsc accumulating cells within the germinal centers (van Keulen et al., 1996; O'Rourke et al., 1998). Indeed, specific markers of different cell populations are lacking in the case of sheep, most often antibodies being inadequate.

The CNA42 mAb, originally used to characterise FDC in humans (Delsol et al., 1993), is also suitable in other species such as calf, dog, and lamb (Raymond et al., 1997; Bencsik et al., 2000). Comparing the immunolabelling results in human and sheep spleen, we checked the possibility to use CNA42 mAb even after drastic treatment such as formic acid treatment applied on the spleen samples before paraffin embedding. In our study, the CNA42 labelled cells within human spleen were not as intense as previously shown (Delsol et al., 1993). This difference is probably due to the 1 h formic acid treatment applied on human samples, a treatment currently used in CJD suspicion in order to reduce infectivity, before paraffin embedding. However, our study clearly shows that FDC retain their ability to be recognised by CNA42 mAb. The antigen recognised by CNA42 mAb is also expressed on round cells located at the periphery of the lymphoid follicles. Noticeably, these cells were observable both in human and sheep spleen and reasonably, they could not be considered as FDC since they did not show a dendritic shape nor a location within the germinal centers (Imai et al., 1998). A similar phenomenon was also observed with the FDC-M1 antibody, used to identify murine FDC, that cross-reacts with some macrophages (Montrasio et al., 2000). Furthermore, these round cells were never accumulating PrPsc in our double labelling experiments. By contrast, this double immunolabelling applied on

spleen samples of scrapie affected sheep towards control animal as well as human samples, showed that the second incubation series did not induce any non-specific staining. This is probably due to both the saturation of first enzyme capacity to precipitate the first chromogen and the use of a second blocking step. In this manner the double immunolabelling results showed its specificity. Thus, this study showed that CNA42 mAb was also suitable to recognise FDC even after PrPsc immunohistochemistry that needed other drastic treatments such as formic acid, autoclaving and proteinase K treatment.

In summary, this study demonstrates the suitability of using the CNA42 mAb for FDC precise identification as PrPsc accumulating cells in scrapie affected sheep and represents an alternative way to study FDC implication in human prion diseases.

## Acknowledgements

This work was supported in parts by grants from the Programme National de Recherches sur les ESST et les Prions. Stéphane LEZMI was financially supported by a grant from the Académie Nationale de Médecine.

We gratefully acknowledge T. Marchal (Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France) and P.A. Bryon (Faculté de Médecine Rockefeller, Lyon, France) for helpful discussion concerning FDC.

## References

- Aguzzi, A., 1997. Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *Lancet* 349, 742–743.
- Bencsik, A., Lezmi, S., Hunsmann, G., Baron, T., 2000. Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Develop. Immunol.*, in press.
- Bossers, A., Schreuder, B.E.C., Muileman, I.H., Belt, P.B.G., Smits, M.A., 1996. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Genet. Virol.* 77, 2669–2673.
- Brown, K.L., Stewart, K., Ritchie, D.L., Mabbott, N.A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W.I., Bruce, M.E., 1999. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nature Med.* 5, 1308–1312.
- Bruce, M.E., Brown, K.L., Mabbott, N.A., Farquhar, C.F., Jeffrey, M., 2000. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol. Today* 21, 442–446.
- Delsol, G., Meggetto, F., Brousset, P., Cohen-Knafo, E., Al Saati, T., Rochaix, P., Gorguet, B., Rubin, B., Voigt, J.-J., Chittal, S., 1993. Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed–Sterberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am. J. Pathol.* 142, 1729–1738.
- Elsen, J.M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andréoletti, O., Eychenne, F., Vu Tien Khang, J., Poivey, J.-P., Lantier, F., Laplanche, J.-L., 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* 144, 431–445.
- Imai, Y., Yamakawa, M., Kasajima, T., 1998. The lymphocyte–dendritic cell system. *Histol. Histopathol.* 13, 469–510.
- Hunter, N., Foster, J.D., Goldmann, W., Stear, M.J., Hope, J., Bostock, C., 1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* 141, 809–824.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K., Tateishi, J., 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt–Jakob disease. *J. Virol.* 65, 6292–6295.
- Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A.J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R.M., Aguzzi, A., 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390, 687–690.

- Kosco, H., Pflugfelder, E., Gray, D., 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol.* 148, 2331–2339.
- Krasemann, S., Groschup, M., Harmeyer, S., Hunsmann, G., Bodemer, W., 1996. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP<sup>0</sup>/0-mice. *Mol. Med.* 2, 725–734.
- McBride, P.A., Ekelboom, P., Kraal, G., Fraser, H., Bruce, M.E., 1992. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J. Pathol.* 168, 413–418.
- Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M.A., MacKay, F., Aguzzi, A., Weissmann, C., 2000. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288, 1257–1259.
- O'Rourke, K.I., Bazsler, T.V., Parish, S.M., Knowles, D.P., 1998. Pre-clinical detection of PrP<sup>sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet. Record.* 142, 489–491.
- Race, R.E., Ernst, D., 1992. Detection of proteinase K-resistant prion protein and infectivity in mouse spleen by 2 weeks after scrapie agent inoculation. *J. Virol.* 73, 3319–3323.
- Raeber, A.J., Klein, M.A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A., Weissmann, C., 1999a. PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO* 18, 2702–2706.
- Raeber, A.J., Sailer, A., Hegyi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Fischer, M., Brandner, S., Aguzzi, A., Weissmann, C., 1999b. Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *PNAS* 96, 3987–3992.
- Raymond, I., Al Saati, T., Tkaczuk, J., Chittal, S., Delsol, G., 1997. CNA42, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant antigen of follicular dendritic reticulum cells. *Am. J. Pathol.* 151, 1577–1585.
- Sy, M.S., Gambetti, P., 1999. Prion replication — once again blaming the dendritic cell. *Nature Med.* 5, 1235–1237.
- van Keulen, L.J.M., Schreuder, B.E.C., Meloen, R.H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M.E.W., Langeveld, J.P.M., 1996. Immunohistochemical detection of prion in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1228–1231.

## Article 4

---

### **Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen : a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie**

ANNA BENCSIK, STÉPHANE LEZMI, THIERRY BARON

*Journal of Neurovirology*, 2001, vol.7, pp447-453

Dans la tremblante naturelle comme dans la tremblante expérimentale, encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), l'agent infectieux, étroitement lié à la PrP<sup>sc</sup>, une forme anormale de la protéine prion cellulaire, envahit et se réplique dans les organes lymphoïdes comme la rate avant de gagner le système nerveux central (SNC). Pour clarifier l'implication de différentes cellules dans la neuro-invasion depuis la rate jusqu'au SNC, nous avons étudié l'innervation sympathique des territoires lymphoïdes dans la rate. La distribution des fibres noradrenergiques, provenant du ganglion nerveux coeliomésentérique, a été comparée au site d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans la rate de moutons atteints de tremblante naturelle. En utilisant des doubles marquages, nous avons démontré la proximité de terminaisons nerveuses noradrenergiques avec les cellules accumulant la PrP<sup>sc</sup>, soutenant ainsi l'hypothèse d'une possible implication de ces structures dans le processus de neuro-invasion.



# Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: A possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie

Anna Bencsik, Stéphane Lezmi, and Thierry Baron

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité de Virologie ATNC, Lyon, France

**In experimental as well as in natural scrapie, transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), the infectious agent, closely related to PrPsc, an abnormal isoform of the cellular prion protein, invades and replicates in lymphoid organs such as spleen before affecting the brain. To clarify the cellular requirements for the possible neuroinvasion of scrapie agent from the spleen to the central nervous system, we have studied the sympathetic innervation within the lymphoid territories of the spleen. These noradrenergic fibers originating from the coeliomesenteric ganglia were examined with regard to PrPsc-associated cells in spleen of adult sheep severely affected with natural scrapie. Using a double immunolabelling strategy, we demonstrated the proximity of noradrenergic endings with PrPsc-accumulating cells, strengthening its possible implication in the neuroinvasion process. *Journal of NeuroVirology* (2001) 7, 447–453.**

**Keywords:** noradrenaline; neuroinvasion; PrP; scrapie; tyrosine hydroxylase; immunohistochemistry

## Introduction

The transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative disorders without associated inflammatory syndrome, which include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, scrapie in sheep and goat, or bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle. In scrapie, variant CJD and experimental murine TSEs, the immune system probably plays a critical role in the pathogenesis, not only as the initial peripheral site of replication of the TSE's agent, but also with regard to its implication in the neuroinvasion process (Beekes *et al*, 1996; Aguzzi, 1997; Race *et al*, 1998; Bruce *et al*, 2000; Glatzel and Aguzzi, 2000). How TSE's agent propagates from lym-

phatic tissues to the central nervous system (CNS) is unclear, but lymphoreticular system and peripheral nervous system are considered to be involved in scrapie neuroinvasion, in experimental (Kimberlin and Walker, 1988; Lasmezas *et al*, 1996; Baldauf *et al*, 1997; Klein *et al*, 1997; Groschup *et al*, 1999), as well as in natural disease (O'Rourke *et al*, 2000; van Keulen *et al*, 1996; van Keulen *et al*, 1999; van Keulen *et al*, 2000).

Besides the possible involvement of blood cells in the transport of TSE's agent (Klein *et al*, 1997; Houston *et al*, 2000), the autonomous nervous system that innervates the lymphoid organs may directly contribute to their dissemination from the spleen to the CNS (Fried *et al*, 1986; Groschup *et al*, 1999). Because PrPsc, an abnormal isoform of the cellular prion protein, copurifies with prion infectivity, it is considered as a component of the infectious agent (Bolton *et al*, 1982; Prusiner, 1997). Indeed, in sheep, PrPsc deposits are first detectable in the thoracic spinal cord or in the nucleus parasympatheticus nerve X, both connected to the

---

Address correspondence to Anna Bencsik, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité de Virologie—ATNC, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France. E-mail: a.bencsik@lyon.afssa.fr

Received 19 December 2000; revised 4 April; accepted 24 April 2001.

coeliomesenteric ganglia (van Keulen *et al*, 1999; Andréoletti *et al*, 2000; van Keulen *et al*, 2000). In addition, PrPsc accumulation was also described in the enteric nervous system of the gastrointestinal tract, that is also originating from the coeliomesenteric ganglia (van Keulen *et al*, 1999). In this context, the purpose of our work was thus to investigate the distribution of noradrenergic fibers originating from coeliomesenteric ganglia, compared to the topography of PrPsc-associated cells in the spleen of sheep genetically susceptible and affected with natural scrapie. Sheep with severe symptoms of scrapie were used to have a maximum of PrPsc-associated cells in spleen together with PrPsc presence in the CNS and autonomous nervous system. Therefore, in this study using immunohistochemistry we show that in natural scrapie, PrPsc deposition found in spinal cord as well as in spleen is consistent with spread of TSE's agent from the spleen to the CNS (spinal cord and brain) via noradrenergic nerves of coeliomesenteric ganglia.

## Results

### *PrPsc detection in brain, spinal cord, coeliomesenteric ganglia, and spleen of scrapie affected sheep*

Besides clinical signs of scrapie, the sheep were diagnosed as infected with scrapie on the basis of cerebral detection of the pathological PrPsc by immunohistochemistry method using 4F2 monoclonal antibody. As an illustration, PrPsc was detected in the granular and molecular layers (Figure 1B) of the cerebellum of scrapie-infected sheep but never in the brain of healthy lamb (Figure 1A). In the spinal cord, PrPsc was detected in the grey matter of the dorsal horn (Figure 2B) as well as in the coeliomesenteric ganglia (Figure 2C). In the spleen, PrPsc was present within all secondary lymphoid follicles, mostly in the germinal centers and few cells labelled in the mantle

zone (Figure 2D). Sections in which the primary antibody was omitted and replaced by a normal serum were used to evaluate the background staining that was nonexistent.

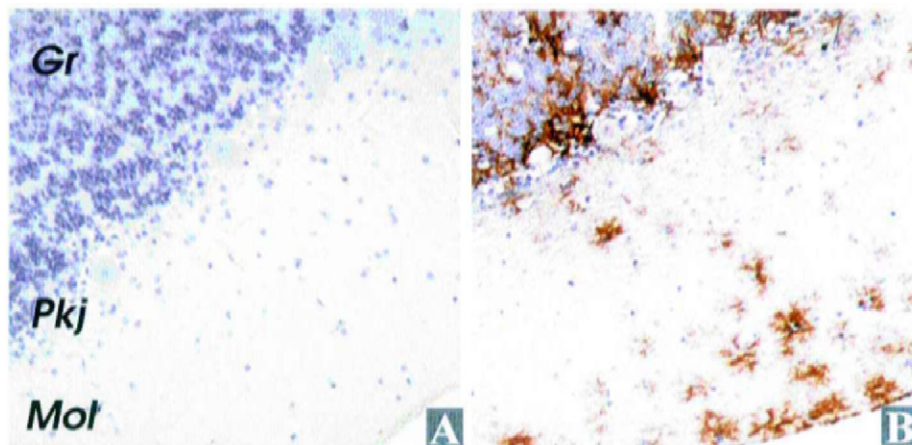
### *Autonomous innervation from coeliomesenteric ganglia to spleen*

One anatomical link between spinal cord, coeliomesenteric ganglia, and spleen is represented by noradrenergic neurons of autonomous nervous system (Figure 2A). Using tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry, noradrenergic cell bodies of coeliomesenteric ganglia, were identifiable (Figure 3A). As shown after double-labelling experiment most of these neurons presented PrPsc deposits on their membrane (Figure 3B).

Noradrenergic processes from these cell bodies innervate the spleen; endings were located within the trabeculae (data not shown), around blood vessels (Figure 3C), within the white pulp, in the mantle zone near immune cells, in the outer zone, between germinal centers and mantle zone (Figure 3D). Using double-labelling experiments, noradrenergic fibers were seen adjacent and even close to PrPsc-accumulating immune cells detected with 4F2 mAb (Figure 3E, F) in almost all the germinal centers.

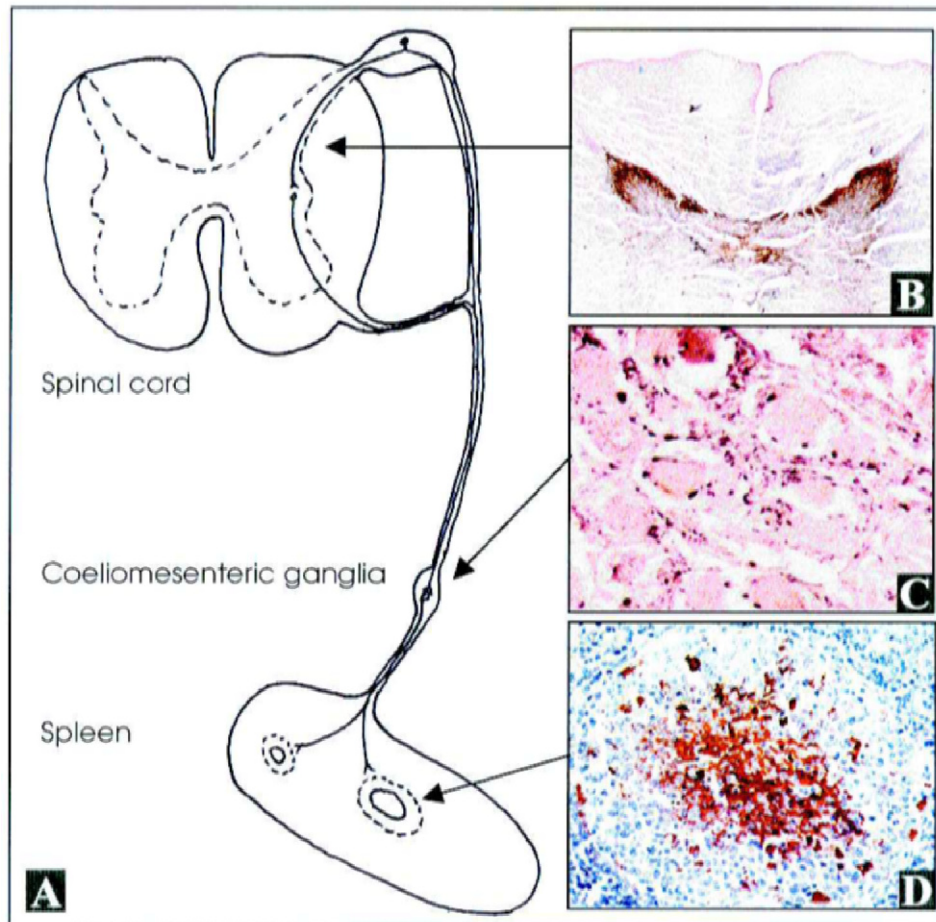
## Discussion

In naturally occurring scrapie, it is assumed that the infection is initiated in the alimentary tract (Hadlow *et al*, 1982) and PrPsc—the TSE-specific abnormal prion protein (Bolton *et al*, 1982)—is first detectable in lymphoid tissues associated to intestine and also in tonsils and spleen (O'Rourke *et al*, 1998; Heggebo *et al*, 2000). In the next step of infectious agent spread, PrPsc is detected in peripheral nervous system in naturally affected sheep (van Keulen *et al*, 1999; Andréoletti *et al*, 2000; van Keulen *et al*, 2000), as



**Figure 1** In contrast to the brain of a healthy lamb (A,  $\times 100$ ), in scrapie-infected sheep, PrPsc is detected using 4F2 antibody in the granular (Gr) and molecular (Mol) layers of the cerebellum, and not in Purkinje (Pkj) cells (B,  $\times 100$ ).





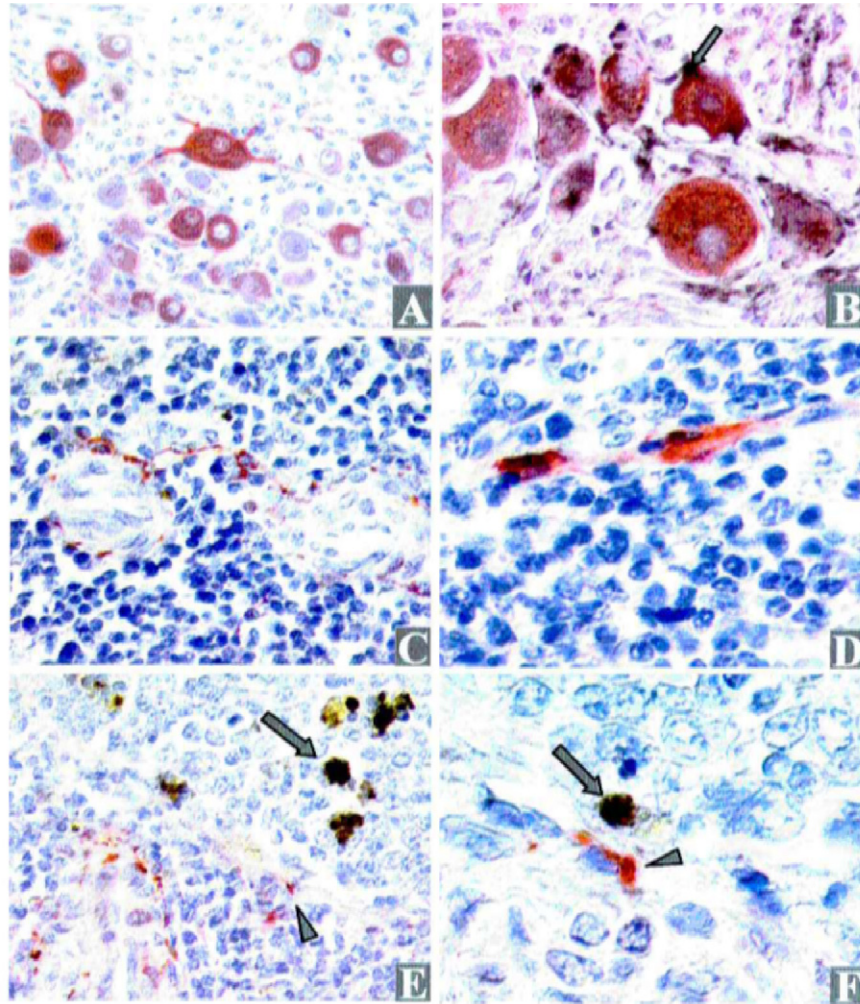
**Figure 2** Schematic sympathetic innervation of spleen from spinal cord *via* coeliomesenteric ganglia (A). PrPsc accumulation sites detected using 4F2 antibody. In thoracic spinal cord, PrPsc was observed in the dorsal horns (B,  $\times 20$ , brown deposits); in coeliomesenteric ganglia PrPsc was seen surrounding neural cell bodies (C,  $\times 200$ , dark deposits); in spleen PrPsc was detected within germinal centers of secondary lymphoid follicles (D,  $\times 100$ , red deposits).

in sheep inoculated intraperitoneally with scrapie (Groschup *et al*, 1999). Similarly, the distribution of PrPsc described in the present study supports the idea of an autonomous nervous system implication in neuroinvasion from the spleen in natural disease. The type of cells involved in the transport of prion infectivity from the lymphoid organs to the central nervous system (CNS) is actually unknown. Besides the conceivable transportation of TSE's agent by blood cells (Klein *et al*, 1997; Houston *et al*, 2000), another possibility is the involvement of peripheral nervous system. Indeed, in experimental models such as hamsters fed with scrapie, vagal nerve was identified as an alternative neuroinvasion pathway from the visceral organs to the medulla (Beekes *et al*, 1996; Baldauf *et al*, 1997; Beekes *et al*, 1998).

The present immunohistochemical study, using the tyrosine hydroxylase, a monoaminergic synthesising enzyme, allows to precise the nature of neuronal pathways potentially involved in prion spread. Our data revealed that PrPsc distribution, in the coeliomesenteric ganglia of naturally scrapie-affected

sheep, was associated with noradrenergic neurons. PrPsc detected in coeliomesenteric ganglia might be due to TSE's agent transportation by blood cells, but because their localisation was restricted to cell bodies and along cell processes of the ganglia, it is more likely originating from the CNS or spleen, considering the neuroanatomical link between these organs. Indeed, PrPsc may be transported either in an anterograde or retrograde manner because PrPsc is detectable in the spleen of mice infected intracranially as well as in the brain after a peripheral inoculation (Fraser, 1970; Kimberlin *et al*, 1983a).

In addition, kinetic studies of PrPsc spread strongly suggested a very low transportation of TSE's agent that have been indirectly evaluated as being around 1 to 2 mm/day (Kimberlin *et al*, 1983b). This rate of spread is compatible with the slow axonal transport described in sympathetic neurons ranging from 0.2 to 8 mm/day (Hirokawa, 1997). This slow anterograde transportation is linked to different cytoskeleton components such as neurofilament or clathrine that might be coupled to PrPc, as recently shown for



**Figure 3** In the coeliomesenteric ganglia of scrapie-infected sheep, noradrenergic neurons were identifiable using anti-TH antibody (A,  $\times 200$ , red deposit). A double-immunolabelling experiment showed that some noradrenergic cell bodies (B,  $\times 400$ , red deposit) were associated with PrPsc on the cell membranes (B, black deposit, arrow). In the spleen, the noradrenergic fibers were identifiable using the same anti-TH antibody (red deposit) around blood vessels (C,  $\times 200$ ) and near several immune cells at the periphery of germinal centers (D,  $\times 400$ ). In double-labelling experiments, noradrenergic fibers (red deposit, arrowheads) are detected at proximity of PrPsc-expressing cells (black deposit, arrows), revealed using 4F2 antibody (E,  $\times 400$ , and F,  $\times 600$ ).

caveolin in noradrenergic neurons (Mouillet-Richard *et al*, 2000). Our study in natural disease cannot clarify whether this possibility is most probable or if an ad-axonal transportation should be suggested. Nevertheless, we demonstrated that noradrenergic fibers, originating from these noradrenergic neurons of coeliomesenteric ganglia, entered deep inside the ovine spleen. The great majority of these noradrenergic fibers were detected around blood vessels, which is consistent with a classical role of blood pressure control or regulation of spleen contraction via the noradrenergic innervation detected in the capsule (Fried *et al*, 1986; Bencsik *et al*, 2000).

More interestingly, the close vicinity of noradrenergic fibers with PrPsc-associated cells within the follicular area together with the colocalisation of PrPsc within cell bodies of the coeliomesenteric ganglia comfort the idea of an implication of sympathetic ner-

vous system in the transport of TSE's agent from the spleen to the CNS. Indeed, in sheep noradrenergic nerve terminals may make direct contacts with lymphoid cells, as demonstrated in rat spleen where, by electron microscopy studies, it was shown that they were separated by a gap junction of only 6 nm (Felten and Felten, 1988). If it is the case in sheep, it would be evocative of a very narrow relationship between immune and nervous system in prion spread within the body, as gap junctions are sites of cytoplasmic communication between adjacent cells, mediating diffusion of metabolites and signalling molecules (Saez *et al*, 2000). Besides, the intensity of PrPsc staining in follicular domains of spleen from natural scrapie cases vary not only with the stage of the disease but also with the breed and genotype of sheep (Hunter *et al*, 1996, 1997, 2000). Thus, it would be interesting to extend our study to other genotypes,

particularly VV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub>, considered as more susceptible to scrapie than AV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> and to AV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>RQ<sub>171</sub> that have been recently shown to accumulate PrPsc solely in the nervous system and not in the lymphoid tissue (Andréoletti *et al*, 2000). Nevertheless, in an older study, a AV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>RQ<sub>171</sub> sheep was found positive in the spleen, suggesting that the strain of scrapie may be also important to take into account (Somerville *et al*, 1997).

Finally, because the different strains of TSE's agent target different neuronal populations in the brain, we are currently attempting to analyse whether other types of neurons than noradrenergic in the coeliomesenteric ganglia may be used by the infectious agent as particular channels for its spread from the periphery to the CNS.

## Materials and methods

### Tissues

The brain, spinal cord, coeliomesenteric ganglia, and spleen of three sheep (3-year-old) with severe symptoms of scrapie, with a susceptible genotype to the disease (AV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub>) (Bossers *et al*, 1996; Hunter *et al*, 1996; Elsen *et al*, 1999) from the same flock of Texel × Charolais breed (Ardennes department) were fixed in 10% buffered formalin. As a control, spleen of a healthy sheep, with a genotype known as resistant to scrapie (AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>RR<sub>171</sub>) (Bossers *et al*, 1996; Hunter *et al*, 1996; Elsen *et al*, 1999) coming from another flock in which some clinical scrapie cases occurred in genetically susceptible animals (Prealpes breed, Drôme department) was immersed in buffered 10% formalin. Once fixed, samples were rinsed for a week in cold phosphate buffer (PBS 0.1 M, pH 7.4), then routinely dehydrated and embedded in paraffin. To ensure adhesion, sections (5 μm) were collected onto pretreated glass slides (Polylysine or StarFrost, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) and baked overnight at 57°C.

### Antibodies

To detect the PrPsc in the scrapie-affected sheep, we used the 4F2 monoclonal antibody (courtesy of Pr G. Hunsmann, German Primate Center, Göttingen, Germany) (Krasemann *et al*, 1996). It was possible to distinguish the immunolabelling of PrPc from the pathological PrPsc by applying pretreatments described in the following staining procedure. Nor-

adrenergic fibers of the autonomous nerve system were identified using a rabbit polyclonal antibody against the tyrosine hydroxylase (TH) (Institut Jacques Boy, France), the rate limiting enzyme in the synthesis of noradrenaline (Björklund and Hökfelt, 1985).

### Immunostaining procedure

The slides were dewaxed and rehydrated in water, then used for immunohistochemical analysis. Every step was done at room temperature (24°C). Endogenous peroxidase activity was inhibited with 10-min incubation in 3% hydrogen peroxide in PBS, 0.1 M. Unspecific antigenic sites were blocked by a 30-min step in blocking reagent (Roche-Boehringer). Then the sections were incubated overnight with the primary antibody (TH, 4F2, Table 1). The sections were rinsed before the detection of the primary antibody using the ABC system (Vector), succinctly using first the biotinylated anti-rabbit (Vector) or anti-mouse antibody (Cliniscience) (30 min) and secondly a peroxidase-labelled avidin-biotin complex (ABC Vector) (30 min). These steps were followed by a 5-min wash and finally peroxidase was revealed by immersing the sections in aminoethylcarbazole solution (AEC, Dako) giving red deposits, in DAB (brown deposit), or DAB intensified with NiCl<sub>2</sub> (Biosys), thus giving black deposits.

To assess the specificity of pathological PrPsc immunostaining several pretreatments were necessary (Bell *et al*, 1997). Hydrated autoclaving (immersed in PBS, 0.1 M, pH 7.4, 15 min at 121°C in a pressure cooker), combined with an immersion for 15 min in 98% formic acid (Merck), proteinase K treatment (Roche-Boehringer, 20 μg/ml in PBS, 0.1 M, pH 7.4, 37°C for 15 min), or guanidium thiocyanate (Sigma, 4 M, for 60 min at room temperature) were applied to sections and led to the detection of the PrPsc form solely.

### Double-staining procedure

We developed a double-immunostaining procedure, allowing the simultaneous detection of PrPsc and NA endings, by modulating the pretreatment sequences (5 min in formic acid and 10 min in PK instead of 15 min for each, but maintaining the hydrated autoclaving step, 15 min at 121°C), using both 4F2 antibody and anti-TH antibodies to visualise PrPsc-accumulating cells and noradrenergic cell bodies as well as fibers (Table 1). Following the first immunohistochemistry procedure, the

**Table 1** Primary antibodies used for the detection of PrPsc, noradrenergic (NA) neurons and endings

Antibodies	Species	Dilutions	Origin
4F2 (PrPhu 79-92)	Mouse	1/200	GPC, Göttingen, Germany
TH (Tyrosine hydroxylase)	Rabbit	1/200	Jacques Boy Institute, France
Biotinylated anti-rabbit (secondary antibody)	Goat	1/100	Vector, France
Biotinylated anti-mouse (secondary antibody)	Rabbit	1/200	Zymed, Cliniscience, France

second one was performed, beginning with a new blocking step (Roche-Boehringer, 30 min). Then, the same procedure was applied. The specificity of the double-immunolabelling procedure was evaluated using healthy sheep samples, in which we checked that only TH immunolabelling was observable and neither PrPsc nor PrPc were detectable. In addition, on diseased samples we also controlled that there was no alteration of the first immunolabelling when in the second immunohistochemistry step the HRP complex was omitted. To reveal the histological organisation of the each sample of tissues, a very weak staining was obtained using

aqueous haematoxylin. Finally, slides were mounted with Crystal Mount medium and observed under a microscope coupled to an image analysis workstation (Biocom, Les Ulis, France).

## Acknowledgements

This work was supported in parts by grants from the French Programme de Recherches sur les ESST et les Prions. Stéphane Lezmi was financially supported by a grant from the Académie Nationale de Médecine.

## References

- Aguzzi A (1997). Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *Lancet* **349**: 742–743.
- Andréoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, Van Keulen L, Schelcher F, Elsen J, Lantier F (2000). Early accumulation of PrPsc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* **81**: 3115–3126.
- Baldauf E, Beekes M, Diring H (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* **78**: 1187–1197.
- Beekes M, Baldauf E, Diring H (1996). Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* **77**: 1925–1934.
- Beekes M, McBride P, Baldauf E (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* **79**: 601–607.
- Bell JE, Gentleman SM, Ironside JW, McCardle L, Lantos PL, Doey L, Lowe J, Fergusson J, Luthert P, McQuaid S, Allen IV (1997). Prion protein immunocytochemistry—UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**: 26–35.
- Bencsik A, Lezmi S, Hunsmann G, Baron T (2001). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Dev Immunol* in press.
- Björklund A, Hökfelt T (1985). *Handbook of chemical neuroanatomy—Classical transmitters in the CNS Vol. 2*, Elsevier, Amsterdam.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309–1311.
- Bossers A, Schreuder BEC, Muileman IH, Belt PBG, Smits MA (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* **77**: 2669–2673.
- Bruce ME, Brown KL, Mabbott NA, Farquhar CF, Jeffrey M (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol Today* **21**: 442–446.
- Elsen J-M, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andréoletti O, Eyche F, Vu Tien Khang J, Poivey J-P, Lantier F, Laplanche J-L (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* **144**: 431–445.
- Felten DL, Felten S (1988). Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun* **2**: 293–300.
- Fraser H (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: The role of spleen. *Nature* **226**: 462–463.
- Fried G, Terenius L, Brodin E, Efendic S, Dockray J, Fahrenkrug J, Goldstein M, Hökfelt T (1986). Neuropeptide Y, enkephalin and noradrenaline coexist in sympathetic neurons innervating the bovine spleen. Biochemical and immunohistochemical evidence. *Cell Tissue Res* **243**: 495–508.
- Glatzel M, Aguzzi A (2000). PrP(c) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* **81**: 2813–2821.
- Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Hardt M, Hainfellner JA, Budka H (1999). Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* **98**: 453–457.
- Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* **146**: 657–664.
- Heggebo R, Press CM, Gunnes G, Inge Lie K, Tranulis MA, Ulvund M, Groschup MH, Landsverk T (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* **81**: 2327–2337.
- Hirokawa N (1997). The mechanisms of fast and slow transport in neurons: Identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 605–614.
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**: 999–1000.
- Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* **141**: 809–824.
- Hunter N, Goldmann W, Marshall E, O'Neill G (2000). Sheep and goats: Natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Arch Virol Suppl* **16**: 181–188.
- Hunter N, Moore L, Hosie BD, Dingwall WS, Greig A (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec* **140**: 59–63.

- Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA (1983a). Pathogenesis of mouse scrapie: Evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol* **64**: 713–716.
- Kimberlin RH, Hall SM, Walker CA (1983b). Pathogenesis of mouse scrapie: Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. *J Neurol Sci* **61**: 315–325.
- Kimberlin RH, Walker CA (1988). Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication within the nervous system and not the lymphoreticular system. *J Gen Virol* **69**: 2953–2960.
- Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390**: 687–690.
- Krasemann S, Groschup M, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W (1996). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP<sup>0</sup>/0-mice. *Mol Med* **2**: 725–734.
- Lasmezas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Loch C, Dormont D (1996). Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* **70**: 1292–1295.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* **289**: 1925–1928.
- O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GA, Ryder SJ, Parish SM, Hamir AN, Cockett NE, Jenny A, Knowles DP (2000). Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* **38**: 3254–3259.
- O'Rourke KI, Baszler TV, Parish SM, Knowles DP (1998). Preclinical detection of PrP<sup>sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet Rec* **142**: 489–491.
- Prusiner SB (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**: 245–251.
- Race R, Jenny A, Sutton D (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: Implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis* **178**: 949–953.
- Saez JC, Branes MC, Corvalan H, Eugenin EA, Gonzales H, Martinez AD, Palisson F (2000). GAP junction in cells of the immune system: Structure, regulation and possible functional role. *Braz J Med Biol Res* **33**: 447–455.
- Somerville RA, Birkett CR, Farquhar CF, Hunter N, Goldmann W, Dornan J, Grover D, Hennion RM, Percy C, Foster J, Jeffrey M (1997). Immunodetection of PrP<sup>sc</sup> in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol* **9**: 2389–2396.
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans MEW, Langeveld JPM (1996). Immunohistochemical detection of prion in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* **34**: 1228–1231.
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM, Smits MA (1999). Scrapie-associated prion protein in the gastro-intestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* **121**: 55–63.
- van Keulen LJM, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM, Smits MA (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl* **16**: 57–71.

## Article 5

---

### Characterization of the PrP<sup>Sc</sup> accumulation in brain and lymphoid tissues of scrapied sheep using ELISA and immunohistochemistry

JEAN-YVES MADEC, STEPHANIE SIMON, STEPHANE LEZMI, ANNA BENCSIK,  
JACQUES GRASSI, THIERRY BARON

Article soumis à *Journal of Virology Methods*

Accepté dans *J Gen Virol* en 2004

Dans les ESST, comme la tremblante du mouton, une accumulation tissulaire de PrP<sup>Sc</sup>, une forme insoluble et partiellement résistante à la digestion par les protéases de la protéine prion cellulaire, est mise en évidence.

Dans une étude précédente, menée sur un troupeau de moutons affectés par la tremblante, nous avons montré que les niveaux d'accumulation de PrP<sup>res</sup> dans le système nerveux central, mesurés par la méthode de Western blot (WB) sont très variables parmi les moutons et dépendent davantage du polymorphisme du gène de la PrP que de la sévérité apparente des signes cliniques.

En utilisant une technique ELISA, nous avons précisé les quantités de PrP<sup>res</sup> trouvées dans le SNC et les organes lymphoïdes. L'immunohistochimie (IHC) a aussi été utilisée permettant de caractériser les types cellulaires impliqués et de corroborer finalement les résultats obtenus par Western blot.

Chez les animaux présentant un faible taux d'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNC, le noyau dorsal du nerf vague a clairement été identifié comme le site majeur d'accumulation de la protéine anormale ; ces résultats concordent avec les études qui montrent que ce noyau nerveux est un des sites majeurs d'entrée de l'agent infectieux.

De plus, chez quatre moutons sans signes cliniques de tremblante, portant au moins un allèle ARR et un mouton ARQ/ARQ, une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> a été identifiée par la technique ELISA mais pas par les deux autres méthodes (IHC et WB). Cette observation qui pose un problème de diagnostic, suggère que certaines formes de la protéine prion pathologique ne sont pas reconnues de façon similaire par les différentes techniques de détections utilisées.

## Short Communication

### Correspondence

J.-Y. Madec

jy.madec@lyon.afssa.fr

Received 23 April 2004

Accepted 26 July 2004

# Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock

J.-Y. Madec,<sup>1</sup> S. Simon,<sup>2</sup> S. Lezmi,<sup>1</sup> A. Bencsik,<sup>1</sup> J. Grassi<sup>2</sup> and T. Baron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AFSSA Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon cedex 07, France

<sup>2</sup>CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA/Saclay, France

The central molecular event in transmissible spongiform encephalopathies, such as scrapie in sheep, is the accumulation in tissues of an abnormal isoform of the cellular prion protein. A previous investigation of 26 sheep showed that the accumulation of PrP<sup>res</sup> in brain correlated more with the *prnp* genotype than with the severity of the clinical disease. Here, the ability of a sandwich ELISA to detect PrP<sup>res</sup> distribution in the brain was demonstrated. Immunohistochemistry also strongly supported the hypothesis that the dorsal motor nucleus of the vagus nerve is the possible entry site in the brain for the scrapie agent. Remarkably, three asymptomatic (or possibly asymptomatic for scrapie) sheep carrying an allele known to be associated with clinical scrapie resistance (ARR), which were negative for the detection of PrP<sup>res</sup> by Western blotting and immunohistochemistry, were positive for the presence of PrP<sup>res</sup> by ELISA, raising the possibility of carriers resistant to the disease and possibly contributing to the persistence of scrapie in certain flocks.

Scrapie is a neurodegenerative disease that naturally affects sheep and goats (Pattison, 1988; Zlotnik, 1958). It belongs to the group referred to as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, along with bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and Creutzfeldt–Jakob disease in humans (reviewed by Prusiner, 1997). The infectious agent responsible for these diseases has been termed a prion, and is thought to be composed entirely of a pathological form (PrP<sup>Sc</sup>) of a host-encoded protein – the prion protein (PrP<sup>C</sup>) – although infectivity has also been demonstrated without detectable PrP<sup>Sc</sup> accumulation in some cases (Lasmézas *et al.*, 1997; Manuelidis *et al.*, 1997). So far, PrP<sup>Sc</sup> is the only specific molecular marker known for TSEs, and differs from its physiological isoform by its insolubility in detergents and its partial resistance to proteases (PrP<sup>res</sup>). In natural scrapie, the accumulation of PrP<sup>Sc</sup> has been reported in numerous tissues including the nervous system, lymphoid organs and placenta (Andréoletti *et al.*, 2000, 2002; Foster *et al.*, 1996; Hardt *et al.*, 2000; Heggebo *et al.*, 2002; Lezmi *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 1993; Onodera *et al.*, 1993; Race *et al.*, 1998; Ryder *et al.*, 2001; Schreuder *et al.*, 1996). The current view is that the scrapie agent first replicates in lymphoid organs before reaching the central nervous system (van Keulen *et al.*, 2000), as has also been shown in rodent models (Lasmézas & Coll, 1996). However, the age at which clinical signs develop in sheep is variable, and is at least partly determined by the primary sequence of the prion gene, which has also been shown to influence strongly the susceptibility of sheep to the disease (Belt *et al.*, 1995; Bossers *et al.*, 1996; Clouscard *et al.*, 1995;

Goldmann *et al.*, 1994; Hunter, 1997; Hunter *et al.*, 1997; Westaway *et al.*, 1994).

Using Western blotting, we previously studied 26 sheep from one scrapie-infected flock (Madec *et al.*, 2000) and demonstrated that PrP<sup>res</sup> levels in the brain varied according to their *prnp* genotype. All sheep sampled were 2 years of age, the only group showing symptoms in this flock at the time of this study. In the present work, we used immunohistochemistry (IHC) and a sandwich ELISA to investigate 23 of these 26 sheep further (Table 1). Initially, we considered a subset of 11 animals, all with detectable PrP<sup>res</sup> in the brain, as detected by Western blotting, which all carried at least one VRQ allele.

Following the same procedure as described previously (Bencsik *et al.*, 2001a, b; Lezmi *et al.*, 2001), specific PrP<sup>Sc</sup> immunolabelling was found in the brainstem of all 11 sheep that were positive by Western blotting. PrP<sup>Sc</sup> deposits were mostly found in the neuropil, typically in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNV), and in the reticular formation, outlining the cell membrane of the cell body of neurons (Foster *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2002; Hardt *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1993; Ryder *et al.*, 2001; van Keulen *et al.*, 1995). Outside the DMNV, but within the same obex sections, significant PrP<sup>Sc</sup> accumulation was also observed in most structures for 9 of 11 sheep, but no staining or only very faint staining was detected for the two remaining sheep, even though these two animals (S9 and S14) were of very different clinical status. This latter observation strongly underlined the fact that severe clinical disease does not

**Table 1.** Detection of PrP<sup>res</sup> in sheep brain using Western blotting, IHC and ELISA

Results were classified with regard to the *prnp* genotypes of the animals and their clinical status at the time of sacrifice, as defined previously (Madec *et al.*, 2000). Three different combinations (+/+/+, -/-/- and -/-/+) were observed for the results obtained using Western blotting, IHC and ELISA, respectively (+, PrP<sup>res</sup>-positive sheep; -, PrP<sup>res</sup>-negative sheep). Genotypes are given using the single-letter code for amino acids corresponding to codons 136, 154 and 171 of the *prnp* gene, respectively.

Genotype	Sheep	No. sheep	Clinical status		
			Highly affected	Possible symptoms	No symptoms
VRQ/VRQ	S4, S5	2	+/+/+		
VRQ/ARQ	S6, S7, S8	3	+/+/+		
VRQ/ARQ	S12, S13, S14	3			+/+/+
VRQ/ARH	S9	1	+/+/+		
VRQ/ARH	S10, S11	2		+/+/+	
ARQ/ARQ	S15	1			-/-/-
ARQ/ARH	S16	1			-/-/-
ARQ/ARH	S17	1			-/-/+
VRQ/ARR	S18	1		-/-/+	
VRQ/ARR	S19	1			-/-/-
ARQ/ARR	S20, S21	2			-/-/-
ARH/ARR	S22	1		-/-/+	
ARH/ARR	S23	1			-/-/+
ARH/ARR	S24, S25, S26	3			-/-/-
Total		23			

necessarily correlate with high PrP<sup>Sc</sup> deposition in the brain, as has been reported previously (Gonzalez *et al.*, 2002). In addition, these data reinforced the hypothesis of the involvement of the DMNV in the very early stages of neuro-invasion (van Keulen *et al.*, 1996, 2000).

PrP<sup>res</sup> was purified from the brain of all 11 sheep, following the protocol specified in the Bio-Rad BSE purification kit, and analysed by a sandwich ELISA using mAbs SAF-34 as the primary antibody (Demart *et al.*, 1999) and 12F10 as the secondary antibody (Krasemann *et al.*, 1996, 1999). The four brain sites previously found to be positive in Western blots in these 11 sheep (cerebellum, brain stem, mesencephalon and frontal cortex) were also positive for ELISA, confirming the suitability of the sandwich ELISA for the detection of PrP<sup>res</sup> in sheep tissues, as reported elsewhere (Bennion & Daggett, 2002). The PrP<sup>res</sup> load was highest in the cerebellum, as reported previously (Ersdal *et al.*, 2003), and the PrP<sup>res</sup> distribution in brain appeared to be highly consistent with that previously detected using Western blotting (Madec *et al.*, 2000), showing a similar gradient in the levels of PrP<sup>res</sup> in positive animals from the cerebellum to the frontal cortex (Begara-McGorum *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 1997; Zlotnik, 1958).

Next, we investigated the 12 sheep from the same flock (Table 1) that had previously had negative results for the detection of PrP<sup>res</sup> in Western blots (Madec *et al.*, 2000), including sheep with possible early symptoms of scrapie (S18 and S22) and asymptomatic sheep (S15–17, S19–21 and S23–26). Two had the susceptible allele VRQ, but in

both cases this was with the resistant ARR allele. Overall, 9 of these 12 sheep carried this ARR allele.

All 12 sheep were diagnosed as negative for the detection of PrP<sup>res</sup> by IHC. However, four animals were positive for the detection of PrP<sup>res</sup> in the cerebellum by ELISA, and two were also positive by ELISA for detection of PrP<sup>res</sup> in the brain stem and/or mesencephalon (giving a specific signal 2.5 times greater than the cut-off level in three separate experiments). All positive results were obtained using pure 20% homogenates and negative results were obtained at a 1:10 dilution, thus indicating low levels of accumulated PrP<sup>res</sup>. Two of these four sheep, including one VRQ/ARR sheep (S18), had been classified as having possible symptoms (Madec *et al.*, 2000), including some wool loss and emaciation but no trembling, hyperexcitability or paresthesias. However, since marked clinical signs can be associated with a low amount of brain PrP<sup>res</sup> (as in sheep S9), it was reasonable to assume that a less obvious clinical status might also be associated with a very low level of PrP<sup>res</sup> accumulation, possibly only detectable by ELISA. By comparison, the two animals in which PrP<sup>Sc</sup> was only found in the DMNV (S9 and S14, see above) by IHC displayed OD values by ELISA at least 2.5-fold higher than those obtained for the two IHC-negative sheep with possible symptoms (S18 and S22). These results suggested that ELISA may have a higher sensitivity than IHC for the detection of PrP<sup>res</sup> in these sheep and under these experimental conditions, whereas Western blotting and IHC may have a comparable sensitivity, as also suggested by other studies (Jeffrey *et al.*, 2002).

Interestingly, three of these four asymptomatic (or possibly



asymptomatic for scrapie) and ELISA-positive animals carried the ARR allele (Table 1). The ARR allele is associated with a protective effect against, if not resistance to, clinical scrapie. Our results thus raise some concern that PrP<sup>Sc</sup> can be found not only in preclinical stages of the disease in susceptible animals, but also in relatively resistant animals. It is generally considered that ARH/ARR animals are either not expected to develop scrapie during their life span or that they will develop the disease only after 70 months (Andréoletti *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 1996). Therefore, these findings suggest that scrapie-infected sheep with genetic resistance may behave as healthy carriers or as only very slightly affected animals in flocks. The possibility of a carrier state has already been suggested in certain rodent models (Collis & Kimberlin, 1985; Race & Chesebro, 1998; Race *et al.*, 2001) and this could help to explain the persistence of the natural disease in some cases. It may also have significance for breeding and lambing management programmes for the eradication of scrapie.

It is not known whether both PrPs encoded by the ARH and ARR alleles or only the PrP encoded by the most susceptible alleles (ARH or VRQ) are converted into a pathological form in these sheep during the natural process of scrapie infection. It is notable that the sheep PrP encoded by the ARR allele was successfully converted into its pathological counterpart in experimental BSE challenge of sheep (Houston *et al.*, 2003). A recent study also reported that some atypical ELISA-positive sheep remained negative using either Western blotting or, in some cases, IHC (Buschmann *et al.*, 2003), and this work also included a number of sheep carrying the ARR or AHQ allele associated with a relatively high resistance to clinical scrapie. Similar observations were also made by another group in sheep with so-called Nor98 scrapie carrying the AHQ allele, displaying clinical signs of scrapie (Benestad *et al.*, 2003). The data presented here on asymptomatic animals with partial genetic resistance to the disease reinforce the possible association between these alleles and an unusual biochemical behaviour or low levels of PrP<sup>Sc</sup>, according to the method used for its identification. Attempts to transmit the disease to ovine-transgenic mice, which have been shown to be more susceptible to scrapie than conventional rodents (Crozet *et al.*, 2001; Vilotte *et al.*, 2001), will help to determine the potential infectivity of these samples.

## Acknowledgements

We gratefully thank M. Lavoine and V. Metayer for their excellent technical participation. We thank also P. Belli and D. Calavas for their assistance in collecting the samples. This work was partly funded both by a grant from the EU (PL97-3305) and the 'Programme National de Recherches sur les ESST et les prions'.

## References

Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J.-M. & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous

tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* **81**, 3115–3126.

Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A. & 8 other authors (2002). PrP<sup>Sc</sup> accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* **83**, 2607–2616.

Begara-McGorum, I., Gonzalez, L., Simmons, M., Hunter, N., Houston, F. & Jeffrey, M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol* **127**, 39–68.

Belt, P. B. G. M., Muilheman, J. H., Schreuder, B. E. C., Ruitjer, J., Bos, D. E., Gielkens, A. L. J. & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* **75**, 509–517.

Bencsik, A., Lezmi, S. & Baron, T. (2001a). Autonomous nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. *J Neurovirol* **7**, 447–453.

Bencsik, A., Lezmi, S., Hunsmann, G. & Baron, T. (2001b). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Dev Immunol* **8**, 235–241.

Benestad, S., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**, 202–208.

Bennion, B. & Daggett, V. (2002). Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. *Clin Chem* **48**, 2105–2114.

Bossers, A., Schreuder, B. E. C., Muileman, I. H., Belt, P. B. G. & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* **77**, 2669–2673.

Buschmann, A., Biacabe, A., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J., Erhardt, G., Lühken, G., Baron, T. & Groschup, M. (2003). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117**, 27–36.

Cloucard, C., Beaudry, P., Elsen, J.-M. & 7 other authors (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol* **76**, 2097–2101.

Collis, S. & Kimberlin, R. (1985). Long-term persistence of scrapie infection in mouse spleens in the absence of clinical disease. *FEMS Microbiol* **29**, 111–114.

Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. & Baron, T. (2001). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* **75**, 5328–5334.

Demart, S., Fournier, J. G., Creminon, C. & 7 other authors (1999). New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Comm* **265**, 652–657.

Ersdal, C., Ulvund, M., Benestad, S. & Tranulis, M. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol* **40**, 164–174.

Foster, J. D., Wilson, M. & Hunter, N. (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec* **139**, 512–515.

Goldmann, 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. *J Gen Virol* **75**, 989–995.

Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M. & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and

- host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol* **126**, 17–29.
- Hardt, M., Baron, T. & Groschup, M. H. (2000).** A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* **122**, 43–53.
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Gonzalez, L. & Jeffrey, M. (2002).** Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* **83**, 479–489.
- Houston, F., Goldmann, W., Chong, A., Jeffrey, M., Gonzalez, L., Foster, J., Parnham, D. & Hunter, N. (2003).** BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* **423**, 498.
- Hunter, N. (1997).** Molecular biology and genetics of scrapie in sheep. In *The Genetics of Sheep*, pp. 225–240. Edited by L. Piper & A. Ruvinsky. Wallingford, UK: CAB International.
- Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingwall, W. S. & Greig, A. (1997).** Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec* **140**, 59–63.
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M. & Gonzalez, L. (2002).** Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol* **127**, 264–273.
- Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. & Bodemer, W. (1996).** Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Mol Med* **2**, 725–734.
- Krasemann, S., Jürgens, T. & Bodemer, W. (1999).** Generation of monoclonal antibodies against prion proteins with an unconventional nucleic acid-based immunization strategy. *J Biotechnol* **73**, 119–129.
- Lasmézas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Hauw, J. J. & Dormont, D. (1996).** Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **77**, 1601–1609.
- Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Robain, O. & 7 other authors (1997).** Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**, 402–405.
- Lezmi, S., Bencsik, A. & Baron, T. (2001).** CNA 42 monoclonal antibody identifies FDC as PrP<sup>Sc</sup> accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Vet Immunol Immunopathol* **82**, 1–8.
- Ligos, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J. & Simmons, M. M. (2002).** Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol* **127**, 45–57.
- Madec, J.-Y., Groschup, M. H., Calavas, D., Junghans, F. & Baron, T. (2000).** Protease-resistant prion protein in brain and lymphoid organs of sheep within a naturally scrapie-infected flock. *Microb Pathog* **28**, 353–362.
- Manuelidis, L., Fritch, W. & Xi, Y. G. (1997).** Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* **277**, 94–98.
- Miller, J. M., Jenny, A. L., Taylor, W. D., Marsh, R. F., Rubenstein, R. & Race, R. E. (1993).** Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* **5**, 309–316.
- Onodera, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y. & Shinagawa, M. (1993).** Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. *Microbiol Immunol* **37**, 311–316.
- Pattison, I. H. (1988).** Fifty years with scrapie: a personal reminiscence. *Vet Rec* **123**, 661–666.
- Prusiner, S. B. (1991).** Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515–1522.
- Race, R. & Chesebro, B. (1998).** Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* **392**, 770.
- Race, R., Jenny, A. & Sutton, D. (1998).** Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis* **178**, 949–953.
- Race, R., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B. & Chesebro, B. (2001).** Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt–Jakob disease in humans. *J Virol* **75**, 10106–10112.
- Ryder, S. J., Spencer, Y. I., Bellerby, P. J. & March, S. A. (2001).** Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec* **148**, 7–13.
- Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P. & Smits, M. A. (1996).** Preclinical test for prion diseases. *Nature* **381**, 563.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. & Langeveld, J. P. (1995).** Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* **32**, 299–308.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. & Langeveld, J. P. (1996).** Immunohistochemical detection of prion in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* **34**, 1228–1231.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P. & Smits, M. A. (2000).** Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl.* **16**, 57–71.
- Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R. & 14 other authors (2001).** Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J Virol* **75**, 5977–5984.
- Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C. M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A. L., Detwiler, L. & Prusiner, S. B. (1994).** Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev* **8**, 959–969.
- Wood, J. L. N., McGill, I. S., Done, S. H. & Bradley, R. (1997).** Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982–1991. *Vet Rec* **140**, 167–174.
- Zlotnik, I. (1958).** The histopathology of the brain stem of sheep affected with natural scrapie. *J Comp Pathol* **68**, 148–165.

## Article 6

---

### **Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie isolates and experimental BSE in sheep using Western blot and immunohistochemical methods**

STÉPHANE LEZMI, STUART MARTIN, STÉPHANIE SIMON, EMMANUEL COMOY, ANNA BENCSIK, JEAN-PHILIPPE DESLYS, JACQUES GRASSI, MARTIN JEFFREY, THIERRY BARON

Article soumis à *Journal of Virology* et accepté en 2004

Dans le cadre du développement de techniques permettant de différencier l'agent de l'ESB de la tremblante naturelle chez le mouton, un test ELISA basé sur des différences de sensibilité à la protéinase K (PK) entre la PrP issue de moutons atteints de tremblante et celle issue de moutons expérimentalement infectés par l'ESB, a été mis au point par l'équipe du Dr Grassi.

Lors de l'évaluation de ce test, deux moutons atteints de tremblante naturelle sur 214 ont présenté une signature différente des autres cas de tremblante, se rapprochant en partie de celle obtenue chez les moutons infectés par l'ESB.

Des investigations supplémentaires ont été menées sur ces deux moutons dans le but de caractériser leur maladie. L'utilisation du western blot, qui permet d'évaluer la taille des fragments de PrP<sup>res</sup> après digestion à la PK, a permis de montrer que la taille de la bande non glycosylée de la PrP<sup>res</sup> est très proche de celles obtenues chez des moutons expérimentalement infectés par l'ESB comparativement à d'autres cas de tremblante. L'utilisation de l'anticorps anti-prion, P4, qui reconnaît un épitope proche de la zone de clivage par la PK, aboutit à une diminution du signal chez ces deux moutons comparativement à un mouton atteint de tremblante naturelle de même génotype et provenant du même troupeau. Cette diminution du signal est cependant moins importante que dans le cas d'ESB-ovine expérimental étudié.

Ces deux échantillons particuliers, tout comme plusieurs autres cas de tremblante naturelle, ont clairement été distinguables de ceux provenant de trois moutons expérimentalement infectés par l'ESB par analyse immunohistochimique des processus cellulaires de dégradation de la PrP<sup>sc</sup> dans le SNC et les organes lymphoïdes.

La caractérisation des souches d'agent infectieux impliquées dans ces deux échantillons nécessite des études de transmission à la souris. Cependant, nos données encouragent l'utilisation de différentes méthodes permettant de caractériser les propriétés moléculaires fines de la PrP anormale afin d'identifier des possibles similitudes induites par l'agent de l'ESB chez les ovins.

## 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

Stéphane Lezmi,<sup>1</sup> Stuart Martin,<sup>2</sup> Stéphanie Simon,<sup>3</sup> Emmanuel Comoy,<sup>4</sup> Anna Bencsik,<sup>1</sup> Jean-Philippe Deslys,<sup>4</sup> Jacques Grassi,<sup>3</sup> Martin Jeffrey,<sup>2</sup> and Thierry Baron<sup>1\*</sup>

*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité Virologie-ATNC, 69364 Lyon Cedex 07,<sup>1</sup> CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA/Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex,<sup>3</sup> and CEA, GIDTIP/DRM/DSV, CEA/Fontenay aux Roses, Fontenay-aux-Roses,<sup>4</sup> France, and Veterinary Laboratory Agency, VLA Lasswade, Penicuik, Midlothian EH26 OPZ, United Kingdom<sup>2</sup>*

Received 27 August 2003/Accepted 10 December 2003

Since the appearance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and its linkage with the human variant of Creutzfeldt-Jakob disease, the possible spread of this agent to sheep flocks has been of concern as a potential new source of contamination. Molecular analysis of the protease cleavage of the abnormal prion protein (PrP), by Western blotting (PrP<sup>res</sup>) or by immunohistochemical methods (PrP<sup>d</sup>), has shown some potential to distinguish BSE and scrapie in sheep. Using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay, we identified 18 infected sheep in which PrP<sup>res</sup> showed an increased sensitivity to proteinase K digestion. When analyzed by Western blotting, two of them showed a low molecular mass of unglycosylated PrP<sup>res</sup> as found in BSE-infected sheep, in contrast to other naturally infected sheep. A decrease of the labeling by P4 monoclonal antibody, which recognizes an epitope close to the protease cleavage site, was also found by Western blotting in the former two samples, but this was less marked than in BSE-infected sheep. These two samples, and all of the other natural scrapie cases studied, were clearly distinguishable from those from sheep inoculated with the BSE agent from either French or British cattle by immunohistochemical analysis of PrP<sup>d</sup> labeling in the brain and lymphoid tissues. Final characterization of the strain involved in these samples will require analysis of the features of the disease following infection of mice, but our data already emphasize the need to use the different available methods to define the molecular properties of abnormal PrP and its possible similarities with the BSE agent.

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are neurodegenerative diseases which include scrapie of sheep and goats and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. Epidemiological studies have failed to demonstrate any link between scrapie and CJD (36). Since the appearance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle (45), other novel TSEs involving ruminants from zoological collections and feline species (1, 32, 35, 48) and humans (variant CJD) (21) have emerged. Strain typing studies with mice have shown that these new prion diseases are linked to the BSE agent (7) and are probably due to consumption of BSE-contaminated tissues. The BSE agent, whether isolated from primary cattle infection or from different naturally or experimentally exposed species, indeed shows remarkably uniform features following transmission to mice (7, 12, 17).

The origin of the cattle BSE agent remains unknown, but it most probably originated from adaptation and recycling of the sheep scrapie agent in cattle (46, 47). Irrespective of the origins of BSE in cattle, the susceptibility of sheep to BSE has been demonstrated by using several different routes of infection (including the oral route) (2, 14–16, 29). The possibility of

spread of this agent to sheep flocks is therefore of considerable concern, as exposure to BSE-contaminated meat and bone meal in some flocks is a real possibility (8). Thus, the precise identification of the BSE agent in sheep is needed, particularly as it may represent a potential new source of contamination for human beings. This identification of BSE in sheep cannot be made by analysis of clinical signs, as BSE-infected sheep show signs similar to those observed in naturally occurring scrapie (2, 15, 25).

The biochemical analysis of abnormal prion protein (PrP), the only specific marker of these diseases (6), can potentially contribute to strain identification. Abnormal PrP is derived from a normal host protein named PrP<sup>c</sup>. The abnormal PrP is partially resistant to protease digestion (PrP<sup>res</sup>) and gives a 27- to 30-kDa fragment after proteinase K (PK) treatment (6); in rodent scrapie a sequence of 62 N-terminal amino acids is digested, leaving a core of 141 amino acids (33). By using the Western blotting method and specific antibodies directed against the core globular domain of the PrP, three fragments can be separated by their relative molecular weights; these correspond to the diglycosylated, monoglycosylated, and nonglycosylated forms of the protein. While high levels of diglycosylated PrP<sup>res</sup> were found in sheep experimentally infected with BSE, natural sheep scrapie and BSE of cattle could not be readily distinguished according to ratios of the different PrP<sup>res</sup> glycoforms (5, 40). Some studies have identified a lower mo-

\* Corresponding author. Mailing address: AFSSA, Unité Virologie-ATNC, 31 avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France. Phone: 33(0)4 78 72 65 43. Fax: 33(0)4 78 61 91 45. E-mail: t.baron@lyon.afssa.fr.

TABLE 1. Sheep used in the study

Group <sup>a</sup>	Identification no. (infection route <sup>b</sup> )	Sheep breed	PrP genotype	Age at death (yr) or dpi <sup>c</sup>	Origin
1	SB1 (i.p.)	Lacaune	ARQ/ARQ	672 dpi	France
	SB3 (i.s.)	Lacaune	ARQ/ARQ	1,444 dpi	France
	R1207 (i.c.)	Romney	ARQ/ARQ	519 dpi	United Kingdom
2	R680	Suffolk	ARQ/ARQ	892 days	United Kingdom
3	O100 <sup>d</sup>	Manech Tête Rousse	VRQ/VRQ	5 yr (1996)	France
	O104 <sup>d</sup>	Manech Tête Rousse	VRQ/VRQ	2 yr (1997)	France
	O58	Manech Tête Rousse	VRQ/VRQ	4 yr (1996)	France
	O54	Manech Tête Rousse	ARQ/XRQ	2 yr (1996)	France
4	O76	Manech Tête Rousse	ARQ/ARQ	2 yr (1996)	France
	O180	Texel × Charollais	ARH/VRQ	Preclinical (1997)	France
	O175	Texel × Charollais	ARQ/VRQ	2 yr (1997)	France
	7028	Romanov × Ile de France	ARQ/VRQ	Preclinical (1999)	France

<sup>a</sup> Group 1, experimentally infected sheep with BSE; group 2, natural scrapie case from the United Kingdom; group 3, naturally infected sheep from a single French flock; group 4, naturally infected sheep from three separate French flocks.

<sup>b</sup> i.p., intraperitoneal infection; i.s., intrasplenic infection; i.c., intracerebral infection.

<sup>c</sup> dpi, day postinfection.

<sup>d</sup> Sheep with unusual Western blot profile.

lecular mass of the unglycosylated PrP<sup>res</sup> in variant CJD compared to most other forms of CJD in humans and also in experimentally BSE-infected sheep compared to natural scrapie cases (2, 9, 21, 40). However, in sheep, a low molecular mass has also been found in the experimental scrapie isolate CH1641 (2, 22, 23, 40), although some molecular differences from the BSE agent in sheep have been reported (40).

Recently, an immunohistochemical approach for identification of BSE in sheep has also been achieved by characterizing the epitopes of abnormal PrP present in neurons and also in phagocytic cells of the lymphoreticular system and brain. This method does not use protease treatment, and the term PrP<sup>d</sup> is used to describe the abnormal disease-specific accumulations of PrP seen by immunohistochemistry. However, by using different peptide-specific antibodies directed against the PK cleavage region of the PrP, a more extensive digestion of the abnormal PrP was revealed in tingibile body macrophages (TBMs) in lymphoid tissues and in glial cells and neurons in the brains of BSE-infected sheep compared to natural scrapie cases (27, 28).

Taken together, all of the data strongly suggest that PrP<sup>res</sup> from animals or humans infected by the BSE agent is more susceptible to PK treatment than PrP<sup>res</sup> found in scrapie-infected animals. As a consequence, a larger segment of the N-terminal sequence of PrP<sup>res</sup> is removed by proteolytic treatment, leading to a loss of the corresponding epitopes. This has already been illustrated in previous studies showing that the epitope recognized by the P4 monoclonal antibody (20) was specifically unexposed in BSE-infected cattle and sheep while kept in scrapie-infected sheep, apart from the CH1641 experimental scrapie isolate (40). On the basis of such observations, a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed, which checks for the presence of the octa-repeat sequence following PK treatment as a way to identify the BSE agent in sheep (39).

In order to identify potential BSE cases in flocks, a series of 214 scrapie samples from affected French flocks was analyzed by the ELISA technique. In this screening step, most of the

brain samples behaved like conventional scrapie samples, but 18 of them showed an increased protease cleavage without reproducing the behavior observed in a BSE-infected sheep control. Interestingly, when tested by Western blotting, 2 of these 18 samples, both originating from the same flock, showed an unglycosylated band with a lower molecular mass than in other scrapie samples and similar to that found in BSE-infected sheep. A precise characterization of these two cases was made in comparison to experimental BSE in sheep and natural scrapie cases, by Western blotting and by using an immunohistochemical analysis of PrP<sup>d</sup> processing in phagocytic cells of the lymphoreticular system and in brain.

## MATERIALS AND METHODS

A series of 214 French field sheep scrapie isolates, collected between 1991 and 1998 through the French surveillance network for suspect clinical cases (D. Calavas, AFSSA-Lyon, France), was first screened by use of the ELISA method to seek suspect cases with molecular features resembling those of experimentally BSE-infected sheep. Following analysis of the molecular masses for suspect cases by Western blotting, a panel of sheep scrapie cases was chosen for further detailed studies by using Western blotting and immunohistochemical methods, in comparison with experimentally BSE-infected sheep.

**Sheep TSE isolates.** The sheep used in this study are described in Table 1.

(i) **Group 1.** Group 1 consisted of sheep experimentally infected with BSE. Two Lacaune sheep with a PrP genotype known to give sensitivity to natural scrapie (ARQ/ARQ at codons 136, 154, and 171) were inoculated by either the intraperitoneal or intrasplenic route with 0.5 g of a brain homogenate from a French BSE-affected cow. One animal died at 672 days postinoculation (after intraperitoneal infection), and the other was euthanized at 1,444 days postinoculation (after intrasplenic infection) after having shown clinical signs of neurological disease. Sheep R1207 was an ARQ/ARQ Romney sheep experimentally challenged intracerebrally with a 10<sup>-4</sup> dilution of BSE-infected brain homogenate. The animal developed clinical disease and was euthanized at 519 days postinoculation. Typical vacuolar pathology, brain, and peripheral PrP<sup>d</sup> accumulation were present in all three sheep experimentally infected with BSE.

(ii) **Group 2.** Group 2 consisted of one sheep with natural scrapie. R680 was a naturally diseased ARQ/ARQ British Suffolk sheep which died 892 days after birth. The animal showed typical vacuolar pathology and PrP<sup>d</sup> accumulation as previously characterized in this flock (18).

(iii) **Group 3.** Group 3 consisted of four Manech Tête Rousse sheep from the same affected flock for which the first official declaration of scrapie occurred in 1996. These sheep were euthanized between December 1996 and February

1997 when they were between 2 and 5 years of age and presenting with clinical signs of scrapie. The histological examination of fixed brain stems confirmed the diagnosis of TSE. Only frozen frontal brain regions were available for biochemical studies. Of these four samples, two (O100 and O104) showed moderate or severe autolysis as determined by routine histology methods. Preliminary studies of PrP<sup>res</sup> patterns in sheep by using Western blotting had shown an usual pattern in the O100 and O104 isolates, with a low molecular mass of the unglycosylated PrP<sup>res</sup>, compared to previous data obtained in the laboratory (2).

(iv) **Group 4.** Group 4 included four sheep with histologically confirmed TSE detected from three other outbreaks within the French surveillance network. Biochemical studies were also performed on frontal brain regions, and histological analysis was performed on hindbrains.

**ELISA procedure.** The ELISA used in this study was designed to distinguish BSE from scrapie. It is similar in design to a rapid test used on a large scale in Europe (the Bio-Rad test formally developed by CEA). In this test PrP<sup>res</sup> is first purified and concentrated before being denatured and analyzed by using a sandwich immunoassay (19). The capture antibody, immobilized into the solid phase, recognizes an epitope in the N terminus of the PrP, whereas the tracer antibody binds to the C-terminal moiety. In the Bio-Rad tests used for the postmortem diagnosis of BSE in cattle, the PK digestion, which is a key step in this assay, is done in a controlled medium (a mixture of detergents and chaotropic agents) so that the N-terminal epitope recognized by the capture antibody is preserved during the proteolysis. By varying the conditions of PK treatment (notably by altering the nature and concentration of the detergents and chaotropic agents and the PK concentration), we have found that the PrP<sup>res</sup> associated with the BSE agent was more sensitive to PK digestion than other prion strains. Conditions were thus defined in which the epitope recognized by the capture antibody (here the octa-repeat sequence) was eliminated by the PK treatment in the BSE agent but remained preserved in scrapie strains. In practice, we used two sets of conditions of PK treatment. Compared to the Bio-Rad test validated for detection of PrP<sup>res</sup> in cattle BSE, this typing involves several modifications, including a change in the antibodies used for the sandwich immunoassay and the extensive use of PK inhibitors in order to have a better control of PK digestion. A more detailed description of this test will be given elsewhere (S. Simon et al., unpublished data). Under the first set of digestion conditions (set A), the critical epitope is conserved whatever the strain is. In the second set of conditions (set A'), the treatment preferentially eliminates the N-terminal epitope described above in BSE but not in scrapie. Ratios between the two measurements (A/A') were determined for differential detection of BSE and natural scrapie. This ratio is equal (or close) to unity with most natural scrapie isolates and is significantly above unity with the BSE agent.

**Western blot procedure.** Brain samples were homogenized at 10% in a 5% glucose solution by forcing the brain suspension through a 0.4-mm-diameter needle. A 330- $\mu$ l volume was made up to 1.2 ml in 5% glucose before incubation with PK (10  $\mu$ g/100 mg of brain tissue) (Roche) for 1 h at 37°C. *N*-Lauroyl sarcosyl at 30% (600  $\mu$ l; Sigma) was added. After incubation at room temperature for 15 min, samples were centrifuged at 200,000  $\times$  *g* for 2 h on a 10% sucrose cushion in a Beckman TL100 ultracentrifuge. The pellets were resuspended and heated for 5 min at 100°C in 50  $\mu$ l of denaturing buffer (sodium dodecyl sulfate, 4%;  $\beta$ -mercaptoethanol, 2%; glycine, 192 mM; Tris, 25 mM; sucrose, 5%).

Samples were subjected to sodium dodecyl sulfate–15% polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted to nitrocellulose membranes in transfer buffer (Tris, 25 mM; glycine, 192 mM; isopropanol, 10%) at a constant 400 mA for 1 h. The membranes were blocked for 1 h with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline–Tween 20 (0.1%) (PBST). After two washes in PBST, the membranes were incubated (1 h at room temperature) with Bar233 monoclonal antibody (1/5,000 in PBST), which was raised against an ovine histidine-tagged recombinant protein (3) and recognizes the ovine PrP sequence from position 144 to 155 (FGNDYEDRYRE) (5), or with P4 monoclonal antibody (1/5,000), which was prepared against a synthetic ovine PrP sequence from position 89 to 104 (GGGGWGGGSHSQWNK) (from R-biopharm, Darmstadt, Germany) (20). After three washes in PBST, the membranes were incubated (30 min at room temperature) with peroxidase-labeled conjugates against rabbit or mouse immunoglobulins (1/2,500 in PBST) (Clinisciences). After three washes in PBST, bound antibodies were then detected with enhanced chemiluminescence (Amersham) or Supersignal (Pierce) chemiluminescent substrates. Migrations of the unglycosylated PrP<sup>res</sup> were compared for repeated runs of the samples, either on films after exposure of the membranes on Biomax MR Kodak films (Sigma) or by using pictures obtained with the Fluor-S Multimager (Bio-Rad). Molecular masses of the three PrP<sup>res</sup> glycoforms were determined in some selected samples by comparison of at least eight different runs of the samples of the center positions of the PrP<sup>res</sup> bands with a biotinylated marker (SDS-6B; Sigma), using Quantity One software (Bio-Rad). The intensities of PrP<sup>res</sup> signals were assessed

TABLE 2. Antibodies used and their specificity for PrP epitopes

Antibody	Type	Immunogen position (PrP)	Reference
P4	Monoclonal	89–104 (ovine) PrP	20
R521	Polyclonal	94–105 (ovine)	41
505	Polyclonal	100–111 (ovine)	41
Bar233	Monoclonal	145–156 (ovine)	Unpublished data
R486	Polyclonal	221–234 (ovine)	28

by using the Fluor-S-Multimager software, allowing comparisons of reactivities with either Bar233 or P4 monoclonal antibody. Scoring of the reactivities used according to the decrease of P4 labeling: –, no labeling;  $\pm$ , light labeling; +, moderate labeling; and ++, intense labeling. For quantitative studies of glycoform ratios, chemiluminescent signals corresponding to the three glycoforms of the protein were quantified by using a Fluor S-Multimager analysis system. Glycoform ratios were expressed as mean percentages ( $\pm$  standard errors) of the total signal for the three glycoforms (high, low, and unglycosylated), from at least eight different runs of the samples.

**Immunohistochemical procedure.** Tissues were fixed in 10% formalin and then routinely embedded in paraffin wax. To ensure adhesion, tissues sections (5  $\mu$ m thick) were collected onto pretreated glass slides (StarFrost; Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) and dried. Once they were dewaxed, rehydrated sections were used for disease-specific PrP<sup>d</sup> immunohistochemical analysis. Briefly, sections were immersed in 98% formic acid for 5 min, washed in running tap water, and then immersed in 0.2% citrate buffer to be autoclaved for 30 min at 121°C. Endogenous peroxidase was blocked by using 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ethanol for 20 min. After rinsing in tap water and in PBST (0.2% Tween 20) buffer, nonspecific tissue antigens were blocked in normal horse serum for 60 min. Incubation with primary antibody was then performed overnight at 4°C. Different PrP antibodies (Table 2) were used, with the following specific concentrations: R521, 1/10,000; P4, 1/2,000; 505, 1/10,000; and R486, 1/10,000. The first three are directed against the upstream segment of the flexible tail (37) of the abnormal isoform of PrP, and R486 recognizes a more resistant region of the abnormal PrP (28). Bound antibodies were labeled by means of a commercial immunoperoxidase technique (Vector-Elite ABC; Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom). Once labeled, sections were immersed in 0.5% copper sulfate to enhance the intensity of the reaction product. Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin.

The intensity of intraneuronal PrP<sup>d</sup> labeling was subjectively estimated according to criteria presented in a previous paper (28): –, no labeling;  $\pm$ , trace of light labeling; +, light labeling; ++, moderate labeling; and +++, intense labeling over most of the target site.

## RESULTS

**ELISA screening of French field sheep isolates.** The experimental ovine BSE samples (group 1, SB1 and SB3) were used as internal controls in each series of measurements, and these were characterized by an A/A' ratio of  $3.3 \pm 0.8$  (absolute values of between 2.3 and 5.3). Most of the scrapie isolates had A/A' ratios of close to 1, while 18 had ratios that were consistently and repeatedly greater than 1 (ranging from 1.4 to 3.1). Due to interassay variations, the two populations (experimental BSE and field isolates) overlapped; however, in a given series, none of the field isolates behaved like the experimental BSE control. For instance, in the series including the field sample with an A/A' ratio of 3.1, the corresponding BSE value was 4.9. A more detailed description of results obtained for field sheep samples and experimental BSE in sheep will be given elsewhere (Simon et al., unpublished data). However, when analyzed by Western blotting, 2 of the 18 samples (O100 and O104, both originating from the same flock [group 3]) giving the highest ELISA ratios showed a lower apparent molecular weight of the unglycosylated PrP<sup>res</sup>. These two isolates were then characterized in more detail by Western blotting and

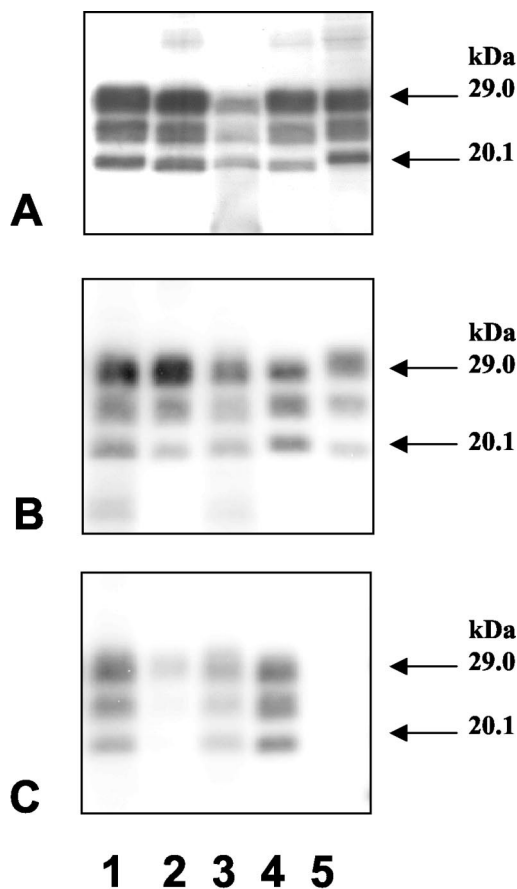


FIG. 1. Western blotting analysis of PrP<sup>res</sup> with Bar233 (A and B) or P4 (C) monoclonal antibody. (A) Lanes: 1, cattle BSE; 2, BSE-infected sheep (intraperitoneal inoculation); 3, sheep scrapie case O100; 4, BSE-infected sheep (intrasplenic inoculation); 5, natural scrapie case. (B and C) Lanes: 1, sheep scrapie case O100; 2, BSE-infected sheep (intraperitoneal inoculation); 3, sheep scrapie case O104; 4, sheep scrapie case O58; 5, cattle BSE.

immunohistochemical methods together with a panel of other sheep isolates, including those from field cases and experimental BSE in sheep, as described in Materials and Methods and in Table 1.

**Western blotting study of sheep TSE isolates.** All but one (O180, group 4) of the eight field scrapie samples studied by Western blotting gave a characteristic protein banding pattern corresponding to the three glycoforms of PrP<sup>res</sup>, with the diglycosylated (top), the monoglycosylated (middle), and the unglycosylated (bottom) bands (Fig. 1). It should be noted that samples O100 and O104 (group 3), strongly autolysed, showed only low levels of PrP<sup>res</sup>, and smears were regularly observed on Western blotting.

The unglycosylated PrP<sup>res</sup> fragment from the two sheep experimentally infected with French cattle BSE (Fig. 1A, lanes 2 and 4) had a low molecular mass, slightly lower than that of PrP<sup>res</sup> from a BSE-infected cow (Fig. 1A, lane 1). The unglycosylated PrP<sup>res</sup> fragments of six of eight French scrapie-affected sheep had a clearly distinct and higher molecular mass compared with PrP<sup>res</sup> from BSE-infected animals (Fig. 1A and B, lanes 5 and 4, respectively), as previously described (2). Repeated runs of samples from the two other naturally in-

fectured French sheep (O100 and O104) from the same Manech Tête Rousse flock showed, from extractions from different regions of the available frozen brain sample, an unglycosylated PrP<sup>res</sup> fragment with a molecular mass similar to that found in BSE-infected sheep (Fig. 1A and B). These results were reproduced in two different laboratories.

The molecular masses and glycoform ratios obtained from repeated runs of these two samples (O100 and O104) are shown in Fig. 2B, in comparison with another sample from a sheep (O58) with the same homozygous V<sub>136</sub> R<sub>154</sub> Q<sub>171</sub> genotype from the same flock and with BSE infection in cattle or in sheep.

Comparison of the intensities of PrP<sup>res</sup> signals detected by using the Bar233 and P4 monoclonal antibodies showed a strong lowering of PrP signals with the P4 antibody in BSE-infected sheep (Fig. 1C, lane 2). Scoring of the differential reactivities (P4/Bar233) for the different samples is indicated in Fig. 1C. A lowering of P4 immunoreactivity was also observed in O100 and O104 when compared in repeated runs of the samples with the sample O58, which shows unglycosylated PrP<sup>res</sup> a higher molecular mass. This decrease was, however, clearly less pronounced than that observed with BSE-infected sheep. Cattle PrP<sup>res</sup> was not detected with P4 monoclonal antibody (Fig. 1C, lane 5). The glycoform ratios observed following PrP<sup>res</sup> detection with Bar233 antibody (Fig. 2A) showed very high levels of diglycosylated PrP<sup>res</sup> in BSE-infected sheep,

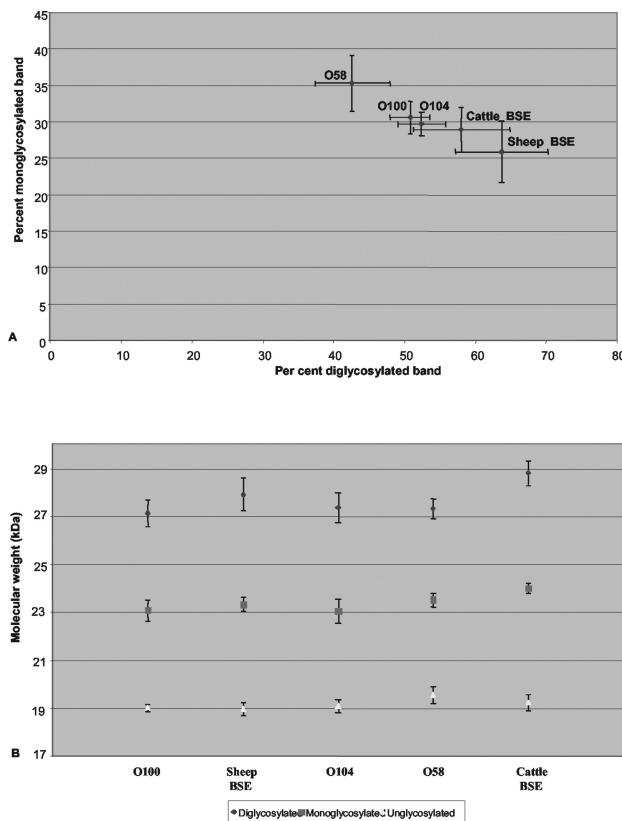


FIG. 2. Glycoform ratios (A) and molecular masses (B) (means ± standard deviations) of PrP<sup>res</sup> detected by Western blotting with the Bar233 monoclonal antibody in sheep infected with natural scrapie or experimental BSE and in cattle with BSE.

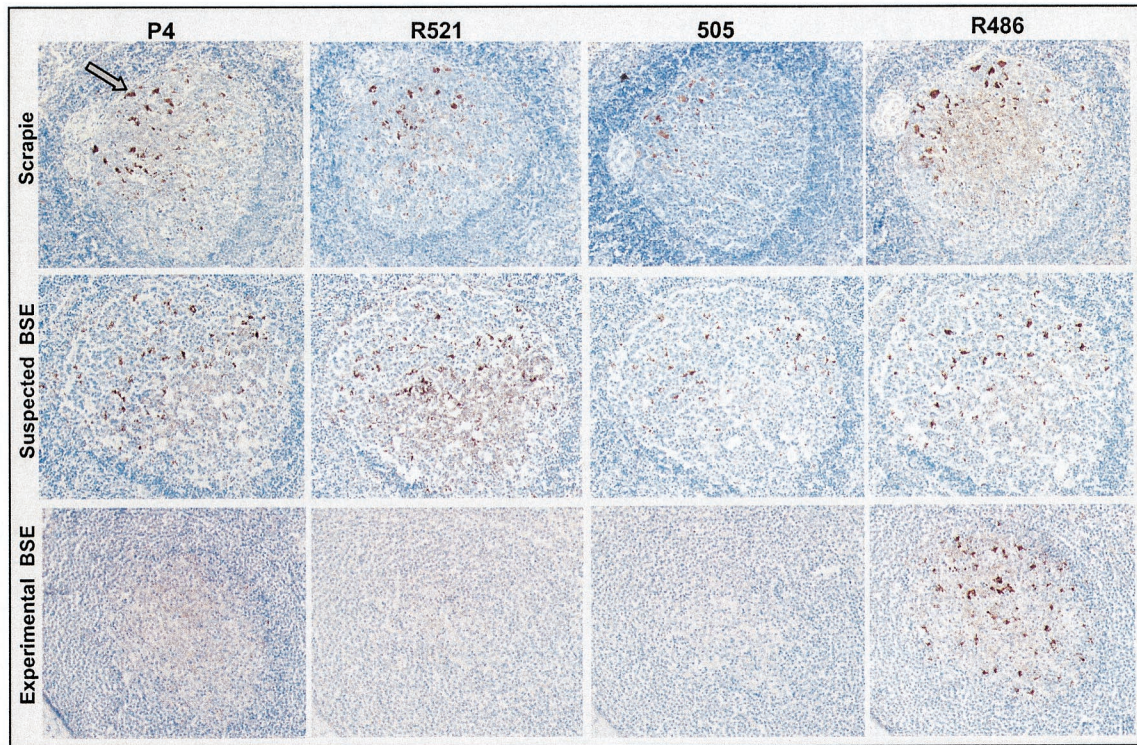


FIG. 3. Comparison of immunolabeling of PrP<sup>d</sup> in lymph nodes with the P4, R521, 505, and R486 antibodies on serial sections. TBMs were labeled with all of the antibodies used in the natural cases of sheep TSE (brown deposits; arrow) (row 1) and in O100 (row 2) but not in experimentally infected sheep with BSE (row 3), where only R486 gave labeling. In row 2, the O100 sheep follicle shows numerous tissue spaces within the light zone and also shows separation of the follicular capsule from adjacent paracortical lymphocytes. These features are not present in the other two samples shown and are caused by postmortem changes consistent with autolysis. A  $\times 10$  objective was used.

which was at least twice as abundant as the monoglycosylated form, in contrast with natural scrapie cases, including O100 and O104. PrP<sup>res</sup> from BSE-infected cattle showed intermediate levels of glycosylation, overlapping with those of natural scrapie cases O100 and O104.

**Immunohistochemical study. (i) Lymphoid organs: TBMs.** Lymphoid organ samples were immunolabeled with R521, P4, 505, and R486 antibodies. The results show that most antibodies labeled follicular dendritic cells (FDCs) and TBMs with different intensities (Fig. 3).

In all samples obtained from naturally exposed sheep (groups 2, 3, and 4), TBMs were labeled with all of the antibodies used (Fig. 3). This same pattern was observed for the two Manech Tête Rousse sheep (O100 and O104), which in Western blotting showed unglycosylated bands similar to those from BSE-infected sheep (Fig. 3). In contrast, TBMs of sheep experimentally infected with BSE (group 1) were labeled only with antibody R486 (Fig. 3). These different patterns of TBM labeling, for natural TSE or experimental BSE, were found in all lymph node, spleen, or Peyer's patch samples examined. No differences were observed between natural TSE cases from France or the United Kingdom or between BSE-infected sheep, of different breeds and infected via different routes with either French or British BSE cattle samples.

**(ii) Central nervous system.** At the level of the obex sections, the patterns of PrP<sup>d</sup> immunolabeling produced by different antibodies were compared for the different sheep ana-

lyzed (natural sheep TSE isolates and experimental BSE in sheep). For each brain stem sample, the dorsal nucleus vagus (X) and the hypoglossal (XII) and olivary nuclei were studied in order to characterize the intraglial and intraneuronal PrP<sup>d</sup> labeling patterns.

**(a) Intraglial labeling.** PrP<sup>d</sup> was detected with R521, P4, 505, and R486 antibodies in all naturally occurring TSE cases from the United Kingdom and France analyzed (groups 2, 3, and 4) (Fig. 4). The precise identification of the labeling was always indicated by the presence of a nucleus (in blue) closely associated with a coarse particulate type of PrP<sup>d</sup> deposit (brown deposits) (Fig. 4). This same pattern, with a similar intensity, was found for TSE cases O100 and O104 (Fig. 4). In contrast, in all BSE-affected sheep, whereas the 505 and R486 antibodies produced a similar intracellular PrP<sup>d</sup> labeling of glial cells, P4 and R521 did not produce this type of labeling (Fig. 4).

**(b) Intraneuronal labeling.** The intracytoplasmic labeling of PrP<sup>d</sup> in neurons in the dorsal (parasympathetic) nucleus of the vagal nerve (X) and the hypoglossal (XII) and olivary nuclei was studied. In brain stem samples from natural TSE cases, the P4, R521, 505, and R486 antibodies produced an intracytoplasmic labeling of neurons (Fig. 5); the labeling being more intense with both P4 and R486. Of the three brain stem nuclei studied, the intensity of this intracytoplasmic labeling was generally more conspicuous in the olivary nucleus (Table 3). This same pattern with a similar intensity was found for natural TSE cases O100 and O104 (Fig. 5; Table 3). For the BSE-infected



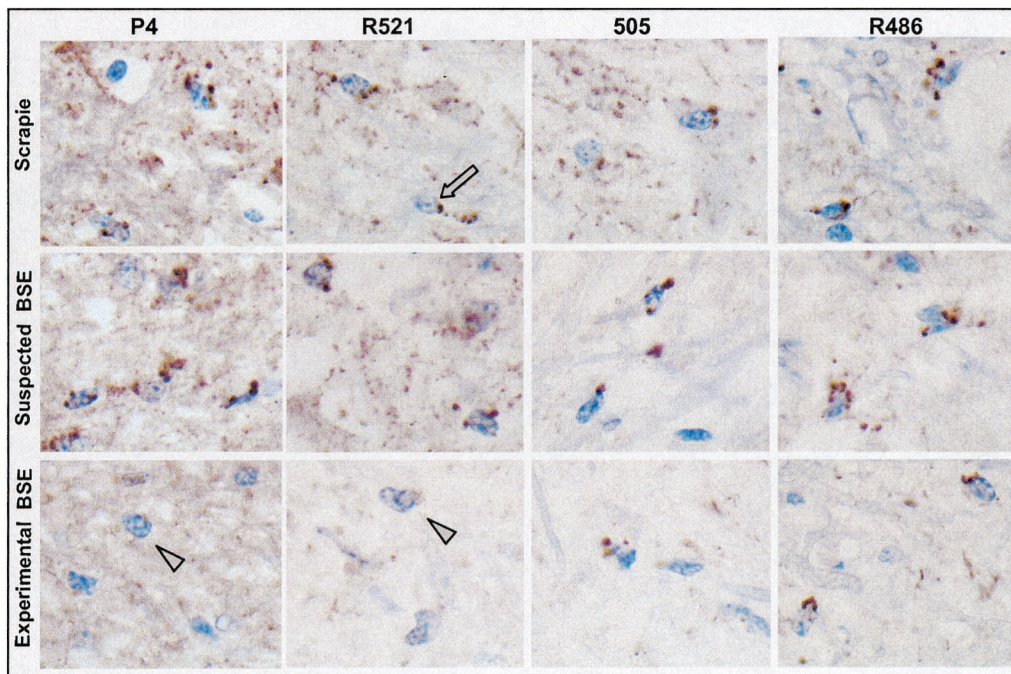


FIG. 4. Comparison of intragial PrP<sup>d</sup> immunolabeling (brown deposits; arrow) with the P4, R521, 505, and R486 antibodies on serial sections of brain stem. Intragial PrP<sup>d</sup> was labeled with all of the antibodies used in the cases of natural sheep TSE (row 1) and in O100 (row 2) but not in sheep experimentally infected with BSE (row 3) (arrowheads), where only R486 and 505 gave labeling of glia. A ×100 objective was used.

sheep samples, only R521, 505, and R486 produced an intracytoplasmic labeling of neurons, with a more intense labeling observed with R486; P4 did not producing this labeling (Fig. 5; Table 3).

**DISCUSSION**

We describe features of the abnormal PrP accumulating in the brains of sheep with natural TSE or with experimental

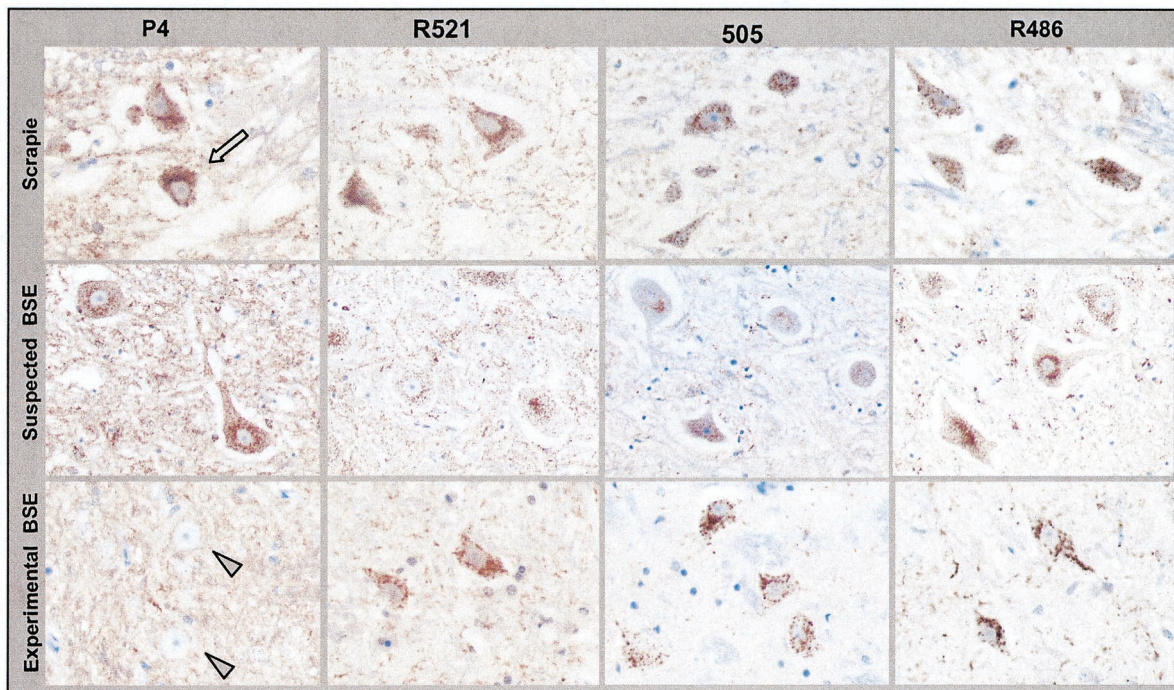


FIG. 5. Comparison of intraneuronal PrP<sup>d</sup> immunolabeling (brown deposits; arrow) with the P4, R521, 505, and R486 antibodies on serial sections of brain stem. Intraneuronal PrP<sup>d</sup> was labeled with all of the antibodies used in the natural cases of sheep TSE (row 1) and in O100 (row 2) but not in sheep experimentally infected with BSE (row 3), where no intraneuronal immunolabeling was obtained with P4 (arrowheads). A ×40 objective was used.

TABLE 3. Comparative intensity of intraneuronal immunolabeling in dorsal nucleus vagus (X), hypoglossal nucleus (XII), and olivary nucleus with the P4 and R486 antibodies

Animal <sup>a</sup>	Labeling <sup>b</sup> of:			Antibody
	X	XII	Olivary nucleus	
SB1	+	ND <sup>c</sup>	+++	R486 P4
	-	ND	+/-	
SB3	++	++	+++	R486 P4
	-	+/-	+/-	
R1207	++	++	+++	R486 P4
	-	-	+/-	
R680	+	+	+++	R486 P4
	+	+	+++	
O100	++	++	+	R486 P4
	++	++	+/-	
O104	++	+++	+++	R486 P4
	++	++	+/-	
O58	++	++	+++	R486 P4
	++	+++	+++	
O54	++	+	+++	R486 P4
	++	+	+++	
O76	++	++	+++	R486 P4
	++	++	+++	
O180	++	+	++	R486 P4
	++	+	+/-	

<sup>a</sup> SB1 and SB3 are sheep from France that were experimentally infected with BSE by the intraperitoneal and intrasplenic routes, respectively; R1207 is a sheep from the United Kingdom that was experimentally infected with BSE; and R680 is a sheep from the United Kingdom with natural scrapie. All others are sheep from France with natural TSE.

<sup>b</sup> See Materials and Methods.

<sup>c</sup> ND, not determined.

BSE, originating from either British or French sources, determined by using ELISA and Western blotting detection of PrP<sup>res</sup> or immunohistochemical detection of PrP<sup>d</sup>. The specific Western blotting features of PrP<sup>res</sup> had already been described for BSE-infected sheep of different breeds from both French and United Kingdom sources, which typically showed a lower molecular mass of the unglycosylated PrP<sup>res</sup> than seen for natural scrapie cases or for cattle BSE (2, 22, 40). We also confirmed in this study that PrP<sup>res</sup> was only faintly labeled by the P4 monoclonal antibody, as previously described for sheep infected with British cattle BSE by using a modification of a rapid Western blotting diagnosis test for BSE (40). These biochemical features were identical in the two Lacaune sheep inoculated with French cattle BSE agent by the intraperitoneal or intrasplenic route in this study. As also previously reported (40), the decrease of P4 labeling was also less in BSE-infected sheep than in cattle BSE, which might be linked to the different sequences in this region of the protein in the two species. More importantly, this work also demonstrates the same differences in the immunohistochemical labeling of PrP<sup>d</sup> in phagocytic cells of the lymphoreticular system and brain and in neurons in BSE-infected sheep inoculated with French or British cattle BSE agent, compared with naturally occurring scrapie cases, as

previously observed (27, 28). Whereas these differences seem to be independent of the breed and route of infection, these results, consistent with a common origin of French and British BSE, further suggest that characterization of the protease cleavage site could aid identification of potential BSE cases in sheep.

The identification of the precise cell type accumulating PrP<sup>d</sup> in TSE-affected sheep can be based on the shape and the localization of the implicated cells or on specific markers. In lymphoid organs, FDCs and TBMs were identified as accumulating abnormal PrP (31, 41), as well as different cell populations in the central nervous system (18, 38). Extracellular forms of PrP<sup>d</sup> released around neurons, astrocytes, and FDCs of sheep infected with scrapie are present as the full-length protein (26). In TBMs, glial cells, and neurons, intralysosomal PrP<sup>d</sup> appeared to be truncated by protein-degrading enzymes, and antibodies such as BG4 and FH11 did not label PrP<sup>d</sup> in these cells, as they are directed against the downstream segment of the N-terminal end of PrP (28, 37). It is therefore suggested that the N terminus of PrP<sup>d</sup> acquired from the extracellular space is digested within phagocytic cell lysosomes. A more detailed analysis using P4, R521, and 505 antibodies directed against the upstream segment of the flexible tail of the PrP molecule permits differentiation of BSE in sheep from different sheep scrapie sources (27, 28). This differentiation is possible because the degradation of the abnormal PrP in lysosomes seems to be more extensive in BSE infection than in natural scrapie. In sheep BSE, the P4, R521, and 505 antibodies do not label PrP<sup>d</sup> in TBMs, in contrast to what was observed for scrapie. The specific degradation of PrP<sup>d</sup> is, however, variable in different cells, being more extensive in TBMs, less so in glial cells, and less again in neurons. The precise site of truncation delimiting the most resistant domain of the abnormal PrP is therefore difficult to determine because of this cellular variation of PrP<sup>d</sup> labeling and because results can vary according to pretreatments used for PrP<sup>d</sup> antigen retrievals. Nevertheless, all of the results suggest that a more extensive truncation of the PrP<sup>d</sup> occurred in phagocytic cells and in neurons in BSE-infected sheep than with scrapie infection, and these immunohistochemical results are consistent with those obtained by using the Western blotting method after PK treatment. The more extensive protease digestion of the PrP<sup>res</sup> extracted from BSE-infected animals has been characterized by epitope mapping following Western blotting detection or by N-terminal sequencing of the PrP<sup>d</sup> protein following transmission in sheep (40), mice (4), and humans (34).

Following an initial screening by using an ELISA technique aimed at identifying the BSE agent in sheep based on the reactivity against an epitope close to the PK cleavage site, Western blotting studies of PrP<sup>res</sup> extracted from the brains of French sheep field TSE cases led to the finding of two particular cases (O100 and O104), of the same genotype (VRQ/VRQ) and from a same flock, that showed some similarities with BSE in sheep regarding the molecular mass of the unglycosylated PrP<sup>res</sup>. Other cases analyzed in this study (O58 and O54 [group 3], including a sheep of this same genotype from this flock, and four sheep from other TSE outbreaks [group 4]) showed the PrP<sup>res</sup> pattern previously described for natural scrapie cases, with a clearly distinct and higher molecular mass compared to that for BSE in sheep (2, 22, 40). So far, a single

sheep TSE isolate, CH1641, with close similarities in the migration of unglycosylated PrP<sup>res</sup> to that found for BSE in sheep has been described. CH1641 has been experimentally maintained by serial passages in sheep from a scrapie case that occurred in the United Kingdom in the 1970s (2, 13, 23). The BSE agent and CH1641 in sheep also shared a strongly decreased recognition by the P4 monoclonal antibody compared to that in natural scrapie cases (40). P4 labeling was also decreased in O100 and O104 compared to a scrapie control of the same genotype and from the same flock, but to a lesser extent than for BSE in sheep. These results are in good agreement with those obtained by ELISA characterization of protease digestion, showing an increased protease digestion without reaching the level found for BSE in sheep. In contrast with immunohistochemical methods, biochemical analysis does not allow characterization of the cell types in which PrP<sup>res</sup> accumulates. The natural TSE sheep samples described above were studied by immunohistochemical methods, using antibodies close to the protease cleavage site, in brain and lymphoid tissues. All of them, including those from the two affected sheep with unusual Western blotting patterns, O100 and O104, had a typical scrapie-like signature by immunohistochemical analysis. We also observed differences of glycoform ratios between natural sheep TSE cases, including O100 and O104, and experimental BSE in sheep. These differences, mainly linked to the very high levels of diglycosylated PrP<sup>res</sup> in BSE-infected sheep, are quite consistent with those previously described for British cases of natural scrapie or experimental BSE, using a modified version of the Western blotting Prionics test and 6H4 antibody (40). Together these data suggest that O100 and O104 do not share all the features found in BSE in sheep. Nevertheless, criteria which allow the distinction of ovine BSE from scrapie need to be more clearly defined, especially when quantitative assessment of the glycoform ratios or differential reactivities of antibodies directed toward the protease cleavage sites are considered, as these methods are difficult to standardize.

The significance of the biochemical properties of sheep isolates O100 and O104 is unclear, and several hypothesis can be considered to explain these observations (1). Since the non-fixed brain material from these two sheep was autolysed, an endogenous protease action, might have predigested the tissue and abnormal PrP during the autolysis process, thereby facilitating or enhancing the PK action. However, among the frozen samples received in the laboratory for diagnosis, a number of field samples were also autolysed without showing any unusual protease cleavage. Similarly, use of variable concentrations of PK did not lead to changes in the molecular weight, and only the signal intensity of PrP<sup>res</sup> detection was modified (24, 30).

Several procedural steps which contribute to variations in electrophoretic mobility or/and glycoform ratios have previously been identified. These included metal ion chelations, prior to PK treatment (43), PrP<sup>res</sup> extraction under different pH conditions (49, 50), and the use of sodium phosphotungstic acid precipitation before PK treatment (44). Whereas in these situations changes in the PrP<sup>res</sup> patterns were the result of modifications in the laboratory methods, it should be emphasized that they could reveal a genuine biological diversity of these diseases.

Our results could be explained by the presence in these sheep of a particular strain of TSE agent with some properties close to those found in the BSE agent and in the CH1641 scrapie isolate. While the unusual electrophoretic features were similarly found in two sheep of the same genotype in the same flock, but not in some other sheep of this flock, characterization of the infectious agent involved in these scrapie cases is required, using mouse transmission studies in a panel of mice with different *pm-p* genotypes, as used for strain typing (7), and in other transgenic mouse models (10, 11, 42).

In conclusion, our results have reinforced the idea that uniform features could be found in sheep experimentally infected with BSE, including those infected with BSE from different geographical origins. Importantly, through the study of a panel of field sheep TSE cases, two with some biochemical features similar to those of ovine BSE were found. These two samples were initially identified from a group of 18 following application of a rapid ELISA test, which may be useful for screening of large series of samples. The accurate identification of the infectious agent strain in sheep, however, requires a careful analysis by the different available methods, including those which aid characterization of different molecular properties that may characterize TSE strains and mouse transmission studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Martin Groschup for the P4 antibody, to Jan Langeveld for gifts of the R521 and 505 antibodies, and to Roy Jackman for R486. We gratefully acknowledge Didier Calavas for analysis of the data obtained from the French scrapie surveillance network and Dominique Canal and Jérémy Verchère for technical assistance.

Stéphane Lezmi was financially supported by a grant from Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).

#### REFERENCES

1. Baron, T., P. Belli, J.-Y. Madec, F. Moutou, C. Vitaud, and M. Savey. 1997. Spongiform encephalopathy in an imported cheetah in France. *Vet. Rec.* **141**:270-271.
2. Baron, T., J.-Y. Madec, D. Calavas, Y. Richard, and F. Barillet. 2000. Comparison of French natural scrapie isolates with BSE and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci. Lett.* **284**:175-178.
3. Baron, T. G. M., D. Betemps, H. Martin, M. H. Groschup, and J.-Y. Madec. 1999. Immunological characterization of the sheep prion protein expressed as fusion proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**:379-384.
4. Baron, T. G. M., and A. G. Biacabe. 2001. Molecular analysis of the abnormal prion protein during coinfection of mice by bovine spongiform encephalopathy and a scrapie agent. *J. Virol.* **75**:107-114.
5. Baron, T. G. M., J.-Y. Madec, and D. Calavas. 1999. Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy-linked diseases. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3701-3704.
6. Bolton, D. C., M. P. McKinley, and S. B. Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**:1309-1311.
7. Bruce, M. 1996. Strain typing studies of scrapie and BSE, p. 223-236. *In* H. Baker and R. M. Ridley (ed.), *Prion diseases*. Humana Press, Totowa, N.J.
8. Butler, D. 1998. Doubts over ability to monitor risks of BSE spread to sheep. *Nature* **395**:6-7.
9. Collinge, J., K. C. L. Sidle, J. Meads, J. Ironside, and A. F. Hill. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**:685-690.
10. Crozet, C., A. Bencsik, F. Flamant, S. Lezmi, J. Samarut, and T. Baron. 2001. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Rep.* **21**:952-956.
11. Crozet, C., F. Flamant, A. Bencsik, D. Aubert, J. Samarut, and T. Baron. 2001. Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J. Virol.* **75**:5328-5334.
12. Foster, J. D., M. Bruce, I. Mc Connell, A. Chree, and H. Fraser. 1996. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet. Rec.* **138**:546-548.
13. Foster, J. D., and A. G. Dickinson. 1988. The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet. Rec.* **123**:5-8.

14. Foster, J. D., J. Hope, and H. Fraser. 1993. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.* **133**:339–341.
15. Foster, J. D., D. Parnham, A. Chong, W. Goldmann, and N. Hunter. 2001. Clinical signs histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.* **148**:165–171.
16. Foster, J. D., D. W. Parnham, N. Hunter, and M. Bruce. 2001. Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J. Gen. Virol.* **82**:2319–2326.
17. Fraser, H., M. E. Bruce, A. Chree, I. McConnell, and G. A. Wells. 1992. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J. Gen. Virol.* **73**:1891–1897.
18. Gonzalez, L., S. Martin, I. Begara-McGorum, N. Hunter, F. Houston, M. Simmons, and M. Jeffrey. 2002. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J. Comp. Pathol.* **126**:17–29.
19. Grassi, J., C. Crémion, and Y. Frobert. 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. *Arch. Virol.* **16**:197–205.
20. Harmeyer, S., E. Pfaff, and M. H. Groschup. 1998. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J. Gen. Virol.* **79**:937–945.
21. Hill, A., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. L. Sidle, I. Gowland, and J. Collinge. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448–450.
22. Hill, A. F., K. C. L. Sidle, S. Joiner, P. Keyes, T. C. Martin, M. Dawson, and J. Collinge. 1998. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci. Lett.* **255**:159–162.
23. Hope, J., S. C. E. R. Wood, C. R. Birkett, A. Chong, M. E. Bruce, D. Cairns, W. Goldmann, N. Hunter, and C. J. Bostock. 1999. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J. Gen. Virol.* **80**:1–4.
24. Horiuchi, M., T. Nemoto, N. Ishiguro, H. Furuoka, S. Mohri, and M. Shinagawa. 2002. Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3421–3426.
25. Houston, E. F., and M. B. Gravenor. 2003. Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet. Rec.* **152**:333–334.
26. Jeffrey, M., C. M. Goodsir, A. Holliman, R. J. Higgins, M. E. Bruce, P. A. McBride, and J. R. Fraser. 1998. Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet. Rec.* **142**:534–537.
27. Jeffrey, M., S. Martin, and L. Gonzalez. 2003. Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* **84**:1033–1045.
28. Jeffrey, M., S. Martin, L. Gonzalez, S. J. Ryder, S. J. Bellworthy, and R. Jackman. 2001. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J. Comp. Pathol.* **125**:271–284.
29. Jeffrey, M., S. Ryder, S. Martin, S. A. C. Hawkins, L. Terry, C. Berthelin-Baker, and S. J. Bellworthy. 2001. Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J. Comp. Pathol.* **124**:280–289.
30. Kuczius, T., and M. H. Groschup. 1999. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol. Med.* **5**:406–418.
31. Lezmi, S., A. Bencsik, and T. Baron. 2001. CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrPsc accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **82**:1–8.
32. Lezmi, S., A. Bencsik, E. Monks, T. Petit, and T. Baron. 2003. First case of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah born in France—PrPsc analysis in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochem. Cell Biol.* **119**:415–422.
33. Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, S. B. Prusiner, and C. Weissmann. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**:735–746.
34. Parchi, P., W. Q. Zou, W. Wang, P. Brown, S. Capellari, B. Ghetti, N. Kopp, W. J. Schulz-Schaeffer, H. A. Kretschmar, M. W. Head, J. W. Ironside, P. Gambetti, and S. G. Chen. 2000. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:10168–10172.
35. Peet, R., and J. Curran. 1992. Spongiform encephalopathy in an imported cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Aust. Vet. J.* **69**:171.
36. Prusiner, S. B. 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**:245–251.
37. Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wüthrich. 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein mPrP(23–231). *FEBS Lett.* **413**:282–288.
38. Ryder, S. J., Y. I. Spencer, P. J. Bellerby, and S. A. March. 2001. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.* **148**:7–13.
39. Simon, S., E. Comoy, N. Morel, J. Y. Madec, T. Baron, J. P. Deslys, and J. Grassi. 2003. Identification of the BSE strain in mouse and sheep using a rapid enzyme immunoassay. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**:207–208.
40. Stack, M. J., M. J. Chaplin, and J. Clark. 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 Neuropathol.* **104**:279–286.
41. van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, R. H. Meloen, G. Mooij-Harkes, M. E. W. Vromans, and J. P. M. Langeveld. 1996. Immunohistochemical detection of prion in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1228–1231.
42. Vilotte, J. L., S. Soulier, R. Essalmani, M. G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J. C. DaSilva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M. F. Madelaine, S. Rakatobe, A. LeDur, D. Vilette, and H. Laude. 2001. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J. Virol.* **75**:5977–5984.
43. Wadsworth, J. D. F., A. F. Hill, S. Joiner, G. S. Jackson, A. R. Clarke, and J. Collinge. 1999. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat. Cell Biol.* **1**:55–59.
44. Wadsworth, J. D. F., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert, and J. Collinge. 2001. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**:171–180.
45. Wells, G. A. H., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson, and R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**:419–420.
46. Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, and M. J. Atkinson. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* **128**:199–203.
47. Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, and W. D. Hueston. 1992. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res. Vet. Sci.* **52**:325–331.
48. Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. H. Wells, and J. W. Wilesmith. 1991. Naturally occurring scrapie-like encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* **129**:233–236.
49. Zanusso, G., A. Farinazzo, M. Fiorini, M. Gelati, A. Castagna, P. G. Righetti, N. Rizzuto, and S. Monaco. 2001. pH-dependent prion protein conformation in classical Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Biol. Chem.* **276**:40377–40380.
50. Zanusso, G., S. Ferrari, F. Cardone, P. Zampieri, M. Gelati, M. Fiorini, A. Farinazzo, M. Gardiman, T. Cavallaro, M. Bentivoglio, P. G. Righetti, M. Pocchiari, N. Rizzuto, and S. Monaco. 2003. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* **348**:711–719.

## Article 7

---

### **Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE**

CAROLE CROZET, ANNA BENCSIK, FRÉDÉRIC FLAMANT, STÉPHANE LEZMI,  
JACQUES SAMARUT, THIERRY BARON

*EMBO reports* 2001, vol.2, pp 952-956

L'étude des souches d'agent infectieux des maladies à prion est abordée classiquement par transmission à la souris. Les durées d'incubation et l'analyse des sites de vacuolisation (profils lésionnels) permettent de discerner différentes souches d'agent infectieux. C'est par cette méthode qu'un certain nombre de souche de tremblante ovine et caprine a été isolé chez la souris.

L'identification des souches d'agent infectieux par cette méthode présente certaines limites ; en effet, cette approche est longue et à cause au phénomène de barrière d'espèce la transmission de la maladie est parfois impossible. Ainsi l'isolat de tremblante expérimental CH1641 n'est pas transmissible à la souris.

C'est dans ce contexte d'étude des souches (notamment celles issues de moutons atteints de tremblante) qu'un modèle murin transgénique exprimant la PrP ovine (TgovPrP4) a été développé au laboratoire par Carole Crozet. Ce modèle permet la transmission de la tremblante avec une plus grande facilité comparativement à des souris conventionnelles. En effet, tous les isolats de tremblante naturelle ou expérimentaux qui ont été inoculés ont d'ailleurs toujours été transmis à ces souris, ce qui n'avait pas été possible avec les souris C57BL/6.

L'inoculation d'un extrait de cerveau d'un mouton expérimentalement infecté par l'agent de l'ESB dans ce modèle, a conduit au développement d'une signature phénotypique particulière : de nombreuses plaques florides, similaire à celles observées dans le vMCJ, ont été observées dans le SNC des souris. L'inoculation de 6 isolats de tremblante naturelle a conduit à des signatures neuropathologiques différentes.

Comparativement des souris C57BL/6, infectées avec l'agent de l'ESB ovine, n'ont pas présenté une accumulation de PrP anormale sous cette forme. La formation des plaques florides dans ce modèle TgovPrP4 semble donc spécifique de cette lignée murine infectée par l'ESB ovine.

## Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE

Carole Crozet<sup>†</sup>, Anna Bencsik, Frédéric Flamant<sup>1</sup>, Stéphane Lezmi, Jacques Samarut<sup>1</sup> & Thierry Baron

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité de Virologie-ATNC, 31 Avenue Tony Garnier, 69364 Lyon and <sup>1</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Lyon, France

Received May 23, 2001; revised August 7, 2001; accepted August 8, 2001

The occurrence of the variant Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD), related to bovine spongiform encephalopathy (BSE), raises the important question of the sources of human contamination. The possibility that sheep may have been fed with BSE-contaminated foodstuff raises the serious concern that BSE may now be present in sheep without being distinguishable from scrapie. Sensitive models are urgently needed given the dramatic consequences of such a possible contamination on animal and human health. We inoculated transgenic mice expressing the ovine PrP gene with a brain homogenate from sheep experimentally infected with BSE. We found numerous typical florid plaques in their brains. Such florid plaques are a feature of vCJD in humans and experimental BSE infection in macaques. Our observation represents the first description, after a primary infection, of this hallmark in a transgenic mouse model. Moreover, these mice appear to be a promising tool in the search for BSE in sheep.

### INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative diseases characterized by vacuolation and accumulation of the pathological form of the prion protein—PrP<sup>sc</sup>—in the brain. Ten years after the first bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases reported in the United Kingdom, the occurrence in April 1996 of the variant form of the human TSE Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD), affecting unusually young patients, raised the important question of the sources of human contamination (Will *et al.*, 1996; Almond and Pattison, 1997). The histopathological hallmark in the brain of all patients with vCJD is the presence of numerous florid plaques (Fraser, 1979; Ironside and Bell, 1997) that were also found in the brain of macaques infected with cattle BSE (Lasmezas *et al.*, 1996), thus

providing the first link between BSE and vCJD. This correlation has been rapidly confirmed by disease transmission studies in inbred wild-type mice or bovine PrP transgenic mice (Will *et al.*, 1996; Almond and Pattison, 1997; Bruce *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). The similarities between incubation times and between the lesion distributions revealed that a common agent was responsible for both vCJD in human and BSE in cattle (Bruce *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Moreover, studies of the quantitative ratios of the different PrP<sup>sc</sup> glycoforms and evaluation of the molecular mass of the prion protein showed a typical and unusual molecular pattern named type 4 (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997) in all cases of vCJD compared with sporadic and iatrogenic CJD. This type 4 pattern has also been found in macaques experimentally infected with the BSE agent (Collinge *et al.*, 1996; Lasmezas *et al.*, 2001).

The origin of BSE remains unknown. It may have arisen from sheep TSE, scrapie, through the recycling of scrapie agent in meat and bone meal (MBM) used in cattle foodstuff. These two types of TSEs are, however, distinct in several respects. Natural sheep scrapie is rather common in sheep and has been present in sheep flocks for a long time whereas TSEs were unknown in cattle prior to the 1980s. While BSE seems to be sustained by a single major strain of agent (Bruce *et al.*, 1997), natural scrapie is highly polymorphic with several scrapie strains that differ in terms of incubation time and lesion profile following transmission in inbred wild-type mice (Fraser and Dickinson, 1968; Fraser and Dickinson, 1973).

Since BSE can be transmitted experimentally to small ruminants, including by oral routes (Foster *et al.*, 2001), there is a risk that BSE may have been disseminated through MBM foodstuff into the sheep population. Subsequent horizontal and vertical transmission of the BSE agent within sheep population may

<sup>†</sup>Corresponding author. Tel: +33 4 78 72 65 43; Fax: +33 4 78 61 91 45; E-mail: ccrozet@ens-lyon.fr  
C. Crozet and A. Bencsik contributed equally to this work

constitute a new source of BSE agent exposure to human. Sensitive models are urgently needed considering the dramatic consequences on animal and human health. Biochemical analysis may be discriminant (Hill *et al.*, 1998) but there is, at least, one exception with the CH1641 experimental scrapie showing the same electrophoretic pattern as that found in a BSE-infected sheep. In addition, the lesion profile, following transmission of the disease to wild-type mice, is a time-consuming method. Thus, there is unfortunately no real specific and easy manner to recognize rapidly the BSE agent in sheep.

To address this question we have used ovine PrP transgenic mice [Tg(OvPrP4)] expressing, selectively in their brain, the ovine PrP gene using the neuron-specific enolase promoter (Crozet *et al.*, 2001). Compared with wild-type mice, these mice are more sensitive to sheep scrapie (Crozet *et al.*, 2001). In the present study, we have inoculated Tg(OvPrP4) mice with a brain homogenate prepared from a sheep inoculated with French cattle BSE agent (Baron *et al.*, 2000). Here we report that the singular 'florid plaques' signature in the brain of infected Tg(OvPrP4) mice is identical to that of vCJD in humans. This simple criteria may thus provide the opportunity to identify possible field contamination of sheep by the BSE agent.

## RESULTS AND DISCUSSION

We used Tg(OvPrP4) mice expressing the ovine PrP gene (AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> genotype) in the brain under the control of the neuron-specific enolase promoter (Crozet *et al.*, 2001). Five-week-old mice ( $n = 20$ ) were intracerebrally inoculated with a brain homogenate obtained from a sheep (AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> genotype) experimentally infected with cattle BSE agent (Baron *et al.*, 2000). Two hundred and twenty days after inoculation, the mice started to display extensive clinical signs of encephalopathy (leanness, hunched posture, hindlimb paralysis, equilibrium trouble, plastic tail and prostration), and they died between 221 and 371 days post-inoculation (p.i.) (mean survival time  $300 \pm 40$  days). Biochemical analysis, performed on every other mouse brain, showed the presence of proteinase K-resistant PrP with an electrophoretic profile comparable to that of ovine BSE (Figure 1). When comparing the electrophoretic features obtained in mice with the natural scrapie isolates, a lower apparent molecular weight of the unglycosylated PrPres was observed in Tg(OvPrP4) mice inoculated with ovine BSE. This difference is evocative of the one observed between PrPres in

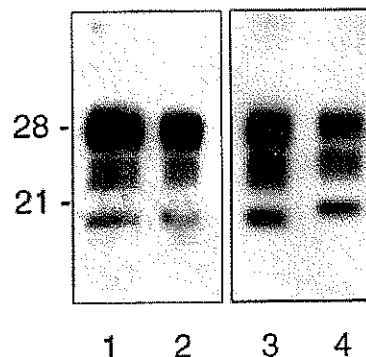


Fig. 1. Western blot analysis with RB1 antibody showing similar electrophoretic profiles of the proteinase K-resistant protein in the brain of BSE-infected sheep (lane 1) and in the brain of Tg(OvPrP4) mice (lane 2). This electrophoretic pattern shows a lower apparent molecular weight of proteinase K-resistant protein in the brain of Tg(OvPrP4) inoculated with ovine BSE (lane 3) compared with Tg(OvPrP4) inoculated with a natural scrapie isolate (lane 4).

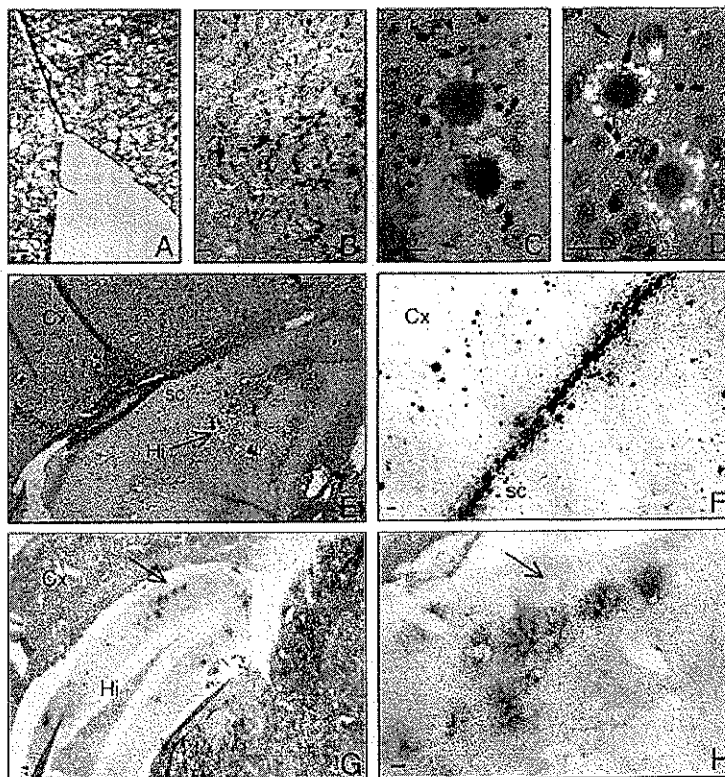
sheep inoculated with BSE and other natural scrapie isolates (Hill *et al.*, 1998; Baron *et al.*, 2000) (Figure 1) and also of those described in mice (Kuczius *et al.*, 1998) or in humans with the so-called type 4 pattern in vCJD (Collinge *et al.*, 1996). This already suggests that the original biochemical BSE strain properties, characterized by a specific electrophoretic type 4-like pattern, are maintained in infected Tg(OvPrP4) mice, even after a passage in sheep. Beside these biochemical features, histological analysis on the other mouse brains showed spongiform changes (Figure 2A). PrPsc immunostaining consisted of fine, granular deposits, always associated with vacuolation in the habenula, thalamus and hypothalamus (Figure 2B). More predominantly, plaques with a fibrillar core were observed, isolated or sometimes grouped into small clusters (Figure 2C). Remarkably, these plaques were surrounded by a ring of small vacuoles reminiscent of florid plaques (Figure 2C). In addition, on adjacent sections, Congo Red staining (Figure 2D) demonstrated the amyloid nature of these plaques, further providing evidence that they are similar to the florid plaques described for vCJD in human (Ironsides and Bell, 1997). These florid plaques were numerous (Table I) and were found mostly in the subcallosal

Table I. Breed and genotype of sheep used for Tg(OvPrP4) mice inoculation

TSE	Breed	Genotypes	Mean survival time (days $\pm$ SEM)	Number of florid plaques per slide
Experimental BSE in sheep	Lacaune	ARQ/ARQ	300 $\pm$ 40	120 $\pm$ 30
Natural scrapie	Lacaune	ARQ/ARQ	303 $\pm$ 74	0
Natural scrapie	Blanc du massif central	ARQ/ARQ	238 $\pm$ 7	0
Natural scrapie	Manech Tête Rousse	ARQ/VRQ	290 $\pm$ 104	0
Natural scrapie	Manech Tête Rousse	VRQ/VRQ	370 $\pm$ 124	0
Natural scrapie	X Texel	VRQ/VRQ	361 $\pm$ 93	0
Natural scrapie	Charollais X Texel	VRQ/VRQ	502 $\pm$ 133	0

Mean survival time and total number of florid plaques per brain section in Tg(OvPrP4) diseased mice of each experiment.

C. Crozet *et al.*



**Fig. 2.** (A) Hematoxylin–eosin staining showing the presence of vacuolation lesion in the hypothalamus of Tg(OvPrP4) mice infected with 'ovine BSE'. (B, C and E–H) PrP immunostaining using SAF 84. It consists of parenchymatous and fine granular red deposits like in the thalamic nuclei (B) or in a plaque-type staining (C) showing a fibrillar core surrounded by a regular ring of vacuoles. The amyloid nature of these plaques is confirmed by Congo Red coloration (D). (E and F) These florid plaques are most frequently seen in the cortex (Cx), subcallosal region (sc) and hippocampus (Hi, arrow). (G and H) In the same area of wild-type mice inoculated with 'ovine BSE', PrPsc immunohistochemistry shows fine granular black deposits but not florid plaque-type accumulation. Scale bar, 20  $\mu$ m

region, hippocampus, midbrain and thalamus, and moderately in the cortex and dorsal medulla (Figure 2E and F).

The anatomical distribution of PrPsc florid plaques observed here, as early as the first passage, is similar to the amyloid plaque distribution reported in second passage experiments for bovine PrP transgenic mice infected either with vCJD or BSE (Scott *et al.*, 1999). As a different transcription promoter was used in this last case (endogenous PrP promoter), these similarities suggest that the PrPsc plaque deposit topography depends more on the strain of agent than on the PrP gene expression pattern. Until now, florid plaques were never detected in Tg(OvPrP4) mice ( $n = 45$ ) inoculated with six different isolates of scrapie (Table I), indicating that this hallmark is peculiar to BSE agent transmitted to ovine species.

The biological meaning of florid plaques remains unclear. Originally described in wild-type mice inoculated with three Icelandic sheep (Fraser, 1979, 1983) and in a mouse adapted-scrapie strain (111A) (McBride *et al.*, 1988), these florid plaques were rare in sporadic CJD (Kopp *et al.*, 1996). No florid plaques were found in other cases of wild-type mice inoculated from field scrapie cases. This shows that this phenomenon is probably limited to a very narrow range of scrapie strains and is not a usual feature. However, a high density of florid plaques has been

reported only for vCJD and has been a decisive criterion in establishing a similar origin in these patients (Will *et al.*, 1996; Ironside and Bell, 1997). This neuropathological marker of vCJD has also been described in macaques experimentally infected with BSE, producing a disease close to vCJD in humans and providing the first link between the BSE agent and the vCJD disease (Lasmezaz *et al.*, 1996). In addition, in control experiments still in progress over 500 days p.i., consisting of the inoculation of a BSE isolate in Tg(OvPrP4) mice, only six mice have died so far ( $437 \pm 104$  days p.i.). First, biochemical and histochemical analysis did not allow the detection of PrPsc accumulation, suggesting that cattle BSE is not easily transmissible to Tg(OvPrP4) mice. This probably reflects the species barrier effect in this transmission. Florid plaques have never been observed after transmission of BSE or vCJD to mice, even when the mice carried a human or bovine PrP transgene (Collinge *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Lasmezaz *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). In previous studies, sheep experimentally infected with BSE inoculated to wild-type mice also failed to produce florid plaques. Similarly, in our control study, still in progress, wild-type mice inoculated with our ovine BSE isolate died from 348 days p.i. and >500 p.i. with spongiosis and PrPsc accumulation, but without florid plaques



(Figure 2G and H). Thus, another factor—present in our ovine transgenic mice and common at least to some humans or macaques—could be decisive for the manifestation of the BSE agent into florid plaques. In any case, the correlation between the abundance of florid plaques and BSE contamination remains to be clarified. Since we found a high density of florid plaques in Tg(OvPrP4) mice inoculated with the brain of sheep experimentally infected with BSE, and none in any of the mice inoculated with different scrapie isolates, the presence of florid plaques could be considered in our model as a criterion to discriminate BSE from natural scrapie in sheep.

The sheep experimentally infected with BSE was of the AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> genotype. The fact that this sheep and Tg(OvPrP4) mice share the same PrP genotype could be important for the occurrence of florid plaques. Tg(OvPrP4) mice, however, were sensitive to natural scrapie isolated from AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> as well as VV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> and AV<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> genotypes (Table I), and the genotype did not seem to influence the nature of the PrPsc deposits. We did not attempt to investigate the effect of PrP genotype on florid plaques occurrence, for which brain homogenates of other BSE-infected sheep would have been required.

Taken together, these results already provide an important improvement to prion strain identification in sheep. Compared with wild-type mice, our Tg(OvPrP4) mice are more susceptible to sheep scrapie isolates (Crozet *et al.*, 2001) and seem to be able to discriminate BSE agent in sheep. Indeed, the easy recognition of florid plaques following relatively short incubation periods may be an advantageous alternative to the lesion profile method performed in wild-type mice. Finally, the proper calculation of sensitivity and specificity of florid plaques criterion would require testing of other sheep brain homogenates experimentally infected with BSE (Foster *et al.*, 2001), as well as a larger number of field and experimental scrapie isolates.

### Speculation

The appearance of florid plaques in future inoculations of Tg(OvPrP4) mice with field scrapie could be interpreted in two ways. It might reveal BSE contamination in sheep. Alternatively, it might allow the identification of a natural scrapie strain similar to those that could have been at the origin of the BSE epidemic. In both cases this would be important, as it would allow the identification of a sheep population potentially hazardous for human health.

### METHODS

**Animals.** The Tg(OvPrP4) transgenic mice used in this study selectively expressed in neurons the ovine PrP gene (AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> genotype) but not the endogenous murine PrP. The generation of these mice and their susceptibility to scrapie are described in Crozet *et al.* (2001). The transgenic mice were cared for and housed in an autonomous filtered pressurized enclosure according to the guidelines of the French Ethical Committee (Decree 87-848) and European Community Directive 86/609/EEC.

**Animal inoculation and follow up.** The transgenic 5-week-old mice were inoculated intracerebrally with 20 µl of a 10% (wt/vol)

brain homogenate in 5% glucose, from Lacaune sheep with an AA<sub>136</sub>RR<sub>154</sub>QQ<sub>171</sub> that had been experimentally infected with cattle BSE ( $n = 20$ ) and with six natural scrapie isolates ( $n = 10$  per experiment) from different regions in France detected by the French Epidemiological Surveillance Network (D. Calavas, AFSSA-Lyon, France) (Table I). The mice were then checked weekly for the presence of clinical signs such as leanness, hunched posture, hindlimb paralysis, equilibrium trouble, plastic tail, prostration, tremors, ruffled fur, abnormal gait and clapping feet.

As soon as a mouse showed one of these clinical signs, it was isolated and monitored daily, until death. Mice were killed when the intensity of clinical symptoms appeared life threatening or in some cases were found dead. The whole brain was quickly removed, and the brain of every second mouse was fixed [paraformaldehyde, 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4] for immunohistochemical analysis, the other frozen samples being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for western blot analysis as described elsewhere (Crozet *et al.*, 2001).

**Detection of abnormal PrP in scrapie-inoculated transgenic mice.** After being fixed in paraformaldehyde in 0.1 M PBS pH 7.4 for one night at  $4^{\circ}\text{C}$ , the brains were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were collected onto pre-treated glass slides (Polylysine or StarFrost, Fischer Scientific) and baked overnight at  $57^{\circ}\text{C}$ . The slides were then dewaxed and were submitted to pre-treatments designed to destroy the normal cellular PrP. These consisted of a formic acid treatment (98%; Merck) for 10 min at room temperature,  $121^{\circ}\text{C}$  for 30 min in water, each step being followed by a 5 min rinse in water, which appeared more appropriate for detection of PrPsc by immunohistochemistry. The slides were treated with proteinase K (20 µg/ml; Roche-Boehringer) for 10 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . All following steps were performed at room temperature ( $22\text{--}24^{\circ}\text{C}$ ). Endogenous peroxidase activity was inhibited with 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) in 0.1 M PBS for 5 min. Non-specific antigenic sites were blocked by a 30-min incubation in blocking reagent (Roche-Boehringer). SAF84 monoclonal antibody recognizing the human 142–160 PrP sequence (0.5 µg/ml) (kindly provided by Dr J. Grassi, CEA/SPI, Saclay, France) was then applied overnight. The brain sections were rinsed before detection of the primary antibody using the ABC system (Vector). These steps were followed by rinsing in 0.1 M PBS, and the peroxidase was finally revealed by incubating the sections in 0.1 M PBS containing aminoethylcarbazole (AEC; Dako) or diaminobenzidine (DAB; Clinisciences) to give red or black deposits, respectively. The slides were weakly counterstained with aqueous hematoxylin before mounting (GelMount).

**Congo Red staining.** Congo Red staining was used to reveal specifically the amyloid nature of the plaques. Dewaxed slides were coloured with Harris hematoxylin for 10 min. Congo Red (1%, 30 min), lithium carbonate (15 s), 80% ethanol (30 s) were then applied successively. The slides were dehydrated and mounted.

**Western blot analysis of PrPres.** The presence of protease-resistant protein was analysed by western blot analysis using the RB1 monoclonal antibody raised against synthetic bovine 105–120 PrP peptide as described elsewhere (Madec *et al.*, 1997; Crozet *et al.*, 2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Denise Aubert for transgenesis (Ecole Normale Supérieure, Lyon), and Michèle Lavoine and Annie Kato for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the French Programme de Recherche sur les ESST et les prions. Carole Crozet was financially supported by a grant from AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

Almond, J. and Pattison, J. (1997) Human BSE. *Nature*, **389**, 437–438.  
 Baron, T.G., Madec, J., Calavas, D., Richard, Y. and Barillet, F. (2000) Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci Lett.*, **284**, 175–178.  
 Bruce, M.E. et al. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498–501.  
 Collinge, J. et al. (1995) Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature*, **378**, 779–783.  
 Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J. and Hill, A.F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685–690.  
 Crozet, C., Flamant, F., Bencsik, A., Aubert, D., Samarut, J. and Baron, T. (2001) Efficient transmission of two different scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J. Virol.*, **75**, 5328–5334.  
 Foster, J.D., Parnham, D., Chong, A., Goldmann, N. and Hunter, N. (2001) Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet. Rec.*, **118**, 165–171.  
 Fraser, H. (1979) The pathogenesis and pathology of scrapie. Aspect of slow and persistent virus infections. Daj, T. (ed.). Nijhoff, The Hague, The Netherlands.  
 Fraser, H. (1983) A survey of primary transmission of Icelandic scrapie (RIDA) to mice. In Court, L.A., Masson, C.F. (eds), *Virus Non Conventionnels et Affections du Système Nerveux Central*, Paris, France, pp. 34–46.  
 Fraser, H. and Dickinson, A.G. (1968) The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.*, **78**, 301–311.

Fraser, H. and Dickinson, A.G. (1973) Scrapie in mice: agent strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J. Comp. Pathol.*, **83**, 29–40.  
 Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J. and Lantos, P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448–450.  
 Hill, A.F., Sidle, K.C., Joiner, S., Keyes, P., Martin, T.C., Dawson, M. and Collinge, J. (1998) Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci Lett.*, **255**, 159–162.  
 Ironside, J.W. and Bell, J.E. (1997) Florid plaques and new variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Lancet*, **350**, 1475.  
 Kopp, N., Streichenberger, N., Deslys, J.P., Laplanche, J.L. and Chazot, G. (1996) Creutzfeldt–Jakob disease in a 52-year-old woman with florid plaques. *Lancet*, **348**, 1239–1240.  
 Kuczius, T., Haist, I. and Groschup, M.H. (1998) Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J. Infect. Dis.*, **178**, 693–699.  
 Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Demalmay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. and Hauw, J.J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743–744.  
 Lasmezas, C.I. et al. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402–405.  
 Lasmezas, C.I. et al. (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt–Jakob disease: implications for human health. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4142–4147.  
 Madec, J.Y., Vanier, A., Dorier, A., Bernillon, J., Belli, P. and Baron, T. (1997) Biochemical properties of protease resistant prion protein PrPsc in natural sheep scrapie. *Arch. Virol.*, **142**, 1603–1612.  
 McBride, P.A., Bruce, M.E. and Fraser, H. (1988) Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **14**, 325–336.  
 Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O., Tremblay, P., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 15137–15142.  
 Will, R.G. et al. (1996) A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921–925.

DOI: 10.1093/embo-reports/kve204

## Article 8

---

### **Neuro-anatomical distribution of abnormal PrP in C57BL/6 mice allows differentiating BSE agent from different origins when compared to scrapie agents**

STÉPHANE LEZMI, ANNA BENCSIK, THIERRY BARON

Article en préparation pour soumission à  
*Journal of Experimental Neurology and Experimental Pathology*

Accepté dans *J Histochem Cytochem* (en2006)

L'étude des souches d'ESST est abordée historiquement par transmission à la souris. Les durées d'incubation et l'analyse des sites de vacuolisation neuronale (profils lésionnels) permettent de discerner différentes souches d'agent infectieux. C'est par cette méthode qu'un certain nombre de souches de tremblante ont été isolées chez la souris.

Au sein du laboratoire, un des modèles murins utilisés pour l'analyse des souches de prion est la souris C57BL/6. Dans ce modèle, nous avons cherché à développer une méthode de typage de souche par analyse de la répartition des dépôts de PrP anormale dans le SNC de souris inoculées avec différents types d'agent d'ESST.

Ainsi différentes transmissions ont été réalisées sur C57BL/6, les inocula ayant pour origine :

- un cas d'une vache britannique atteinte par l'ESB,
- un cas d'un mouton expérimentalement infecté par un extrait de cerveau d'une vache française atteinte par l'ESB (SB1),
- un cas d'encéphalopathie spongiforme féline (ESF) chez un guépard né en Grande Bretagne et diagnostiqué en France,
- un isolat de tremblante français provenant d'un mouton atteint de tremblante naturelle,
- une souche de tremblante expérimentale, C506M3, issue d'un cas de tremblante ovine des Etats Unis.

La mise en évidence neuro-anatomique des dépôts de PrP anormale a été réalisée par immunohistochimie et par la méthode de PET-Blot grâce à l'utilisation d'anticorps anti-prion. Les résultats obtenus permettent d'identifier qu'une distribution particulière de dépôts de PrP anormale est induite avec l'agent de l'ESB ; ainsi malgré un passage de l'agent infectieux de la vache au mouton, une signature de type ESB est retrouvée chez les souris. Comparativement les résultats obtenus avec l'isolat et la souche de tremblante expérimentale sont clairement différents ce qui conforte cette approche pour le typage de souche. De plus, l'observation d'une signature de type ESB chez les souris infectées avec le cas d'ESF conforte l'idée que l'agent de l'ESB est responsable des cas d'ESF chez les félins.

Finalement, l'uniformité des résultats obtenus, à partir d'inocula provenant de cas d'ESB français ou britannique, conforte l'idée de la stabilité de l'agent de l'ESB transmis à différentes espèces.

ARTICLE

## PET-blot Analysis Contributes to BSE Strain Recognition in C57Bl/6 Mice

Stéphane Lezmi, Anna Bencsik, and Thierry Baron

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Unité ATNC, Lyon, France

**SUMMARY** Identification of the strain of agent responsible for bovine spongiform encephalopathy (BSE) can be made histologically through the analysis of both distribution and intensity of brain vacuolar lesions after BSE transmission to mouse. Another useful way to distinguish the BSE agent from other prion strains is the study of the distribution of the abnormal prion protein (PrP<sup>res</sup>). For that purpose, paraffin-embedded tissue blot (PET-blot) method was applied on brains from C57Bl/6 mice infected with cattle BSE, experimental sheep BSE, or feline spongiform encephalopathy (FSE) from a cheetah. PrP<sup>res</sup> distribution was comparable, whichever of the three BSE agent sources was considered and was distinct from the PrP<sup>res</sup> distribution in C57Bl/6 mice inoculated with a French scrapie isolate or with a mouse-adapted scrapie strain (C506M3). These data confirm a common origin of infectious agent responsible for the British and French cattle BSE. They also indicate that PET-blot method appears as a precise complementary tool in prion strain studies because it offers easy and quick assessment of the PrP<sup>res</sup> mapping. Advantages and limits of the PET-blot method are discussed and compared with other established and validated methods of strain typing.

(J Histochem Cytochem 54:1087–1094, 2006)

### KEY WORDS

bovine spongiform  
encephalopathy  
mouse  
paraffin-embedded tissue blot  
prion  
scrapie  
strains

PRION DISEASES including scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and Creutzfeldt-Jakob disease in human beings are fatal neurodegenerative disorders. Existence of distinct clinical forms of scrapie in sheep, including nervous and itching types, was first described in 1926 by Stockman (Pattison 1988). Transmission of this disease to goats also led to the observation of different clinical forms (Pattison and Millson 1961). A significant advance in scrapie research resulted from the successful transmission of the disease to mice by Chandler (1961,1963), who described different mouse susceptibilities to different scrapie isolates. Subsequent studies demonstrated many different phenotypic expressions of the disease in rodents. These observations led to the “strain” concept in the field of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), strains being defined by specific incubation periods, clinical signs, and neuropathological features such as distribution and intensity of

spongiform changes (lesion profile) observed in different inbred mouse lines (Chandler 1963; Dickinson et al. 1968; Fraser and Dickinson 1968). Numerous experimental scrapie strains have been characterized using transmission to mice (Bruce 1991,1993) showing, at the same time, important interactions between the strain of TSE agent and genetic features of the host (Dickinson et al. 1968; Bruce et al. 1991). The use of mice for strain typing became particularly important with the appearance of BSE in cattle in 1986 (Wells et al. 1987), and this approach demonstrated that a number of different species including humans, cats, and some captive wild animals had probably been infected by the BSE agent (Fraser et al. 1994; Bruce et al. 1997; Hill et al. 1997).

The abnormal prion protein is derived from a normal host protein (PrP<sup>c</sup>) and accumulates in the brain mainly as an insoluble and partially protease-resistant form of the protein (PrP<sup>res</sup>) during the course of the disease (McKinley et al. 1983). This abnormal protein is the only known specific marker for these diseases (Bolton et al. 1982). It contributes to the identification of the strain of TSE agent in the natural host as well as in mice experimentally infected (Jeffrey et al. 2001; Stack et al. 2002; Baron et al. 2004). In

Correspondence to: Thierry Baron, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Unité ATNC 31, avenue Tony Garnier 69364, Lyon cedex 07, France. E-mail: t.baron@lyon.afssa.fr  
Received for publication November 24, 2005; accepted May 16, 2006 [DOI: 10.1369/jhc.5A6892.2006].

particular, in natural hosts, the histological strain-typing analyses are based on the fine study of differential PrP immunohistochemical (IHC) labeling of neurons and glial cells at the cellular level (Gonzalez et al. 2003), but in wild-type or transgenic mice this method has not yet been reported, and the neuro-anatomical distribution of pathological PrP is used as a strain typing parameter (DeArmond et al. 1987,1993; Bruce et al. 1993,1994a; Green et al. 2004).

The present study investigated the distribution of PrP<sup>res</sup> accumulation in the brains of C57Bl/6 mice inoculated with three different origins of BSE agent and with two scrapie agents. Using an original method, PrP<sup>res</sup> distribution in mice was assessed with PET-blot that allowed easy, rapid, and precise identification of the neuro-anatomical distribution of PrP<sup>res</sup> in situ (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Limitations and advantages of this method are discussed using the example of transmission of BSE and scrapie to mice that show distinct BSE signature in terms of PrP<sup>res</sup> distribution.

## Materials and Methods

Four- to 5-week-old female C57Bl/6 mice (Charles River; L'Arbresle, France) were intracerebrally challenged with 20  $\mu$ l of an inoculum prepared from infected brain tissues from different affected species with TSEs as described in Table 1, diluted in physiological glucose at 1% for serial passages in wild-type mice, or at 10% for passage from ovine transgenic mice. Mice were inoculated after anesthesia and cared for and housed according to the guidelines of the French Ethical Committee (decree 87-848) and European Community Directive 68/609/EEC.

**Table 1** Different TSE sources

Origin of inocula
Scrapie 1 (Scr1): From a natural scrapie case from a Charollais x Texel (VRQ/VRQ) (Ardennes, France)
Year of death: 1999 (Baron et al. 2004)
Second passage
C506M3: mouse-adapted scrapie strain
From a natural case of scrapie in sheep (US) (Maignien et al. 1999)
Multiple passages
C57Bl mouse-adapted scrapie strain
From a cow with BSE (UK) (Lasmézas et al. 2001)
Multiple passages
Experimental transmission of a French BSE case to a Lacaune sheep (ARQ/ARQ)
(SB1) (Baron et al. 2000)
Second passage
Cheetah born in 1987, reared in Whipsnade Zoo (UK) for 6 years, then sent to Peaugres Zoo (France)
Year of death: 1997 (Baron et al. 1997)
Second passage
French cattle BSE transmitted to a Lacaune sheep (ARQ/ARQ) (SB1), then inoculated to TgOvPrP4 ovine transgenic mice (Crozet et al. 2001a)
First passage

TSE, transmissible spongiform encephalopathy; BSE, bovine spongiform encephalopathy.

Once inoculated, mice were regularly observed twice weekly. When the first clinical signs occurred, evolution of the disease was followed daily as recommended by others (Dickinson et al. 1968; Bruce et al. 1991; Thackray et al. 2002). When the intensity of clinical symptoms appeared life threatening, mice were sacrificed, and brains were quickly collected and fixed in 4% buffered paraformaldehyde ( $n=6$  to 13 per group). Four coronal brain sections were prepared as originally described by Fraser and Dickinson (1968). Most of the brains were cut using a dedicated matrix allowing the standardization of the level of sections as well as assuring symmetrical sections. Brain pieces were then placed in a cassette, routinely dehydrated, and embedded in paraffin.

## PET-blot Analysis

PET-blot method was used as previously described with few changes, in order to visualize in situ the resistant form of abnormal PrP, PrP<sup>res</sup>, after digestion with a high concentration of proteinase K (PK) (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Five- $\mu$ m paraffin sections were cut and collected onto 0.45- $\mu$ m pore nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France) and then dried for 1 hr at 55C. Membranes were dewaxed by immersion in xylene (45C, 20 min) and rinsed in isopropanol 100 (2 $\times$  10 min) followed by stepwise rehydration. Membranes were dried at room temperature. After wetting with TBST (10 mM Tris HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20; Euromedex, Mundolsheim, France), enzymatic digestion was performed using 250  $\mu$ g/ml PK (Roche Diagnostics; Meylan, France) in a buffer consisting of 10 mM Tris HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.1% Brij 35 for 8 hr at 55C, so that only PK PrP<sup>res</sup> will be detectable. After washing with TBST, sections were treated for 10 min with guanidine isothiocyanate (3 M). Guanidine was washed out five times in TBST. Immunodetection was performed after pre-incubation in blocking solution (skimmed milk diluted at 0.2% in TBST). Monoclonal antibody used was SAF84 (1/2000) overnight at room temperature. After three washes in TBST, a phosphatase alkaline-coupled anti-mouse antibody (Clini-Sciences; Montrouge, France) was used (1/500 in TBST, 37C, 45 min). Membranes were washed three times in TBST and pH was adjusted to 9 by incubating in NTM buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Finally, 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT; CliniSciences) was used to visualize the reaction product (dark blue deposits). PET-blot membranes were assessed using a stereomicroscope (Olympus; Rungis, France) coupled to an image analysis workstation (Biocom; Les Ulis, France). To better define the different structural levels actually targeted by PrP<sup>res</sup> deposition that was not possible to confidently assign using PET-blot, we used PrP IHC or hematoxylin/eosin-stained serial sections as well as mouse brain atlas (Sidman et al. 1971).

Brain sections of uninfected C57Bl/6 mice and PrP<sup>0/0</sup> mice were also used to check that no specific staining was observable on such tissue control.

## Results

### Specific Detection of PrP<sup>res</sup> Using PET-blot

Specificity of PET-blot was confirmed by the results obtained on brain stem and cerebellum samples of unin-

ected mice that did not present any staining (Figure 1C) in comparison to the PrP<sup>res</sup> labeling visualized in the same structures in mice infected with scrapie or BSE agents (Figures 1A and 1B). Detail of the cerebellum in the stratum molleculare (sm) of mice affected with these two agents shows the ability of this method to detect different types of PrP<sup>res</sup> accumulation that remain remarkably accessible despite being quite unrefined as compared with IHC data.

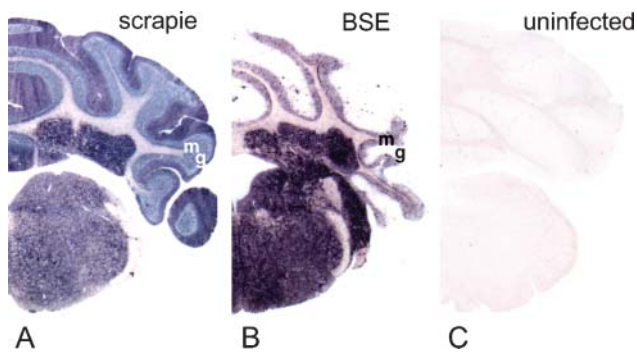
### PrP<sup>res</sup> Profiles in Brain of Infected Mice with Scrapie Agents and BSE

Figure 2 shows comparative views of PET-blot analysis of brain sections from C57Bl/6 mice inoculated with different TSE sources such as a French natural scrapie case Scr1 (three mice, analyzed on two sections) (row 1), a murinized scrapie strain, C506M3 (two mice, analyzed on two to four sections) (row 2), a British cow naturally affected with BSE (two mice analyzed on two sections) (row 3), an experimentally infected sheep with French BSE (row 4) (seven mice analyzed on one to three sections), and a cheetah diagnosed with FSE in France (one mouse analyzed on two sections) (row 5), as indicated in Table 1.

Results are presented to compare PrP<sup>res</sup> distribution for each anatomical level (four sections) of the different experimentations. The description was performed on the brain of mice infected with scrapie compared with mice infected with BSE sources, in order to identify which brain areas could better allow BSE and scrapie discrimination. The main distinct areas identified between BSE and scrapie sources are summarized in Table 2.

### First Level of Brain Section

In the cortex of mice infected with cattle BSE, cheetah FSE, and experimental ovine BSE, dense PrP<sup>res</sup> deposits were observed in some specific layers, whereas others were spared except in the insular area located in the



**Figure 1** Paraffin-embedded tissue (PET)-blot analysis of the proteinase K (PK)-resistant form of the prion protein (PrP<sup>res</sup>) (dark blue deposits) in the brain stem and cerebellum of mice infected with scrapie (A) and bovine spongiform encephalopathy (BSE) (B). Control section from a non-infected mouse shows absence of PrP<sup>res</sup> labeling (C). g, granular layer; m, molecular layer.

lateroventral region of the cortex that shows a dense zone of PrP<sup>res</sup> accumulation (Figure 2, column 1, rows 3–5). The limiting glia also accumulated significant amounts of PrP<sup>res</sup> for these three experiments. Comparatively, in mice infected with the two scrapie agents, PrP<sup>res</sup> accumulation was dense and homogeneous, affecting all cortical layers except the limiting glia (Figure 2, column 1, rows 1 and 2).

In the caudate putamen nuclei, dense clusters of PrP<sup>res</sup> deposits were always identified with more or less intensity (rows 3–5) in mice infected with BSE agent. In comparison, this type of labeling was never observed with scrapie agents in this site (rows 1 and 2).

In the central area of the para-terminal body (septal nucleus), a weaker PrP<sup>res</sup> accumulation was observed in comparison to the periphery of this structure in mice infected with BSE sources (rows 3–5). In comparison, in mice infected with scrapie agents (rows 1 and 2), a homogeneous PrP<sup>res</sup> accumulation was visualized.

In the ventral limit of the diagonal band of Broca (glia limitans), dense amounts of PrP<sup>res</sup> were identified in mice infected with BSE (rows 3–5), which was not observed in mice infected with scrapie agents (rows 1 and 2).

### Second Level of Brain Section

In the cortex, identical criteria as presented for the first section are maintained allowing the differentiation of BSE from scrapie agents.

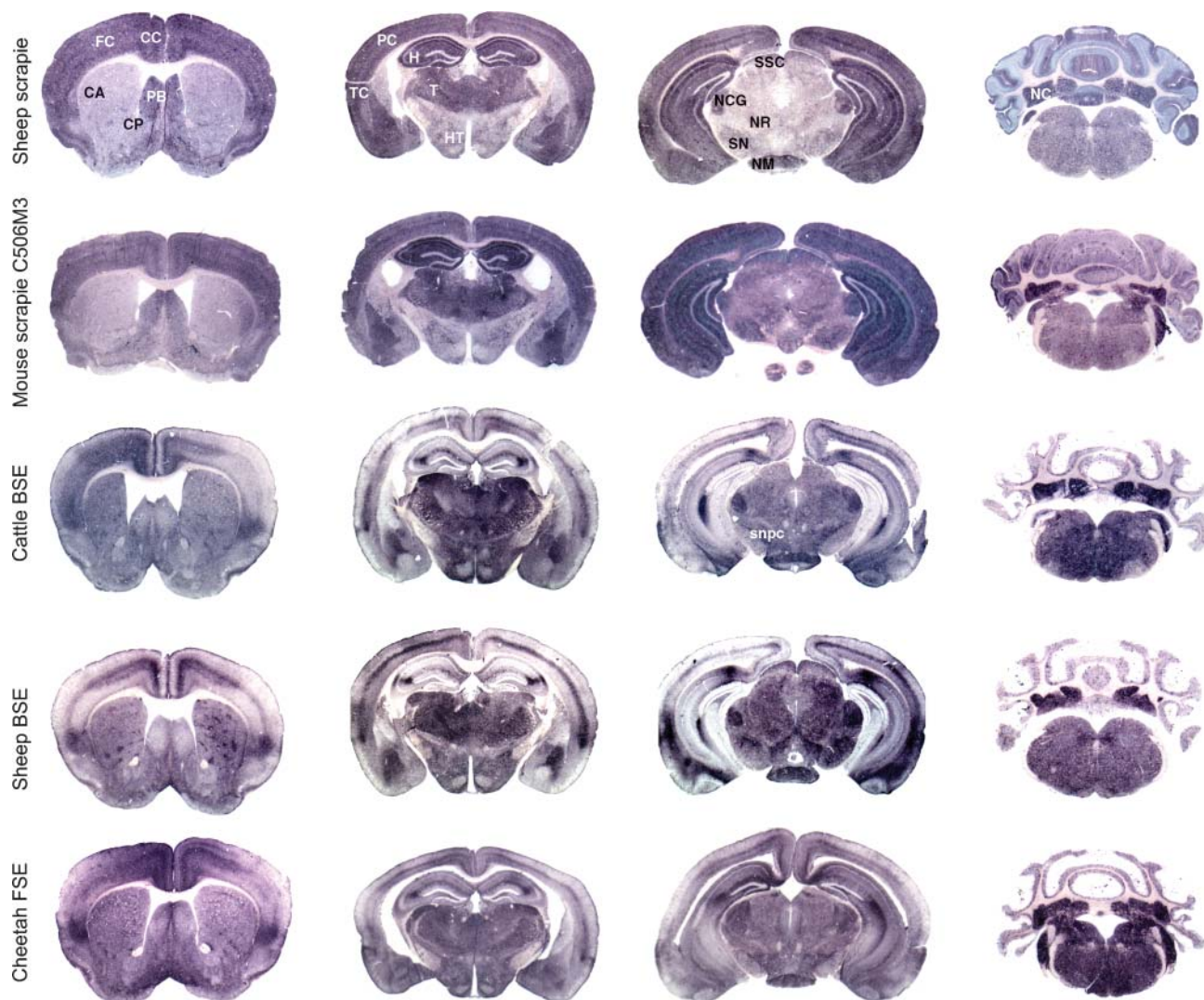
In the hippocampus, specific PrP<sup>res</sup> accumulation occurred with all three BSE sources. The stratum lacunosum molleculare of the hippocampus (CA2 region) was specifically stained for PrP<sup>res</sup> as well as the limiting zone of the sm of the dentate gyrus where a dense PrP<sup>res</sup> accumulation was observed. In the hippocampus of mice infected with scrapie, all molecular layers accumulate significant amounts of PrP<sup>res</sup> delimitating the dentate gyrus that appear unlabeled (Figure 2, column 2, rows 1 and 2).

In the thalamus and hypothalamus of mice infected with the three BSE sources, PrP<sup>res</sup> was detected as well in both structures (Figure 2, column 2, rows 3–5). In comparison, in mice infected with scrapie sources, PrP<sup>res</sup> accumulation was significantly more important in the thalamus.

### Third Level of Brain Section

In the cerebral cortex and in the hippocampus (Figure 2, column 3), the previously described particularities of PrP<sup>res</sup> profiles in either BSE or scrapie sources were also maintained in this third brain section, both in mice infected with BSE and in mice infected with scrapie.

In the mesencephalon, PrP<sup>res</sup> accumulation was relatively homogeneous in this section with the BSE agent. However, the nucleus corporis geniculati, the nucleus mammillari, the stratum superficiale colliculi, and the pars compacta of substantia nigra accumulate large amounts of PrP<sup>res</sup>.



**Figure 2** Neuro-anatomical distribution of PrP<sup>res</sup> (PET-blot) in the brain of C57Bl/6 mice infected with natural scrapie case (row 1), C506M3 mouse-adapted scrapie strain (row 2), BSE agent from a cow (row 3), ovine BSE (row 4), and FSE agent from a cheetah (row 5). The different sources of BSE agent induced a uniform abnormal PrP distribution distinct from those seen in the case of scrapie sources. FC, frontal cortex; CC, cingulate cortex; CA, caudate putamen; PB, paraterminal body; CP, caudate putamen; PC, parietal cortex; TC, temporal cortex; H, hippocampus; T, thalamus; HT, hypothalamus; SSC, stratum moleculare of the cerebellum; NCG, nucleus corporis geniculati; NR, nucleus ruber; SN, substantia nigra; NM, nucleus mammillaris; NC, deep nuclei of the cerebellum; snpc, substantia nigra pars compacta.

In comparison, in mice infected with the French scrapie agent, PrP<sup>res</sup> accumulation was particularly intense in these four nuclei compared with other adjacent structures that accumulate lesser amounts of PrP<sup>res</sup>. With C506M3 scrapie strain, PrP<sup>res</sup> accumulation in this structure was nearly identical to that induced by the BSE agent, but the red nucleus also accumulated high amounts of PrP<sup>res</sup>.

#### Fourth Level of Brain Section

In the cerebellum (Figure 2, column 4) of mice infected with BSE, a homogeneous PrP<sup>res</sup> accumulation was observed in the stratum granulosum (sg), and numerous dense aggregates occurred in the sm (Figure 1 and Figure 2). Com-

paratively, in mice infected with scrapie agents, similar PrP<sup>res</sup> distribution was observed in the sg, but PrP<sup>res</sup> accumulation appears as homogeneous stripes in the sm perpendicular to the cerebellar surface (Figure 1 and Figure 2).

In mice infected with BSE, more abundant PrP<sup>res</sup> accumulation was observed at the level of the pons when compared with posterior and anterior sections. This was not easily illustrated here because levels of sections were not strictly identical.

#### Features of BSE Strain From a Cow Successively Passaged in Sheep, TgOvPrP4, and C57Bl/6 Mice

PET-blot method was also performed to study PrP<sup>res</sup> distribution in C57Bl/6 mice ( $n=2$ ) infected with

**Table 2** Summary of the main distinctive criteria (anatomical site and intensity of PrP<sup>res</sup>) resulting from a PET-blot analysis that allows differentiation of BSE from scrapie agent<sup>a</sup>

Neuro-anatomical sites	Intensity of PrP <sup>res</sup> accumulation revealed by PET-blot	
	BSE agent	Scrapie agent
Cerebral cortex (rows 1–3)	Dense in 1 or 2 layers	Dense, affecting all cortical structures
Caudate putamen (row 1)	Dense clusters	Homogeneous
Paraterminal body (row 1)	Moderate and peripheral	Homogeneous and central
Hippocampus (rows 2 and 3)	Dense in CA2 region	Dense in all molecular layers
Thalamus/hypothalamus (row 2)	Dense in the thalamus	Dense in the thalamus
	Dense in the hypothalamus	Moderate in the hypothalamus
Cerebellar cortex, molecular layer (row 4)	Moderate, dense depositions (plaques as revealed by immunohistochemistry)	Dense and homogeneous, with stripes in the molecular layer

<sup>a</sup>Rows from Figure 2.

PrPres, protein-resistant prion; PET-blot, paraffin-embedded tissue blot.

the BSE agent transmitted to ovine transgenic mice (TgOvPrP4 mouse line expressing the A136 R154 Q171 ovine PrP protein) after a first experimental passage from cattle to sheep (A136 R154 Q171 homozygous genotype of the prnp gene).

Neuro-anatomical PrP<sup>res</sup> distribution in infected C57Bl/6 mice is illustrated in Figure 3 at only three levels of brain sections compared with Figure 2. Apparent differences are observed at the level of the thalamus compared with that shown in Figure 2 (column 2, row 3), and these are linked to a less-intense accumulation and to a level of the tissue sections slightly more rostral in Figure 3 compared with sections of Figure 2 (column 2). However, PrP<sup>res</sup> distribution is quite comparable to that previously described in C57Bl/6 mice directly infected with cattle BSE or with experimental ovine BSE. Hallmarks of BSE infection that have previously been described distinct from mice infected with scrapie sources were also present in the cortex, hippocampus, and brain stem, as well as in the cerebellum.

## Discussion

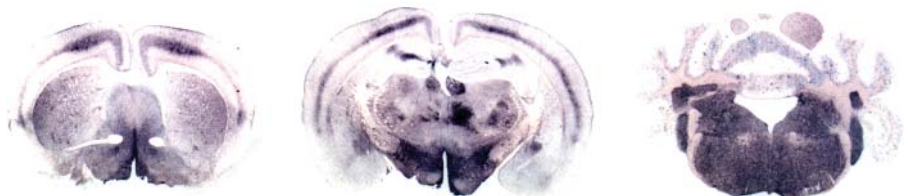
Among the different approaches for studying TSE strains after transmission of the disease to mice, topographical distribution of the abnormal form of the prion protein has a significant place, in particular because of its specificity compared with the study of vacuolar lesions. It is more and more studied using PrP IHC but does not appear easily and precisely transcript-

able onto a map of the mouse brain. PET-blot method seems to offer the most adapted strategy to study PrP<sup>res</sup> brain distribution rapidly and precisely. Here we assessed this strategy successfully on C57Bl/6 mice infected with different TSE sources.

Sensitivity of this method was previously demonstrated for diagnosis of BSE in cows (Schulz-Schaeffer et al. 2000a). In addition to its high sensitivity, this method allows greater anatomical resolution when compared with histoblots (Telling et al. 1994; Scott et al. 1999). Indeed, the use of fixed and paraffin-embedded tissues before PK digestion offered better preservation of the samples compared with histoblot method performed on unfixed frozen samples. As for histoblot, PET-blot approach is similar to the Western blot method because of the extensive pretreatment with PK that ensures complete digestion of all proteins including PrP<sup>c</sup>, whereas abnormal PrP is only partially degraded to PrP<sup>res</sup> (Schulz-Schaeffer et al. 2000a,2000b; Ritchie et al. 2004). Even more precisely, PK conditions used in the PET-blot method are more severe than those used in the Western blot method (Baron et al. 2004).

Remarkably, even if this method lacks high cellular precision, it is possible to distinguish different types of PrP<sup>res</sup> deposition. However, these criteria cannot be used instead of a precise cellular analysis that only IHC offers. Advantageously, PET-blot method also offers the possibility to analyze old tissue block collections of paraffin-embedded samples that represent an important source of archival materials. Above all and without

**Figure 3** Neuro-anatomical distribution of PrP<sup>res</sup> (PET-blot) in three sections of brain of C57Bl/6 mice infected with a brain homogenate from TgOvPrP4 infected with ovine BSE (successive transmission of cattle BSE to a sheep, then to TgOvPrP4 mice, and finally to C57Bl/6) revealed a PrP<sup>res</sup> distribution reminiscent of the one described for the other BSE sources illustrated here.





doubt, the main advantage of the PET-blot is a rapid and acute approach to examine PrP<sup>res</sup> distribution in the infected brain.

Nevertheless, PET-blot data cannot be considered alone to establish the identification of a given strain because, in some cases, PrP<sup>res</sup> is present at a minimal or undetectable level (Lasmézas et al. 1997). PrP<sup>res</sup> is also not correlated with the presence of vacuolar lesions (Manson et al. 2000). In any case and even though the distribution of vacuolar degeneration is most often closely correlated with the distribution of abnormal PrP accumulation in infected mice (Bruce et al. 1989, 1994b), a precise comparison of both approaches with different prion strains is needed to validate this method, as the lesion profile method benefits from several years of experience.

#### Identification of Scrapie Agents

Although all three groups of mice infected with BSE or FSE showed a consistent pattern of PrP distribution, this pattern was easily differentiated from that found with two different scrapie sources. This included an experimental mouse-adapted scrapie strain (C506M3) and transmission in C57Bl/6 mice from a French natural scrapie isolate (Scr1). Molecular studies following transmission in wild-type and ovine transgenic mice of this Scr1 isolate have recently been described (Baron et al. 2004). Our study now extends these observations to the characterization of PrP<sup>res</sup> distribution in the brain of C57Bl/6 mice.

Differences observed between scrapie and BSE sources in PrP<sup>res</sup> brain targeting argues for a selective spread of the infectious agent. Specific neural cells appear to accumulate abnormal PrP, which could be the result of differential cellular susceptibilities, PrP<sup>res</sup> processing, and tropism following infection with different agents. Other preliminary results showed that with mouse-adapted scrapie strains 79A and 22A inoculated into C57Bl/6 mice, abnormal PrP brain distribution is clearly different not only from BSE but also from Scr1 and C506M3 scrapie sources studied here (data not shown). Thus, the present data suggest that this approach may also be useful for scrapie strain typing.

In the present study, identification of the precise scrapie agent isolated from the French sheep scrapie case is still not possible, as only partial results have been published previously about abnormal PrP distribution in the brain of mice infected with experimental scrapie. However, similar abnormal PrP accumulation has been reported in C57Bl/6 inoculated with the scrapie strain ME7, which presented identical prion accumulation in the hippocampus and cerebellum (Bruce et al. 1994b). A characteristic zonal pattern of abnormal PrP in the molecular layer of the cerebellum was also described, labeling appearing as stripes perpendicular to the cerebellar surface that was considered to be associated with the dendrites of Purkinje cells (Bruce et al. 1994b).

Furthermore, intense abnormal PrP accumulation in the hippocampal area was also described with ME7 (Bruce et al. 1994b). These data suggest that the isolated strain of the present scrapie case may be a ME7-like strain. PET-blot data obtained by another group with ME7 in C57Bl mice in sagittal brain sections also showed comparable results (Schulz-Schaeffer et al. 2000b). Actually, PrP<sup>res</sup> distribution differences observed with our isolate Scr1 and C506M3 experimental scrapie strain are faint and both agents present similarities with ME7 (hippocampal and cerebellar PrP<sup>res</sup> signature). Furthermore, ME7 strain is one of the most commonly isolated strains by passage in mice from different cases of natural scrapie, at least in the UK (Bruce and Dickinson 1987; Bruce et al. 2002).

To the best of our knowledge, characterization of French scrapie by transmission in wild-type mice has only been described for a single scrapie case (Lasmézas et al. 2001). In this case, vacuolar lesion profiles found following transmission in C57Bl/6 mice were clearly different from that observed in mice infected with C506M3 strain. However, comparisons of these data could support the hypothesis that different strains of scrapie affect French sheep flocks, which is also observed in the UK.

#### Identification of the BSE Agent Among Species

The infectious agent responsible for BSE has been previously isolated from different cattle sources, and transmission studies in mice have revealed the existence of a single major strain of agent (Bruce et al. 1994a, 2002; Green et al. 2005). These studies also showed that the BSE agent was unchanged when passaged through a range of different species (Foster et al. 1996; Bruce et al. 1997), and our PET-blot study now provides additional data sustaining the BSE strain stability among species. First, PrP<sup>res</sup> distribution substantiates further that ARQ/ARQ sheep experimentally infected with a brain homogenate from a French BSE cow developed a TSE due to the BSE agent inoculated with similar properties to the BSE agent isolated from British cattle also studied here (Baron et al. 2000; Lezmi et al. 2004). PET-blot data are also sustaining the hypothesis of a common origin of cattle BSE epidemic in France and the UK, as previously demonstrated for the Swiss cases by the study of vacuolar lesion profiles (Bruce 1996).

Here we showed that PrP<sup>res</sup> study allows the identification of the BSE agent, especially by analyzing the cortex, hippocampus, thalamus/hypothalamus, and cerebellum areas that appeared to be the best BSE discriminative regions. In another recent study, specific amounts of abnormal PrP were detected by IHC in other brain areas such as the locus coeruleus, facial nucleus, and cochlear nucleus (Green et al. 2005). Accumulation of PrP<sup>res</sup> was marked only in the cochlear nucleus in this study, but this staining was also observed in the two scrapie agent transmission studies.

With regard to the agent isolated from the cheetah affected with FSE, analysis of PrP<sup>res</sup> distribution suggested a possible link with the BSE agent originating from cattle. Even if lesion profile studies are needed to confirm this hypothesis, this observation is consistent with data previously reported using the lesion profile method in mice infected with FSE from three domestic cats (Fraser et al. 1994). Biochemical analyses also showed high levels of di-glycosylated form of PrP<sup>res</sup> in cheetah and in mice infected with FSE, as generally reported with the BSE agent. These similarities again suggest that BSE and FSE in different feline species may be due to the same infectious agent.

Finally, analysis of PrP<sup>res</sup> brain distribution in C57Bl/6 mice infected with a brain homogenate of transgenic mice expressing the sheep prion protein (TgOvPrP4) (Crozet et al. 2001b) infected with ovine BSE also revealed the PET-blot typical BSE signature. This result argues for the BSE strain stability even after passage in a murine transgenic model, which apparently did not induce changes of the BSE agent strain property. The BSE agent was indeed easily recognized by PET-blot approach following transmission to C57Bl/6 mice, as well as by its molecular features (Baron et al. 2004).

In conclusion, although PET-blot may have some limitations, the advantage is that this method identifies the PK-resistant form of the prion protein, PrP<sup>res</sup>, in situ and allows the rapid and accurate identification of the distribution of PrP<sup>res</sup> in brain, thus describing the type of strain for the agent responsible for the different TSEs. PET-blot approach should be considered as a complementary method in strain typing studies in murine models.

### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Programme National de Recherche sur les ESST et les Prions. S.L. was financially supported by a grant from Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).

We are grateful to Dr. Norman Barlow (Sanofi-Aventis) for critical evaluation of the English and to Dr. Michel Solsona (AFSSA-Lyon) for technical suggestions.

### Literature Cited

- Baron T, Belli P, Madec JY, Moutou F, Vitaud C, Savey M (1997) Spongiform encephalopathy in an imported cheetah in France. *Vet Rec* 141:270–271
- Baron T, Crozet C, Biacac A-G, Philippe S, Verchere J, Bencsik A, Madec J-Y, et al. (2004) Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* 78:6243–6251
- Baron T, Madec J-Y, Calavas D, Richard Y, Barillet F (2000) Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci Lett* 284:175–178
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309–1311
- Bruce M (1996) Strain typing studies of scrapie and BSE. In Baker H, Ridley RM, eds. *Prion Diseases*. Totowa, NJ, Humana Press, 223–236
- Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H (1994a) Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 343:405–411
- Bruce ME (1993) Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 49:822–838
- Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, Fraser H (2002) Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* 83:695–704
- Bruce ME, Dickinson AG (1987) Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol* 68:79–89
- Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF (1989) Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102:1–6
- Bruce ME, McBride PA, Jeffrey M, Scott JR (1994b) PrP in pathology and pathogenesis in scrapie-infected mice. *Mol Neurobiol* 8:105–112
- Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG (1991) The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol* 72:595–603
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, et al. (1997) Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389:498–501
- Chandler RL (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1:1378–1379
- Chandler RL (1963) Experimental scrapie in the mouse. *Res Vet Sci* 4:276–285
- Crozet C, Bencsik A, Flamant F, Lezmi S, Samarut J, Baron T (2001a) Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO reports* 2:952–956
- Crozet C, Flamant F, Bencsik A, Aubert D, Samarut J, Baron T (2001b) Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* 75:5328–5334
- DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB (1987) Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 50:1271–1280
- DeArmond S, Yang S-L, Lee A, Bowler R, Taraboulos A, Groth D, Prusiner SB (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6449–6453
- Dickinson AG, Meikle VMH, Fraser H (1968) Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol* 78:293–299
- Foster JD, Bruce M, Mc Connell I, Chree A, Fraser H (1996) Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet Rec* 138:546–548
- Fraser H, Dickinson AG (1968) The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78:301–311
- Fraser H, Pearson GR, McConnell I, Bruce ME, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ (1994) Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec* 134:449
- Gonzalez L, Martin S, Jeffrey M (2003) Distinct profiles of PrP(D) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 84:1339–1350
- Green R, Horrocks C, Wilkinson A, Hawkins SAC, Ryder SJ (2005) Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions. *J Comp Pathol* 132:117–131
- Hill A, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448–450
- Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Jackman R (2001) Differential diagnosis of infections with the bovine

- spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol* 125:271–284
- Lasmézas CI, Deslys J-P, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin J-M, Fournier J-G, et al. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275:402–405
- Lasmézas CI, Fournier J-G, Nouvel V, Boe H (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4142–4147
- Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys J-P, Grassi J, et al. (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. *J Virol* 78:1–9
- Maignien T, Lasmézas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP (1999) Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 80:3035–3042
- Manson JC, Barron R, Jamieson E, Baybutt H, Tuzi N, McConnell I, Melton D, et al. (2000) A single amino acid alteration in murine PrP dramatically alters TSE incubation time. *Arch Virol* 16:95–102
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35:57–62
- Pattison IH (1988) Fifty years with scrapie: a personal reminiscence. *Vet Rec* 123:661–666
- Pattison IH, Millson GC (1961) Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *J Comp Pathol* 71:171–176
- Ritchie DL, Head MW, Ironside JW (2004) Advances in the detection of prion protein in peripheral tissues of variant Creutzfeldt-Jakob disease patients using paraffin-embedded tissue blotting. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:360–368
- Schulz-Schaeffer WJ, Fatzer R, Vandevelde M, Kretzschmar HA (2000a) Detection of PrP<sup>Sc</sup> in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol* 16:173–180
- Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, et al. (2000b) The paraffin-embedded tissue blot detects PrP<sup>Sc</sup> early in the incubation time in prion disease. *Am J Pathol* 156:51–56
- Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen H-O, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15137–15142
- Sidman RL, Angevine JB, Taberpiece E (1971) *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. Cambridge, MA, Harvard University Press
- Stack J, Chaplin MJ, 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 Neuropathol (Berl)* 104:279–286
- Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, Sidle KC, et al. (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9936–9940
- Thackray AM, Klein MA, Aguzzi A, Bujdoso R (2002) Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J Virol* 76:2510–2517
- Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, et al. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419–420

Les premières transmissions de l'ESB au mouton ont été initiées en 1988 à Edimbourg par Foster et collaborateurs qui démontrèrent ainsi la sensibilité des ovins à cet agent infectieux [Foster *et al.* 1993]. En 1996, les premiers cas du vMCJ ont été décrits et le lien avec l'ESB a clairement été identifié par différentes équipes [Hill *et al.* 1997a] [Bruce *et al.* 1997]. Dès lors, la question des éventuelles sources de contamination humaine a été posée notamment en ce qui concerne les troupeaux ovins suspectés d'avoir pu être infectés par des farines de viande contaminées. Dès 1997, le laboratoire de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Lyon a initié le développement d'un modèle d'ESB ovine expérimental. Quatre brebis saines, de race Lacaune, ont été infectées par l'agent de l'ESB. Deux ovins présentant un génotype connu pour induire une sensibilité à la tremblante naturelle (ARQ/ARQ), et deux autres de génotype conférant une importante résistance à la tremblante (ARR/ARR) ont été inoculés par voies périphériques avec un extrait de cerveau de vache française atteinte d'ESB.

L'objectif de ce travail de thèse était de caractériser l'encéphalopathie spongiforme bovine expérimentalement transmise aux ovins chez ces quatre brebis. Deux ans post-inoculation une première brebis de génotype ARQ/ARQ (SB1, infection intra-péritonéale) développa des signes cliniques très similaires à ceux de la tremblante naturelle. Dans le même temps, une autre brebis de génotype ARR/ARR (SB2) développa une maladie intercurrente et fut alors sacrifiée. Ce n'est que deux plus tard que le second animal de génotype ARQ/ARQ (SB3, infection intra-splénique) développa des signes cliniques. En ce qui concerne le dernier mouton ARR/ARR infecté par voie intra-splénique (SB4), aucun signe clinique n'a été identifié à ce jour, six ans après inoculation.

## **Première partie : transmission de l'ESB au mouton – physiopathologie**

Chez le mouton, le développement de la tremblante est influencé par le génotype, la souche d'agent infectieux, la voie d'inoculation et parfois par la race des ovins. En ce qui concerne les descriptions britanniques de transmission de l'ESB au mouton, les animaux de génotypes AXQ/AXQ ont montré une sensibilité importante comparativement à d'autres génotypes, comme le génotype VRQ/VRQ qui confère une très grande sensibilité à la tremblante. Dans notre expérimentation, les moutons SB1 et SB3, de génotypes ARQ/ARQ, ont développé l'ESB ce qui est en accord avec la grande sensibilité de ce type d'ovins à cet agent infectieux. Des périodes d'incubation différentes (2 ans) ont été observées entre les deux animaux ce qui pourrait être du au fait que deux voies différentes d'inoculation ont été testées. Cependant, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres équipes qui ont observé des périodes d'incubation très différentes chez des moutons de génotypes

ARQ/ARQ (596 à 1073 jours) ou AHQ/AHQ (553 à 935 jours) infectés par voie orales [Foster et al. 2001b].

Les signes cliniques observés à la fois dans la tremblante et l'ESB chez le moutons sont variables ; cependant l'apparition soudaine d'ataxie et l'absence de prurit sont des signes plus fréquemment observés lors d'infection par l'agent de l'ESB [Houston et al. 2003b]. Dans notre expérimentation les deux moutons SB1 et SB3 ont présenté des signes cliniques très différents malgré des profils neuro-anatomiques d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> très semblables (résultats complémentaires article 1).

### **Distribution des sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> chez les moutons ARQ/ARQ infectés par l'ESB comparativement à la tremblante (articles 1, 3, 4, 5).**

#### ***De grandes similitudes avec la tremblante***

Chez les deux moutons ARQ/ARQ infectés par l'ESB, une accumulation de PrP<sup>sc</sup> a été identifiée principalement dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans le système lymphoïde. Des résultats similaires ont été décrits dans d'autres modèles expérimentaux chez les ovins d'autres races, infectés par voie orale par un isolat d'ESB britannique [Jeffrey et al. 2001c] [Foster et al. 2001b].

Le SNC est le site principal d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> ; d'importantes quantités de PrP<sup>sc</sup> ont été détectées dans la rétine, le cortex frontal, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière. Dans les cas de tremblante naturelle, des résultats similaires sont décrits (article 5) [Race et al. 1992a] [Madec et al. 2000]. Au niveau de la rétine, les sites d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> sont très similaires à ceux décrits chez le mouton atteint de tremblante [Jeffrey et al. 2001b], chez le guépard atteint d'ESF (article 2) et chez l'homme atteint de la MCJ et dans le cas du vMCJ [Head et al. 2003].

Quantitativement, le système lymphoïde est le second système accumulant la PrP<sup>sc</sup>. De nombreux organes sont donc susceptibles d'être impliqués : la amygdales, les nœuds lymphatiques, la rate ainsi que tous les structures pouvant présenter des follicules lymphoïdes comme la muqueuse oropharyngée, une grande partie du tube digestif (de la caillette au rectum), la trachée, la vessie et les nœuds hématiques situés le long de certains vaisseaux sanguins chez les ruminants. A l'échelle cellulaire, l'accumulation de PrP<sup>sc</sup> a été identifiée dans les cellules folliculaires dendritiques (FDCs) et dans les macrophages à corps tingibles (TBMs) des follicules lymphoïdes secondaires. Ces cellules ont aussi été incriminées dans d'autres expérimentations d'ESB chez le mouton [Jeffrey et al. 2001c] [Foster et al. 2001b] et dans des cas de tremblante naturelle (article 3, 5) [van Keulen et al. 1996].

Dans le système nerveux périphérique, de plus faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> ont été détectées dans les ganglions nerveux du système nerveux autonome et dans le système nerveux

entérique. Des observations identiques ont été faites dans d'autres modèles d'ESB ovine [Jeffrey *et al.* 2001c] [Foster *et al.* 2001b] ainsi que dans la tremblante naturelle [van Keulen *et al.* 1999] (article 4).

Finalement, la distribution tissulaire des sites d'accumulation de la PrP<sup>sc</sup> chez les moutons expérimentalement infectés par l'ESB est très similaire à celle rencontrée dans les cas de tremblante.

Cependant, quelques particularités ont été identifiées chez les deux moutons ARQ/ARQ infectés par l'ESB.

### **Quelques particularités**

La première observation concerne les quantités d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans l'ensemble des structures impliquées. Dans le SNC, les quantités maximales de PrP<sup>sc</sup> ont été détectées dans le tronc cérébral par ELISA (13000ng/g de tissu) ; comparativement, chez 13 moutons de génotype ARQ/ARQ ou ARQ/VRQ cliniquement atteints de tremblante naturelle, 40000+/- 20000ng de PrP<sup>sc</sup>/g de tissu nerveux ont été détectés. De même dans le système nerveux autonome (système nerveux entérique et différents ganglions nerveux), les quantités de PrP<sup>sc</sup> détectées ainsi que la distribution générale est bien moins importante comparativement aux cas de tremblante analysés au laboratoire [Lezmi 2001] ou rapportés par d'autres auteurs [van Keulen *et al.* 1999].

Dans les organes lymphoïdes, les quantités de PrP<sup>sc</sup> accumulées sont aussi moins importantes comparé aux cas de tremblante analysés (articles 3, 4, 5). Deux points peuvent expliquer ces différences :

a- Le premier concerne le développement des structures immunitaires (nombre et taille des follicules lymphoïdes secondaires) qui est relativement faible. En effet, hormis les structures lymphoïdes directement associées au tube digestif (amygdales, nœud lymphatique rétropharyngé, plaques de Peyers), les autres, comme la rate, comportent très peu de follicules lymphoïdes. D'ailleurs, dans la rate de faibles niveaux d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> ont été détectés. Ce phénomène semble traduire que l'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans les organes lymphoïdes est un phénomène passif et dépend en grande partie de la maturité des FDCs. Le mode de stabulation dans une animalerie protégée est probablement à l'origine du pauvre développement des structures immunitaires chez nos moutons. On peut étendre cette réflexion aux autres modèles d'ESB ovine en admettant cette hypothèse. Ainsi ceci pourrait avoir des conséquences sur les mesures d'infectiosité, y compris du sang comme dans les expérimentations de Houston chez des moutons infectés par l'ESB [Houston *et al.* 2000]. En effet, c'est la présence de PrP<sup>sc</sup> dans les organes lymphoïdes qui pourrait être une source de l'infectiosité du sang. Des conditions d'expérimentations plus proches des conditions naturelles d'élevage seraient alors préférables pour des études de ce type.

b- Deuxièmement, même dans les structures immunitaires associées au tube digestif et relativement bien développées, tous les follicules lymphoïdes secondaires ne présentent pas d'accumulation de PrP<sup>sc</sup>. Ce phénomène n'a jamais été observé chez les 13 moutons atteints de tremblante naturelle, au stade clinique ou en cours d'incubation (article 5). Ceci pourrait refléter une caractéristique de l'ESB chez le mouton ou du moins une adaptation partielle de l'agent lors d'un premier passage chez le mouton. En effet, la rapide implication du système immunitaire dans l'accumulation de PrP<sup>sc</sup>, décrite dans les cas de tremblante naturelle ou expérimentale [Andreoletti *et al.* 2000] [van Keulen *et al.* 2002b], ne semble pas être une caractéristique de infection par l'ESB chez le mouton [Jeffrey *et al.* 2001c], du moins au premier passage.

Finalement, les faibles niveaux d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans le système nerveux et le système lymphoïde sont peut être une caractéristique de l'ESB chez le mouton ou reflètent simplement une partielle adaptation de l'agent infectieux (passage primaire), comme dans la plupart de modèles expérimentaux murins [Bruce 1996a]. Cependant ce phénomène ne peut être généralisé car il existe une souche de tremblante expérimentale, 111A, qui ne semble pas s'adapter à la souris ; en effet, aucune réduction du temps d'incubation n'a été observée, après 4 passages successifs chez la souris [Fraser *et al.* 1991]. De même, chez des bovins expérimentalement infectés par voie IC avec un isolat de tremblante naturelle, les lésions cérébrales étaient relativement faibles au premier passage [Cutlip *et al.* 1994] ; au second passage, dans les mêmes conditions expérimentales, les lésions cérébrales étaient similaires et aucune évidence d'une adaptation de l'agent infectieux à son hôte n'a été mise en évidence [Cutlip *et al.* 1997].

D'autres particularités ont aussi été identifiées à l'échelle cellulaire dans certains nœuds lymphatiques et dans les neurones des plexus coeliomésentérique et cervical cranial. Dans certains nœuds lymphatiques des deux moutons ARQ/ARQ, en plus de l'implication des FDCs et des TBMs, des macrophages localisés dans la région sous capsulaire ont clairement été identifiés comme accumulant de la PrP<sup>sc</sup>. A notre connaissance, cette observation n'a jamais été rapportée dans des cas de tremblante et aucun mouton atteint tremblante n'a présenté un tel marquage (article 5). Dans les ganglions nerveux, une accumulation intra-neuronale de PrP<sup>sc</sup> a été identifiée chez les deux moutons infectés par l'ESB. Comparativement, dans les cas de tremblante analysés, seule une accumulation péri-neuronale a été identifiée (article 4) [Groschup *et al.* 1999]. Le faible nombre de cas analysés ne permet pas de conclure sur ces spécificités physiopathologiques ; cependant ces observations ouvrent de nouvelles voies d'étude sur la caractérisation de l'ESB ovine.

La recherche de la PrP anormale permet aussi d'approcher l'infectiosité des différents tissus analysés. En effet, même si quelques cas d'ESST ont été rapportés sans accumulation de PrP

anormale [Lasmézas *et al.* 1997] ou avec de très faibles taux d'accumulation [Hsiao *et al.* 1994] [Manson *et al.* 2000], la présence de la PrP<sup>sc</sup>, marqueur spécifique de ces maladies, est généralement corrélée à la présence d'une infectiosité [Bolton *et al.* 1982].

La distribution tissulaire des sites d'accumulation de la PrP anormale chez les moutons expérimentalement infectés par l'ESB montre une distribution large de l'agent infectieux chez ces animaux. Dans notre étude, nous avons d'ailleurs montré l'infectiosité du SNC et de la rate du mouton SB1, par inoculation à des souris C57BL/6 (résultats complémentaires article 8). Comparativement, chez les bovins, les tissus infectieux sont principalement représentés par le SNC ainsi que l'iléon et l'amygdale dans un modèle expérimental. L'infectiosité de nombreux tissus périphériques chez le mouton est donc à prendre en compte, car les ovins infectés par cet agent représentent donc un danger potentiellement plus important pour la santé publique étant donné que de nombreux tissus périphériques accumulent de la PrP<sup>sc</sup>. L'infectiosité de certains organes de nos moutons reste donc à évaluer, comme les muscles, le sang, mais aussi les nerfs périphériques.

#### **Accumulation de la PrP<sup>sc</sup> dans le système nerveux entérique du mouton ARR/ARR (SB2) infecté par l'ESB.**

Des traces de PrP<sup>sc</sup> ont clairement été identifiées dans le système nerveux entérique du mouton ARR/ARR inoculé avec l'agent de l'ESB. Ces traces de PrP<sup>sc</sup> ne sont probablement pas dues à la détection de l'inoculum deux ans après l'infection du fait de la localisation des immunomarquages au niveau des neurones entériques.

Afin de tester l'infectiosité de ces tissus, un extrait d'iléon de SB2 a été inoculé aux souris transgéniques, TgOvPrP4, exprimant la PrP<sup>c</sup> ovine. A ce jour quelques souris ont présenté une accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans leur SNC, ce qui a été détecté par Western blot. La présence de PrP<sup>sc</sup> et de l'infectiosité révèle donc qu'un mouton de génotype ARR/ARR peut être porteur de l'infection par l'ESB. Même si les moutons de génotype ARR/ARR sont généralement considérés comme plutôt résistants à la tremblante naturelle [Detwiler *et al.* 2003], un cas a été rapporté au Japon [Ikeda *et al.* 1995]. De plus l'agent de l'ESB a aussi été transmis par voie intra-cérébrale à des moutons ARR/ARR, ce qui montre finalement que ce génotype ne confère pas de résistance totale aux ESST [Houston *et al.* 2003c]. Cependant, la voie d'inoculation joue probablement un rôle important comme chez le porc qui est seulement sensible à l'infection par l'ESB lors d'inoculation parentérale mais pas par voie orale [Wells *et al.* 2003]. Chez les moutons ARR/ARR infectés par voie orale, aucune trace de PrP<sup>sc</sup> n'a été détectée dans les viscères et le SNC deux ans après infection [Jeffrey *et al.* 2001c]. Dans le but d'éliminer la tremblante des cheptels ovins plusieurs pays ont initié des programmes fondés sur la sélection génétique des ovins ARR/ARR. Cette sélection va probablement limiter le développement des maladies à prion dans les troupeaux ; cependant une éventuelle adaptation de certaines souches de prion à ce génotype « résistant » doit être



considérée car cela deviendrait un problème dans l'avenir. A ce sujet, plusieurs ovins atteints de tremblante naturelle dont certains portent un allèle ARR posent des problèmes de diagnostic car des tests concluent sur des résultats positifs alors que d'autres concluent sur des résultats négatifs [Buschmann, soumis pour publication]. Dans notre étude sur un troupeau de moutons infectés par la tremblante (article 5), chez 4 ovins portant un allèle ARR, les résultats obtenus par ELISA sont positifs alors que le Western blot et l'immunohistochimie concluent sur un résultat négatif. Finalement le statut de ces animaux reste à ce jour discutable. Seules des expérimentations de transmission à la souris pourront conclure sur la présence ou non d'infectiosité et sur la nature éventuelle des souches incriminées.

### **Etude du cas d'encéphalopathie spongiforme féline chez le guépard (article 2)**

Au cours de notre travail, il a été possible de réaliser une étude similaire chez un guépard « naturellement » atteint d'ESF. Les résultats obtenus chez cet animal renforcent l'idée que les sites d'accumulation de la PrP anormale, dans une espèce donnée, dans les maladies à prions sont a priori difficilement prévisibles. Ainsi, une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> dans certains glomérules a été mise en évidence dans le rein. Cette particularité n'a été observée que chez des chats atteints d'ESF [Ryder *et al.* 2001]. Dans cette dernière étude, certains animaux sains ont aussi présenté un immunomarquage de la PrP<sup>Sc</sup> dans les glomérules rénaux. Les auteurs considèrent tout de même que ce marquage est spécifique s'il est associé à une neuropathologie caractéristique [Ryder *et al.* 2001]. Dans notre cas, l'apport du PET-blot a révélé l'intérêt de cette approche. Grâce à l'utilisation de concentration élevée de protéinase K, permettant de digérer le tissu et la PrP<sup>C</sup>, la PrP<sup>Res</sup> a pu être visualisée *in situ*, corroborant la spécificité du marquage identifié par immunohistochimie.

L'étude de l'innervation de la surrénale et du rein a montré la présence de terminaisons nerveuses à proximité des zones accumulant la PrP<sup>Sc</sup>, mais pas en contact direct. Ces observations sont en faveur d'une possible dissémination de l'agent infectieux *via* le sang expliquant éventuellement la présence de PrP<sup>Sc</sup> dans certains glomérules rénaux.

Comparativement, chez les autres espèces affectées naturellement ou expérimentalement par l'agent de l'ESB, les sites d'accumulation de la PrP anormale sont multiples et concernent le SNC et des organes périphériques. L'ESB chez les bovins est donc plus une exception dans le sens où seul le SNC est concerné par l'accumulation de PrP anormale ; il existe tout de même une accumulation transitoire de PrP anormale dans les amygdales et les plaques de Peyer de l'iléon mais cela n'a été décrit que dans des modèles expérimentaux. Les facteurs conduisant ou non à l'accumulation de PrP anormale dans les organes périphériques ne sont pas déterminés. Cependant, certains travaux ont mis en évidence que des formes différentes de PrP<sup>C</sup> sont exprimées dans les FDC des centres germinatifs de nœud lymphatiques et d'amygdales de bovins. Ces formes tronquées de PrP<sup>C</sup> préviendraient, en partie,

l'accumulation de PrP anormale dans ces structures [Thielen *et al.* 2001]. D'autres facteurs comme le précurseur du récepteur à la laminine, qui semble être impliqué dans l'accumulation de PrP anormale dans des modèles de cultures cellulaires infectées [Leucht *et al.* 2003], pourraient aussi présenter une distribution périphérique variable expliquant éventuellement les variations d'accumulation de PrP anormale d'une espèce à l'autre.

## **Deuxième partie : discrimination des souches d'agent infectieux**

Le deuxième objectif du travail a été de caractériser l'infection par l'ESB chez les moutons expérimentalement infectés par l'agent de l'ESB comparativement à des cas de tremblante naturelle en utilisant deux approches différentes. La première partie de ce travail a été de caractériser, chez les moutons infectés, les sites de clivage de la PrP anormale par les protéases. Le deuxième objectif a été de caractériser la souche d'ESB par transmission à la souris en analysant les profils neuro-anatomiques de distribution de la PrP anormale chez la souris.

### **Etude des sites de clivage de la PrP<sup>Sc</sup> (article 6)**

L'étude des sites de clivage de la protéine prion peut être abordée par des méthodes immuno-chimiques en utilisant des anticorps dirigés contre différentes zones de la protéine.

L'utilisation du Western blot, qui permet d'évaluer la taille des fragments de PrP<sup>res</sup> après digestion à la PK, révèle que la taille de la bande non glycosylée de la PrP<sup>res</sup> est plus petite dans les cas d'ESB-ovine (environ 19kDa) comparativement à des cas de tremblante naturelle (environ 20 kDa) comme cela a déjà été décrit dans d'autres études [Baron *et al.* 2000] [Stack *et al.* 2002].

L'utilisation de l'anticorps anti-prion, P4, qui reconnaît un épitope proche de la zone de clivage par la protéinase K (ov PrP 89-104), aboutit à une diminution du signal chez les deux moutons infectés par l'ESB (SB1 et SB3) comparativement à d'autres moutons atteints de tremblante naturelle pour lesquels le signal est important. Ces observations sont similaires à celles décrites par d'autres équipes [Stack *et al.* 2002].

L'étude des sites de clivage de la PrP<sup>Sc</sup> peut aussi être réalisée en immunohistochimie et révèle qu'en fonction des types cellulaires pouvant métaboliser la PrP<sup>Sc</sup>, des différences sont identifiables entre des cas de tremblante naturelle et l'ESB-ovine [Jeffrey *et al.* 2001a] [Jeffrey *et al.* 2003]. Ainsi, dans les macrophages à corps tingibles (TBMs), les cellules gliales et certains neurones, la PrP anormale est tronquée par les protéases de manières différentes lors d'infection par la tremblante ou l'ESB. Chez nos deux moutons (SB1 et SB3) des résultats identiques ont été obtenus, permettant de différencier ces deux cas d'ESB-ovine expérimentaux de cas de tremblante naturelle.

L'ensemble de ces données conforte la transmission de l'ESB à nos deux moutons et permet d'écarter la possibilité du développement d'une tremblante naturelle. De plus l'obtention de résultats identiques à ceux décrits dans les cas d'ESB chez des ovins, infectés avec l'agent de l'ESB d'origine britannique, apporte un argument supplémentaire sur l'uniformité de la souche d'ESB dans les cas étudiés.

Dans ce cadre, l'étude par immunohistochimie de deux cas de tremblante atypiques, qui présentent en Western blot un profil électrophorétique proche de celui de l'ESB-ovine, a abouti à l'obtention de résultats en faveur d'une infection par un agent de tremblante par immunohistochimie. Des inoculations à différents types de souris ont été réalisées dans le but de conclure définitivement sur la nature de l'agent infectieux présent chez ces deux moutons atypiques.

Actuellement, les projets européens, qui visent à détecter d'éventuels cas d'ESB-ovine dans les troupeaux de moutons, préconisent l'utilisation en routine, d'au moins deux méthodes différentes pour le criblage des échantillons issus de moutons infectés par le tremblante<sup>1</sup>. Cette recherche est théoriquement envisageable par Western blot, par immunohistochimie, par une méthode ELISA qui est actuellement en cours de développement au CEA (article 6) et par le test ELISA - CDI (conformational dependant immunoassay) [Safar *et al.* 2000].

Cependant, cette approche pour l'identification de l'ESB ovine révèle certaines limites. En effet, l'existence de souches de tremblante de type C, comme CH1641 qui présente des propriétés biochimiques semblables à celle de l'ESB-ovine [Baron *et al.* 2000] [Stack *et al.* 2002] limite ce type d'analyse (hormis le test CDI ; ce qui reste à vérifier). A ce jour, l'obtention d'une signature de type ESB par analyse de la PrP anormale chez des moutons doit donc impérativement faire l'objet d'un typage sur modèles murins.

#### **Identification des souches par l'utilisation de deux modèles murins (article 7 et 8)**

Le typage des souches d'agent infectieux dans les maladies à prion est usuellement réalisé par transmission à la souris [Bruce 1996a]. Au laboratoire, cette approche a permis de poursuivre la caractérisation de l'ESB ovine chez les moutons SB1 et SB3.

Des souris transgéniques, exprimant la protéine prion cellulaire ovine (ARQ/ARQ) (TgOvPrP4) ont été développées au laboratoire [Crozet *et al.* 2001b]. Ces souris montrent une signature pathologique particulière (plaques florides) suite à l'inoculation avec l'agent de l'ESB-ovine (SB1) par comparaison à des cas de tremblante [Crozet *et al.* 2001b]. L'inoculation d'un extrait de cerveau du deuxième mouton infecté par l'ESB (SB3) a conduit une nouvelle fois à l'observation de plaques florides chez les quelques souris analysées à ce jour. L'utilisation de ce modèle murin dans le typage de l'ESB-ovine est d'un intérêt tout particulier, car il permet de s'affranchir du phénomène de barrière d'espèce et d'obtenir une transmission optimale

---

<sup>1</sup> 'Strategy to investigate the possible presence of BSE in sheep' April 2002, European commission, G. Wells.

des cas de tremblante ce qui n'est absolument pas le cas avec les souris conventionnelles. En effet, certains auteurs rapportent par exemple que 2 isolats de tremblante sur 10 n'ont pas pu être transmis à des souris conventionnelles [Bruce *et al.* 2002]. Cependant l'ESB et l'ESB ovine restent en général aisément transmissibles aux souris conventionnelles qui sont donc utilisables pour de l'identification de cette souche.

La caractérisation de l'agent de l'ESB a également été réalisée sur souris C57BL/6. L'analyse des dépôts de PrP<sup>sc</sup> dans le SNC par la méthode de PET-blot, permet d'identifier un profil similaire chez les souris inoculées avec de l'ESB, de l'ESB-ovine et de l'ESF. Par contre, des profils différents ont été obtenus chez des souris infectées avec deux agents de tremblante (un isolat naturel et une souche expérimentale, C506M3). Cette approche présente l'intérêt d'utiliser le même matériel que celui employé pour l'analyse des profils lésionnels (cerveaux fixés et inclus en paraffine). Aussi sa spécificité, liée à la mise en évidence de la PrP anormale résistante à la protéinase K, permet de visualiser facilement la « signature » d'un agent d'ESST sur l'ensemble des coupes examinées (pas de représentation graphique, pas de perte d'information). Dans nos expérimentations, il a donc été possible d'identifier aisément l'agent de l'ESB pour chacune des souris inoculées avec l'ESB, de l'ESB-ovine, l'ESF. Notre travail montre ainsi que l'ESB transmise aux ovins garde ses caractéristiques de souche. Ceci avait déjà été observé dans une autre étude qui montrait que l'infection par l'ESB chez des moutons expérimentalement infectés pouvait être identifiée par transmission à la souris et par analyse des profils lésionnels [Foster *et al.* 1996]. De même, la transmission de trois cas d'ESF chez des chats domestiques à la souris, montrait que l'agent de l'ESB était responsable de cette pathologie chez les félins [Fraser *et al.* 1994] ; à nouveau, nous apportons des résultats similaires à partir d'un cas d'ESF chez un guépard, ce qui conforte cette hypothèse.

Bien que facilement identifiable, le profil d'accumulation de PrP<sup>sc</sup> chez les souris inoculées avec l'agent de l'ESF était un peu différent comparativement aux souris inoculées avec l'ESB ou l'ESB-ovine : dans l'hippocampe, une accumulation plus importante de PrP<sup>sc</sup> dans les différentes couches moléculaires a été visualisée. Des résultats similaires ont été décrits par d'autres équipes : la comparaison des caractéristiques neuropathologiques, dont les dépôts de PrP<sup>sc</sup>, induites par l'agent de l'ESB et du vMCJ, chez 4 types différents de souris, a révélé des différences. Les auteurs concluent tout de même sur la nature identique de l'agent infectieux dans les deux maladies [Brown *et al.* 2003]. De même la transmission à la souris de l'ESB, passée une ou deux fois chez le macaque, révèle « une signature hippocampique » (lésions de vacuolisation plus importantes) qui semble caractéristique de l'adaptation de l'agent de l'ESB chez le singe [Lasmézas *et al.* 2001]. Dans notre étude, le passage de l'ESF à la souris semble avoir induit un phénomène similaire, montrant que l'hôte infecté peut influencer l'expression de la maladie chez la souris, voire de la nature de la souche. Il est très

probable que la séquence du gène de la PrP influence les caractéristiques de la souche comme l'ont suggéré plusieurs auteurs [Carlson *et al.* 1989] [Peretz *et al.* 2002]. Dans notre étude, on observe d'ailleurs que la transmission à la souris de l'ESB et de l'ESB-ovine induit des profils de dépôts de PrP<sup>sc</sup> très similaires ; comparativement, la transmission de l'ESF induit un profil un peu différent. Il est possible que la différence minime de séquence de la PrP<sup>c</sup> ovine et bovine n'induit pas de changement des caractéristiques de la souche ESB contrairement à ce qui est observé avec l'ESF (séquence de la PrP<sup>c</sup> du guépard probablement plus différente) [Rheede *et al.* 2003]. De façon similaire, les profils de PrP<sup>sc</sup> dans les SNC de souris inoculées avec l'ESB et le vMCJ sont un peu différents [Brown *et al.* 2003], reflétant probablement un phénomène identique.

Notre étude sur les souris C57BL/6 a donc permis de statuer définitivement sur la nature de l'agent infectieux (ESB) présent chez SB1 et d'identifier la présence de l'agent de l'ESB à la fois dans le SNC mais aussi dans la rate, les profils neuro-anatomiques de PrP anormale chez la souris étant identiques après transmission à partir de ces deux tissus. Des résultats similaires avaient été obtenus par analyse des profils lésionnels chez des souris R111 inoculées avec des extraits de SNC et de rate d'un mouton expérimentalement infecté par l'ESB britannique [Foster *et al.* 1996].

De la même façon, les résultats obtenus sur les souris C57BL/6 infectées avec l'ESB-ovine passée sur souris TgOvPrP4, permettent d'affirmer que la nature de la souche d'ESB est aussi maintenue chez les souris TgOvPrP4, les profils neuro-anatomiques de PrP anormale étant identiques (articles 8, résultats complémentaires). L'ensemble de ces données concernant les profils neuro-anatomiques de PrP<sup>sc</sup> chez les souris C57BL/6 confirment les données obtenues par d'autres équipes sur la grande stabilité de cet agent infectieux transmis à différentes espèces [Bruce 1996a] [Bruce *et al.* 1997]. Aussi, l'origine britannique et française des inocula utilisés montre que les propriétés de souche des cas d'ESB étudiés sont identiques.

## Conclusion - Perspectives

En résumé, il a été possible de transmettre l'agent de l'ESB aux deux moutons de génotype ARQ/ARQ, génotype conférant une certaine sensibilité à la tremblante. Ces deux animaux ont développé des signes cliniques très similaires à ceux décrits dans les cas de tremblante naturelle. La distribution des sites d'accumulation de la protéine prion anormale touche principalement le SNC, les organes lymphoïdes et le système nerveux périphérique comme dans les cas de tremblante naturelle. En ce qui concerne le mouton de génotype ARR/ARR (SB2), qui est considéré comme le plus résistant à la tremblante, des traces de protéine prion anormale ont été détectées dans le système nerveux entérique permettant de le considérer comme porteur de l'infection.

Chez les deux brebis ARQ/ARQ (SB1 et SB3), l'agent de l'ESB a pu être en revanche clairement distingué de cas de tremblante naturelle par l'analyse immuno-chimique des sites de clivage de la PrP<sup>Sc</sup> par les protéases. De plus, l'étude comparée chez des souris infectées par l'ESB, l'ESB-ovine et la tremblante, de la distribution neuro-anatomique des dépôts de PrP<sup>Sc</sup> a aussi permis de discriminer clairement l'agent de l'ESB de deux agents de tremblante. Nous avons ainsi contribué à la caractérisation de l'encéphalopathie spongiforme bovine transmise aux ovins. Nous avons pu montrer que, chez les ovins affectés par l'ESB, certaines caractéristiques physiopathologiques sont très similaires à celles rencontrées dans les cas de tremblante naturelle mais qu'il est toutefois possible d'identifier la maladie. De ce fait, des outils ont été développés permettant au laboratoire d'identifier d'éventuels cas d'ESB-ovine dans les troupeaux.

L'impact pour la santé publique de la transmission de l'ESB chez les ovins est encore inconnu. En effet, aucune donnée n'est encore disponible quant à la transmissibilité de l'ESB à l'homme à partir d'ovins contaminés par cette souche. Pour cela il pourrait être intéressant d'inoculer des primates avec un extrait de cerveau de mouton infecté par l'ESB. L'utilisation de macaques ou de lémuriens pourrait être pour cela très intéressante car la neuropathologie suite à l'infection par l'ESB et/ou le vMCJ est déjà connue [Lasmézas *et al.* 2001] [Bons *et al.* 2002] et permettrait aussi d'évaluer la virulence de l'ESB-ovine.

L'évaluation de l'infectiosité de différents tissus et organes des deux moutons (ARQ/ARQ) qui ont développé la maladie suite à l'inoculation de l'ESB (SB1 et SB3) est importante notamment en ce qui concerne le sang, les muscles, les nerfs périphériques et les fèces. Cette évaluation de l'infectiosité de ces différents tissus pourrait être réalisée sur le modèle transgénique TgOvPrP4 exprimant la PrP<sup>C</sup> ovine. En effet, il présente le double intérêt d'être facilement infectable par les prions ovins [Crozet *et al.* 2001b] et permet dans le même temps d'identifier la signature pathologique d'une infection par l'ESB-ovine (plaques florides).

De même l'infectiosité de différents tissus de SB2 reste à évaluer notamment en ce qui concerne le muscle qui présente un résultat au dessus du seuil de positivité en ELISA.

Des transmissions successives de l'ESB-ovine à d'autres moutons sont aussi envisageables ; une adaptation de la souche est en effet possible et un changement de la signature pathologique de l'infection pourrait être observé (distribution tissulaire de la PrP<sup>Sc</sup> plus systématique par exemple). De même lors de ces passages successifs chez les moutons, un typage de souche sur souris est nécessaire afin d'évaluer la stabilité de la souche ou une éventuelle adaptation comme cela a été décrit lors de passages successifs de l'ESB chez le macaque [Lasmézas *et al.* 2001]. Dans ce contexte, l'utilisation de différents modèles murins est aussi nécessaire pour identifier la signature de l'agent de l'ESB notamment en fonction des génotypes des moutons infectés. En effet, plusieurs travaux rapportent qu'en fonction de la séquence de la PrP<sup>C</sup> de l'hôte infecté, les critères permettant d'identifier cette souche sont modifiés (période d'incubation, lésions neuronales, propriétés biochimiques de la PrP anormale) [Carlson *et al.* 1989] [Peretz *et al.* 2002]. Dans ce contexte, le typage de souches sur souris concernant les moutons de génotype ARR/ARR infectés par l'ESB pourrait révéler l'émergence d'une nouvelle souche différente de celle identifiée chez les moutons ARQ/ARQ.

Ce concept de souche dans les maladies à prion est d'ailleurs encore très difficile à comprendre car il repose sur des différences de propriétés de la PrP<sup>Sc</sup> ainsi que sur des critères de transmission à l'animal de laboratoire qui parfois semble aboutir à l'apparition de nouvelles formes d'expression de la maladie (nouvelles souches ?) [Bruce 1996a]. La caractérisation et l'identification d'un agent infectieux dans une espèce ne peuvent donc garantir sa reconnaissance dans une autre espèce ni même « sa stabilité » et sa potentielle transmissibilité à d'autres espèces. L'identification de l'agent de l'ESB chez différentes espèces par ces méthodes (propriété de la PrP anormale, transmission à la souris...) a donc été finalement une grande chance qui a permis de donner relativement rapidement les premiers éléments permettant de cerner ce problème de santé publique.

## A

- Abiola, O. O., C. Iyegbe, P. Lantos, R. Plomin, B. H. Anderton and S. A. Whatley (2002). Profound sex-specific effects on incubation times for transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Intervirology* 45 (1): 56-58.
- Aguzzi, A. and Klein (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Medicine* 4(12): 1429-1433.
- Aguzzi, A. and C. Weissmann (1997). Prion research: the next frontiers. *Nature* 389: 795-798.
- Alper, T., D. A. Haig and M. C. Clarke (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 22 (3): 278-284.
- Alperovitch, A. and J. H. dAignaux (2002). vCJD epidemic in the UK: anatomy and physiology of predictive models. *Medecine Sciences* 18 (11): 1081-1088.
- Alter, M. and E. Kahana (1976). Creutzfeldt-Jakob disease among Libyan Jews in Israel. *Science* 192: 428.
- Andreoletti, O., P. Berthon, D. Marc, P. Sarradin, J. Grosclaude, L. vanKeulen, F. Schelcher, J. M. Elsen and F. Lantier (2000). Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology* 81: 3115-3126.
- Andreoletti, O., C. Lacroux, A. Chabert, L. Monnereau, G. Tabouret, F. Lantier, P. Berthon, F. Eychenne, S. LafondBenestad, J. M. Elsen and F. Schelcher (2002). PrPSc accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology* 83: 2607-2616.
- Andrews, A. H. (1998). Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *The Veterinary Record*: 512.
- Asante, E. A., J. M. Linehan, M. Desbrulais, S. Joiner, I. Gowland, A. L. Wood, J. Welch, A. F. Hill, J. D. F. Wadsworth and J. Collinge (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *The Embo Journal* 21 (23): 6358-6366.
- Aucouturier, P., F. Geissmann, D. Damotte, G. P. Saborio, H. C. Meeker, R. Kascsak, R. Kascsak, R. I. Carp and T. Wisniewski (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *Journal of Clinical Investigation* 108 (5): 703-708.

## B

- Badiola, J. J., E. Monleon, M. Monzon, C. Acin, L. Lujan, D. Fernandez, M. Simmons and A. Vargas (2002). Description of the first cases of BSE in Spain. *Veterinary Record* 151 (17): 509-510.
- Baldauf, E., M. Beekes and H. Diringier (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *Journal of General Virology* 78: 1187-1197.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Revue of Immunology* 18: 767-811.



- Baron, T., P. Belli, J.-Y. Madec, F. Moutou, C. Vitaud and M. Savey (1997). Spongiform encephalopathy in an imported cheetah in France. *The Veterinary Record* 141: 270-271.
- Baron, T., J.-Y. Madec, D. Calavas, Y. Richard and F. Barillet (2000). Comparison of French natural scrapie isolates with BSE and experimental scrapie infected sheep. *Neuroscience Letters* 284: 175-178.
- Baron, T. G. M., J.-Y. Madec and D. Calavas (1999). Similar Signature of the Prion Protein in Natural Sheep Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy-Linked Diseases. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11): 3701-3704.
- Bartz, J. C., A. E. Kincaid and R. A. Bessen (2002). Retrograde transport of transmissible mink encephalopathy within descending motor tracts. *Journal of Virology* 76 (11): 5759-5768.
- Bartz, J. C., A. E. Kincaid and R. A. Bessen (2003). Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *Journal of Virology* 77 (1): 583-591.
- Baylis, M. (2002). The BSE-susceptible proportion of UK sheep. *Veterinary Record* 151 (16): 481-482.
- Baylis, M., W. Goldmann, F. Houston, D. Cairns, A. Chong, A. Ross, A. Smith, N. Hunter and A. R. McLean (2002). Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *Journal of General Virology* 83: 2907-2914.
- Beekes, M. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamster orally infected with scrapie. *neuroscience letter* 278: 181-184.
- Beekes, M., P. Mc Bride and E. Baldauf (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal General Virology* 79(3): 601-607.
- Begara McGorum, I., L. Gonzalez, M. Simmons, N. Hunter, F. Houston and M. Jeffrey (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: Factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *Journal of Comparative Pathology* 127 (1): 59-68.
- Belt, P. B. G. M., J. H. Muilheman, B. E. C. Schreuder, J. Ruitjer, D. E. Bos, A. L. J. Gielkens and M. A. Smits (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology* 75: 509-517.
- Bencsik, Lezmi and Baron (2000). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *developmental immunology* 00: 1-7.
- Beringue, V., M. Demoy, C. Lasmézas, B. Gouritin, C. Weingarten, J.-P. Desly, J.-P. Andreux, P. Couvreur and D. Dormont (2000). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *Journal of Pathology* 190: 495-502.
- Besnestad, S., P. Sarradin, M. Chaplin, M. Stack, T. Moum and B. Bratberg (2002). Ovine scrapie - A challenging diagnosis. International conference on transmissible spongiform encephalopathies, Edinburgh.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992). Biochemical and Physical Properties of the Prion Protein from Two Strains of the Transmissible Mink Encephalopathy Agent. *Journal of Virology* 66 (4): 2096-2101.

- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). Distinct PrP Properties Suggest the Molecular Basis of Strain Variation in Transmissible Mink Encephalopathy. *Journal of Virology* 68 (12): 7859-7868.
- Betemps, D. and T. Baron (2001). Molecular specificities of antibodies against ovine and murine recombinant prion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 281: 101-108.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1982). Identification of a Protein That Purifies with the Scrapie Prion. *Science* 218: 1309-1311.
- Bons, N., S. Lehmann, N. Nishida, N. MestreFrances, D. Dormont, P. Belli, A. Delacourte, J. Grassi and P. Brown (2002). BSE infection of the small short-lived primate *Microcebus marinus*. *Comptes Rendus Biologies* 325 (1): 67-74.
- Bons, N., N. MestreFrances, P. Belli, F. Cathala, D. C. Gajdusek and P. Brown (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 4046-4051.
- Borchelt, D. R., V. E. Koliatsos, M. Guarnieri, C. A. Pardo, S. S. Sisodia and D. L. Price (1994). Rapid Anterograde Axonal Transport of the Cellular Prion Glycoprotein in the Peripheral and Central Nervous Systems. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14711-14714.
- Bossers, A., R. deVries and M. A. Smits (2000). Susceptibility of Sheep for Scrapie as Assessed by in Vitro Conversion of Nine Naturally Occurring Variants of PrP. *Journal of Virology* 74 (3): 1407-1414.
- Bradley, R. (1996). Experimental transmission of bovine spongiform encephalopathy. *Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Diseases*. L. Court and B. Dodet. Paris, Elsevier: 51-56.
- Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann and A. Aguzzi (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379: 339-343.
- Bratberg, B., K. Ueland and G. Wells (1995). Feline spongiform encephalopathy in a cat in Norway. *veterinary record* 136: 444.
- Brown (2000). Prion protein peptides: optimal toxicity and peptide blockade of toxicity. *Molecular and cellular neuroscience* 15: 66-78.
- Brown, D., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. V. Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway and H. Kretzschmar (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687.
- Brown, D. A., M. E. Bruce and J. R. Fraser (2003). Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29: 262-272.
- Brown, D. R. (1999). Prion Protein Peptide Neurotoxicity Can Be Mediated by Astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 73 (3): 1105-1113.
- Brown, D. R., A. Besinger, J. W. Herms and H. A. Kretzschmar (1998). Microglia expression of the prion protein. *Neuroreport* 9 (7): 1425-1429.

- Brown, D. R., C. Clive and S. J. Haswell (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of Neurochemistry* 76 (1): 69-76.
- Brown, D. R., B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell and I. M. Jones (1999a). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochemical Journal* 344: 1-5.
- Brown, K. L., K. Stewart, D. L. Ritchie, N. A. Mabbott, A. Williams, H. Fraser, W. I. Morrison and M. E. Bruce (1999b). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nature Medicine* 5 (11): 1308-1312.
- Brown, P. (2001). Creutzfeldt-Jakob disease: Blood infectivity and screening tests. *Seminars in Hematology* 38 (4): 2-6.
- Brown, P., F. Cathala, R. F. Raubertas, D. C. Gajdusek and P. Castaigne (1987). The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 37: 895-904.
- Brown, P., M. Preece and J. P. Brandel (2000a). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 55: 1075-1081.
- Brown, P., E. H. Rau, B. K. Johnson, A. E. Bacote, C. J. Gibbs and D. C. Gajdusek (2000b). New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: Threshold survival after ashing at 600 degrees C suggests an inorganic template of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3418-3421.
- Brown, P., R. G. Rohwer and D. C. Gajdusek (1984). Sodium hydroxide decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease virus. *The New England Journal of Medicine* 310 (11): 727-727.
- Bruce, M. (1981). Serial studies on the development of cerebral amyloidosis and vacuolar degeneration in murine scrapie. *Journal of comparative pathology* 91: 589-597.
- Bruce, M. (1996a). Strain Typing Studies of Scrapie and BSE. *Prion Diseases*. H. Baker, R. M. Ridley and N. J. Totowa, Humana Press: 223-236.
- Bruce, M., A. Chree, I. McConnell, J. Foster, G. Pearson and H. Fraser (1994a). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 343: 405-411.
- Bruce, M. and H. Fraser (1975). Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie: morphological variation and staining properties. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 7: 289-298.
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin* 49(4): 822-838.
- Bruce, M. E. (1996b). Chapter 13: Strain Typing Studies of Scrapie and BSE. *Prion Diseases*. H. P. Inc. Totowa, New Jersey: 223-237.
- Bruce, M. E., A. Boyle, S. Cousens, I. McConnell, J. Foster, W. Goldmann and H. Fraser (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *Journal of General Virology* 83: 695-704.
- Bruce, M. E., K. L. Brown, N. A. Mabbott, C. F. Farquhar and M. Jeffrey (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunology Today* 21 (9): 442-446.

- Bruce, M. E. and A. G. Dickinson (1987). Biological Evidence that Scrapie Agent Has an Independent Genome. *Journal of General Virology* 68: 79-89.
- Bruce, M. E., A. G. Dickinson and H. Fraser (1976). Cerebral amyloidosis in scrapie in the mouse : effect of agent strain and mouse genotype. *Neuropathology and applied Neurobiology* 2: 471-478.
- Bruce, M. E., P. A. Mc Bride and C. F. Farquhar (1989). Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, Pr P, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neuroscience Letters* 102: 1-6.
- Bruce, M. E., P. A. Mc Bride, M. Jeffrey and J. R. Scott (1994b). PrP in Pathology and Pathogenesis in Scrapie-Infected Mice. *Molecular Neurobiology* 8: 105-112.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttle, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser and C. J. Bostock (1997). Transmission to mice indicates that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.
- Büeler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.-A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie. *Cell* 73: 1339-1347.
- Büeler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.

## C

- Capucchio, M. T., F. Guarda, N. Pozzato, S. Coppolino, S. Caracappa and V. DiMarco (2001). Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: A comparative study in sheep and goats. *Journal of Veterinary Medicine Series A Physiology Pathology Clinical Medicine* 48(1): 23-31.
- Caramelli, M., G. Ru, C. Casalone, E. Bozzetta, P. Acutis, A. Calella and G. Forlini (2001). Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Record*. 148: 531-536.
- Cardone, F., Q. G. Liu, R. Petraroli, A. Ladogana, D. A. M, C. Arpino, M. Di Bari, G. Macchi and M. Pocchiari (1999). Prion protein glyco-type analysis in familial and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Brain Research Bulletin* 49(6): 429-33.
- Carlson, G. A., D. Westaway, S. J. DeArmond, M. Torchia and S. B. Prusiner (1989). Primary structure of prion protein may modify scrapie isolate properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 7475-7479.
- Carp, R. and Callahan (1981). In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal Macrophages. *Intervirology* 16: 8-13.
- Carp, R. and S. M. Callahan (1991). Variation in the characteristics of the 10 mouse-passaged scrapie lines derived from five scrapie-positive sheep. *Journal of General Virology* 72 (2): 293-298.
- Casamayor Palleja, M., P. Mondiere, C. Verschelde, C. Bella and T. Defrance (2002). BCR ligation reprograms B cells for migration to the T zone and B-cell follicle sequentially. *Blood* 99(6): 1913-1921.

- Castagna, A., N. Campostrini, A. Farinazzo, G. Zanusso, S. Monaco and P. G. Righetti (2002). Comparative two-dimensional mapping of prion protein isoforms in human cerebrospinal fluid and central nervous system. *Electrophoresis* 23(2): 339-346.
- Cazeau, G., C. Ducrot, E. Morignat, N. Lauvergne, S. Philippe, C. Cohen and D. Calavas (2002). Clinical surveillance of BSE in France - Quantitative analysis of animal features and clinical signs. *Revue de Medecine Veterinaire* 153(12): 785-794.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1: 1378-1379.
- Chandler, R. L. (1963). Experimental Scrapie in the Mouse. *Research Veterinary Science* 4: 276-285.
- Chaplin, M. J., A. D. Aldrich and M. J. Stack (1998). Scrapie associated fibril detection from formaldehyde fixed brain tissue in natural cases of ovine scrapie. *Research in Veterinary Science* 64 (1): 41-44.
- Chatelain, J., F. Cathala, P. Brown, S. Raharison, L. Court and D. C. Gajdusek (1981). Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. *Journal of the Neurological Sciences* 51: 329-337.
- Chatelain, J. and C. Dautheville-Guibal (1989). Ovine scrapie : follow-up of sheep belonging to an endemic scrapie infected flock. *Eur. J. Epidemiol.* 5: 113-116.
- Chelle, P. L. (1942). Un cas de tremblante chez la chèvre. *Bull. Acad. Vét.* 15: 294-295.
- Clark, A. M. (1991). Diagnosis of scrapie. *The Veterinary Record* 128 (9): 214.
- Clark, W. W., J. L. Hourrigan and W. J. Hadlow (1995). Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent. *American Journal of Veterinary Research* 56 (5): 606-612.
- Clarke, M. C. and R. H. Kimberlin (1984). Pathogénésis of mouse scrapie: distribution of of the agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Veterinary Microbiology* 9: 215-225.
- Clouscard, C., P. Beaudry, J.-M. Elsen, D. Milan, M. Dussaucy, C. Bounneau, F. Schelcher, J. Chatelain, J.-M. Launay and J.-L. Laplanche (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology* (76): 2097-2101.
- Cohen, F. E. and S. B. Prusiner (1999). Structural Studies of Prion Proteins. *Prion Biology and Diseases*. S. B. Prusiner. 10 Skyline Drive/Plainview/NY 11803-2500/USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 191-228.
- Cole, S. and R. H. Kimberlin (1985). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of vacuolation in brain and spinal cord after intraperitoneal infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 11 (3): 213-27.
- Collinge, J. and S. Hawke (1998). B lymphocytes in prion neuroinvasion: Central or peripheral players? *Nature Medicine* 4 (12): 1369-1370.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, I. Gowland, R. Medori, J. Ironside and P. Lantos (1995). Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet* 346 (8974): 569-70.
- Collinge, J., K. C. L. Sidle, J. Meads, J. Ironside and A. F. Hill (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690.

- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. L. Sittle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke and J. G. R. Jefferys (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297.
- Crozet, C., A. Bencsik, F. Flamant, S. Lezmi, J. Samarut and T. Baron (2001a). Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Reports* 21 (101): 952-956.
- Crozet, C., F. Flamant, A. Bencsik, D. Aubert, J. Samarut and T. Baron (2001b). Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *Journal of Virology* 75 (11): 5328-5334.
- Cutlip, R. C., J. M. Miller and H. D. Lehmkuhl (1997). Second passage of a US scrapie agent in cattle. *Journal of Comparative Pathology* 117: 271-275.
- Cutlip, R. C., J. M. Miller, R. E. Race, A. L. Jenny, J. B. Katz, H. D. Lehmkuhl, B. M. DeBey and M. M. Robinson (1994). Intracerebral Transmission of Scrapie to Cattle. *The Journal of Infectious Diseases* 169: 814-820.

## D

- Davies, D. and R. Kimberlin (1985). Selection of Swaledale sheep of reduced susceptibility to experimental scrapie. *The Veterinary Record* 116: 211-214.
- DeArmond, S., S.-L. Yang, A. Lee, R. Bowler, A. Taraboulos, D. Groth and S. B. Prusiner (1993). Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 90: 6449-6453.
- DeArmond, S. J., W. C. Mobley, D. L. DeMott, R. A. Barry, J. H. Beckstead and S. B. Prusiner (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 50: 1271-80.
- DellOmo, G., E. Vannoni, A. L. Vyssotski, M. A. DiBari, R. Nonno, U. Agrimi and H. P. Lipp (2002). Early behavioural changes in mice infected with BSE and scrapie: automated home cage monitoring reveals prion strain differences. *European Journal of Neuroscience* 16 (4): 735-742.
- Deslys, J.-P. (1998). Les maladies à prions. *Pour la Science* (19 HS): 110-116.
- Detwiler, L. and M. Balys (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* 22: 121-143.
- Detwiler, L. A. (1992). Scrapie. *Rev. sci. Off. int. Epiz.* 11: 491-537.
- Dickinson, A. and H. Fraser (1979). An assessment of the genetics of the scrapie agent in sheep and mice. *Slow transmissible diseases of the nervous system. A. Press.* 1: 367-385.
- Dickinson, A. G. and V. M. H. Meikle (1969a). A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genetical Research* 13: 213-225.
- Dickinson, A. G., V. M. H. Meikle and H. Fraser (1968a). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology* 78: 293-299.

- Dickinson, A. G., V. M. H. Meikle and H. Fraser (1969b). Genetical Control of the Concentration of ME7 Scrapie Agent in the Brain of Mice. *Journal of Comparative Pathology* 79: 15-22.
- Dickinson, A. G., J. T. Stamp, C. C. Renwick and J. C. Rennie (1968b). Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep infected with a Cheviot-passaged scrapie agent. *Journal of Comparative Pathology* 78: 313-321.
- Dickinson, A. G. and D. M. Taylor (1978). Resistance of scrapie agent to decontamination. *The New England Journal of Medicine* 299 (25): 1413-1414.
- Donnelly, C. A. (1998). Maternal transmission of BSE: interpretation of the data on the offspring of BSE-affected pedigree suckler cows. *The Veterinary Record* 142 (21): 579-580.
- Dormont, D. (1998). Biologie des agents transmissibles non conventionnels ou prions. *Revue Neurologique* 154 (2): 142-151.
- Ducrot, C. and D. Calavas (1998). Tremblante ovine - Etudes de cas - Comptes rendus de 15 études de cas réalisées dans des élevages ovins atteints de tremblante. Theix, Rapport INRA - CNEVA: 76.
- Ducrot, C., P. Roy, E. Morignat, T. Baron and D. Calavas (2003). How the surveillance system may bias the results of analytical epidemiological studies on BSE: prevalence among dairy versus beef suckler cattle breeds in France. *Veterinary Research* 34 (2): 185-92.

## E

- Elsen, J.-M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andréoletti, F. Eychenne, J. Vu Tien Khang, J.-P. Poivey, F. Lantier and J.-L. Laplanche (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of Virology* 144: 431-445.
- Endo, T., D. Groth, S. Prusiner and A. Kobata (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28: 8380-8388.
- Ersdal, C., M. J. Ulvund, S. L. Benestad and M. A. Tranulis (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP<sup>sc</sup>) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Veterinary Pathology* 40 (2): 164-174.

## F

- Ferguson, N. M., A. C. Ghani, C. A. Donnelly, T. J. Hagenaars and R. M. Anderson (2002). Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature* 415 (6870): 420-424.
- Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, Chauvin, J.P., Decavel, J.P., Varea, R., Grassi, J., Fontes, M., Cesbron, J.Y. (2002). PrP expression and replication by Schwann cells: Implications in prion spreading. *Journal of Virology* 76 : 2434-2439.
- Foot, W. C., W. Clark, A. Maciulis, J. W. Call, J. Hourigan, R. C. Evans, M. R. Marshall and M. de Camp (1993). Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *American Journal of Veterinary Research* 54 (11): 1863-1868.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani and F. Tagliavini (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546.

- Forloni, G., N. Angeretti, P. Malesani, E. Peressini, T. R. Martin, P. DellaTorre and M. Salmona (1999). Influence of Mutations Associated with Familial Prion-Related Encephalopathies on Biological Activity of Prion Protein Peptides. *Annals of Neurology* 45 (4): 489-494.
- Foster, J. D., M. Bruce, I. Mc Connell, A. Chree and H. Fraser (1996). Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *The Veterinary Record* 138: 546-548.
- Foster, J. D. and A. G. Dickinson (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *The Veterinary Record* 123: 5-8.
- Foster, J. D. and A. G. Dickinson (1989). Age of death from natural scrapie in a flock of Suffolk sheep. *The Veterinary Record* 125: 415-417.
- Foster, J. D., J. Hope and H. Fraser (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *The Veterinary Record* 133: 339-341.
- Foster, J. D., W. A. C. McKelvey, M. J. A. Mylne, A. Williams, N. Hunter, J. Hope and H. Fraser (1992). Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *The Veterinary Record* 130: 341-343.
- Foster, J. D., D. Parnham, A. Chong, W. Goldmann and N. Hunter (2001a). Clinical signs histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *The Veterinary Record* 148: 165-171.
- Foster, J. D., D. W. Parnham, N. Hunter and M. Bruce (2001b). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *Journal of General Virology* 82: 2319-2326.
- Fraser, H. (1970). Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of spleen. *Nature* 226: 462-463.
- Fraser, H. (1976). The pathology of natural and experimental scrapie. *Slow virus diseases of animals and man*. R. H. Kimberlin. Amsterdam, North-Holland Publishing Company: 267-305.
- Fraser, H. (1979a). Neuropathology of scrapie: the precision of the lesions and their diversity. *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*. Prusiner & Hadlow. New York: Academic press 1: 387-406.
- Fraser, H. (1979b). The Pathogenesis and pathology of scrapie (In *Aspects of slow and Persistent virus Infections*).
- Fraser, H. (1979c). Scrapie: a transmissible degenerative CNS disease. *Neurological research*. London, Pitman Medical: 194-210.
- Fraser, H., K. L. Brown, K. Stewart, I. Mc Connell, P. Mc Bride and A. Williams (1996). Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow. *Journal of General Virology* 77 (8): 1935-1940.
- Fraser, H., M. E. Bruce, A. Chree, I. McConnell and G. A. Wells (1992). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *Journal of General Virology* 73: 1891-1897.



- Fraser, H., M. E. Bruce and I. Mc Connell (1991). Murine scrapie strains, BSE models and genetics. Sub-acute Spongiform Encephalopathies. Bradley et al. Brussels: 131-136.
- Fraser, H. and A. G. Dickinson (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology* 78: 301-311.
- Fraser, H. and A. G. Dickinson (1973). Scrapie in Mice: Agent-strain Differences in the Distribution and Intensity of Grey Matter Vacuolation. *Journal of Comparative Pathology* 83: 29-40.
- Fraser, H. and A. G. Dickinson (1978). Studies of the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: The role of spleen and thymus. *Journal of Comparative Pathology* 88: 563.
- Fraser, H., I. Mc Connell, G. A. H. Wells and M. Dawson (1988). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *The Veterinary Record* 123: 472-472.
- Fraser, H., G. R. Pearson, I. McConnell, M. E. Bruce, J. M. Wyatt and T. J. Gruffydd-Jones (1994). Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *The Veterinary Record* 134: 449-449.

## G

- Gambetti, P., P. Parchi and S. G. Chen (2003). Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clinical Laboratory Medicine* 23: 43-64.
- Gauczynski, S., C. Hundt, C. Leucht and S. Weiss (2001a). Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Advances in Protein Chemistry*, Vol 57. B. Caughey. 525 B Street/ Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495/USA, Academic Press Inc: 229-272.
- Gauczynski, S., J. M. Peyrin, S. Haik, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J. P. Deslys, D. Dormont, C. I. Lasmezas and S. Weiss (2001b). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO Journal* 20 (21): 5863-5875.
- Ghani, A., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson and R. M. Anderson (2000). Assessment of the prevalence of vCJD through testing tonsils and appendices for abnormal prion protein. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 23-29.
- Gibbs, C., Jr., H. L. Amyx, A. Bacote, C. L. Masters and D. C. Gajdusek (1980). Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *Journal Infectious Disease* 142: 205-208.
- Glatzel, M., E. Abela, M. Maissen and A. Aguzzi (2003). Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 349: 1812-1820.
- Glatzel, M. and A. Aguzzi (2000). PrPC expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *Journal of General Virology* 81: 2813-2821.
- Glatzel, M., F. L. Heppner, K. M. Albers and A. Aguzzi (2001). Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* 31(1): 25-34.
- Goldgaber, D., L. Goldfarb, P. Brown, D. Asher, W. Brown, S. Len, J. Teener, S. Feinstone, R. Rubenstein, R. Kascsak, J. Boellard and D. Gajdusek (1989). PrP gene mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Journal of Experimental Neurology* 106: 204-206.

- Goldmann, W., N. Hunter, J. D. Foster, J. M. Salbaum, K. Beyreuther and J. Hope (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 2476-2480.
- Goldmann, W., N. Hunter, T. Martin, M. Dawson and J. Hope (1991). Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within protein-coding exon. *Journal of General Virology* 72: 201-204.
- Gonzalez, L., S. Martin, I. Begara McGorum, N. Hunter, F. Houston, M. Simmons and M. Jeffrey (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 126 (1): 17-29.
- Gonzalez, L., S. Martin and M. Jeffrey (2003). Distinct profiles of PrPd immunoreactivity in the brain of scrapie and BSE affected sheep: implication for differential cell targeting and PrP processing. *Journal of General Virology* 84: 1339-1350.
- Gordon, W. S. (1946). Louping-ill Tick-borne Fever and Scrapie. *The Veterinary Record* 58 (47): 516-520.
- Grathwohl, K.-U. D., M. Horiuchi, N. Ishiguro and M. Shinagawa (1997). Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrPsc in crude tissue extracts from scrapie-affected mice. *Journal of Virological Methods* 64: 205-216.
- Groschup, M., F. Weiland, O. Straub and E. Pfaff (1996). Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis* 3: 191-195.
- Groschup, M. H., M. Beekes, P. A. McBride, M. Hardt, J. A. Hainfellner and H. Budka (1999). Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathology* 98(5): 453-457.
- Groschup, M. H., T. Kuczius, F. Junghans, T. Sweeney, W. Bodemer and A. Buschmann (2000). Characterization of BSE and scrapie strains/isolates. *Archives of Virology*: 217-226.

## H

- Hadlow, W., S. Prusiner, C. Richard, M. Kennedy and E. Race (1980a). Brain tissues from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease cause scrapie-like encephalopathy in goat. *Annual Neurology* 8: 628-631.
- Hadlow, W., R. Race, R. Kennedy and C. Eklund (1979). Natural infection of sheep with scrapie virus. *Transmissible diseases of the nervous system*. Prusiner-Hadlow. New York, Academic Press. 2: 331-356.
- Hadlow, W. J. and L. Karstad (1968). Transmissible Encephalopathy of mink in Ontario. *Canadian Veterinary Journal* 9 (8): 193-196.
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy and R. E. Race (1982). Natural Infection of Suffolk Sheep with Scrapie Virus. *Journal of Infectious Diseases* 146 (5): 657-664.
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy, R. E. Race and C. M. Eklund (1980b). Virologic and Neurohistologic Findings in Dairy Goats Affected with Natural Scrapie. *Veterinary Pathology* 17: 187-199.

- Harris, D. A. (2001). Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Advances in Protein Chemistry*, Vol 57. B. Caughey. 525 B Street/ Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495/USA, Academic Press Inc: 203-228.
- Harris, D. A., P. Lele and W. D. Snider (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by *in situ* hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 4309-4313.
- Hartsough, G. R. and D. Buerger (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologiv and clinical observations. *Journal of Infectious Diseases* 115: 387-392.
- Hay, B., S. B. Prusiner and V. R. Lingappa (1987). Evidence for a secretory form of the cellular prion protein. *Biochemistry* 25: 8110-5.
- Head, M. W., V. Northcott, K. Rennison, D. Ritchie, L. McCardle, T. J. R. Bunn, N. F. McLennan, J. W. Ironside, A. B. Tullo and R. E. Bonshek (2003). Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(1): 342-346.
- Healy, A. M., A. J. Hanlon, E. Weavers, J. D. Collins and M. L. Doherty (2002). A behavioural study of scrapie-affected sheep. *Applied Animal Behaviour Science* 79(2): 89-102.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and V. R. Lingappa (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-834.
- Heggebo, R., C. Press, G. Gunnes, K. L. Lie, M. A. Tranulis, M. Ulvund, M. H. Groschup and T. Landsverk (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *Journal of General Virology* 81: 2327-2337.
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, M. J. Ulvund, M. A. Tranulis and T. Landsverk (2003). Detection of PrP<sup>Sc</sup> in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *Journal of Comparative Pathology* 128 (2-3): 172-181.
- Heppner, F. L., A. D. Christ, M. A. Klein, M. Prinz, M. Fried, J. P. Kraehenbuhl and A. Aguzzi (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine* 7 (9): 976-977.
- Herms, J., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schurmann, O. Windl, N. Brose and H. Kretzschmar (1999). Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein. *The Journal of Neuroscience* 19 (20): 8866-8875.
- Herrmann, L. M., W. P. Cheevers, W. C. Davis, D. P. Knowles and O. R. Kl (2003). CD21-Positive Follicular Dendritic Cells: A Possible Source of PrP(Sc) in Lymph Node Macrophages of Scrapie-Infected Sheep. *Am J Pathol* 162 (4): 1075-81.
- Herzberg, L., B. N. Herzberg and J. Gibbs (1974). Creutzfeldt-Jakob disease: hypotesis for high incidence in Libyan Jews in Israel. *Science* 186: 848.
- Hill, A., M. Antoniou and J. Collinge (1999a). Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology*. 80: 11-14.
- Hill, A., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. L. Sidle, I. Gowland and J. Collinge (1997a). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450.

- Hill, A. F., R. J. Butterworth, S. Joiner, G. Jackson, M. N. Rossor, D. J. Thomas and A. Frosh (1999b). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *The Lancet* 353(9148): 183-189.
- Hill, A. F., S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos and J. Collinge (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(18): 10248-10253.
- Hill, A. F., S. Joiner, J. D. Wadsworth, K. C. Sidle, J. E. Bell, H. Budka, J. W. Ironside and J. Collinge (2003). Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 126 (6): 1333-46.
- Hill, A. F., K. C. L. Sidle, S. Joiner, P. Keyes, T. C. Martin, M. Dawson and J. Collinge (1998). Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neuroscience Letters* 255 (3): 159-162.
- Hill, A. F., M. Zeidler, J. Ironside and J. Collinge (1997b). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *The Lancet* 349: 99-100.
- Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, M. Penney, D. Ritchie and J. W. Ironside (2002). Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *British Medical Journal* 325 (7365): 633-634.
- Hope, J. (1994). The nature of the scrapie agent: The evolution of the virino. *New-York Academie Science* 724: 282-289.
- Hope, J., S. C. E. R. Wood, C. R. Birkett, A. Chong, M. E. Bruce, D. Cairns, W. Goldmann, N. Hunter and C. J. Bostock (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *Journal of General Virology* 80: 1-4.
- Hopp, P., M. J. Ulvund and J. Jarp (2001). A case-control study on scrapie in Norwegian sheep flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 51(3-4): 183-198.
- Horiuchi, M., T. Nemoto, N. Ishiguro, H. Furuoka, S. Mohri and M. Shinagawa (2002). Biological and biochemical characterization of sheep scrapie in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9): 3421-3426.
- Horiuchi, M., N. Yamazaki, T. Ikeda, N. Ishiguro and M. Shinagawa (1995). A cellular form of prion protein (PrP<sub>c</sub>) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *The Journal of General Virology* 76 (10): 2583-2587.
- Hourigan, J. L., A. Klingsporn, W. W. Clark and M. Decamp (1979). Epidemiology of scrapie in the US. *New York*. 1: 331-356.
- Houston, E. F. and M. B. Gravenor (2003a). Clinical signs in sheep experimentally infected with Scrapie and BSE. *Veterinary Record* 152: 333-334.
- Houston, E. F. and M. B. Gravenor (2003b). Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Veterinary Record* 152 (11): 333-334.
- Houston, F., J. D. Foster, A. Chong, N. Hunter and C. J. Bostock (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356 (9234): 999-1000.

- Houston, F., W. Goldmann, A. Chong, M. Jeffrey, L. Gonzalez, J. Foster, D. Parnham and N. Hunter (2003c). Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* 423 (6939): 498.
- Hsiao, K. K., D. Groth, M. Scott, S. L. Yang, H. Serban, D. Rapp, D. Foster, M. Torchia, S. J. Dearmond and S. B. Prusiner (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proceedings National Academy Sciences USA* 91: 9126-9130.
- Huang, F. P., C. F. Farquhar, N. A. Mabbott, M. E. Bruce and G. G. MacPherson (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrP<sup>Sc</sup> from the gut. *Journal of General Virology* 83: 267-271.
- Huber, R., T. Deboer and I. Tobler (2002). Sleep deprivation in prion protein deficient mice and control mice: genotype dependent regional rebound. *Neuroreport* 13 (1): 1-4.
- Hunter, N., D. Cairns, J. D. Foster, G. Smith, W. Goldmann and K. Donnelly (1997). Is scrapie solely a genetic disease? *Nature* 386: 137.
- Hunter, N., J. Dann, A. D. Bennett, R. A. Somerville, I. McConnell and J. Hope (1992). Are Sinc and the PrP gene congruent? Evidence from PrP gene analysis in Sinc congenic mice. *Journal of General Virology* 73: 2751-2755.
- Hunter, N., J. Foster, A. Chong, S. McCutcheon, D. Parnham, S. Eaton, C. MacKenzie and F. Houston (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *Journal of General Virology* 83: 2897-2905.
- Hunter, N., J. D. Foster, G. Benson and J. Hope (1991). Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep. *Journal of General Virology* 72: 1287-1292.
- Hunter, N., J. D. Foster, A. G. Dickinson and J. Hope (1989). Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *The Veterinary Record* 124: 364-366.
- Hunter, N., J. D. Foster, W. Goldmann, M. J. Stear, J. Hope and C. Bostock (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of Virology* 141: 809-824.
- Hunter, N., W. Goldmann, E. Marshall and G. O'Neill (2000). Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Archives of Virology*: 181-188.

I

- Ikeda, T., M. Horiuchi, N. Ishiguro, Y. Muramatsu, G. G. Uwe and M. Shinagawa (1995). Amino acid polymorphisms of PrP with references to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *Journal of General Virology* 76: 2577-2581.
- Ikegami, Y., M. Ito, H. Isomura, E. Momotani, K. Sasaki, Y. Muramatsu, N. Ishiguro and M. Shinagawa (1991). Pre-clinical and clinical diagnostic of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. *The Veterinary Record* 128: 271-275.
- Ironside, J. W. and J. E. Bell (1997). Florid plaques and new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet* 350 (9089): 1475.

Ironside, J. W., M. W. Head, J. E. Bell, L. McCardle and R. G. Will (2000a). Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 37 (1): 1-9.

Ironside, J. W., D. A. Hilton, A. Ghani, N. J. Johnston, L. Conyers, L. McCardle and D. Best (2000b). Retrospective study of prion-protein accumulation in tonsil and appendix tissues. *The Lancet* 355: 1693-1694.

## J

Jeffrey, M., S. Martin and L. Gonzalez (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology* 84: 1033-45.

Jeffrey, M., S. Martin, L. Gonzalez, S. J. Ryder, S. J. Bellworthy and R. Jackman (2001a). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 125 (4): 271-284.

Jeffrey, M., S. Martin, J. R. Thomson, W. S. Dingwall, I. BegaraMcGorum and L. Gonzalez (2001b). Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *Journal of Comparative Pathology* 125 (1): 48-57.

Jeffrey, M., G. McGovern, S. Martin, C. M. Goodsir and K. L. Brown (2000). Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Archives of Virology*: 23-38.

Jeffrey, M., S. Ryder, S. Martin, S. A. C. Hawkins, L. Terry, C. BerthelinBaker and S. J. Bellworthy (2001c). Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *Journal of Comparative Pathology* 124 (4): 280-289.

Joubert, L., M. Lapras, J. Gastellu, M. Prave and D. Laurent (1972). Un foyer de tremblante du mouton en Provence. *Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée* 74: 165-184.

## K

Kaneko, K., L. Zulianello, M. Scott, C. M. Cooper, A. C. Wallace, T. L. James, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proceedings National Academy Sciences USA* 94: 10069-10074.

Kao, R., M. B. Gravenor, M. Baylis, C. J. Bostock, C. M. Chihota, J. C. Evans, W. Goldmann, A. J. Smith and A. R. McLean (2002). The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. *Science* 295: 332-335.

Kascsak, R., R. Rubenstein, P. Merz, M. Tonna-Demasi, R. Fersko and R. Carp (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibrils proteins. *Journal of Virology* 61: 3688-3693.

Kascsak, R. J., R. Rubenstein, P. Merz, R. I. Carp, H. M. Wisniewski and H. Diringer (1985). Biochemical differences among scrapie associated fibrils support the biological diversity of scrapie agent. *Journal of General Virology* 66: 1715-1722.

Kim, Y., R. Carp, S. Callahan and H. Wisniewski (1988). Adrenal involvement in scrapie-induced obesity. *proc Soc Exp Biol Med* 189: 21-27.

- Kim, Y., R. I. Carp, S. M. Callahan and H. M. Wisniewski (1987). Incubation Periods and Survival Times for Mice Injected Stereotaxically with Three Scrapie Strains in Different Brain Regions. *Journal of General Virology* 68: 695-702.
- Kimberlin, R. H., S. Cole and C. A. Walker (1987). Temporary and Permanent Modifications to a Single Strain of Mouse Scrapie on Transmission to Rats and Hamsters. *Journal of General Virology* 68 (7): 1875-1881.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamster involves separation of agent strains from a mixture. *Journal of General Virology* 39: 487-496.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1979). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol* 89 (4): 551-62.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1982). Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. *Journal of the Royal Society of Medicine* 75: 618-624.
- Kimberlin, R. H. and C. A. Walker (1988). Pathogenesis of experimental scrapie. *Ciba Found Symp* 135: 37-62.
- Kimberlin, R. H., C. A. Walker and H. Fraser (1989). The Genomic Identity of Different Strains of Mouse Scrapie Is Expressed in Hamsters and Preserved on Reisolation in Mice. *Journal of General Virology* 70 (8): 2017-2025.
- Kimura, K. M., M. Haritani, M. Kubo, S. Hayasaka and A. Ikeda (2002). Histopathological and immunohistochemical evaluation of the first case of BSE in Japan. *Veterinary Record* 151 (11): 328-330.
- Klein, M. A., R. Frigg, E. Flechsig, A. J. Raeber, U. Kalinke, H. Bluethmann, F. Bootz, M. Suter, R. M. Zinkernagel and A. Aguzzi (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390: 687-690.
- Klein, M. A., R. Frigg, A. J. Raeber, E. Flechsig, I. Hegyi, R. M. Zinkernagel, C. Weissmann and A. Aguzzi (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Medicine* 4 (12): 1429-1433.
- Klein, M. A., P. S. Kaeser, P. Schwarz, H. Weyd, I. Xenarios, R. M. Zinkernagel, M. C. Carroll, J. S. Verbeek, M. Botto, M. J. Walport, H. Molina, U. Kalinke, H. AchaOrbea and A. Aguzzi (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Medicine* 7 (4): 488-492.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury and B. Caughey (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474.
- Kocisko, D. A., P. T. Lansbury and B. Caughey (1996). Partial unfolding and refolding of scrapie associated prion protein: evidence for a critical 16 kDa C-terminal domain. *Biochemistry* 35: 13434-42.
- Kraehenbuhl, J. P. and M. R. Neutra (2000). Epithelial M cells: Differentiation and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 301-332.

- Krebs, J. R., R. M. May and M. P. H. Stumpf (2002). Theoretical models of sheep BSE reveal possibilities. *Nature* 415 (6868): 115.
- Kretzschmar, H., S. Prusiner, L. Stowring and S. DeArmond (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *American Journal of Pathology* 122: 1-5.
- Kubosaki, Ueno, Matsumoto, Doi, Saeki, Matsumoto and Onodera (2000). Analysis of prion protein mRNA by in situ hybridization in brain and placenta of sheep. *Biochemical and Biophysocal Research Communications* 273: 890-893.
- Kuczius, T. and M. H. Groschup (1999). Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Molecular Medecine* 5: 406-418.
- Kuczius, T., I. Haist and M. H. Groschup (1998). Molecular Analysis of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Strain Variation. *The Journal of Infectious Diseases* 178 (3): 693-699.
- Kutzer, T., I. Pfeiffer and B. Brenig (2002). Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119 (4): 201-208.

## L

- Lasmézas, C.-I., J.-Y. Cesbron, J.-P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, R. Rioux, C. Lemaire, C. Locht and D. Dormont (1996a). Immune System-Dependent and -Independent Replication of the Scrapie Agent. *Journal of Virology* 70 (2): 1292-1295.
- Lasmézas, C. I., J.-P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside and J.-J. Hauw (1996b). BSE transmission to macaques. *Nature* 381: 743-744.
- Lasmézas, C. I., J.-P. Deslys, O. Robain, A. Jaegly, V. Beringue, J.-M. Peyrin, J.-G. Fournier, J.-J. Hauw, J. Rossier and D. Dormont (1997). Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein. *Science* 275: 402-405.
- Lasmézas, C. I., J.-G. Fournier, V. Nouvel and H. Boe (2001). Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparaison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98 (7): 4142-4147.
- Latarjet, R. and B. Muel (1970). Inactivation of the Scrapie Agent by Near Monochromatic Ultraviolet Light. *Nature* 227: 1341-1343.
- Lehmann, S. and D. A. Harris (1997). Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *Journal Biological Chemistry* 272: 21479-21487.
- Lemaire-Vieille, Schulze, Podevin-Dimster, Bailly and Cesbron (2000). Epithelial and endotelial expression of green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 97 (10): 5422-5427.
- Leucht, C., S. Simoneau, C. Rey, K. Vana, R. Rieger, C. I. Lasmezas and S. Weiss (2003). The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *Embo Report* 4 (3): 290-5.



- Lezmi, S. (2001). Analyse topographique des sites d'accumulation de la protéine prion chez le mouton atteint de tremblante naturelle. Lyon, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon - université Claude Bernard Lyon1.
- Ligos, C., M. Jeffrey, S. J. Ryder, S. J. Bellworthy and M. M. Simmons (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology* 127 (1): 45-57.
- Lindhout, E. and C. DeGroot (1995). Follicular dendritic cells and apoptosis: life and death in the germinal centre. *Histochemical journal* 27: 167-183.
- Lorains, J. W., C. Henry, D. A. Agbamu, M. Rossi, M. Bishop, R. G. Will and J. W. Ironside (2001). Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient. *The Lancet* 357: 1339-1340.

### M

- Ma, J. Y. and S. Lindquist (1999). De novo generation of a PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in living cells. *Nature Cell Biology* 1 (6): 358-361.
- Ma, J. Y. and S. Lindquist (2002a). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science* 298 (5599): 1785-1788.
- Ma, J. Y., R. Wollmann and S. Lindquist (2002b). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298 (5599): 1781-1785.
- Mabbott, N. A., K. L. Brown, J. Manson and M. E. Bruce (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 92: 161-165.
- Mabbott, N. A. and M. E. Bruce (2001a). The immunobiology of TSE diseases. *Journal of General Virology* 82: 2307-2318.
- Mabbott, N. A., M. E. Bruce, M. Botto, M. J. Walport and M. B. Pepys (2001b). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nature Medicine* 7 (4): 485-487.
- Mabbott, N. A., A. Williams, C. F. Farquhar, M. Pasparakis, G. Kollias and M. E. Bruce (2000). Tumor Necrosis Factor Alpha-Deficient, but not Interleukin-6-Deficient, Mice Resist Peripheral Infection with Scrapie. *Journal of Virology* 74 (7): 3338-3344.
- Mabbott, N. A., J. Young, I. McConnell and M. E. Bruce (2003). Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *Journal of Virology* 77 (12): 6845-6854.
- Madec, J.-Y., M. H. Groschup, D. Calavas, F. Junghans and T. Baron (2000). Protease-resistant prion protein in brain and lymphoid organs of sheep within a naturally scrapie-infected flock. *Microbial Pathogenesis* 28: 353-362.
- Maekawa, S., S. Iino and S. Miyata (2003). Molecular characterisation of the detergent-insoluble cholesterol-rich membrane microdomain (raft) of the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1610: 261-270.
- Maignien, T., C. I. Lasmézas, V. Beringue, D. Dormont and J.-P. Deslys (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Journal of General Virology* 80: 3035-3042.
- Mangé, A. and S. Lehmann (2002). Nouveaux aspects de la biologie de la protéine prion. *Medecine et Science* 18: 1267-1275.

- Manson, J., P. McBride and J. Hope (1992). Expression of the PrP gene in the brain of *sin*c congenic mice and its relationship to the development of scrapie. *Neurodegeneration* 1: 45-52.
- Manson, J. C., R. Barron, E. Jamieson, H. Baybutt, N. Tuzi, I. McConnell, D. Melton, J. Hope and C. Bostock (2000). A single amino acid alteration in murine PrP dramatically alters TSE incubation time. *Archives of Virology*: 95-102.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, P. A. McBride, I. McConnell and J. Hope (1994). PrP Gene Dosage Determines the Timing but not the Final Intensity or Distribution of lesions in Scrapie Pathology. *Neurodegeneration* 3: 331-340.
- Manuelidis, L., I. Zaitsev, P. Koni, Z. Y. Lu, R. A. Flavell and W. Fritch (2000). Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Virology* 74 (18): 8614-8622.
- Marsh, R. F., R. A. Bessen, S. Lehmann and G. R. Hartsough (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *Journal of General Virology* 72 (3): 589-94.
- Marsh, R. F., J. C. Sipe, S. S. Morse and R. P. Hanson (1976). Transmissible mink encephalopathy. Reduced spongiform degeneration in aged mink of the Chediak-Higashi genotype. *Laboratory Investigations* 34: 381-386.
- Mastrianni, J. A., S. Capellari, G. C. Telling, D. Han, P. Bosque, S. B. Prusiner and S. J. DeArmond (2001). Inherited prion disease caused by the V210I mutation - Transmission to transgenic mice. *Neurology* 57 (12): 2198-2205.
- McBride, P. A., M. E. Bruce and H. Fraser (1988). Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathology and Applied Neurobiology* 14: 325-336.
- McBride, P. A., P. Ekelboom, G. Kraal, H. Fraser and M. E. Bruce (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *Journal of Pathology* 168: 413-418.
- McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H. A. Kretzschmar and M. Beekes (2001). Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *Journal of Virology* 75 (19): 9320-9327.
- McGowan, J. P. (1922). Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture*. 5: 365-375.
- McKinley, M. P., D. C. Bolton and S. B. Prusiner (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35: 57-62.
- Mead, S., J. Beck, A. Dickinson, E. M. C. Fisher and J. Collinge (2000). Examination of the human prion protein-like gene Doppel for genetic susceptibility to sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters* 290 (2): 117-120.
- Merz, P. A., R. G. Rohwer, R. Kascsak, H. M. Wisniewski, R. A. Somerville, C. J. Gibbs and D. C. Gajdusek (1984). Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 225: 437-439.

- Merz, P.-A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski and K. Iqbal (1981). Abnormal Fibrils from Scrapie-infected Brain. *Acta Neuropathologica* 54: 63-74.
- Middleton, D. J. and R. M. Barlow (1993). Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Veterinary Record* 132: 545-547.
- Miller, M. W. and E. S. Williams (2002). Detection of PrPCWD in mule deer by immunohistochemistry of lymphoid tissues. *Veterinary Record* 151 (20): 610-612.
- Miller, M. W. and E. S. Williams (2003). Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* 425: 35-36.
- Miller, M. W., E. S. Williams, C. W. McCarty, T. R. Spraker, T. J. Kreeger, C. T. Larsen and E. T. Thorne (2000). Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases* 36 (4): 676-690.
- Montrasio, F., R. Frigg, M. Glatzel, M. A. Klein, F. MacKay, A. Aguzzi and C. Weissmann (2000). Impaired Prion Replication in Spleens of Mice Lacking Functional Follicular Dendritic Cells. *Science* 288: 1257-1259.
- Moore, R. C., Prusiner and Westaway (1999). Ataxia in prion protein deficient mice associated with up regulation of the novel PrP<sup>Sc</sup> Protein doppel. *Journal of Molecular Biology* 273: 797-817.
- Morignat, E., C. Ducrot, R. Roy, T. Baron, J. L. Vinard, A. G. Biacabe, J. Y. Madec, A. Bencsik, S. Debeer, M. Eliazewicz and D. Calavas (2002). Targeted surveillance to assess the prevalence of BSE in high-risk populations in western France and the associated risk factors. *Veterinary Record* 151 (3): 73-77.
- Moser, M., R. J. Colello, U. Pott and B. Oesch (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 3: 509-517.
- Mouillet-Richard, S., M. Emonval, C. Chebassier, J. Laplanche, S. Lehmann, J. Launay and O. Kellermann (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928.
- Moya, K. L., N. Salés, R. Hässig, C. Créminon, J. Grassi and L. Di Giamberardino (2000). Immunolocalization of the Cellular Prion Protein in Normal Brain. *Microscopy Research and Technique* 50 (1): 58-65.

O

- Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M. P. Mc Kinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood, S. B. Prusiner and C. Weissmann (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746.
- Onodera, T. and T. Hayashi (1994). Diversity of Clinical Signs in Natural Scrapie Cases Occurring in Japan. *JARQ* 28: 59-61.
- Onodera, T., T. Ikeda, Y. Muramatsu and M. Shinagawa (1993). Isolation of Scrapie Agent from the Placenta of Sheep with Natural Scrapie in Japan. *Microbiology Immunology* 37 (4): 311-316.
- Orge, L., J. P. Simas, A. C. Fernandes, M. Ramos and A. Galo (2000). Similarity of the lesion profile of BSE in Portuguese cattle to that described in British cattle. *Veterinary Record* 147 (17): 486-488.

O'Rourke, K. I., T. V. Baszler, S. M. Parish and D. P. Knowles (1998). Preclinical detection of PrPsc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *The Veterinary Record* 142 (18): 489-491.

Outram, G. W. (1976). The pathogenesis of scrapie in mice. *Slow virus diseases of animals and man*. R. H. Kimberlin. 14: 325-357.

P

Pallson, P. (1979). Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology. *Slow transmissible diseases of the nervous system*. P. e. s. Hadlow. New York, Academic. 1: 357-366.

Pammer, J., H. S. Cross, Y. Frobert, E. Tschachler and G. Oberhuber (2000). The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv* 436: 466-472.

Pammer, J., W. Weninger and E. Tschachler (1998). Human Keratinocytes Express Cellular Prion-Related Protein in Vitro and during Inflammatory Skin Diseases. *American Journal of Pathology* 153 (5): 1353-1358.

Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1993). Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 10962-10966.

Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. F. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). Molecular Basis of Phenotypic Variability in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Annals Neurology* 39 (6): 767-778.

Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. SchulzSchaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti and H. Kretschmar (1999). Classification of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Based on Molecular and Phenotypic Analysis of 300 Subjects. *Annals of Neurology* 46 (2): 224-233.

Parry, H. B. (1983). *Scrapie disease in sheep*, New York, Oppenheimer ed.

Pattison, I. H. (1966). The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Research Veterinary Science* 7: 207.

Pattison, I. H. (1988). Fifty years with scrapie: A personal reminiscence. *The Veterinary Record* 123: 661-666.

Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett and W. A. Watson (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *The Veterinary Record* 90 (17): 465-468.

Pattison, I. H., M. N. Hoare, J. N. Jebbett and W. A. Watson (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *British Veterinary Journal* 130: Ixv-Ixvii.

Pattison, I. H. and K. M. Jones (1968). Modification of a Strain of Mouse-adapted Scrapie by Passage through Rats. *Research Veterinary Science* 9: 408-410.

Pattison, I. H. and G. C. Millson (1961). Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *Journal of Comparative Pathology* 71: 171-176.

- Pattison, I. H. and G. C. Millson (1962). Distribution of the scrapie agent in the tissue of experimentally inoculated goats. *Journal of Comparative Pathology* 72: 233-244.
- Pearson, G. R., J. M. Wyatt, T. J. Gruffydd-Jones, J. Hope, A. Chong, R. J. Higgins, A. C. Scott and G. A. H. Wells (1992). Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *The Veterinary Record* 131: 307-310.
- Peet, R. and J. Curran (1992). Spongiform encephalopathy in an imported cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Aust Vet J.* 69: 171.
- Peretz, D., R. A. Williamson, G. Legname, Y. Matsunaga, J. Vergara, D. R. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and M. R. Scott (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34 (6): 921-932.
- Peters, J., J. M. Miller, A. L. Jenny, T. L. Peterson and K. P. Carmichael (2000). Immunohistochemical diagnosis of chronic wasting disease in preclinically affected elk from a captive herd. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (6): 579-582.
- Post, K., D. Riesner, V. Walldorf and H. Mehlhorn (1999). Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *The Lancet* 354: 1969-1970.
- Prinz, M., G. Huber, A. J. Macpherson, F. L. Heppner, M. Glatzel, H. P. Eugster, N. Wagner and A. Aguzzi (2003). Oral Prion Infection Requires Normal Numbers of Peyer's Patches but Not of Enteric Lymphocytes. *American Journal of Pathology* 162 (4): 1103-11.
- Prinz, M., F. Montrasio, M. A. Klein, P. Schwarz, J. Priller, B. Odermatt, K. Pfeffer and A. Aguzzi (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 919-924.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 216: 136-144.
- Prusiner, S. B. (1992). Chemistry and biology of prion. *Biochemistry* 31 (49): 12277-12288.
- Prusiner, S. B. (1997). Transmissible encephalopathies (Prion diseases). Structural biology and genetics of prions. *Journal of NeuroVirology* 3 (1): 21.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23): 13363-13383.
- Prusiner, S. B., D. Groth, A. Serban, R. Koehler, D. Foster, M. Torchia, D. Burton, S. L. Yang and S. J. DeArmond (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proceedings National Academy Sciences USA* 90: 10608-10612.
- Puoti, G., G. Giaccone, G. Rossi, B. Canciani, O. Bugiani and F. Tagliavini (1999). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: Co-occurrence of different types of PrPsc in the same brain. *Neurology* 53: 2173-2176.

## R

- Race, R., D. Ernst, A. Jenny, W. Taylor, D. Sutton and B. Caughey (1992a). Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep. *American Journal of Veterinary Research* 53 (6): 883-885.

- Race, R., A. Jenny and D. Sutton (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: Implications for transmission and antemortem diagnosis. *Journal of Infectious Diseases* 178 (4): 949-953.
- Race, R., M. Oldstone and B. Chesebro (2000). Entry versus Blockade of Brain Infection following Oral or Intraperitoneal Scrapie Administration: Role of Prion Protein Expression in Peripheral Nerves and Spleen. *Journal of Virology* 74 (2): 828-833.
- Race, R. E. and D. Ernst (1992b). Detection of proteinase K-resistant prion protein and infectivity in mouse spleen by 2 weeks after scrapie agent inoculation. *Journal of Virology* 73: 3319-3323.
- Race, R. E., A. Raines, T. G. M. Baron, M. W. Miller, A. Jenny and E. S. Williams (2002). Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *Journal of Virology* 76 (23): 12365-12368.
- Raeber, A. J., R. E. Race, S. Brandner, S. A. Priola, A. Sailer, R. A. Bessen, L. Mucke, J. Manson, A. Aguzzi, M. Oldstone, C. Weissmann and B. Chesebro (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *Embo Journal* 16: 6057-6065.
- Raymond, G. J., J. Hope, D. A. Kocisko, S. A. Priola, L. D. Raymond, A. Bossers, J. Ironside, R. G. Will, S. G. Chen, R. B. Petersen, P. Gambetti, R. Rubenstein, M. A. Smits, P. T. Lansbury Jr and B. Caughey (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388: 285-288.
- Rheede, T., M. Smolenaars, O. Madsen and W. DeJong (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *mol.biol.evol.* 20: 111-121.
- Robinson, M. M., W. J. Hadlow, T. P. Huff, G. A. H. Wells, M. Dawson, R. F. Marsh and J. R. Gorham (1994). Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology* 75: 2151-2155.
- Rocher, O. (1993). Suivi clinique de moutons atteints de tremblante naturelle, Université de Créteil - Val de Marne: 92.
- Rossi, D., A. Cozzio, E. Flechsig, M. A. Klein, T. Rulicke, A. Aguzzi and C. Weissmann (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO Journal* 20 (4): 694-702.
- RusselakisCarneiro, M., G. P. Saborio, L. Anderes and C. Soto (2002). Changes in the glycosylation pattern of prion protein in murine scrapie - Implications for the mechanism of neurodegeneration in prion diseases. *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36872-36877.
- Ryder, S. J., S. A. C. Hawkins, M. Dawson and G. A. H. Wells (2000). The Neuropathology of Experimental Bovine Spongiform Encephalopathy in the Pig. *Journal of Comparative Pathology* 122: 131-143.
- Ryder, S. J., G. A. H. Wells, J. M. Bradshaw and G. R. Pearson (2001). Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 148 (14): 437-441.

S

- Safar, J., F. E. Cohen and S. B. Prusiner (2000). Quantitative traits of prion strains are enciphered in the conformation of the prion protein. *Archives of Virology*: 227-235.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). Eight prion strains have PrP<sup>Sc</sup> molecules with different conformations. *Nature Medicine* 4 (10): 1157-1165.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto and T. Noda (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531.
- Sales, N., R. Hassig, K. Rodolfo, L. DiGiambardino, E. Traiffort, M. Ruat, P. Fretier and K. L. Moya (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *European Journal of Neuroscience* 15 (7): 1163-1177.
- Sales, N., K. Rodolfo, R. Hässig, B. Faucheux, L. D. Giambardino and K. L. Moya (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *European Journal of Neuroscience* 10 (7): 2464-2471.
- Schelcher, F., O. Andreoletti, G. Tabouret and P. Cabanié (2002). La tremblante des petits ruminants : modalités de transmission chez les ovins. *Bulletin des GTV* 13: 119-112.
- Schreuder, B. E. C. and R. A. Somerville (2003). Bovine spongiform encephalopathy in sheep? *Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizooties* 22 (1): 103-120.
- Scott, M., D. Foster, C. Miranda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond and a. et (1989a). Transgenic Mice Expressing Hamster Prion Protein Produce Species- Specific Scrapie Infectivity and Amyloid Plaques. *Cell* 59: 847-857.
- Scott, M. R., R. Will, J. Ironside, H.-O. Nguyen, P. Tremblay, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96 (26): 15137-15142.
- Scott, P.-R., B. M. Aldridge, M. Clarke and R. Will (1989b). Bovine spongiform encephalopathy in a cow in the United Kingdom. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195 (12): 1745-1747.
- Shimizu, S., K. Hoshi, T. Muramoto, M. Homma, J. W. Ironside, S. Kuzuhara, T. Sato, T. Yamamoto and T. Kitamoto (1999). Creutzfeldt-Jakob Disease With Florid-Type Plaques After Cadaveric Dura Mater Grafting. *Archives of Neurology* 56 (3): 357-362.
- Shinagawa, M., K. Takahashi, S. Sasaki, S. Doi, H. Goto and G. Sato (1985). Characterization of scrapie agent isolated from sheep in Japan. *Microbiol. Immunol.* 29: 543-551.
- Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blattler, S. Brandner, J. Gotz, T. Rulicke, E. Flechsig, A. Cozzio, A. Aguzzi and C. Weissmann (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesion. *Cell* 2: 203-214.
- Shyng, S.-L., K. L. Moulder, A. Lesko and D. A. Harris (1995). The N-terminal Domain of a Glycolipid-anchored Prion Protein Is Essential for Its Endocytosis via Clathrin-coated Pits. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (24): 14793-14800.

- Sigurdarson, S. (1991). Epidemiology of scrapie in Iceland and experience with control measures. Sub-Acute Spongiform Encephalopathies, Brussels.
- Sigurdson, C. J., C. BarillasMury, M. W. Miller, B. Oesch, L. J. M. vanKeulen, J. P. M. Langeveld and E. A. Hoover (2002). PrPCWD lymphoid cell targets in early and advanced chronic wasting disease of mule deer. *Journal of General Virology* 83: 2617-2628.
- Sigurdson, C. J., T. R. Spraker, M. W. Miller, B. Oesch and E. A. Hoover (2001). PrPCWD in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Journal of General Virology* 82: 2327-2334.
- Silverman, G. L., K. F. Qin, R. C. Moore, Y. Yang, P. Mastrangelo, P. Tremblay, S. B. Prusiner, F. E. Cohen and D. Westaway (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein - Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 26834-26841.
- Simmons, M. M., P. Harris, M. Jeffrey, S. C. Meek, I. W. H. Blamire and G. A. H. Wells (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *The Veterinary Record* 138: 175-177.
- Simoneau, S., S. Haik, C. Leucht, D. Dormont, J. P. Deslys, S. Weiss and C. Lasmezas (2003). Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP. *Biological Chemistry* 384 (2): 243-246.
- Somerville, R. A., A. Chong, O. U. Mulqueen, C. R. Birkett, S. C. E. R. Wood and J. Hope (1997). Biochemical typing of scrapie strains (with response from Collinge, J. et al.). *Nature* 386: 564.
- Somerville, R. A. and L. A. Ritchie (1990). Differential glycosylation of the protein PrP forming scrapie associated fibrils. *Journal of General Virology*. 2: 833-839.
- Soto, C., G. P. Saborio and L. Anderes (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends in Neurosciences* 25 (8): 390-394.
- Stack, M. J., M. J. Chaplin and J. Clark (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 (3): 279-286.
- Stahl, N., D. R. Borchelt, K. Hsiao and S. B. Prusiner (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240.
- Stewart, R. S. and D. A. Harris (2001). Most Pathogenic Mutations Do Not Alter the Membrane Topology of the Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (3): 2212-2220.
- Stöckel, J., J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). Prion Protein Selectively Binds Copper (II) Ions. *Biochemistry* 37 (20): 7185-7193.
- Stoltze, L., H. Rezaei, G. Jung, J. Grosclaude, P. Debey, H. Schild and H. G. Rammensee (2003). CD4+ T cell-mediated immunity against prion proteins. *Cellular Molecular Life Science*. 3: 629-638.



- Taraboulos, A., M. Rogers, D. R. Borchelt, M. P. McKinley, M. Scott, D. Serban and S. B. Prusiner (1990). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proceeding of National Academic Science of USA* 87(21): 8262-6.
- Tateishi, J. (1996). Transmission of human prion diseases to rodents. *Virology* 7: 175-180.
- Taylor, D. (2002). Inactivation of the BSE agent. *Comptes Rendus Biologies* 325 (1): 75-76.
- Taylor, D. M. (2000). Inactivation of Transmissible Degenerative Encephalopathy Agents: A Review. *The Veterinary Journal* 159: 10-17.
- Taylor, D. M., K. Fernie, P. J. Steele, I. McConnell and R. A. Somerville (2002). Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents. *Journal of General Virology* 83: 3199-3204.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. De Armond and S. B. Prusiner (1995). Prion Propagation in Mice Expressing Human and Chimeric PrP Transgenes Implicates the Interactions of Cellular PrP with Another protein. *Cell* 83: 79-90.
- Terry, L. A., S. Marsh, S. J. Ryders, S. Hawking, G. Wells and Y. Spencer (2003). Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet, Record* 152: 387-392.
- Thackray, A. M., M. A. Klein, A. Aguzzi and R. Bujdoso (2002). Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *Journal of Virology* 76 (5): 2510-2517.
- Thielen, C., F. Melot, O. Jolois, F. Leclereq, R. Tsunoda, Y. Frobert, E. Heinen and N. Antoine (2001). Isolation of bovine follicular dendritic cells allows the demonstration of a particular cellular prion protein. *Cell and Tissue Research* 306 (1): 49-55.
- Thorgeirsdottir, S., S. Sigurdarson, H. M. Thorisson, G. Georgsson and A. Palsdottir (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *Journal of General Virology* 80: 2527-2534.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642.
- Tremblay, P., Z. Meiner, M. Galou, C. Heinrich, C. Petromilli and T. Lisse (1998). Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A.* 95 (21): 12580-12585.
- Tuo, W. B., D. Y. Zhuang, D. P. Knowles, W. P. Cheevers, M. S. Sy and K. I. ORourke (2001). PrP-C and PrP-Sc at the fetal-maternal interface. *Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 18229-18234.
- Tuzi, N. L., E. Gall, D. Melton and J. C. Manson (2002). Expression of doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease. *Journal of General Virology* 83: 705-711.

V

- Valleron, A. J., P. Y. Boelle, R. Will and J. Y. Cesbron (2001). Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science* 294 (5547): 1726-1728.

- van Keulen, L., C. Thuring, J. Langevel, J. Vromans, F. van Zijderveld and T. Sweeney (2002a). Immunohistochemical differences of pre-clinical BSE and scrapie infection in sheep. International conference on transmissible spongiform encephalopathies, Edinburgh.
- van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, R. H. Meloen, G. Mooij-Harkes, M. E. W. Vromans and J. P. M. Langeveld (1996). Immunohistochemical Detection of Prion in Lymphoid Tissues of Sheep with Natural Scrapie. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (5): 1228-1231.
- van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, M. E. W. Vromans, J. P. M. Langeveld and M. A. Smits (1999). Scrapie-associated Prion Protein in the Gastro-intestinal Tract of Sheep with Natural Scrapie. *Journal Comparative Pathology* 121: 55-63.
- van Keulen, L. J. M., B. E. C. Schreuder, M. E. W. Vromans, J. P. M. Langeveld and M. A. Smits (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology*: 57-71.
- van Keulen, L. J. M., M. E. W. Vromans and F. G. VanZijderveld (2002b). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* 110 (1): 23-32.
- Vorberg, I. and S. A. Priola (2002). Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36775-36781.

#### W

- Wadsworth, J. D. F., A. F. Hill, S. Joiner, G. S. Jackson, A. R. Clarke and J. Collinge (1999). Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nature Cell Biology* 1: 55-59.
- Wadsworth, J. D. F., S. Joiner, A. F. Hill, T. A. Campbell, M. Desbruslais, P. J. Luthert and J. Collinge (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358 (9277): 171-180.
- Waggoner, D. J., B. Drisaldi, T. B. Bartnikas, R. L. Casareno, J. R. Prohaska, J. D. Gitlin and D. A. Harris (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *Journal of Biological Chemistry* 11: 7455-7458.
- Wang, S., W. C. Foote, D. L. Sutton, A. Maciulis, J. M. Miller, R. C. Evans, G. R. Holyoak, J. W. Call, T. D. Bunch, W. D. Taylor and M. R. Marshall (2001). Preventing experimental vertical transmission of scrapie by embryo transfer. *Theriogenology* 56 (2): 315-327.
- Ward, H., M. Head, R. G. Will and J. W. Ironside (2003). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Clinical Laboratory Medicine*. 23: 87-108.
- Weber, M. (2003). Infections humaines à prion. *Bulletins de la Societe Française de Microbiologie* 18: 1-23.
- Weih, D. S., Z. B. Yilmaz and F. Weih (2001). Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *Journal of Immunology* 167 (4): 1909-1919.
- Wells, G. A. H., M. Dawson, S. A. C. Hawkins, R. B. Green, I. Dexter, M. E. Francis, M. M. Simmons, A. R. Austin and M. W. Horigan (1994a). Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record* 135: 40-41.

- Wells, G. A. H., S. A. C. Hawkins, A. R. Austin, S. J. Ryder, S. H. Done, R. B. Green, I. Dexter, M. Dawson and R. H. Kimberlin (2003). Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Journal of General Virology* 84: 1021-1031.
- Wells, G. A. H., Y. I. Spencer and M. Haritani (1994b). Configurations and Topographic Distribution of PrP in the Central Nervous System in Bovine Spongiform Encephalopathy: An Immunohistochemical Study. *Annals New York Academy of Sciences* 724: 350-352.
- Wells, G. A. H. and J. W. Wilesmith (1995). The Neuropathology and Epidemiology of Bovine Spongiforme Encephalopathy. *Brain Pathology* 5: 91-103.
- Westaway, D. and G. A. Carlson (2002). Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (6): 301-307.
- Westaway, D., P. A. Goodman, C. A. Mirenda, M. P. McKinley, G. A. Carlson and S. B. Prusiner (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 4: 651-662.
- Westaway, D., V. Zuliani, C. M. Cooper, M. Da Costa, S. Neuman, A. L. Jenny, L. Detwiler and S. B. Prusiner (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev* 8: 959-969.
- Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan and M. J. Atkinson (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Veterinary Record* 128: 199-203.
- Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, M. A. Stevenson, R. S. Morris, D. U. Pfeiffer, D. Lin, R. Jackson and R. L. Sanson (2000). Temporal aspects of the epidemic of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: holding-associated risk factors for the disease. *Veterinary Record* 147 (12): 319-325.
- Wilesmith, J. W., G. A. H. Wells, M. P. Cranwell and J. B. M. Ryan (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Veterinary Record* 123: 638-644.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman and P. G. Smith (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet* 347 (9006): 921-925.
- Will, R. G., G. Stewart, M. Zeidler, M. A. Macleod and R. S. Knight (1999). Psychiatric features of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Psychiatr Bull* 23: 264-267.
- Williams, A., P. J. Lucassen, D. Ritchie and M. Bruce (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Experimental Neurology* 144 (2): 433-8.
- Williams, E. S., M. W. Miller, T. J. Kreeger, R. H. Kahn and E. T. Thorne (2002). Chronic wasting disease of deer and elk: A review with recommendations for management. *Journal of Wildlife Management* 66 (3): 551-563.
- Williams, E. S. and S. Young (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Diseases* 16 (1): 89-97.
- Williams, E. S. and S. Young (1992). Spongiform encephalopathies in Cervidae. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 11 (2): 551-567.
- Williams, E. S. and S. Young (1993). Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer and elk. *Vet. Pathol.* 30: 36-45.

- Willoughby, D., D. Kelly, D. Lyon and G. Wells (1992). Spongiform encephalopathy in a captive puma. *veterinary record* 131: 431-434.
- Wisniewski, H. M. and S. Sigurdarson (1996). Mites as vectors for scrapie. *The Lancet* 347: 1114.
- Wong, B. S., D. R. Brown, T. Pan, M. Whiteman, T. Liu, X. D. Bu, R. L. Li, P. Gambetti, J. Olesik, R. Rubenstein and M. S. Sy (2001). Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metals perturbations and altered antioxidant activities. *Journal of Neurochemistry* 79 (3): 689-698.
- Wood, J., J. L. Lund and S. H. Done (1992). The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet. Rec.* 130: 25-27.
- Wood, J. L. N., I. S. McGill, S. H. Done and R. Bradley (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *The Veterinary Record* 140: 167-174.
- Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. H. Wells and J. W. Wilesmith (1991a). Encéphalopathie spongiforme d'origine naturelle chez cinq chats domestiques (traduction de Naturally occurring scrapie-like encephalopathy in five domestic cats). *Veterinary Record* 129: 233-236.
- Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. H. Wells and J. W. Wilesmith (1991b). Naturally occurring scrapie-like encephalopathy in five domestic cats. *Veterinary Record* 129: 233-236.

**Z**

- Zanusso, G., C. Casalone, P. Acutis, E. Bozzetta, A. Farinazzo, M. Gelati, M. Fiorini, G. Forloni, M. S. Sy, S. Monaco and M. Caramelli (2003). Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *Journal of General Virology* 84: 1047-1052.
- Zanusso, G., A. Farinazzo, M. Fiorini, M. Gelati, A. Castagna, P. G. Righetti, N. Rizzuto and S. Monaco (2001). pH-dependent prion protein conformation in classical Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 40377-40380.
- Zanusso, G., E. Nardelli, A. Rosati, G. M. Fabrizi, S. Ferrari, A. Carteri, F. De Simone, N. Rizzuto and S. Monaco (1998). Simultaneous occurrence of spongiform encephalopathy in a man and his cat in Italy. *The Lancet* 352: 1116-1117.
- Zanusso, G., P. G. Righetti, S. Ferrari, L. Terrin, A. Farinazzo, F. Cardone, M. Pocchiari, N. Rizzuto and S. Monaco (2002). Two-dimensional mapping of three phenotype-associated isoforms of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis* 23 (2): 347-355.
- Zeidler, M., G. E. Stewart, C. R. Barraclough, D. E. Bateman, D. Bates, D. J. Burn, A. C. Colchester, W. Durward, N. A. Fletcher, S. A. Hawkins, J. M. Mackenzie and R. G. Will (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *The Lancet* 350: 903-907.
- Zlotnik, I. (1958). The histopathology of the brain stem of sheep affected with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 68: 148-165.

Souches murines isolées sur souris sinc s7 (PrPa/a)

Souches	Origines	Souris sinc s7 (C57BL)	Souris sinc p7 (VM)	Particularités
ME7	Tremblante naturelle Injection Intra-gastrique de rate d'un sulffolk atteint de tremblante [1] [2] à des souris – IC souris Moredum [3]	Incubation courte. Stable (150-170J) [4] [5] 43A, 58A, 104A, 31A : autres souches isolées à partir de cas de tremblante, très similaires à ME7 [6]	Incubation longue. Stable (274-333J)[4] (343J) [5]	Stable même si 1P au hamster [7] (Fraser 84) 22A et ME7 petites différences dans la distribution des vacuoles. Clinique : forte inactivité, coordination motrice normale pendant les phases d'activité [3] [6]
22L	SSBP/1- 24 P mouton [8]	(150J) stable [9] [5]	(205J) [5]	Cervelet très vacuolisé [10]. Si inoculée dans le cervelet vacuoles uniquement dans cervelet [9] Souris VM : vacuolisation substance blanche Souris RIII : vacuolisation substance grise [10]
139A Chandler	SSBP/1- 16P mouton – 8P chèvre « drowsy » - 30P souris sur s7s7 et clonage [11]-	(155J) Stable [5] IP : 160J [12]	Stable (201J) [5]	Instable si 1P hamster Stable si cloné et 1P sur rat [13] 139A=chandler[12] [14] Lésions substance blanche chez toutes les souris [14]
79A	SSBP/1- 16P mouton - 9P chèvre « drowsy » [8]	Incubation plus courte / 79V (150J). stable [5]	Incubation plus longue / 79V (320J) [5]	[6] Lésions substance blanche chez toutes les souris [14]
22C	SSBP/1-21P sur mouton [15] [6] [8]	Stable (184J)[5]	Instable, donne 22H et 22C Stable si cloné (443J) [5] (535 j) [16]	Instable si 1P hamster Réisolée 3 fois depuis SSBP1 [6] Pas de lésion de la substance blanche [14]
22F	SSBP/1- 21P sur mouton cheviot principalement [15],	stable	22A sur souris p7p7	

Origine des principales souches et isolats d'ESST

87A	Border Leicester x Scottish Half breed (tremblante naturelle) [6]  Isolée de différents cas de tremblante naturelle. Bruce 96 [17]	Stable faible dose (+ 300J) Instable forte dose et donne une souche de type ME7 [18] 360 J [5]	(618J) [5]	IP ou IC vacuoles parfois non symétrique [9] [17] – plaque amyloïdes ; phénomène de rupture. Clinique : Souris actives mais incoordination motrice forte [6]
302K	SSBP/1- 16P mouton – 8P chèvre « drowsy » - 12Prat – 2P hamster [11]	Stable (142J) [8]		Si le nombre de passages de 302K est augmenté sur hamster la transmission à la souris n'est plus possible (+600J) et 302k devient identique à 263K [8]
431K	SSBP/1- 16P mouton – 8P chèvre « drowsy » - 12P rat – 3P hamster [11]			Pathogène pour la souris et le hamster [11]
301C	ESB bovine	Stable 200J [19]	P1 : 360J [19]	Souris C57BL/6 + ou – en PrP <sup>es</sup> en P1 mais toutes infectieuses [20]. Bande non glycosylée de bas poids moléculaire [21]
RML	Chandler- P sur swiss mice - P sur swiss CD1 mice	150J [7]		
C506M3	Cas de tremblante naturelle, cheviot (USA) (P.Brown) [22]	Stable [23]		
Hessen 1	Cas de tremblante naturelle chez un bélier suffolk de 4 ans [24]	290 j [25]		
221C	Nouvelle souche isolée de 4 cas de tremblante UK , 3 races différentes entre 1989 et 1994 [26]			

Souches murines isolées sur souris sinc p7 (PrP<sup>b/b</sup>)

Souches	Origine	Souris sinc s7 (C57BL)	Souris sinc p7 (VM)	Particularités
22H	1P de 22C sur sinc p7			
79V	SSBP/1. 16P mouton puis 9P chèvre « drowsy » [8]	Incubation plus longue / 79A (242J) [5]	Incubation plus courte / 79A (276J) [5]	
22A	SSBP/1. 21P sur mouton Cheviot principalement [3] ds [6] [8]	Incubation longue, donne 22F même si cloné (443J) 479 J [5]	Courte incubation. Stable (200J) [3] 69) 216J [5] assez grande thermostabilité [16].	Stable même si 1P au hamster. 22A et ME7 petites différences dans la distribution des vacuoles. Clinique : incoordination motrice forte, souris actives [3, 6] Ré-isolée 3 fois comme 22C [6]
87V	SSBP/1- 16P mouton – chèvre « drowsy » Ré-isolée de cas de tremblante naturelle	Très faible répliation (700J) [27] [5]	Vacuolisation très localisée+plaques amyloïdes (390J) [5, 27]	Bande non glycosylée basse comme BSE [28]. Pas de neuroinvasion si infection IP d'après coles 85 ? (dans[29])
111A	Tremblante naturelle	(+600J) [5]	Après 4P pas de réduction du temps incubation (750J) [5]	Plaques amyloïdes [27] Plaques Florides [30] [31]
301V	ESB bovine	P1 : 244J [16], 274 J [5] [19]	Px : 116J [5]	Souche présentant une grande thermostabilité [16] Bande non glycosylée de bas poids moléculaire [21]

Souches entretenues sur hamster

Souches	Origine	Sur Hamster	Sur Souris	Particularités
263K (Sc 237)	SSBP/1- 16P mouton – 8P chèvre « drowsy » - 12P rat – 6P hamster [11] [32] [33]	(65J) [8]	Transmission difficile, subclinique [34]	
ME7-H	Injection intra-gastrique de rate d'un sulfolk atteint de scrapie[2] a des souris – IC souris Moredum [3] –xP souris s7s7 clonée- 4P hamster	(251J) [8]	Si transmission à la souris redonne ME7 [8]	
22A-H	SSBP/1. 21P sur mouton-xP souris s7s7 clonée- 7P hamster	(151J) [8]	Si transmission à la souris redonne 22A [8]	
22L-H	SSBP/1- 24 P mouton – xP souris s7s7-3P hamster	(128 J) [8]		
22C-H	SSBP1- 21P mouton- xP souris s7s7 clonée- 7P hamster	(140J) [8]	Souche différente de 22C après passage sur Hamster : nouvelle souche 22C-H-M	[19] [35]
79V-H	SSBP/1-16P mouton -9P chèvre « drowsy » - x P souris p7p7- 4P hamster	(64J) [8]		
79A-H	SSBP/1-16P mouton -9P chèvre « drowsy » - x P souris s7s7- 4P hamster	(175J) [8]		
139A-H	SSBP/1- 16P mouton – 8P chèvre « drowsy » - x P souris s7s7 clonée- xP hamster	(122J) [8]	Souche différente de 139A après passage sur Hamster : nouvelle souche 139A-H-M	[13] [35] [19]
HY	Visons naturellement infectés par des carcasses de moutons atteints de tremblante (hypothèse) [36]	Hyperexcitabilité et ataxie cérébelleuse (65J) 100 fois plus infectieux que DY. HY hamster pas infectieux pour le vison [37] [32]	Transmission difficile à la souris [38]	Pr <sup>Pres</sup> haut poids moléculaire [39] [40]
DY	Visons naturellement infectés par des carcasses de moutons atteints de tremblante (hypothèse) [36]	Léthargie progressive (168J) 100 fois moins infectieux que HY. DY hamster pathogène pour le vison [37] [32]	Transmission difficile à la souris [38]	Pr <sup>Pres</sup> bas poids moléculaire [39] [40]



### Isolats expérimentaux entretenus sur ovins et caprins

Souches	Origine	Passage sur souris	Particularités
SSBP/1 (ovine)	scrapie sheep brain pool/1 : (1 Cheviot + 2 Cheviot x Border Leicester). Passé principalement sur Cheviot [41].	Donne de nombreuses souches	Cet inoculum a été entretenu sur des moutons Cheviot sélectionnés pour leur sensibilité à l'inoculation sous-cutané (500J) [42] En IC : 200J [42]
CH1641 (ovine)	1 cas naturel de tremblante chez 1 Cheviot UK 1971 [42]	Ne passe pas à la souris [42]	Bande non glycosylée de bas poids moléculaire cf. BSE [21]
Drowsy (caprine)	SSBP/1- 16P mouton	Donne de nombreuses souches (cf. tableaux précédents) [43]	
Scratching (caprine)	SSBP/1- 16P mouton	Passe à la souris mais période d'incubation significativement plus longue / drowsy [44]	

### Isolats d'ESST humains caractérisés sur rongeurs

Souches	Origine	Passage sur modèle animal	Particularités
Echigo 1	CJD panencephalopathique chez une femme de 33 ans	Transmis au guinea pig (P1 : 728J ; Px : 400J) 1 animal hyperactif et hyperesthésique (Px : 254J) [45]	Cette souche a été entretenue sur hamster (Px : 141J)
Fukuoka 2	CJD typique, cas N°2 dans [46]	P1 sur des souris CF1 (326j) puis sur souris NZW (Px : 120J)[47]	
SY	CJD sporadique typique E.U. [48]	Px : 360J [49]	
FU	Homme 62 ans GSS mutation ponctuelle codon 102, Japon	P1 253J +/- 107 [50] Px : 130J [49]	Fu présente 10000 fois plus d'unités infectieuses que SY mais les quantités de PrP <sup>Sc</sup> ne sont que 10 fois supérieures. SY « inhibe » FU lors de co-infections. [49]

## Références

1. Zlotnik, I. and J.C. Rennie, *Further Observations on the Experimental Transmission of Scrapie From Sheep and Goats to Laboratory Mice*. Journal of Comparative Pathology, 1963. **73**: p. 150-162.
2. Zlotnik, I. and J.C. Rennie, *Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters*. Journal of Comparative Pathology, 1965. **75**: p. 147-157.
3. Dickinson, A.G. and V.M.H. Meikle, *A comparison of some biological characteristics of the mouse -passaged scrapie agents, 22A and ME7*. Genetical Research, 1969. **13**: p. 213-225.
4. Dickinson, A.G., V.M.H. Meikle, and H. Fraser, *Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice*. Journal of Comparative Pathology, 1968. **78**: p. 293-299.
5. Fraser, H., M.E. Bruce, and I. Mc Connell, *Murine scrapie strains, BSE models and genetics*, in *Sub-acute Spongiform Encephalopathies*, Bradley et al., Editor. 1991: Brussels. p. 131-136.
6. Fraser, H. and A.G. Dickinson, *Scrapie in Mice: Agent-strain Differences in the Distribution and Intensity of Grey Matter Vacuolation*. Journal of Comparative Pathology, 1973. **83**: p. 29-40.
7. Scott, R., et al., *Propagation of Prion Strains through Specific Conformers of the Prion Protein*. Journal of Virology, 1997. **71**(12): p. 9032-9044.
8. Kimberlin, R.H., C.A. Walker, and H. Fraser, *The Genomic Identity of Different Strains of Mouse Scrapie Is Expressed in Hamsters and Preserved on Reisolation in Mice*. Journal of General Virology, 1989. **70**(8): p. 2017-2025.
9. Kim, Y., et al., *Incubation Periods and Survival Times for Mice Injected Stereotaxically with Three Scrapie Strains in Different Brain Regions*. The Journal of General Virology, 1987. **68**: p. 695-702.
10. Fraser, H., *Neuropathology of scrapie : the precision of the lesions and their diversity*. Slow Transmissible Diseases of the Nervous System. Prusiner & Hadlow. New york: Academic press, 1979. **1**: p. 387-406.
11. Kimberlin, R.H. and C.A. Walker, *Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamster involves separation of agent strains from a mixture*. Journal of General Virology, 1978. **39**: p. 487-496.
12. Cole, S. and R.H. Kimberlin, *Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of vacuolation in brain and spinal cord after intraperitoneal infection*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1985. **11**(3): p. 213-27.
13. Kimberlin, R.H., S. Cole, and C.A. Walker, *Temporary and Permanent Modifications to a Single Strain of Mouse Scrapie on Transmission to Rats and Hamsters*. Journal of General Virology, 1987. **68**(7): p. 1875-1881.
14. Fraser, H., *The pathology of natural and experimental scrapie*, in *Slow virus diseases of animals and man*, R.H. Kimberlin, Editor. 1976, North-Holland Publishing Compagny: Amsterdam. p. 267-305.
15. Dickinson, A.G. and J.T. Stamp, *Experimental scrapie in Cheviot and suffolk sheep*. J. Comp. Pathol., 1969. **79**: p. 23-26.
16. Taylor, D.M., et al., *Thermostability of mouse-passaged BSE and scrapie is independent of host PrP genotype: implications for the nature of the causal agents*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 12): p. 3199-204.
17. Bruce, M.E. and H. Fraser, *Focal and asymmetrical vacuolar lesions in the brains of mice infected with certain strains of scrapie*. Acta Neuropathol (Berl), 1982. **58**(2): p. 133-40.
18. Bruce, M.E. and A.G. Dickinson, *Biological Evidence that Scrapie Agent Has an Independent Genome*. Journal of General Virology, 1987. **68**: p. 79-89.
19. Bruce, M., et al., *Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier*. Philosophical Transactions of the Royal Society, 1994. **343**: p. 405-411.
20. Lasmézas, C.I., et al., *Transmission of the BSE Agent to Mice in the Absence of Detectable Abnormal Prion Protein*. Science, 1997. **275**: p. 402-405.
21. Stack, M.J., M.J. Chaplin, and J. Clark, *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, 2002. **104**(3): p. 279-286.

22. Lasmézas, C.I., et al., *Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparaison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 2001. **98**(7): p. 4142-4147.
23. Maignien, T., et al., *Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents*. The Journal of General Virology, 1999. **80**: p. 3035-3042.
24. Groschup, M., et al., *Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep*. Neurobiol Dis, 1996. **3**: p. 191-195.
25. Kuczus, T., I. Haist, and M.H. Groschup, *Molecular Analysis of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Strain Variation*. The Journal of Infectious Diseases, 1998. **178**(3): p. 693-699.
26. Bruce, M.E., et al., *Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE*. Journal of General Virology, 2002. **83**: p. 695-704.
27. Bruce, M.E., A.G. Dickinson, and H. Fraser, *Cerebral amyloidosis in scrapie in the mouse : effect of agent strain and mouse genotype*. Neuropathology and applied Neurobiology, 1976. **2**: p. 471-478.
28. Groschup, M.H., et al., *Characterization of BSE and scrapie strains/isolates*. Archives of Virology, 2000: p. 217-226.
29. Dormont, D., *Biologie des agents transmissibles non conventionnels ou prions*. Revue Neurologique, 1998. **154**(2): p. 142-151.
30. McBride, P.A., M.E. Bruce, and H. Fraser, *Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF)*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1988. **14**: p. 325-336.
31. Jeffrey, M., et al., *Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice*. The Veterinary Record, 1998. **142**(20): p. 534-537.
32. Marsh, R.F. and R.A. Bessen, *Physicochemical and biological characterizations of distinct strains of the transmissible mink encephalopathy agent*. Philosophical Transactions of the Royal Society Londres B, 1994. **343**: p. 413-414.
33. Kimberlin, R.H. and C. Walker, *Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster*. J Gen Virol, 1977. **34**(2): p. 295-304.
34. Hill, A.F., et al., *Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(18): p. 10248-10253.
35. Bruce, M.E., *Chapter 13 : Strain Typing Studies of Scrapie and BSE*, in *Prion Diseases*, H.P. Inc., Editor. 1996: Totowa, New Jersey. p. 223-237.
36. Hartsough, G.R. and D. Buerger, *Encephalopathy of mink. I. Epizzotilogiv and clinical observations*. Journal of Infectious Diseases, 1965. **115**: p. 387-392.
37. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters*. J Gen Virol, 1992. **73**(Pt 2): p. 329-34.
38. Taylor, D.M., et al., *Evidence that transmissible mink encephalopathy agent is biologically inactive in mice*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 1986. **12**: p. 207-215.
39. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Biochemical and Physical Properties of the Prion Protein from Two Strains of the Transmissible Mink Encephalopathy Agent*. Journal of Virology, 1992. **66**(4): p. 2096-2101.
40. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Distinct PrP Properties Suggest the Molecular Basis of Strain Variation in Transmissible Mink Encephalopathy*. Journal of Virology, 1994. **68**(12): p. 7859-7868.
41. Wilson, D.R., R.D. Anderson, and W. Smith, *Journal of Comparative Pathology*, 1950. **60**: p. 267.
42. Foster, J.D. and A.G. Dickinson, *The unusual properties of CHI641, a sheep-passaged isolate of scrapie*. The Veterinary Record, 1988. **123**: p. 5-8.
43. Chandler, R.L., *Experimental Scrapie in the Mouse*. Research Veterinary Science, 1963. **4**: p. 276-285.
44. Pattison, I.H., *The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent*. Res. Vet. Sci., 1966. **7**: p. 207.
45. Liberski, P.P. and M. Jaskolski, *Prion diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance*. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2002. **62**(3): p. 197-226.
46. Tateishi, J., et al., *Experimental transmission of human subacute spongiform encephalopathy to small rodents. III. Futher transmission from three patients and distribution patterns of lesions in mice*. Acta Neuropathol (Berl.), 1981. **53**: p. 161-163.
47. Muramoto, T., et al., *The Sequential Development of Abnormal Prion Protein Accumulation in Mice with Creutzfeldt-Jakob Disease*. American Journal of Pathology, 1992. **140**(6): p. 1411-1420.

48. Manuelidis, L. and Z.Y. Lu, *Attenuated Creutzfeldt-Jakob Disease agents can hide more virulent infections*. Neuroscience Letters, 2000. **293**(3): p. 163-166.
49. Manuelidis, L., *Transmissible Encephalopathies : Speculations and Realities*. Viral Immunol., 2003. **16**: p. 123-139.
50. Muramoto, T., et al., *Species Barrier Prevents an Abnormal Isoform of Prion Protein from Accumulating in Follicular Dendritic Cells of Mice with Creutzfeldt-Jakob Disease*. Journal of Virology, 1993. **67**(11): p. 6808-6810.

---

## RESUME

Dans le but de caractériser chez les ovins l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) responsable du variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme, trois brebis de génotype sensible (2-ARQ/ARQ) ou résistant (1-ARR/ARR) à la tremblante ont été infectées par un cas d'ESB français.

La recherche des sites d'accumulation de la protéine prion anormale (PrP<sup>Sc</sup>) a révélé des traces PrP<sup>Sc</sup> chez le mouton ARR/ARR mais n'a pas permis de différencier l'ESB chez les moutons ARQ/ARQ de cas de tremblante naturelle.

Chez ces brebis, l'agent de l'ESB a pu être en revanche identifié par l'analyse des sites de clivage de la PrP<sup>Sc</sup> par les protéases comme par l'étude comparée, chez des souris infectées par l'ESB, l'ESB-ovine et la tremblante, de la distribution neuro-anatomique discriminante des dépôts de PrP<sup>Sc</sup>.

Ainsi, grâce au maintien de certaines de ses propriétés chez les ovins, il devrait être possible d'identifier l'agent de l'ESB dans les troupeaux par ces approches complémentaires.

---

## TITLE

Study of the transmission of bovine spongiform encephalopathy agent to sheep

---

## ABSTRACT

To characterise in sheep the bovine spongiform encephalopathy agent (BSE) responsible for variant Creutzfeldt-Jakob disease in human beings, three ewes, presenting either a susceptible (2-ARQ/ARQ) or a resistant (1-ARR/ARR) genotype toward scrapie, were infected with a French BSE case.

The research of abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) accumulating sites revealed traces of PrP<sup>Sc</sup> in ARR/ARR sheep but did not distinguish BSE agent in ARQ/ARQ sheep from natural scrapie cases.

The BSE agent was finally identified in these ewes by analysing protease cleavage sites of PrP<sup>Sc</sup> and comparing, in mice infected with BSE, ovine-BSE and scrapie, the neuro-anatomical distribution of PrP<sup>Sc</sup> deposits which was discriminant.

Thus, as some properties of the BSE agent are maintained in sheep, it may be possible to identify this agent in sheep flocks using these approaches.

---

## MOTS-CLES

ATNC, ESB, ESF, ESST, guépard, immunohistochimie, ovins, PET-blot, prion, souris, tremblante

---

## INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

AFSSA – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
31, avenue Tony Garnier  
69364 LYON cedex 07