ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 – Thèse n°



METHODES DE DIAGNOSTIC DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE (ESB) CHEZ LES BOVINS : CONTRIBUTION A LA VALIDATION D'UN TEST DE CONFIRMATION NATIONAL

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD – LYON I (Médecine – Pharmacie) et soutenue publiquement le 21 avril 2010 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

NICOLLO Julia Née le 14 juin 1984 à AIX EN PROVENCE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 – Thèse n°



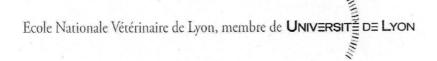
METHODES DE DIAGNOSTIC DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE (ESB) CHEZ LES BOVINS : CONTRIBUTION A LA VALIDATION D'UN TEST DE CONFIRMATION NATIONAL

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD – LYON I (Médecine – Pharmacie) et soutenue publiquement le 21 avril 2010 pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

NICOLLO Julia Née le 14 juin 1984 à AIX EN PROVENCE



DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 24/11/2009

Prénom Nom * Grade ALOGNINOUWA Théodore PR1 UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt MC Classe Normale ALVES-DE-OLIVEIRA Laurent Production animale UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale Marie-Anne MC Classe Normal **ARCANGIOLI** UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale ARTOIS Marc UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) AVISON Timothy PCFA UP Pathologie du bétail MC Classe Normale BECKER Claire Stagiaire UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants BELLI MC Contractuel UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire Patrick MC Classe Normale BELLUCO UP Pathologie Morphologique et Clinique Sara Stagiaire UP Equine - Dpt Equine BENAMOU-SMITH Agnès MC Classe Normale UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie PR1 BENOIT Etienne UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénoblotiques UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie PR2 BERNY Philippe UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques MC Classe Normale UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) BERTHEI ET Marie-Anne UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire BONNET-GARIN Jeanne-Marie PR2 PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Vie étudiante UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) MC Classe Normale Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et BOULOCHER Caroline Stagiaire biomatériaux UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Carnivores BOURDOISEAU PR1 Gilles UR Thématique Leishmaniose Direction Adjoint au Directeur BOURGOIN MC Classe Normale PT Laboratoires d'analyses Parasitologie Gilles **UP** Reproduction BRUYERE Pierre MC Contractuel BUBLOT UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores Isabelle MC Contractuel UP Reproduction - Dpt Carnivores UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle BUFF MC Classe Normale Samuel PT CERREC PT Formation continue UP Biologie fonctionnelle - Dpt Analyses de Laboratoire BURONFOSSE MC Hors Classe Thierry UR UMR 271 INSERM Hépatites virales
UP Médecine des Carnivores - Dpt Equine UR UMR 754 INRA - UCBL - ENVL - EPHE Rétrovirus Pathologie comparée CADORE Jean-Luc PR1 Direction Adjoint au directeur - Chargé de missions UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie CALLAIT-CARDINAL Marie-Pierre MC Classe Normale UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux MC Classe Normal CAROZZO Claude UP Médecine des Carnivores CHABANNE PR2 **Dpt Carnivores** Luc UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) CHALVET-MONFRAY MC Classe Normale Dpt Industrie Karine UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) COMMUN Loic MC Contractuel Dpt Analyses de Laboratoire Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie DELIGNETTE-MULLER Marie-Laure PR2 UR UMR CNRS 5558 UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie DEMONT Pierre PR2 DESJARDINS PESSON MC Contractuel **UP** Equine Isabelle UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) FGRON-MORAND Germaine MC Classe Normal Dpt Production animale UP Médecine des Carnivores MC Classe Normal **Dot Carnivores ESCRIOU** Catherine UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et PR2 FAU Didier biomatériaux FLEURY Catherine PR2 UP Equine - Dpt Equine UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores FOURNEL Corinne PR1 UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt FRANCK Michel PR1 Production animale FRIKHA Mohamed-Ridha MC Classe Normale UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale MC Contractuel UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine GANGL Monika UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores GARNIER François PR1 UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores **GENEVOIS** PRX GILOT-FROMONT UP Biologie Fonctionnelle Emmanuelle PR2

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 24/11/2009

Nom	racioni	The second secon	LID Santé Publique Vétérinaire. Ont Industria
GONTHIER	Alain	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles
7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7			UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)
GRAIN	Françoise		Dpt Analyses de Laboratoire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante
			Direction Adjoint au directour. Chargée de la Pédagogie
			UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
GRANCHER	Denis		Production animale
SKANCHER	Deriis	WIC TIOIS Classe	UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
			Direction Adjoint au directeur - Chargé des relations intérieures
GREZEL	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
			UP Reproduction - Dpt Production animale
GUERIN	Pierre	PR2	LIR LIPSP ENVI_ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Analyses de Laboratoire
JULINIT AUBLEL	Veroriique	INIO CIUSSO HOITIUIC	UR UMR CNRS 5558
HUGONNARD	Marine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
	1		UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie
JAUSSAUD	Philippe	PR1	PT Laboratoires d'analyses Laboratoire LEPS
MARKATA AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN	E8-U= 70		UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
JUNOT	Stéphane	MC Classe Normale	
			UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire UP Biologie fonctionnelle
VECV	Gérard	PR1	Dpt Industrie
KECK	Geraiu	2.31	UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
			UP Santé Publique Vétérinaire
KODJO	Angeli	PR2	Dpt Industrie
	The state of the		UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
ACHERETZ	Antoine	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire Dot Industrie
			UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)
AMBERT	Véronique	MC Classe Normale	Dot Analyses de Laboratoire
E-GRAND	Dominique	MC Hors Classe	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
			UP Santé Publique Vétérinaire
EBLOND	Agnes	PR2	Dpt Equine
			UMR INRA EPIA - UR 346
EFRANC-POHL	Anne-Cécile	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Equine UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
EPAGE	Olivier	PR1	UP Equine - Dpt Equine
OUKIADIS	Estelle	ISPV	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
OUZIER	Vanessa	MC Classe Normale	
JUZIER	Variessa	The second secon	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
MARCHAL	Thierry	MC Hors Classe	UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
MARTIN	Gillian	PCEA	PT Logistique LANGUES
MIALET	Sylvie	ISPV	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
	1	THE RESERVE OF THE RE	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
MOUNIER	Luc	MC Classe Normale	
	Annual Section 1		UR UMR INRA URH
PIN	Didier	MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
PONCE	Frédérique	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores + Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
			UR UPSP 3203 Fairbiogle Comparee des Cendres de l'antiques et presentations de l'antiques et presentation de l'antiques et presentation de l'antique et
PORTIER	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
POUZOT	Céline	MC Contractuel	PT CHEV CHEVAC - SIAMU
	The state of the s		PT CHEV UMR 1233 Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
PROUILLAC	Caroline		
REMY	Denise	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
			UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
RICHARD	Yves	PRX	PT Logistique Bureau de la Recherche
			Direction Directeur scientifique
			UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Industrie
30050	This	DD4	UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
ROGER	Thierry	PR1	PT ICLB
			PT Formation continue
SABATIER	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Production animale
Z. IGENTICIN	Титро		UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs)
SAWAYA	Serge	MC Classe Normale	
			UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
CEDOCATET	Delebise	MC Classa Normala	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
SERGENTET	Delphine	MC Classe Normale	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
	Jean-Jacques	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
THIEBAULT	The second secon		UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt
	Jacquemine	MC Hors Classe	Analyses de Laboratoire -
	Jacquemine	MC Hors Classe	Analyses de Laboratoire -
VIALARD	Jacquemine Eric	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
VIALARD VIGUIER	Eric	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
THIEBAULT VIALARD VIGUIER VIRIEUX-WATRELOT ZENNER			UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores

Remerciements

A Monsieur le professeur J.-P. FLANDROIS,

De la faculté de Médecine de Lyon,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le professeur A. KODJO,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui m'a guidé et soutenu dans ce travail,

Nos remerciements les plus vifs

A Madame la maître de conférence M.-A. ARCANGIOLI,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Qui a accepté avec sympathie de faire partie de notre jury de thèse,

Sincères remerciements

A Monsieur T. BARON,

De L'AFSSA-Lyon,

Qui est à l'origine de ce travail et qui l'a encadré,

Merci pour sa patience, sa gentillesse et ses précieux conseils pour la réalisation de cette thèse,

Sincères remerciements

A J.-N. ARSAC,

De l'AFSSA- Lyon,

Qui m'a encadré pour la réalisation de la partie expérimentale et qui m'a fait partager son travail et son savoir-faire,

Merci pour sa confiance et sa gentillesse.

Au personnel du service ATNC de l'AFSSA-Lyon,

Merci de m'avoir accueilli chaleureusement et de m'avoir fait découvrir votre travail.

A ma famille,

Papa, Jeff, Olivier et Maman qui n'a pu voir ce jour,

Merci d'avoir gardée confiance en moi et de m'avoir soutenu tout au long de ma scolarité,

Merci pour votre amour et votre présence.

A mon groupe de clinique,

Yan, Fanny, Romain, Virginie, Nico, Kenny, Simon, Sandra et Pierrick,

Pour tous les bons moments passés ensemble, aux souvenirs de nos repas de groupe de clinique, espérons qu'ils soient encore nombreux ...

A la T1-Pro bétail,

Julie, Pierre, Sophie, Yac et Axel

Pour toutes ses journées de franches rigolades en votre présence.

A mon poulot Florian,

Je te souhaite un brillant avenir.

A ma meilleure amie, Audrey,

Pour tout ce qu'on a vécu ensemble.

Tables des matières

Listes des illustrations	13
Abréviations	15
Introduction	17
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
PRESENTATION DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGI METHODES DE DIAGNOSTIC	
I – Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles	
A) Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissible	
1) La tremblante du mouton et de la chèvre ou « scrapie »	
2) L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)	
3) Les autres encéphalopathies spongiformes transmissibles	animales 23
B) Les encéphalopathies spongiformes subaigües transmissible	
1) Le kuru	
2) La maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ)	24
3) Autres encéphalopathies spongiformes transmissibles hur	naines26
II – L'agent étiologique de ces encéphalopathies	29
A) L'agent infectieux des encephalopathies spongiformes suba	igues transmissibles 29
1) Propriétés	29
2) Pouvoir pathogène	30
a) Sources de l'agent infectieux	30
b) Notion de souches	30
c) Barrière d'espèce	31
B) La découverte de la protéine prion	31
C) La PrPsens	33
1) Structure	33
a) Le gène de la PrPsens	33
b) La structure primaire	33
c) La structure secondaire	34
d) La structure tertiaire	34
2) Propriétés	35
3) Biologie cellulaire et localisation	35

a) Biologie cellulaire	35
b) Localisation anatomique	37
4) Fonction biologique	38
D) La PrPsc	39
1) Structure	39
2) Propriétés	39
3) Biologie cellulaire, distribution et transmission de la PrPsc	39
a) Biologie cellulaire	39
b) Pathogénie et distribution tissulaire de la PrPsc	40
c) Rôle pathogène	40
4) Conversion de la PrPsens en PrPsc	41
a) La conversion, un phénomène auto-catalytique	41
b) Hypothèses sur les facteurs favorisant cette conversion	42
III – L'encéphalopathie spongiforme bovine	43
A) Epidémiologie	43
1) Epidémiologie descriptive	43
2) Epidémiologie analytique	45
B) Clinique	47
1) L'ESB classique	47
2) Les ESB atypiques	48
C) Caractéristiques lésionnelles et électrophorétiques de l'ESB	48
1) Caractéristiques lésionnelles	48
2) Profil électrophorétique	51
3) Caractéristiques par bio essai	53
E) Réglementation française	54
1) Evolution de la réglementation française	54
2) Evolution des mesures de police sanitaire	55
3) Mesures de protection du consommateur	55
IV – Méthodes de diagnostic de l'encéphalopathie spongiforme bovine	56
A) Histopathologie	56
B) Microscopie électronique et Scrapie Associated Fibrils (SAF)	57
C) Les méthodes immunohistopathologiques	58
1) L'immunohistochimie	58
a) Principe de l'IHC	58
h) Influence de la congélation et de l'état des prélèvements	59

c) Autres utilisations de l'IHC	60
2) Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET-Blot)	60
a) Principe du PET-Blot	60
b) Résultats du PET-Blot – comparaison avec l'IHC	61
c) Intérêt du PET-Blot	61
D) Western blot (WB)	62
1) Principe du Western blot	62
2) Influence de l'état des prélèvements	63
E) Tests rapides	63
1) Principe des tests rapides approuvés par l'Union Européenne	63
2) Description des tests rapides approuvés en 2001	65
a) Bio-Rad TeSeE dit Platelia test ou ancien test CEA	65
b) Enfer Test	65
c) Prionics-Check western test	65
3) Description des tests rapides approuvés en 2003	65
Prionics-Check LIA (Luminescence ImunoAssay)	66
4) Description des tests rapides approuvés en 2005	66
a) Enfer TSE kit version 2.0 et enfer TSE version 3	66
b) IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit (EIA)	66
c) Prionics-Check PrioSTRIP	67
d) Roboscreen Beta Prion BSE EIA test kit	67
e) Roche Applied Science PrionScreen	67
F) Autres tests	67
1) Le dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFIA)	67
2) Le conformation-dependent immunoassay (CDI)	68
3) Le laser-induced fluorescence immunoassay (LIFIA)	68
4) Les aptamères	69
5) Le multi-spectral ultraviolet fluorescence spectroscopy (MUFS)	70
6) Le confocal dual-color fluorescence correlation spectroscopy (FCS)	70
G) Recherche de la PrPsc dans d'autres tissus que le système nerveux central et test a mortem	
1) La PrPsc dans le sang et le capillary immunoelectrophoresis (CIE)	
2) La PrPsc dans les urines et les fèces	
3) La PrPsc dans les tissus lymphoïdes	
H) Détection d'autres marqueurs des ESST et test ante-mortem	12 72

1) Recherche de marqueurs dans le liquide céphalorachidien	72
a) La protéine 14-3-3	72
b) La protéine tau	73
c) La protéine S100b	73
d) L'énolase spécifique des neurones (ESN)	74
e) L'apoprotéine E (ApoE)	74
2) Recherche de marqueurs dans le sang	74
a) Le DiaSpec's rapid ante mortem BSE test ou l'AquaSpec BSE rapid ant test	
b) Les acides nucléiques	75
3) Autres méthodes d'orientation diagnostic	75
a) L'électrocardiographie	75
b) L'électroencéphalogramme	75
c) L'imagerie médicale	75
DEUXIEME PARTIE: PARTIE EXPERIMENTALE CONTRIBUTION A LA VALIDATION D'UN TEST DE CONFIRMATION NATIONALE DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE	
I – Objectif	
II – Matériels et méthodes	
III – Résultats	79
1) Comparaison du Western blot TeSeE® et du Western blot AFSSA	79
2) Comparaison du Western blot TeSeE® avec deux tests rapides très sensibles	81
IV – Discussion	82
Conclusion	85
Bibliographie	87

Listes des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Lésions de vacuolisation périneuronales et du neuropile chez une chèvre atteinte de tremblante naturelle. Coloration à l'hémalun-éosine sur une section d'obex
Figure 2 : Carte des sites de restriction du gène <i>PRNP</i> humain avec représentation des deux exons composant le <i>PRNP</i>
Figure 3 : Structure tertiaire de la PrP obtenue par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire chez la souris
Figure 4: Synthèse de la PrPsens
Figure 5 : Cycle cellulaire de la PrPsens
Figure 6 : Distribution géographique par pays rapportant au moins un cas confirmé d'ESB de 1989 au 5 janvier 2010
Figure 7 : Morphologie de dépôts de PrPsc révélés par immunohistochimie50
Figure 8 : Dépôts amyloïdes ou plaques amyloïdes51
Figure 9 : Représentation des westerns blots obtenus pour l'ESB classique et pour les deux cas atypiques de l'ESB avec un anticorps révélant les épitopes situés sur le segment 110 à 164 acides aminés
Figure 10 : Comparaison des profils électrophorétiques de l'ESB typique (T-ESB) et de l'ESB de type-H (H-ESB) obtenus avec trois anticorps de famille différente
Figure 11 : Principaux sites examinés pour le diagnostic histologique de l'ESB56
Figure 12: SAF au microscope électronique57
Figure 13 : Méthode de révélation de l'IHC utilisé à l'AFSSA
Figure 14 : IHC et PET-Blot de néocortex d'un patient atteint de MCJ61
Figure 15 : Méthode de révélation du WB à l'AFSSA Lyon
Figure 16 : Protocole du LIFIA69
Figure 17 : Echantillons positifs (A et B) avec le Western blot TeSeE® qui était négatif avec le Western blot AFSSA (non représenté ici) et en IHC79
Figure 18 : Résultats des différentes souches d'ESB avec le test Western blot TeSeE® 80
Figure 19 : Série de dix dilutions d'un échantillon positif (colonnes 1 à 10) et un échantillon négatif analysé avec le Western blot TeSeE® (A), avec le Western blot AFSSA (B) et avec le Western blot AFSSA dont l'anticorps primaire a été remplacé par le Sha31 (C)
Figure 20 : Comparaison d'une série de dilution d'un échantillon positif entre le Western blot TeSeE® et le TeSeE® ELISA (a) et avec le HerdChek® BSE (b)

<u>Liste des tableaux</u>
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes ESST animales et humaines
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différences majeures entre la PrPsens et la PrPres 41
Tableau 3 : Evolution du nombre de cas d'ESB en France et au Royaume-Uni depuis 1989 jusqu'en janvier 2010
Tableau 4 : Evolution de l'ESB chez les bovins 47
Tableau 5 : Sensibilité en pourcentage de la détection des SAF et de la recherche de PrPres par Western Blot dans différentes régions de l'encéphale
Tableau 6 : Principes et caractéristiques des tests rapides pour la détection de l'ESB approuvés par l'Union Européenne
Tableau 7 : Echantillons utilisés pour l'étude et classés en fonction de leurs résultats pour le Western blot AFSSA et l'IHC, ainsi que les résultats obtenus avec le Western blot TeSeE® pour ces différentes catégories
Tableau 8 : Récapitulatif des étapes comparées de la réalisation du Western blot AFSSA et du Western blot TeSeE®
Liste des graphiques
Graphique 1 : Nombre de cas d'ESB en France de 1989 à 2008 et mesures réglementaires appliquées aux FVO
<u>Liste des Annexes</u>
Annexe 1 : Evaluation du Western Blot TeSeE® en tant que test de confirmation107
Annexe 2 : Matériels de l'étude et résultats
Annexe 3 : Protocole du Western Blot de l'AFSSA
Annexe 4 : Protocole du Western Blot TeSeE® commercialisé par Bio-Rad

Abréviations

aa: Acides aminés

Ac: Anticorps

ADN: Acide désoxyribonucléique

AFSSA: Agence française de sécurité sanitaire des aliments

APMS: Arrêté préfectoral de mise sous surveillance

ApoE: Apoprotéine E

APPDI: Arrêté préfectoral portant déclaration d'infection

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messager

ATNC: Agent transmissible non conventionnel

CDI: Conformation-dependent immunoassay

CIE: Capillary immunoelectrophoresis

DELFIA: Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay

ECL: Electrochimiluminescent

EDRF: Erythroid differentiation related factor

EDTA: Acide ethylene diamine tetra acétique

EEG: Electroencéphalogramme

EIA: Enzyme immunoassay

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ESB C: ESB classique

ESB H: ESB variant H

ESB L: ESB variant L

ESB: Encéphalopathie spongiforme bovine

ESN: Enolase spécifique des neurones

ESST: Encéphalopathie spongiforme subaiguës transmissibles

FCS: Confocal dual-color fluorescence correlation spectroscopy

FVO: Farines de viande et d'os

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GSS: Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

IFF: Insomnie fatale familiale

IHC: Immunohistochimie

IRM: Imagerie par résonance magnétique

kDa: Kilo Dalton

KO: Knock-out

LDA: Laboratoire d'analyse départemental

MCJ: Maladie de Creutzfeldt-Jakob

MUFS: Multi-spectral ultraviolet fluorescnec spectroscopy

NAIF: Nés après l'interdiction des farines

OMS: Organisme mondiale de la santé

pb: Paire de bases

PBS: Phosphate buffered saline

PBST: Phosphate buffered saline with Tris

PET-Blot: Paraffin-embedded tissue blot

PMCA: Protein misfolding cyclic amplification

PrPsc: Protéine prion pathogène

PrPsens ou PrPc: Protéine prion non pathogène

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RU: Royaume-Uni

SAF: Scrapie-associated fibrils

SDS: Sodium dodécyl sulfate

SNC: Système nerveux central

UV: Ultraviolet

vMCJ: Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

WB: Western blot

Introduction

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles sont des pathologies neurodégénératives fatales et rares. La première description concerne la tremblante du mouton et de la chèvre connue depuis plusieurs siècles. Désormais, chez les animaux, on recense également l'encéphalopathie spongiforme bovine, l'encéphalopathie spongiforme du vison et la maladie du dépérissement chronique des cervidés. Chez les humains, la forme la plus étudiée est la maladie de Creutzfeldt-Jakob et son variant, mais d'autres formes tels le kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et les insomnies fatales sont également présentes.

L'agent infectieux responsable de ces pathologies reste très controversé. Actuellement, il est admis que ce serait un agent dont la nature et les propriétés sont uniques dans le règne des entités pathologiques. On l'a appelé agent transmissible non conventionnel aussi surnommé protéine prion lors de sa découverte par S. Prusiner en 1982.

C'est en effet au cours de cette décennie et avec l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine que les travaux de recherche ont pris une ampleur considérable. Ces affections plutôt rares ont été soudainement médiatisées avec l'essor important du nombre de cas chez les bovins et la transmission à l'homme par ingestion d'aliments contaminés. Pour assurer au consommateur l'innocuité des viandes mises sur le marché et afin d'avoir également un outil d'épidémiosurveillance, les tests de diagnostic post-mortem des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles ont été développés au cours des années 1990.

Dans la première partie de ce travail, nous rappellerons la situation actuelle concernant l'ensemble de ces encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles. Puis nous aborderons la nature de l'agent infectieux et ses propriétés. Au vu des particularités de cet agent infectieux, nous détaillerons l'encéphalopathie spongiforme bovine et ses caractéristiques. Finalement, nous ferons le point sur l'ensemble des tests de diagnostic de l'encéphalopathie spongiforme bovine et examinerons quelques perspectives pour des tests humains.

La seconde partie de ce travail a pour objectif de présenter le test de confirmation actuel de l'AFSSA-Lyon, laboratoire français de référence. Afin de valider ce test au niveau international et d'approuver le choix de celui-ci, deux expérimentations ont été réalisées. L'une compare ce test à l'ancien test de confirmation de l'AFSSA-Lyon et l'autre le compare à d'autres tests dits rapides, très sensibles et spécifiques.

PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE PRESENTATION DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE ET DES METHODES DE DIAGNOSTIC

I – Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST)

A) Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles animales

1) La tremblante du mouton et de la chèvre ou « scrapie »

La tremblante du mouton est la première encéphalopathie décrite en Europe et connue depuis le 18^{ème} siècle. En 1755, elle fait l'objet d'un débat officiel à la Chambre des Communes du Royaume-Uni pour ses répercussions sur le commerce de la laine. Puis, J. Leopold, chercheur allemand, décrit en 1759 la clinique de la tremblante du mouton et son évolution fatale. Il note alors que les animaux ont tendance à se coucher, qu'ils se mordent les pieds et les membres, se frottent l'arrière train contre les murs, arrêtent de manger, ne profitent pas et boitent. L'évolution se fait vers la mort après émaciation (Brown P. et Bradley R., 1998).

Par la suite, en 1898, deux vétérinaires, C. Besnoit et C. Morel, identifient les lésions caractéristiques de cette affection : la dégénérescence vacuolaire des neurones (Brown P. et Bradley R., 1998). Mais ce n'est qu'au 20^{ème} siècle que les travaux sur la tremblante prennent un essor important.

Dans un premier temps, en 1935, J. Cuillé et P.-L. Chelle, par des études d'inoculation intracérébrale de tissus cérébraux de brebis atteintes de tremblante à des brebis saines, constatent la transmissibilité de la tremblante ainsi que le temps d'incubation remarquablement long, d'au moins 18 mois. Ils arrivent également à transmettre la tremblante aux chèvres avec un temps d'incubation de 25-26 mois (Cuillé J. et Chelle P.-L., 1939).

Dans les années 1960, de nombreuses équipes ont travaillé sur la description, la localisation et la caractérisation des lésions vacuolaires. Ainsi, I. Zlotnik suspecte des lésions plutôt au niveau du cervelet au vu des symptômes de la tremblante : ataxie, incoordination motrice, perturbations modérées du tonus musculaire. Par l'étude de coupes réalisées sur neuf moutons atteints de tremblante, il observe au niveau du cervelet une dégénérescence et une

vacuolisation des cellules de Purkinje des folia et des paraflocculus. Il note également la présence de lésion sur le mésencéphale (I. Zlotnik, 1960).

E. Field et A. Peat résument l'ensemble des changements histologiques observables et caractéristiques des ESST. Les lésions sont généralement bilatérales et symétriques pour la tremblante et affectent essentiellement la substance grise. Ces lésions consistent en trois modifications principales : une vacuolisation neuronale responsable de spongiose (Figure 1), une dégénérescence des cellules nerveuses et une gliose avec astrocytose et hyperplasie astrocytaire. A cette triade s'ajoute, dans le cas de la tremblante, une amyloïdose avec dépôt de corps amyloïde (Field E. et Peat A., 1969).

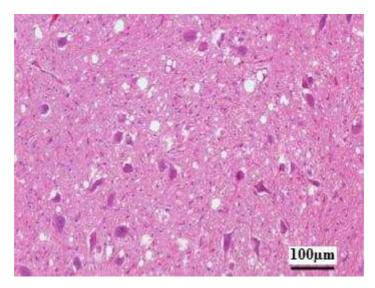


Figure 1 : Lésions de vacuolisation périneuronales et du neuropile chez une chèvre atteinte de tremblante naturelle. Coloration à l'hémalun-éosine sur une section d'obex.

(d'après Sofianidis G. et al., 2006)

Depuis ces années, la tremblante a été utilisée comme modèle expérimental pour l'étude des encéphalopathies spongiformes, modèle qui a pu être simplifié et reproduit grâce aux transmissions aux souris (Chandler R., 1961) et aux hamsters (Zlotnik I., 1963). Ainsi, par des études sur les souris atteintes de tremblante, R. Kimberlin et G. Millson décrivent les modifications biochimiques observables au niveau du cerveau. Constatant au cours du développement de la maladie une diminution du poids des encéphales, ils analysent la teneur en eau, en protéine, en lipide et en ADN et ARN des cerveaux. Ils concluent à un nombre de cellules identiques avec probablement une diminution de la taille de ces dernières. Ils remarquent également que l'activité respiratoire du cerveau chute au cours de l'évolution de la tremblante (Kimberlin G. et Millson G., 1967).

Parallèlement à ces études biochimiques, G. Hunter et G. Millson affinent la localisation de l'agent pathogène en 1963 en montrant une association étroite entre l'agent de la tremblante et les fractions du culot de centrifugation du tissu cérébral chez les souris. Ce culot correspond aux mitochondries et aux lysosomes (Hunter G. et al., 1964). Suite à cette découverte, de nombreux travaux ont été entrepris pour caractériser les propriétés physicochimiques de l'agent de la tremblante et ainsi orienter les chercheurs quant à la nature de cet agent.

Par des études de sédimentation après désintégration ultrasonique des membranes mitochondriales et lysosomiales, G. Hunter et G. Millson estiment que l'agent responsable de la tremblante est de petite taille (Hunter G. et Millson G., 1964). T. Alper et ses collaborateurs proposent en 1967 que ce dernier ne contient probablement pas d'acide nucléique car l'infectiosité est conservée, même après un traitement des extraits de cerveau purifié à base de radiations UV (Alper T. et al., 1967). De plus, l'agent est très résistant à la chaleur et la perte d'infectiosité est négligeable lorsque les culots sont chauffés à 75-80°C, température pour laquelle la plupart des molécules d'ADN sont dénaturées avec séparation des deux brins (Hunter G. et Millson G., 1964).

Toujours au cours de ces années 1960, les chercheurs s'interrogent quant à l'influence génétique sur la tremblante du mouton. H. Parry réalise ainsi une étude clinique de 8 ans sur 50 troupeaux de moutons de 10 races différentes. Il détermine alors que l'âge moyen pour développer la maladie est de 3,25 ans et que c'est une affection transmissible avec des incidences variables selon les troupeaux. Cette transmissibilité est à la fois héréditaire et infectieuse. En effet, il faut une particule déclenchante, non identifiée à cette époque, pour qu'un phénotype pathogène s'exprime. Le caractère héréditaire, quant à lui, répond à un mode autosomal récessif et le gène pathologique se retrouve plus présent dans certaines races (Parry H., 1962).

Par la suite, avec l'hypothèse protéinique pour l'agent causal et la découverte du gène mis en cause, cette susceptibilité génétique s'est confirmée comme ayant une influence sur le temps d'incubation. Elle est liée aux polymorphismes du codon 171 qui peut être occupé par de l'arginine ou de la glutamine chez les moutons Suffolk (Goldmann W. et al., 1990). De plus, un polymorphisme des codons 112 (méthionine ou thréonine), 136 (alanine ou valine) et 154 (arginine ou histidine) a aussi été identifié sur ce même gène (Laplanche J. et al., 1993). Ces découvertes ont permis de réaliser des sélections afin de conserver de préférence les lignées résistantes à la tremblante.

La tremblante du mouton affecte aussi de manière naturelle les chèvres ayant un contact avec des moutons atteints de tremblante (Hadlow W. ⁽¹⁾ et al., 1980). Celles-ci possèdent aussi un polymorphisme génétique influant sur la période d'incubation de la maladie (Goldmann W. et al., 1996) et sur la sensibilité génétique à développer la maladie. Ainsi, 11 génotypes différents sont connus et liés à 8 sites de mutations non silencieuses (Billinis C. et al., 2002).

2) L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

L'ESB est une maladie affectant, à l'origine, les bovins. Le 1^{er} cas est diagnostiqué au Royaume-Uni (RU) en novembre 1986 grâce à des examens histopathologiques d'encéphales de vaches. Mais l'émergence de la maladie semble être plus précoce. En effet, déjà en avril 1985, quelques descriptions cliniques de vaches atteintes de troubles neurologiques laissaient suspecter que celles-ci pouvaient être atteintes d'ESB. La maladie se présentait sous forme de désordres comportementaux, d'ataxie, de parésie et de perte de poids (Wilesmith J. et al., 1988).

En juin 1987, une enquête épidémiologique est entreprise. Elle rapporte ainsi que l'allure épidémique est typique d'une source commune d'infection, qui pourrait correspondre à l'exposition des bovins à un agent similaire à la tremblante, probablement par voie alimentaire. Dans ce cas là, le début de l'exposition est estimée aux années 1981-1982 (Wilesmith J. et al., 1988).

Les investigations ont appris que l'agent responsable a dû être transmis aux vaches par les farines de viande et d'os (FVO), un supplément diététique préparé à partir de protéines issues de ruminants (Bradley R. et Wilesmith J., 1993). Les modifications des procédés de traitement des déchets animaux pour les FVO seraient en cause (Bradley R., 1991). Ainsi, l'exposition à l'agent de la maladie pourrait être liée à l'arrêt de l'extraction des graisses par les solvants hydrocarbonés provenant des FVO dans les usines de traitement (Wilesmith J. et al., 1991) mais aussi à des modifications dans le traitement thermique des déchets des abattoirs (Wilesmith J., 1994).

Des mesures de contrôle de la maladie sont donc mises en place et consistent depuis 1988 (Bradley R., 1991) en l'interdiction des FVO et des produits à bases de protéines de ruminants dans l'alimentation des bovins au Royaume-Uni. De plus les abats des bovins sont retirés de l'alimentation des animaux. Pour protéger le consommateur, les animaux suspects doivent être abattus et leurs viandes, abats et lait sont interdits de consommation (Bradley R. et Wilesmith J., 1993).

L'ESB, sous forme épizootique, dite classique, semble être liée à une unique souche. En effet, une étude rétrospective réalisée en 1996 révèle une similitude dans la distribution des lésions. (Simmons M. et al., 1996). Par la suite, en 2004 sont identifiés les premiers cas atypiques dont deux variants distincts sont constatés : le variant dit de type H et celui de type L (Casalone et al, 2004 ; Biacabe A.-G. et al., 2007). Leurs noms résultent des propriétés électrophorétiques différentes de la protéine prion pathogène de ces variants par rapport à l'ESB classique.

C'est aussi à partir de 2007 que le polymorphisme génétique de l'ESB est découvert. Ainsi, une mutation du codon 211 sur le gène de la protéine qui serait en cause dans les encéphalopathies spongiformes, avec remplacement d'un acide glutamique par de la lysine, provoquerait un des cas de variant H (Richt J. et Hall S., 2008). Une insertion ou une délétion de 23pb ou 12pb dans le promoteur du gène est aussi observée et serait liée à la sensibilité des bovins à l'ESB (Haase B. et al., 2007). Ce polymorphisme du promoteur est associé au cas d'ESB classique et non aux nouveaux variants (Brunelle B. et al., 2007).

L'ESB, de manière naturelle, a aussi été transmise à divers espèces. Ainsi une encéphalopathie spongiforme avec ataxie et altération de l'état général a été constaté chez un oryx d'Arabie et un grand koudou (Kirkwood J. et al., 1990). Une chèvre est également identifiée en France en 2005 comme ayant un agent de signature similaire à l'ESB après inoculation à des souris (Eloit M. et al., 2005). En plus des ruminants, d'autres animaux sont concernés comme les carnivores et en particulier les félidés. La première observation remonte en 1990 sur un chat présentant de l'ataxie, des trémulations musculaires, des pupilles dilatées et des modifications comportementales (Leggett M. et al., 1990). Cinq autres chats ont ensuite été diagnostiqués. Ils présentaient une maladie neurologique progressive induisant des perturbations locomotrices, un comportement anormal et une altération de la réponse sensorielle. Au niveau lésionnel, on retrouve une vacuolisation étendue du neuropile de la substance grise ainsi que du péricaryon et une astrocytose réactionnelle (Wyatt J. et al., 1991). L'ESB a aussi été diagnostiquée chez des guépards ou des pumas vivant en captivité dans les zoos de Grande-Bretagne. L'origine serait probablement alimentaire et les premières d'atteinte captifs correspondent constatations d'animaux géographiquement temporairement avec l'essor de l'ESB (Kirkwood J. et Cunningham A., 1994).

Concernant la France, le 1^{er} cas d'ESB est constaté en février 1991 (Coles P., 1991). La France avait déjà pris en 1989, suivant le Royaume-Uni (RU), des mesures d'interdiction des FVO issues de Grande-Bretagne pour l'alimentation des bovins (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009). Malgré cette interdiction, des cas dits « NAIF » pour « Nés Après l'Interdiction des Farines »

sont constatés (Abrial D. et al., 2005). Pour garantir l'innocuité des farines pour bovins, en 1996 la France renforce donc sa réglementation avec l'utilisation de traitements thermiques adaptés et l'éviction de tissus à risques pour la fabrication des farines (Legifrance, 1996). Mais avec l'atteinte d'un bovin en 2001 né en 1997, on constate que les cas persistent sur des animaux nés après 1996 dits super-NAIF (Abrial D. et al., 2005). Finalement en 2000, la France interdit totalement les farines de viande et d'os et certaines graisses animales dans l'alimentation de tous les animaux d'élevage (ESBinfo (1), 2009).

Au total en France, 1006 bovins ont été confirmés positifs pour l'ESB jusqu'en 2008 ; depuis 2006, le seuil se situe sous la barre d'environ 10 cas par an (OIE $^{(1)}$, 2010).

3) Les autres encéphalopathies spongiformes transmissibles animales

L'encéphalopathie spongiforme du vison qui sévit occasionnellement dans les fermes d'élevage de visons est connue depuis 1947 principalement aux Etats-Unis. Elle est caractérisée par un temps d'incubation long, de 8 à 12 mois, et provoque une détérioration neuronale entraînant une débilitation puis la mort (Marsh R., 1972). G. Hartsough et D. Burger en 1965 étudient cette maladie et rapportent qu'elle serait probablement liée à des pratiques d'alimentation communes à base de viande ovine. Elle est transmissible expérimentalement au vison après un temps d'incubation long (Marsh R. et al., 1991). Les lésions sont aussi caractéristiques et communes aux encéphalopathies avec des microvacuolisations de la substance grise, une astrocytose et une dégénerescence neuronale (Marsh R., 1972).

R. Marsh et R. Hanson constatent une similitude dans les propriétés de l'agent responsable de l'encéphalopathie du vison et de la tremblante du mouton. Ces pathologies seraient peut être dues à un agent commun (Marsh R. et Hanson R., 1969). Par la suite, R. Hanson inocula expérimentalement des extraits cérébraux d'ovins contenant l'agent de la tremblante à des visons et obtint une maladie similaire sur les plans cliniques et histologiques à l'encéphalopathie spongiforme du vison (Hanson R. et al., 1971). Par contre une transmission par voie orale de l'agent de la tremblante aux visons n'a pu être établie. De plus, un cas d'encéphalopathie spongiforme du vison a été constaté avec une alimentation à base de viande bovine (Marsh R. et Bessen R., 1993). Plus récemment un lien a pu être établi entre un des variants de l'ESB, le variant L, et cette maladie des visons. L'alimentation des visons à base de viande issue de bovins affectés par le type-L serait probablement l'origine de l'encéphalopathie spongiforme du vison (Baron T. et al., 2007).

La maladie du dépérissement chronique des cervidés, connue depuis 1967, atteint les grands cervidés sauvages et de captivité des Etats-Unis et du Canada et plus particulièrement le cerf mulet et le wapiti (Williams E. et Young S., 1992). Plus récemment, la maladie a aussi été observée sur des élans et des caribous (Sigurdson C., 2008).

La transmission de cette pathologie s'effectue horizontalement entre cervidés par le biais de l'environnement (Sigurdson C., 2008).

La maladie se caractérise par une perte de poids, une altération du comportement, une salivation excessive avec une évolution en 2 semaines à 8 mois vers la mort. Les lésions sont confinées au système nerveux central (SNC) et consistent en des modifications spongieuses majeures du neuropile. De plus, des vacuoles intracytoplasmiques uniques ou multiples sont

présentes dans les neurones du péricaryon ainsi qu'une intense astrocytose (Williams E. et Young S., 1980).

Un polymorphisme du gène codant l'agent étiologique a aussi été mis en évidence : 4 mutations ségrégent avec la résistance des animaux à développer la maladie et une mutation sur le codon 135 est associée à la sensibilité pour développer la maladie (Kelly A. et al., 2008).

B) Les encéphalopathies spongiformes subaigües transmissibles humaines

1) Le kuru

V. Zigas et D. C. Gajdusek constatèrent l'existence de troubles nerveux d'évolution fatale dans la partie orientale de l'île de la Papouasie Nouvelle-Guinée, maladie sévissant depuis le début du siècle dernier d'après la tradition orale (Brown P. et Bradley R., 1998). Cette affection concerne la tribu Fore principalement ainsi que les tribus avoisinantes. La maladie concerne essentiellement les femmes et dans une moindre mesure les enfants sans distinctions de sexe. Les hommes semblent peu affectés. L'évolution est fatale en 6-9 mois (Gajdusek D. C. et Zigas V., 1959). Cette distinction, par la suite, sera corrélée au mode alimentaire de cette tribu et les rituels cannibalistes. En effet, les femmes surtout, consommaient les cerveaux humains (Brown P. et Bradley R., 1998).

Par des analyses neurohistologiques, V. Zigas et D. C. Gajdusek décrivent les lésions caractéristiques. Ils notent la présence d'une dégénérescence neuronale étendue ainsi qu'une dégénérescence myélinique. Ils rapportent également une astrogliose et une microgliose. Ces lésions sont présentes dans une plus grande majorité des cas au niveau du cervelet et du sytème extrapyramidal. De plus, ils notent la présence de plaques rappelant un corps anisotrope dans le cervelet et parfois dans le ganglion basal et/ou le cortex cérébral (Gajdusek D. C. et Zigas V., 1959).

En 1959, W. Hadlow rapproche cette maladie de la tremblante du mouton et de la chèvre de part la similitude des lésions histologiques cérébrales observables. En effet, dans les deux maladies, on retrouve la vacuolisation neuronale et la gliose (Hadlow W., 1959).

Par la suite, D. C. Gajdusek et son équipe réalisent des inoculations du kuru à deux singes et constatent ainsi la transmissibilité de la maladie avec un temps d'incubation de 23 mois pour un des singes et de 26 mois pour l'autre (Gajdusek D. C. et al., 1968).

2) La maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ)

Les premières descriptions remontent à un cas en 1920 par H. Creutzfeldt et par 5 cas en 1921 par A. Jakob (Goldhammer Y. et al., 1972). Ces encéphalopathies spongiformes subaiguës ont d'abord été reliées à un dysfonctionnement vasculaire (Jones D. et Nevin S., 1954) avant l'identification de l'agent étiologique protéinique. La pathologie prend alors le nom de maladie de Creutzfeldt-Jakob. La prévalence de la maladie est de 1,5 cas par millions d'habitants soit environ 110 cas par an en France (InVS, 2009).

Concernant la clinique, les patients rapportent, dans la phase initiale, une faiblesse générale, des maux de tête, des difficultés à la concentration et des perturbations

émotionnelles. Ensuite les signes de démence apparaissent : confusion, difficulté de langage conduisant au mutisme, accompagnés de mouvements involontaires et myoclonies. Dans les stades terminaux, le mutisme est complet, on constate des myoclonies et la mort survient en moins de 3 mois (Golghammer Y. et al., 1972). Il existe aussi une forme ataxique de la maladie, dite forme cérébelleuse (Jellinger K. et al., 1974).

En 1954, S. Nevin et D. Jones décrivent des anomalies de l'électroencéphalogramme (EEG) chez les patients atteints de MCJ. Il s'agit de décharges synchrones de haut voltage accompagnées ou non de tressaillement myoclonique de certaines parties du corps. Ces complexes polyphasiques se produisent à raison de un par seconde et dure de 0,2 à 0,5s. Ils peuvent avoir l'apparence d'une onde triphasique pointue ou bien un aspect plus sinusoïdal (Jones D. et Nevin S., 1954).

Des études approfondies révèlent deux profils distincts sur l'EEG en fonction de la localisation des lésions. Ainsi chez les patients où la substance blanche, le tronc cérébral et le lobe frontal sont atteints, on observera une onde lente de haut voltage, d'une durée de 0,7 à 0,8s, intermittente et transitoire. Lors d'atteinte des lobes occipitaux, on constate un complexe d'ondes en pic et lentes, stéréotypées, de 0,4 à 0,5s, persistantes et continues (Goto K., 1976).

Ces anomalies de l'EEG ne sont pas visibles dans les stades précoces et se constatent dans les stades terminaux de l'évolution de la maladie. Mais certains patients ne présentent aucune anomalie tout au long de l'évolution de la maladie (Malin J. et al., 1987). Cet outil de diagnostic n'est pas toujours fiable, mais il permet d'orienter le diagnostic.

Au niveau des lésions histologiques, des petites aires de spongiose sont constatées ainsi qu'un appauvrissement général des neurones corticaux en particulier dans les couches profondes. On note aussi une prolifération neurogliale (Jones D. et Nevin S., 1954). De plus, de nombreuses plaques positives à l'acide périodique de Schiff se retrouvent dans le cervelet d'un patient atteint de MCJ. La structure microscopique de ces plaques est identique à celle décrite dans le kuru laissant penser à un lien entre ces deux maladies (Chou S. et Martin D., 1971).

L'inoculation d'une biopsie cérébrale d'un patient atteint de MCJ à un chimpanzé conduit au développement d'une maladie similaire et d'évolution fatale, après un temps d'incubation de 13 mois (Gibbs C. Jr. et al., 1968). De même, l'inoculation intracérébrale de suspension de tissu nerveux de patients atteints de MCJ à des chèvres produit une maladie similaire à la tremblante chez ces dernières après un temps d'incubation long de 43 mois. W. Hadlow émet donc l'hypothèse d'une étiologie proche entre ces deux maladies (Hadlow W. (2) et al., 1980).

En parallèle à ces descriptions de cas de MCJ sporadiques, des cas familiaux de maladies neurologiques sont rapportés. L'étude d'une de ces familles révèle des observations neuropathologiques identiques aux encéphalopathies spongiformes. Dans cette famille le caractère héréditaire s'effectue selon un mode autosomal dominant (Rosenthal N. et al., 1976). De nombreuses mutations sont rapportées comme par exemple celle affectant le codon 178 dans une famille israélienne (Rosenamnn H. et al., 1998) ou bien encore celle concernant le codon 114 dans une famille chinoise (Ye J. et al., 2008). Ajouté à ces mutations du gène de la protéine prion, il existe un polymorphisme méthionine-valine du codon 129 (Goldfarb L. et al., 1992). Ces différentes mutations sont responsable des différents phénotypes observables dans les formes familiales et le polymorphisme du codon 129, quant à lui, influe sur la susceptibilité de développer une forme sporadique (Goldfarb L. et Brown P., 1995).

Des cas iatrogéniques de MCJ sont aussi constatés. Dans un premiers temps ce sont les greffes de cornées qui sont identifiées comme permettant cette transmission (DeVoe A., 1975), puis les hormones de croissance (Powell-Jackson J. et al., 1985), les greffes de dure

mère (Otto D., 1987), et aussi le matériel chirurgical même stérilisé et en particulier les électrodes des électroencéphalogrammes (Gibbs C. Jr. et al., 1994).

En résumé, 3 formes connues de la MCJ sont décrites. Une forme sporadique, la plus répandue, une forme iatrogénique et une forme génétique.

Un nouveau variant de la MCJ (vMCJ) est diagnostiqué en avril 1996. Dix patients présentaient un nouveau profil neuropathologique : ils avaient un jeune âge, une clinique différente de la MCJ et une absence d'anomalie à l'EEG (Will R. et al., 1996). Au niveau lésionnel, on observe une perte neuronale et des modifications spongieuses (Kapur N. et al., 2001). L'apparition de ce nouveau variant, déclenche une crise de la « vache folle » par suspicion d'un passage de l'ESB à l'homme (Will R. et al., 1996). L'analyse plus détaillée des caractéristiques de la souche par inoculation à des souris permet de confirmer cette hypothèse (Collinge J. et al., 1996; Bruce M. et al., 1997). Cette forme est transmissible par transfusion sanguine (Llewelyn C. et al., 2004). La prévalence de ce nouveau variant est faible et décline progressivement (Hilton D., 2006). A ce jour, 25 cas ont été diagnostiqués en France (InVS, 2009).

Concernant le traitement, il n'existe actuellement aucun traitement pour les MCJ sporadiques, iatrogènes ou pour le vMCJ. Quelques molécules ont été proposées dans le traitement des ESST et ont été testées sur des hamsters et souris inoculés avec l'agent supposé de la tremblante. Une des molécules est l'amphotéricine B, antibiotique de la famille des polyènes aux propriétés antifongiques. Plusieurs études révèlent qu'elle ralentit l'accumulation de PrPsc dans le cerveau et prolonge le temps d'incubation de la maladie (Xi Y.-G. et al., 1992). Un dérivé de cette molécule, le MS-8209, aurait les mêmes effets mais sa toxicité est moindre (Demaimay R. et al., 1994). A ce jour, le niveau de toxicité de l'amphotéricine B ou de ses analogues, n'autorise pas un traitement de longue durée qui permettrait de rallonger le temps de vie des patients atteints d'ESST. Une autre molécule est la quinacrine utilisée initialement contre la malaria. In vitro, elle empêche la conversion de l'agent issu de l'hôte en agent infectieux. Des essais sur patients humains volontaires ont été réalisés. La prise de quinacrine est bien tolérée par les patients mais elle ne semble pas affecter de manière significative l'évolution fatale de la maladie (Collinge J. et al., 2009).

3) Autres encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines

Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) est une maladie héréditaire rare à transmission sur le mode autosomal dominant (Schumm F. et al., 1981). La première description remonte en 1936 dans une famille australienne (Brown P., 1990). Selon le phénotype du patient, l'expression de la maladie sera différente (Schumm F. et al., 1981). En effet, selon la mutation mise en cause, on distingue plusieurs profils cliniques. Dans la plupart des familles atteintes, les symptômes se déclarent entre 33 et 50 ans (Schumm F. et al., 1981) et la durée d'évolution peut être variable de 1 à 10 ans (Hsiao K. et al., 1989). On note des symptômes cérébelleux avec myoclonie et des démences tardives mais aussi des symptômes bulbaires et pyramidaux typiques, des détériorations de la vision et de l'ouïe (Schumm F. et al, 1981) et de l'ataxie dans certaines familles (Hsiao K. et al., 1989). L'EEG révèle un progressif ralentissement général sans dysrythmie périodique (Schumm F. et al, 1981).

Au niveau lésionnel, on observe des dépôts en plaque composés de noyaux amyloïdes souvent multicentriques dans le cortex et la substance blanche subcorticale. On constate aussi une légère astrogliose et des changements spongieux (Schlote W. et al., 1980).

Cette maladie, lors de sa transmission à des singes, a des caractéristiques proches du kuru et de la MCJ, ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'un agent similaire et donc similaire à la tremblante du mouton (Schumm F. et al., 1981).

Du point de vue génétique, la mutation la plus fréquente concerne le codon 102 du gène de la protéine prion avec présence d'une leucine au lieu d'une proline (Hsiao K. et al., 1989). Mais d'autres mutations sont constatées comme par exemple le remplacement d'une alanine en valine sur le codon 117 sans modification du codon 102 (Doh-ura K. et al., 1989) ou bien le changement d'une proline en leucine sur le codon 105 (Kitamoto T. et al., 1993). On constate aussi un polymorphisme du codon 129 (Young K. et al., 1997). Finalement, d'autres remaniements du gène de la protéine prion correspondent à une insertion dans certaines familles atteintes de GSS. Ainsi, en 1992 est identifié un insert correspondant à 8 copies d'un octapeptide répété dans la protéine (Goldfarb L. (1), et al., 1992).

L'insomnie fatale familiale (IFF) a été constatée pour la première fois par R. Medori et son équipe en 1986. C'est une maladie héréditaire à transmission sur le mode autosomal dominant (Manetto V. et al., 1992). La mutation concerne le codon 178 du gène de la protéine prion avec changements d'une asparagine pour l'acide aspartique (Medori R. et al., 1992). Le polymorphisme du gène 129 ne semble pas moduler l'expression phénotypique de la IFF (Medori R. et Tritschler H., 1993). Cette mutation du codon 178 se constate également dans certaines familles atteintes de MCJ. L'expression clinique différente de ce phénotype serait en rapport avec le codon 129 et une conformation différente de la protéine responsable de la pathologie (Shamsir M. et Dalby R., 2005).

La maladie se déclare chez les individus âgés de 37 à 61 ans avec une évolution fatale en 7 à 25 mois. La clinique se caractérise par une insomnie progressive et des perturbations du système nerveux autonome provoquant de l'hyperthermie, de la tachycardie et de l'hypertension. On constate aussi des anomalies motrices avec de l'ataxie, des myoclonies et des dysfonctionnements pyramidaux (Manetto V. et al., 1992).

Au niveau lésionnel, on retrouve une atrophie sévère des noyaux thalamiques ventroantérieurs et dorso-médians, une gliose du cortex cérébral, une atrophie du cervelet et une atrophie majeure du noyau de l'olive inférieure (Manetto V. et al., 1992).

☐ <u>L'insomnie fatale sporadique</u> fut décrite la première fois en 1997 sur un patient âgé de 68 ans et dont l'évolution s'est effectuée en 53 mois vers la mort. Il avait une paralysie progressive similaire à un syndrome supranucléaire et une perturbation du système nerveux autonome. Dans les stades plus avancés de la maladie, on constate des myoclonies généralisées (Kawasaki K. et al., 1997).

Au niveau histologique, il y a une perte neuronale, une gliose avec spongiose du cortex cérébral, une sévère perte neuronale sans spongiose du thalamus et en particulier des noyaux thalamiques ventro-antérieurs et dorso-médians et du noyau de l'olive inférieure. Ces lésions ont orienté le diagnostic vers un cas sporadique d'insomnie fatale plutôt qu'un cas de MCJ (Kawasaki K. et al., 1997).

Par la suite d'autres cas de cette maladie sont identifiés.

 Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes ESST animales et humaines

Maladie	Hôte naturel	Origine
Tremblante du mouton	Ovins et caprins	1 ^{ère} observation en 1755
et de la chèvre	_	Origine inconnue avec influence d'un
		polymorphisme génétique
ESB	Bovins, caprins	1 ^{ère} observation en 1985
	(divers ruminants et	Ingestion de farines de viande et d'os
	carnivores en	contaminées
	captivité)	Origine sporadique pour les variants L et H et
		avec un seul cas d'origine génétique pour le
		variant H
Encéphalopathie	Visons	1 ^{ère} observation en 1947
spongiforme du vison		Ingestion d'aliments contaminés par des tissus
		de ruminants
Maladie du	Cervidés dont les	1 ^{ère} observation en 1967
dépérissement	cerfs mulets et les	Origine inconnue
chronique des cervidés	wapitis	
Kuru	Humains	1 ^{ère} observation en 1959
		Ingestion de tissus contaminés due au
		cannibalisme
MCJ sporadique	Humains	1 ^{ère} observation en 1920
		Origine inconnue
MCJ familiale	Humains	Héréditaire, lié à diverses mutation du gène
		de la protéine prion
MCJ iatrogène	Humains	1 ^{ère} observation en 1975
		Lié à des greffes de cornées, de dure mère,
		aux hormones de croissance, au matériel
		chirurgical
vMCJ	Humains	1 ^{ère} observation en 1996
		Consommation de viandes contaminées par
		l'ESB et par transfusion sanguine
GSS	Humains	1 ^{ère} observation en 1936
		Héréditaire, lié à diverses mutation du gène
		de la protéine prion
IFF	Humains	1 ^{ère} observation en 1986
		Héréditaire, lié à une mutation du gène de la
		protéine prion su le codon 178
Insomnie familiale	Humains	1 ^{ère} observation en 1997
sporadique		Origine inconnue

Avant 1982 et la découverte de la nature probable de l'agent infectieux les encéphalopathies humaines et animales alors connues étaient apparentées de part :

- l'existence commune, au niveau clinique, de trouble nerveux avec possibilité de transmission de la maladie,
 - la similitude des lésions histologiques observées sur les coupes d'encéphale,
- les propriétés physico-chimiques des agents responsables, divergentes de celles connues pour les microorganismes classiques. En effet, une étude comparant l'action de rayonnements γ et UV sur l'agent de la tremblante, du kuru et du MCJ montre une résistance similaire de ces agents les différenciant ainsi des virus classiques (Gibbs C. Jr. et al, 1978).

Grâce à ces caractéristiques communes, les propriétés de l'agent infectieux ont pu être établies et orienter les chercheurs sur la nature probable de cet agent particulier.

II – L'agent étiologique de ces encéphalopathies

A) L'agent infectieux des encephalopathies spongiformes subaigues transmissibles

1) Propriétés

□ L'agent infectieux des ESST possède une grande résistance aux agents physiques ou chimiques de décontamination classique à l'inverse des pathogènes habituels (bactéries, virus, champignons). Ainsi, les traitements thermiques en chaleur sèche n'aboutissent pas à une décontamination totale. Il faut avoir recours à l'autoclave et avec un traitement intensif pour perdre complétement l'infectiosité (Taylor D., 1991) qui reste faiblement conservée après un traitement poussé de 60 min à 134-138°C (Taylor D. et al., 1994). De plus ce procédé peut être compromis par un traitement chimique préalable (Taylor D., 1991). Par exemple, un traitement avec des formaldéhydes avant le passage à l'autoclave fixe l'infectiosité (Brown P. et al., 1990). L'OMS préconise un traitement de 18 minutes à 134-138°C, traitement permettant le mieux de diminuer l'infectiosité de cet agent pathologique (OIE, 2002).

Concernant les méthodes chimiques, seuls des traitements drastiques sont efficaces avec le recours à des concentrations élevées d'hydroxyde de sodium ou d'hypochlorite de sodium (Taylor D., 1991). En effet, même à des concentrations de 1M ou 2M pendant 120 min, l'agent infectieux reste présent en faible quantité. Ce traitement, néanmoins le plus efficace, est donc préconisé par l'OMS (OIE, 2002). Par contre si le taux en chlore est élevé (plus de 16,500 ppm) après une exposition de l'agent infectieux pendant 60min l'infectiosité est détruite (Taylor D. et al., 1994).

La solution la plus efficace actuellement pour détruire l'agent des encéphalopathies spongiformes subaigues transmissibles est l'association de deux procédés. Ainsi, en milieu alcalin, 1 min d'autoclave à 100°C suffit. De même, après un traitement acide, une exposition pendant 2 heures à de l'hydroxyde de sodium à 0,3M permet l'inactivation de l'agent (Taylor D., 2002). Finalement, l'association de l'autoclave pendant 30 min à 120°C avec un traitement à l'hydroxyde de sodium à 2M permet également une perte de l'infectiosité (Taylor D. et al., 1997).

De nouvelles méthodes ont aussi été mises au point pour désinfecter le matériel médical sensible aux procédures précédentes. En effet, l'agent pathogène peut être présent au niveau du matériel chirurgical, principalement suite à une neurochirurgie (Zobeley E. et al., 1999). Ainsi, grâce à un désinfectant phénolique, un nettoyant alcalin ou une combinaison de nettoyant enzymatique et de peroxyde d'hydrogène vaporisé, on peut désinfecter le matériel médical et limiter les transmissions iatrogènes au cours des chirurgies (Fichet G. et al., 2004).

☐ La résistance dans l'environnement est souvent évoquée en raison de l'existence de prairies contaminées depuis de nombreuses années pour le cas de la tremblante du mouton. P. Brown et D. C. Gajdusek, par enfouissement de l'agent de la tremblante dans le sol dans des pots emplis de terre pendant 3 ans, ont montré que l'infectiosité était conservée (Brown P. et Gajdusek D. C., 1991).

☐ L'infectiosité varie en fonction des tissus considérés et de l'espèce considérée. Cette infectiosité est évaluée par transmission aux modèles animaux, principalement la souris et le hamster. Pour l'ensemble des espèces, le tissu possédant la plus grande infectiosité est l'encéphale.

2) Pouvoir pathogène

a) Sources de l'agent infectieux

La source peut être externe ou interne à l'hôte. S. Prusiner et son équipe confirme cette idée : des souris, en absence d'inoculum, mais possédant une mutation similaire à celle conduisant au GSS développent spontanément des dysfonctionnements neurologiques, avec dégénération spongiforme, gliose et astrocytose (Hsiao K. et al., 1991).

On identifie donc trois origines possibles des ESST :

- interne induite par la mutation du gène PrP et qui a un caractère héréditaire comme dans les IFF, les MCJ familiales et le GSS.
- interne par modification spontanée de la protéine et ne prenant pas un caractère héréditaire comme dans les cas de MCJ sporadique et d'insomnie fatale sporadique.
- externe, issue des matériaux à risque contenant l'agent infectieux introduit par diverses voies de contamination dont la voie alimentaire comme la maladie de Kuru, le vMCJ ou l'ESB.

b) Notion de souches

L'existence de différentes souches a été reconnue en 1961 par I. Pattison et G. Millson. Ils constataient ainsi deux formes cliniques de tremblante chez les chèvres : une forme apathique et une forme prurigineuse agitée (Pattison I. et Millson G., 1961).

Par la suite, avec la découverte de la nature protéique de l'agent pathogène, de nouveaux critères ont permis de caractériser ces souches. Ainsi, ces dernières ont été caractérisées par leurs différences concernant le temps d'incubation (Bruce M., 2003), la distribution des dépôts de l'agent pathogène et des lésions de vacuolisation dans le cerveau

(Bruce M. et al., 1991) et les symptômes cliniques (Pattison I. et Millson G., 1961). Elles se distinguent aussi par leurs paramètres biochimiques tels que le pourcentage des différents types des glycosylations qui existent au niveau de la protéine responsable (Kuczius T. et al., 1998) et la taille de la molécule de l'agent pathogène résistant à la digestion par la protéinase K (Howells L. et al., 2008).

c) Barrière d'espèce

L'agent infectieux issu de souris peut infecter d'autres souris. Mais lors d'inoculation d'hamsters avec un inoculum issu de souris atteintes de tremblante, il ne se produit une apparition de l'agent pathogène qu'en très faible quantité (Kocisko D. et al., 1995). Il existe donc bien une barrière d'espèce. Mais cette dernière peut être franchie dans certaines circonstances. En effet, elle dépend non seulement de l'espèce mais aussi de la souche. Pour certaines souches et pour des espèces définies, la barrière d'espèce est inexistante. Entre l'ESB chez le bovin et le vMCJ chez l'homme qui présente un profil similaire avec la présence de « plaques de floride » lors d'inoculation à des macaques, la barrière d'espèce est forte (Lasmézas C. et al., 1996).

De même naturellement, la souche bovine a été transmise à d'autres espèces. Ainsi des cas ont été constatés chez l'oryx d'Arabie et le grand koudou de parcs zoologiques en Grande-Bretagne et chez bien d'autres espèces. Les profils lésionnels de ces individus après inoculation à des souris sont similaires à ceux obtenus chez des souris inoculées avec l'agent de l'ESB (Kirkwood J. et al., 1990).

Le franchissement de la barrière dépend de la voie d'inoculation, de l'infectiosité de l'inoculum et de la nature du donneur et du récepteur. Certains passages d'espèce sont possibles, d'autres difficiles, voire impossibles. Ceci s'expliquerait par une homologie de l'agent pathogène, qui suite à la découverte de la protéine prion correspondrait au tiers moyen de la séquence en acides aminés de la protéine, séquence primordiale à la formation de la forme pathogène. Le polymorphisme de cette région est corrélé à la résistance des hamsters et de certaines chèvres à la tremblante et à l'ESB (Priola S., 1999). Mais la barrière d'espèce reste imprévisible et dépend considérablement de l'agent et de la souche.

Expérimentalement, la souris a pu être infectée par la tremblante et l'ESB par inoculation intracérébrale et orale ainsi que le mouton et la chèvre (Cuillé J. et Chelle P.-L., 1939). Les porcs sont sensibles par voie parentérale mais résistant à l'ESB par voie orale. De même, les volailles ne sont ni sensibles par voie orale ni par voie parentérale (Matthews D. et Cooke B., 2003).

Ainsi, l'espèce animale, le génotype de l'hôte, la voie d'inoculation, l'inoculum influent sur la transmission de la maladie et sur la durée d'incubation.

B) La découverte de la protéine prion

La probable absence d'ADN ou ARN (Alper T. et al., 1967) et la petite taille de l'agent, inférieure à 100nm, (Hunter G. et Millson G., 1964) diminue la véracité de l'hypothèse d'un agent conventionnel tel un virus. Parallèlement, se développent des suspicions concernant la nature protéique de l'agent pathogène (Gibbons R. et Hunter G., 1967).

S. Prusiner et son équipe, par des travaux de sédimentation à partir de rate de souris infectées par de la tremblante, constatent que l'agent responsable de la maladie a un comportement de sédimentation indépendant de celui des membranes cellulaires. De plus, cet agent n'est pas affecté par les détergents détruisant les membranes. Et finalement, l'infectiosité est diminuée par traitement au sodium dodécyl sulfate (SDS) qui dénature les protéines (Prusiner S. et al., 1977). Dans une autre étude, ils notent aussi que l'agent de la tremblante est résistant à l'inactivation par les nucléases et les protéases (Prusiner S. et al., 1980). Ces études sont aussi en faveur d'une nature protéique de l'agent.

Explorant cette hypothèse d'une protéine infectieuse, S. Prusiner et son équipe identifient en 1981 la particule infectante comme étant une protéine hydrophobe (Prusiner S. et al., 1981). En 1982, S. Prusiner baptise l'agent de la tremblante, qui diffère des virus, des plasmides et des viroïdes, sous le nom de prion pour « proteinaceous infectious particle » (Prusiner S., 1982). Le prion serait formé d'une unique protéine dite PrP (McKinley M et al., 1983).

A cela s'ajoute l'observation d'une protéine résistante à la digestion à la protéinase K et d'une masse moléculaire apparente de 27 à 30kDa chez des hamsters atteints de tremblante et non chez les hamsters sains (Bolton D. et al., 1982). Le prion responsable de la tremblante contient donc une protéine appelée PrP 27-30 (Bolton D. et al., 1984) et c'est une sialoglycoprotéine (Bolton D. et al., 1985). Elle est aussi dite PrPres lorsqu'il s'agit de la forme résistante partiellement à la protéinase K. Cette protéine est en fait le résultat de la digestion à la protéinase K d'une protéine plus volumineuse d'une masse moléculaire de 33-35kd (Bolton D. et al., 1987). La protéine complète s'appelle PrPsc pour scrapie.

Parallèlement à ces travaux, il a été découvert, dans les tissus et cerveaux d'individus sains, la présence d'un ARNm PrP qui aboutit à une protéine prion complètement dégradée par la protéinase K (Chesebro B. et al., 1985). Elle est appelée PrPsens pour sensible à la protéinase K ou PrPc pour cellulaire.

A cette hypothèse d'une protéine comme agent responsable des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles s'oppose l'hypothèse d'un petit virus ou virino. Mais aucune des hypothèses n'expliquent actuellement la totalité des résultats scientifiques.

En faveur de la protéine prion, comme nous l'avons déjà dit, l'agent responsable ne contient probablement pas d'ADN ou alors un brin très court qui ne permettrait pas de coder une protéine (Alper T., 1993). De plus, la présence de PrPsens chez tous les individus favorise cette hypothèse. Par contre cette dernière n'explique pas les différentes souches existantes pour la tremblante par exemple (Schreuder B., 1993).

A l'inverse l'hypothèse d'un acide nucléique au sein d'un micro-organisme tel un virino ou un virus explique l'existence de souches variées (Schreuder B., 1993). On suppose alors que les « scrapie associated fibrils » sont des éléments ultrastructuraux de ce virus et que la PrPsc est un marqueur protéique de la présence du virus. Ce virus est dénommé Nemavirus (Narang H., 1996).

C) La PrPsens

1) Structure

a) Le gène de la PrPsens

En 1985, C. Weissmann et son équipe localisent le gène codant cette protéine PrP 27-30 (Oesch B. et al., 1985) et montrent que les deux isoformes, PrPsens et PrPsc, ont la même séquence primaire issue du même gène. Les propriétés différentes de la forme normale et de celle responsable de la tremblante proviendraient probablement d'évènements post-transcriptionnels (Basler K. et al., 1986).

Le gène humain de la PrP, dit *PRNP* (Figure 2), se localise sur le bras court du chromosome 20. Chez la souris, il se nomme *Prn-p* et se situe sur le chromosome 2 (Sparkes R. et al., 1986). Le *PRNP* correspond à 2 exons séparés par un intron de 13kb. L'exon 1 fait environ 136bp et l'exon 2, 9,4kb (Puckett C. et al., 1991). Chez le hamster, on retrouve la même construction du gène, avec deux exons séparés par un intron de 10kb. Seul l'exon 2 possède un cadre ouvert de lecture aboutissant à un ARNm de 2,1kb codant la protéine prion (Turk E. et al., 1988). Chez la souris, la séquence complète de l'ARNm comprend 2151 nucléotides dont 762 codant la protéine prion (Locht C. et al., 1986).

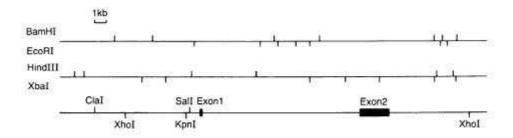


Figure 2 : Carte des sites de restriction du gène *PRNP* humain avec représentation des deux exons composant le *PRNP*

(d'après Puckett C. et al., 1991).

Des études d'hybridation génomique révèlent une séquence très conservée du gène chez les mammifères, voire même chez tous les organismes possédant un système nerveux (Westaway D. et Prusiner S., 1986). Ceci laisse supposer un rôle majeur de la PrPsens.

b) La structure primaire

La protéine prion chez la souris comprend 254 acides aminés (aa) (Locht C. et al., 1986), 256 aa chez les ovins (Goldmann W. et al., 1990) et 256 ou 264 aa chez les bovins en fonction du nombre d'octapeptides répétés (Prusiner S. ⁽¹⁾ et al., 1993).

Elle possède un glycolipide phosphatidylinositol qui permet à la PrPsens d'être ancrée à la surface des membranes cellulaires en région C-terminale (Stahl N. et al., 1987).

En région N-terminale, chez les mammifères, on retrouve 5 répétitions d'un octapeptide dont la séquence des acides aminés est la suivante : PHGGGWGQ (Pro-His-Gly-

Gly-Gly-Trp-Gly-Gln) (Hornemann S. et al., 1997), excepté chez les bovins qui peuvent posséder 5 ou 6 octapeptides répétés (Prusiner S. (1) et al., 1993).

La protéine prion possède deux sites de glycosylation sur des asparagines. Les glycosylations peuvent être de plusieurs structures : des chaînes de sucres complexes ou oligosaccharides possédant deux, trois ou quatre ramifications (Endo T. et al., 1989). Les sites de glycosylation correspondent aux asparagines 181 et 197 (James T. et al., 1997). La protéine prion peut être ainsi sous forme diglycosylée, monoglycosylée et non glycosylée.

c) La structure secondaire

La structure secondaire de cette protéine a pu être analysée par des transformations de Fourier sur spectroscopie infrarouge et par mesure du dichroïsme circulaire. Ainsi K.-M. Pan observe la présence majoritaire d'hélices α (42%) par rapport aux feuillets β (3%) (Pan K.-M. et al., 1993).

Ces résultats correspondent à la formation de 3 hélices α appelées H1 (144-154), H2 (179-191) et H3 (200-217) et de deux courts feuillets β dits S1 (128-131) et S2 (161-164) dont les acides aminés entre parenthèses correspondent à la PrP murine (James T. et al., 1997).

On observe aussi la présence d'un pont disulfure intramoléculaire stabilisant cette structure secondaire, situé au niveau des cystéines 179 et 214 (Turk E. et al., 1988).

d) La structure tertiaire

La structure spatiale de la protéine s'agence en 2 domaines (Figure 3) :

- des acides aminés 121 à 231 (chez la souris), les analyses par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire révèlant la présence des 3 hélices α et des 2 feuillets β antiparallèles (Riek R. et al., 1996). Ce domaine constituerait un noyau stable (James T. et al., 1997).
- des acides aminés 23 à 120 (région N-terminale), les analyses présentant un comportement similaire aux domaines flexibles des chaînes polypeptidiques (Riek R. et al., 1997). En effet, la présence du feuillet β adjacent à un domaine hydrophobe (des aa 113 à 125) autorise une certaine dynamique à la structure. Il y aurait ainsi une hétérogénéité de conformation de la région N-terminale qui subirait des modifications lors du passage de la PrPsens à la PrPres (James T. et al., 1997).

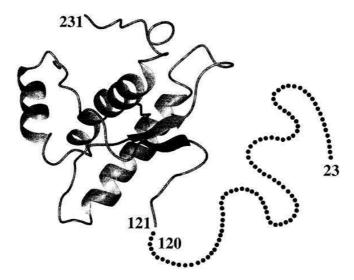


Figure 3 : Structure tertiaire de la PrP obtenue par spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire chez la souris

(d'après Riek R. et al., 1997).

La séquence des acides aminés 23 à 120 est représentée en pointillée de part sa flexibilité et donc sa conformation très variable dont ce schéma n'est qu'une possibilité

C'est une altération de la conformation tridimensionnelle et principalement du secteur correspondant aux acides aminés 121 à 231 chez la souris qui aboutit à la forme pathogène : la PrPsc (Peretz D. et al., 1997).

2) Propriétés

La PrPsens, comme la majorité des protéines, est sensible à la digestion par les protéases, dont la protéinase K et la trypsine, et par les phospholipases telles que la phosphatidylinositol-spécifique phospholipase C (Caughey B. et al., 1990).

Elle est aussi soluble dans les détergents, est peu auto-agrégable et n'a donc pas tendance à polymériser (Meyer R. et al., 1986).

3) Biologie cellulaire et localisation

a) Biologie cellulaire

La PrPsens est transcrite au niveau du réticulum endoplasmique granuleux. C'est dans ce dernier qu'elle subit le clivage du peptide signal dans la région N-terminale, mais aussi un clivage au niveau C-terminal avant l'addition du glycolipide phosphatidylinositol. Pendant le passage à l'appareil de Golgi, les glycosylations se réalisent grâce à des complexes ou des hybrides de glycanes. Ensuite la protéine se fixe par le glycolipide phosphatidylinositol à la membrane cellulaire avec une orientation extracytoplasmique (Figure 4). Le temps de demivie de la protéine est alors de 3 à 6 heures (Caughey B. et al., 1989).

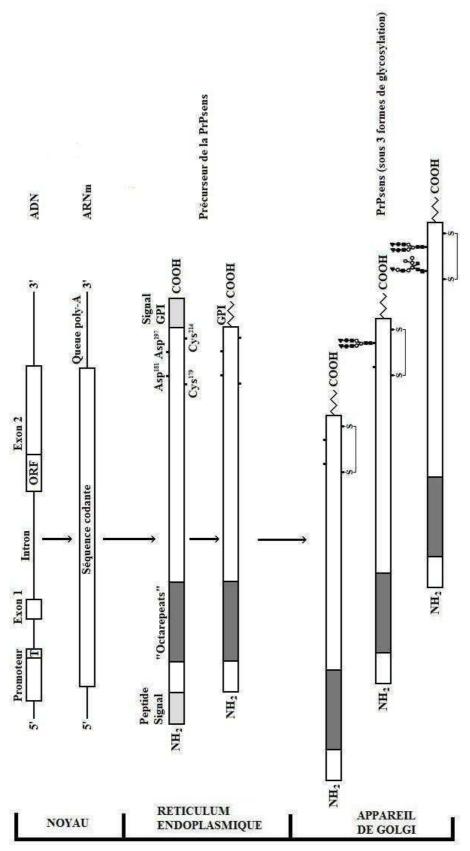


Figure 4 : Synthèse de la PrPsens (d'après Caughey B. et al., 1989).

Pour l'ADN : T = TATA box ; ORF = cadre ouvert de lecture Pour le précurseur de la PrPsens : Asp = asparagine ; Cys = cystéine ; GPI = glycolipide posphatidylinositol La PrPsens réalise ensuite des cycles consécutifs d'environ une heure entre la membrane plasmatique et des vésicules endosomiques (Figure 5). 95% des protéines réinternalisées sont recyclées intactes à la surface membranaire et 5% sont protéolysées soit dans les lysosomes ou des endosomes acides, soit à la surface cellulaire (Shyng S.-L. et al., 1993).

Les cycles, et surtout la phase d'internalisation de la PrPsens, sont permis grâce à un mécanisme clathrines dépendant. En effet, les clathrines sont des protéines organisées en fosses dans lesquelles sont situées des récepteurs transferrines auxquels se lie la PrPsens (Shyng S.-L. et al., 1994).

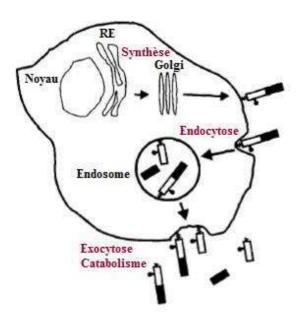


Figure 5: Cycle cellulaire de la PrPsens (d'après Shyng S.-L. et al., 1993) RE = réticulum endoplasmique

b) Localisation anatomique

La localisation anatomique de la PrPsens, par l'intermédiaire de la localisation de l'ARNm, révèle une présence majoritaire au niveau du système nerveux central (SNC). Au sein de celui-ci, on la retrouve principalement dans les neurones du néocortex, du gyrus denté de l'hippocampe, de la corne d'Ammon de l'hippocampe, du thalamus, du ganglion basal, du tronc cérébral et des bulbes olfactifs. Plus minoritairement, elle se retrouve dans les cellules de Purkinje du cervelet (Kretzschmar H. et al., 1986).

L'ARNm est aussi observé au niveau du placenta dans une subpopulation de cellules déciduales et dans les couches amniotiques et mésodermiques de la vitelline. Par contre, aucune structure fœtale n'a de PrPsens. On retrouve également la protéine dans les tissus musculaires utérins et dans les tubes séminifères des testicules (Tanji K. et al., 1995).

La PrPsens est également identifiée par des techniques immunologiques au niveau des reins, des poumons, des cellules épithéliales des muqueuses stomacales et intestinales (Fournier J. et al., 1998) ainsi qu'à la jonction neuromusculaire dans le sarcoplasme présynaptique (Gohel C. et al., 1999). La PrPsens est aussi présente sur les membranes cellulaires

des splénocytes et des lymphocytes sanguins (Mabbott N. et al., 1997), dans la rate, le cœur, les glandes surrénales, la parotide, les nœuds lymphatiques et les glandes mammaires (Horiuchi M. et al., 1995).

La PrPsens est donc une protéine ubiquitaire présente dans de nombreux tissus, mais elle demeure prépondérante dans les tissus nerveux.

4) Fonction biologique

De nombreuses études ont été réalisées pour identifier le rôle de cette protéine. Bien que celui-ci reste encore actuellement indéterminé, de nombreuses pistes ont été élaborées. La PrPsens pourrait jouer divers rôles :

- dans la protection neuronale. L'expression de la PrPsens aurait une action régulatrice sur la superoxyde dismutase zinc-cuivre en agissant sur l'incorporation du cuivre au sein de cette enzyme et aiderait ainsi la cellule à réagir au stress oxydatif (Brown D. et Besinger A., 1998).
- dans le métabolisme du cuivre et d'autres métaux. Les octapeptides répétés de la région N-terminale de la protéine fixent les ions cuivre bivalent (Cu²⁺). Cette fixation se fait sur un mode stœchiométrique : un Cu²⁺ pour un octapeptide. Un modèle propose que le fixation est permise grâce à l'azote de l'histidine et aux deux azote des glycines (Aronoff-Spencer E. et al., 2000). En effet, une étude sur cultures de cellules cérébrales en présence de cuivre radioactif a démontré que la prise de cuivre est histidine dépendante et est corrélée au niveau d'expression de la PrPsens (Brown D., 1999). Il y aurait également deux sites de fixation en région C-terminale. La protéine pourrait fixer d'autres cations bivalents avec des affinités différentes : Cu²⁺ >> Ni²⁺ > Zn²⁺ >> Mn²⁺ (Jackson G. et al., 2001).

Le rôle de la PrPsens serait déterminant au niveau des synapses pour permettre la transmission du cuivre (Brown D., 1999).

- dans la transduction de signal. La PrPsens pourrait être une protéine de transduction de signal (Mouillet-Richard S. et al., 2000). Il y aurait ainsi des interactions entre la PrPsens et le métabolisme des sphingolipides par action sur l'activité de la shingomyélinase. Ceci relierait la PrPsens aux voies de signalement et de modulation associées à ces lipides, ces voies exerçant une fonction antiapoptose (Schmalzbauer R. et al., 2008).
- dans la fonction immunitaire. En effet, des souris KO (sans gène de la PrP) possède une capacité de réponse des splénocytes face à un agent mitogène diminuée par rapport à des souris de type sauvage (Mabbott N. et al., 1997).
- dans la neurogenèse et la différenciation neuronale chez les adultes. Le taux de PrPsens est corrélé à la différenciation de précurseurs neuronaux multipotents en neurones matures in vitro. In vivo, elle augmente également la prolifération cellulaire dans les bulbes olfactifs et les gyrus dentés. Mais le nombre final de neurones produits dans les gyrus dentés est inchangé par l'expression de la PrPsens. D'autres facteurs doivent contrôler la production de nouveaux neurones (Steele A. et al., 2006).
- dans le renouvellement des cellules hématopoïétiques. En effet, des analyses cytométriques ont montré que la PrPsens s'exprime à la surface de plusieurs

populations de cellules de la moelle osseuse. Sur le long terme, il y a alors un enrichissement en cellules hématopoïétiques souches. La PrPsens semble être le support de leur auto-renouvellement (Zhang C. et al., 2006).

Malgré l'implication de la PrPsens dans ces diverses fonctions cellulaires et métaboliques, son importance au sein de ces fonctions ne semble pas être majeure et de nombreux autres facteurs doivent intervenir dans la réalisation de ces fonctions.

En effet, des souris KO, délétées du gène Prn-p, ont un développement et un comportement normaux après plusieurs mois d'observation. Elles n'ont également pas de déficit immunologique apparent (Büeler H. et al., 1992).

D) La PrPsc

1) Structure

La structure primaire de la molécule est identique à la PrPsens avec le même enchainement en acides aminés (Turk E. et al., 1988). Par contre la structure secondaire est modifiée avec une augmentation de la proportion en feuillets β (de 3% à 54%) au détriment des hélices α (de 42% à 21%) (Pan K.-M. et al., 1993).

Ce changement induit une modification de la structure tertiaire et la protéine prend une conformation différente dans l'espace. L'altération de la conformation affecterait en particulier la partie N-terminale de la protéine (Peretz D. et al., 1997).

2) Propriétés

☐ A l'inverse de la PrPsens, la PrPsc n'est que partiellement sensible aux protéases telles que la protéinase K et la trypsine, ainsi qu'aux phospholipases dont la phosphatidylinositol-spécifique phospholipase C (Caughey B. et al., 1990). La protéolyse affecte seulement la partie N-terminale aboutissant à la forme tronquée de la PrPsc, la PrP27-30 ou PrPres (Borchelt D. et al., 1990).

□ La PrPsc, contrairement à la PrPsens, est insoluble dans les détergents. En effet, mis en présence de ceux-ci, elle s'agrège sous forme de fibrilles de type amyloïde (Meyer R. et al., 1986). Cette structure, détectée initialement à partir de prélèvements d'encéphales d'ovins, a été nommé SAF pour « scrapie-associated fibrils » (Merz P. et al., 1981). Elle se retrouve également chez les bovins lorsqu'un prélèvement d'encéphale est placé en présence de détergents (Hope J. et al., 1988).

3) Biologie cellulaire, distribution et transmission de la PrPsc

a) Biologie cellulaire

La PrPsc, contrairement à la PrPsens, est synthétisée et maturée lentement. Son turnover est de plus de 15h contre environ 5 pour la PrPsens. De plus, la PrPsc est retrouvée majoritairement au sein de la cellule et non à sa surface (Borchelt D. et al., 1990).

b) Pathogénie et distribution tissulaire de la PrPsc

La PrPsc est retrouvée dans divers tissus avec une apparition plus ou moins précoce dans ceux-ci en fonction du stade de la maladie et de la voie d'entrée. L'atteinte finale du système nerveux central s'effectue par diverses voies selon la voie d'entrée, l'espèce concernée et la souche de l'agent infectieux.

Chez les bovins, lors d'infection orale, on note la présence de PrPsc au niveau de l'iléon distal dans les structures associées au systéme lymphoïde (plaque de Peyer). Par contre, la PrPsc n'est pas détectée dans les nœuds lymphatiques correspondant à cette portion de tube digestif mais elle est retrouvée dans les neurones du plexus myentérique de l'iléon distal (Terry L. et al., 2003). La propagation du prion s'effectuerait donc de l'intestin vers le système nerveux central par voie nerveuse. Ainsi, chez les bovins, par une technique de Western Blot hautement sensible sur des vaches inoculées par voie orale avec l'agent de l'ESB, on a pu détecter la PrPsc dans le système nerveux périphérique pendant le développement de la maladie (Masujin K. et al., 2007).

Lors d'inoculation par voie orale de l'ESB à des souris, on ne retrouve pas de PrPsc dans le thymus. De même, le foie, les glandes surrénales, l'omentum, la moelle osseuse et les formations lymphoïdes palatines qui contiennent de la PrPsens ne semblent pas développer la forme PrPsc (Maignien T. et al., 1999). Egalement, à ce jour, aucune trace de PrPsc n'a été détectée dans le lait de vaches inoculées (Everest S. et al., 2007).

Chez les ovins, la PrPsc est présente en premier lieu dans les intestins et les nœuds lymphatiques associés (Hadlow W. et al., 1982). En effet, elle possède un lymphotropisme plus marqué qu'avec l'ESB chez les bovins (Aguzzi A. et al., 2004). On observe d'ailleurs une multiplication primaire de l'agent au niveau de la rate et des nœuds lymphatiques avant sa neuroinvasion. Cette dernière s'effectue comme pour les bovins par voie nerveuse, mais aussi par voie lymphatique (van Keulen L. et al., 2002). Du fait de ce lymphotropisme et de la neuroinvasion par voie lymphatique, on constate, chez les ovins, une très faible quantité de la PrPsc dans le sang dans le stade clinique et préclinique de la maladie (Hunter N. et al., 2002). A la différence des bovins, on retrouve également de la PrPsc dans le placenta (Onodera T. et al., 1993) et dans les amygdales (Hadlow W. et al., 1982). Ce schéma pathogénique est aussi constaté lors d'inoculation de tremblante par voie orale à des souris. On observe alors une atteinte du tractus intestinal dans son ensemble et des formations lymphoïdes associées. L'accumulation de PrPsc s'effectue dans les structures lymphoïdes associées au tube digestif (plaques de Peyer) avant de se disséminer aux autres structures lymphoïdes et au système nerveux central (Maignien T. et al., 1999).

c) Rôle pathogène

La présence de PrPsc, issue d'une protéine du soi la PrPsens, n'induit pas de réaction inflammatoire ou immunitaire de l'organisme (Porter D. et al., 1973).

L'accumulation de PrPsc n'aurait pas une action toxique directe comme le révèle les expériences de B. Chesebro, et l'ancre glypiée est nécessaire au pouvoir pathogène (Chesebro B. et al., 2005). L'autophagie aurait aussi un rôle dans les ESST et pourrait participer à la formation des modifications spongieuses. Ainsi, D. Theil constate une association entre le degré de défragmentation cellulaire de l'ADN et l'accumulation anormale de la PrPsc. Mais on ne peut conclure que l'apoptose seule jouerait un rôle dans la perte neuronale dans l'ESB (Theil D. et al., 1999).

D'autres mécanismes sont donc envisagés pour expliquer la perte neuronale et la spongiose. Ainsi on suppose que la PrPsens perdrait ses fonctions anti-oxydantes lors de stress cellulaire dans les cas pathologiques, et qu'au contraire la PrPsc aurait la capacité d'augmenter ce stress oxydatif (Onodera T. et al., 2006). Une autre hypothèse serait que la mort neuronale résulterait du segment 106-126 de la PrPsc qui induirait l'apoptose cellulaire (Forloni G. et al., 1993). Ce segment aurait en effet une activité toxique (Henriques S. et al., 2008).

Le mécanisme exact reste encore actuellement inconnu et correspondrait peut être à une association de ces différents phénomènes concourant à la mort neuronale.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différences majeures entre la PrPsens et la PrPres

	PrPsens	PrPsc					
Biologie cellulaire	• Localisation sur les membranes	Localisation dans le cytoplasme					
	cellulaires	cellulaire					
	• Synthèse rapide et temps de	• Synthèse lente et temps de demi-					
	demi-vie court	vie long					
Propriétés	• Soluble	Hydrophobe					
	• Détruite par les détergents et peu	• Résistante aux détergents et					
	auto-agrégable	s'aggrége en fibrilles dans ceux-ci					
	• Digestion complète par les • Digestion partielle par						
	protéases protéases						
	Destruction facile	• Résistance aux agents physico-					
		chimiques classiques					
Conformation	• Conformation spatiale avec	• Conformation avec beaucoup de					
	beaucoup d'hélices α et très peu de	t très peu de feuillets β plissés.					
	feuillets β plissés						

4) Conversion de la PrPsens en PrPsc

a) La conversion, un phénomène auto-catalytique

La conversion de la PrPsens en PrPsc est un processus post-traductionnel qui altère la conformation de la protéine (Caughey B. et Raymond G., 1991). La souche de l'inoculum induit la protéine prion formée de novo. La synthèse du prion passe par des interactions entre la PrPres de l'inoculum et la PrPsens de l'hôte (Prusiner S. et al, 1990). S. Prusiner émet ainsi en premier l'hypothèse que la PrPres serait capable de s'auto-répliquer en convertissant la PrPsens.

Ainsi des souris KO, dépourvue du gène de la PrP, sont résistantes à l'inoculation de tremblante (Prusiner S. ⁽²⁾ et al., 1993). La présence de PrPsens est indispensable au départ de la maladie. De plus, il est constaté chez la souris une relation inverse entre le taux d'expression de la PrPsens et le temps d'incubation du développement d'une souche de tremblante adaptée à la souris (Büeler H. et al., 1994). La pathogenèse du prion nécessite donc l'expression du gène PrP et le temps d'incubation de la maladie est proportionnel à ce taux d'expression.

Pour les formes génétiques, la mutation affectant le gène de la PrP aboutit à une mauvaise conformation tri-dimentionnelle (Priola S., 1999). Les protéines alors malconformées jouent un rôle auto-catalytique induisant la conversion de l'ensemble des protéines prions.

Cette conversion a été beaucoup étudiée grâce aux bioessais mais aussi grâce au développement des modèles in vitro (Vorberg I. et al., 2001). Une des premières difficultés fût de trouver des lignées cellulaires sensibles au prion et capable d'exprimer une propagation stable. Ainsi la plus ancienne culture cellulaire se réalise sur une lignée de neuroblastomes de souris (N2a), et depuis d'autres lignées ont été identifiées telle celle issue de cellules hypothalamiques de souris (GT1) (Bosque P. et Prusiner S., 2000).

Ainsi, en inoculant à des N2a de souris de la PrP de hamster, S. Priola et son équipe ont identifié un dimère de molécules de PrP liées par liaisons covalentes et atteignant un poids moléculaire de 60kDa. Il est sensible aux protéases comme la PrPsens, mais à la capacité de s'autoagréger comme la PrPsc. Son temps de demi-vie et très court (Priola S. et al., 1995) et il apparaît précocement avant la production de PrPsc (Daude N. et al., 1997). Il semblerait que ce dimère corresponde au produit d'une étape intermédiaire dans la formation de la PrPsc.

M. Eiden et ses collaborateurs ont étudié la cinétique de cette conversion in vitro. Ils ont produit de la PrPsens à partir d'un modèle procaryote auquel a été inséré le gène de la PrP murine modifié au niveau du codon 144 pour permettre sa reconnaissance par l'anticorps L42. La PrPsc est issue de souche d'ESB et de tremblante après un premier passage à des souris. Dans un tampon de conversion, ils ont mélangés la PrPsens et la PrPsc ainsi obtenues et mis cette solution en incubation à 37°C. Chaque jour, ils ont analysé la formation de PrPsc à partir de la PrPsens. En effet, l'anticorps L42 permet dans les conditions de cette étude de révéler la PrPsc formée de novo par rapport à la PrPsc déjà existante dans le mélange. Ils ont ainsi montré, qu'in vitro, la conversion se déroulait en 3 étapes. La première est une phase d'attente où la formation est retardée. Ensuite il y a une accélération effective de la production de PrPres aboutissant à la troisième étape qui constitue une phase plateau (Eiden M. et al., 2006).

Cette conversion se déroulerait, d'après une étude récente, au niveau cellulaire dans les endosomes recyclant la PrP. Cette dernière consistait en l'analyse quantitative de la distribution en PrPsens et en PrPres ainsi qu'en la mesure du taux de PrPres dans différentes lignées cellulaires neuronales (Marijanovic Z. et al., 2009).

b) Hypothèses sur les facteurs favorisant cette conversion

Mais cette conversion nécessite des facteurs additionnels favorisants. En effet, une macromolécule spécifique de l'espèce, désignée sous le terme protéine X, participerait à la formation de la PrPsc et agirait comme une protéine chaperonne (Telling G. et al., 1995).

Diverses hypothèses ont été émises quant à la nature de cette macromolécule. Une étude a testé diverses protéines chaperonnes connues chez les bactéries. Deux de ces protéines, la GroEL et la Hsp104 (heat shock protein 104), affectent de manière significative la conversion de la PrPsens en PrPsc. Mais, elles nécessitent la présence de PrPsc préexistantes (DebBurman S. et al., 1997). Leur rôle exact n'est pas encore identifié et l'existence d'autres molécules est envisagée. En effet, la PrPsens a la capacité de fixer diverses molécules dont la fonction et l'intervention dans la conversion restent à établir. Un lien a pu être ainsi établi entre la PrPsens et une protéine amyloïde précurseur (Yehiely F. et al., 1997).

Aujourd'hui l'existante de cette protéine chaperone est controversée. En effet, grâce à des études d'amplification de la protéine mal-conformée en série et l'utilisation de PrPsens mutante produite en culture cellulaire, il a été montré que la protéine X ne serait pas indispensable à la conversion de la PrPsens en PrPsc et n'existerait tout simplement pas (Geoghegan J. et al., 2009). Par contre d'autres facteurs pourraient avoir un rôle de catalyseur, favorisant la conversion mais non obligatoire pour la réalisation de celle-ci.

Ainsi des petits facteurs organiques cellulaires influenceraient cette conversion. Par exemple, il est souvent rapporté le rôle d'un ARN de l'hôte comme catalyseur de la conversion. In vitro, l'analyse de la conformation de la protéine est réalisée par spectroscopie dichroïsme circulaire en utilisant différentes concentrations d'ARN. On observe que le taux de conversion est fonction de la concentration en ARN, qui pourrait favoriser l'augmentation des feuillets β et la diminution des hélices α . L'association ARN et Cu²+ accroît ce résultat (Liu M. et al., 2007). En effet, in vitro la PrP semble intéragir avec des ARN issus de l'hôte au niveau du secteur N-terminal (Gomes M. et al., 2008).

Le manganèse et le cuivre semblent aussi interagir avec la PrPsens lors de sa conversion. La fixation du manganèse engendrerait une altération de la conformation et un déplacement du cuivre. Le potentiel redox de la protéine est alors modifié ce qui favoriserait sa conversion. La fixation du Mn²⁺ pourrait être un facteur déclenchant des ESST (Brazier M. et al., 2008).

Actuellement, les modalités exactes de la conversion de la PrPsens en PrPsc restent inconnues, et l'implication de cette conversion dans l'acquisition du pouvoir pathogène de la protéine prion est également incertaine.

La découverte de la protéine prion ainsi que l'étude de ses propriétés ont permis d'aborder les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles sous un jour nouveau. Ainsi l'étude des souches, des caractéristiques biochimiques et lésionnelles ont favorisé la compréhension de la pathogénie et de la clinique de ces pathologies bien que de nombreux points restent à élucider. L'ESB, qui fût une des ces pathologies les plus médiatisées, a fait l'objet de nombreux travaux.

III - L'encéphalopathie spongiforme bovine

A) Epidémiologie

1) Epidémiologie descriptive

Le premier cas d'ESB est diagnostiqué au RU en novembre 1986 (Wilesmith J. et al., 1988). Dès que le lien avec les FVO est établi en 1988, le RU interdit ces matières dangereuses chez les bovins mais continuent leurs exportations (Bradley R. et Wilesmith J., 1993). On observe alors au RU l'effet de ces mesures qu'à partir de 1992 où la décroissance du nombre de cas s'amorce comme le montre le tableau 3 (OIE ⁽¹⁾, 2010).

Tableau 3 : Evolution du nombre de cas d'ESB en France et au Royaume-Uni depuis 1989 jusqu'en janvier 2010

Pays/Année	Avant 1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
France	0	0	0	0	5	0	1	4	3	12	6	18
Royaume-Uni	446	2 514	7 228	14 407	25 359	37 280	35 090	24 438	14 562	8 149	4 393	3 235

Pays/Année	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<u>France</u>	31	161	274	239	137	54	31	8	9	8	10
Royaume-Uni	2 301	1 443	1 202	1 144	611	343	225	114	67	37	12

La France émet rapidement un embargo sur les FVO issues du RU en 1989 (ESBinfo⁽¹⁾, 2009). Mais la communauté européenne n'interdira le recours aux FVO qu'en 1994 (Commission Decision 94/381/EC). Ces farines ont contribué à disséminer l'ESB en Europe et dans le monde. Ainsi de nombreux pays sont touchés (Figure 6).

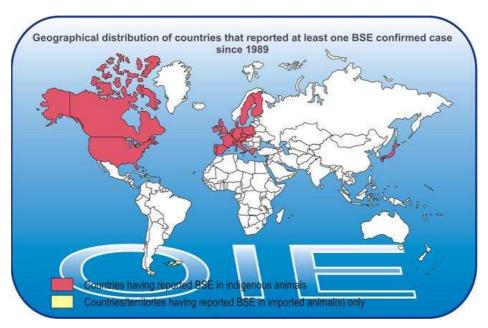
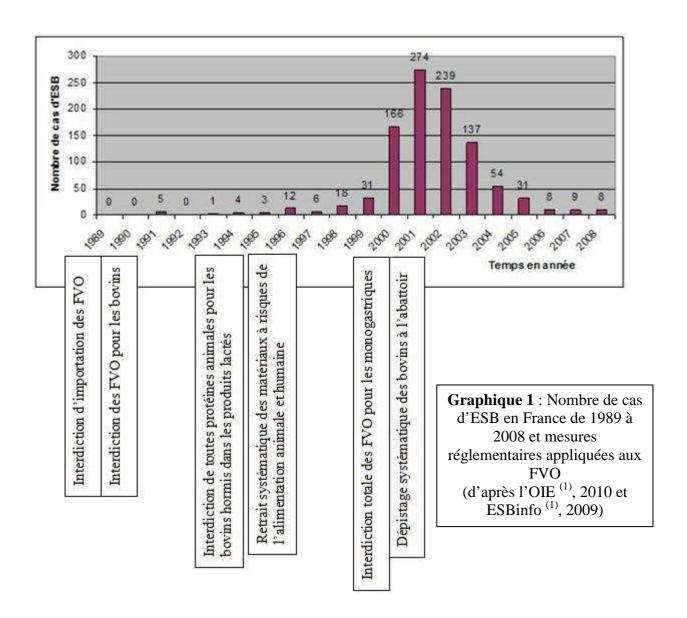


Figure 6 : Distribution géographique par pays rapportant au moins un cas confirmé d'ESB de 1989 au 5 janvier 2010

Le diagnostic systématique des animaux de plus de 24 mois sur les carcasses en abattoir à partir de 2001 en Europe a permis d'éliminer les carcasses contaminées (Commission Regulation ??2001). De plus, l'interdiction des farines depuis 1994 (Commission Decision 94/381/EC) et le retrait systématique des matériaux à risques de l'alimentation humaine et animale depuis 1996 (ESBinfo (1), 2009), ont probablement contribué à la diminution de l'incidence de la maladie.

En ce qui concerne la France, l'épizootie s'est déclarée plus tardivement qu'au RU à partir de 1991 (Coles P., 1991). La décroissance s'effectue à partir de 2002 (OIE ⁽¹⁾, 2010).



2) Epidémiologie analytique

☐ Concernant la source originelle de l'ESB, plusieurs hypothèses sont émises :

- Passage et adaptation de l'agent de la tremblante aux bovins par les FVO
- Agent pathogène bovin sporadique non diagnostiqué avant le développement de l'épizootie

La seconde hypothèse pourrait être désormais la plus vraisemblable. L'unicité de la souche de l'ESB, à la différence de la tremblante qui comporte de multiples souches, est en faveur d'une source alimentaire commune d'infection (Simmons M. et al., 1996). De plus, avec la découverte des cas atypiques bovins (Casalone et al., 2004), cette hypothèse semble privilégiée.

En effet, en 2004, par le bais de la surveillance active de l'ESB, sont identifiés les premiers cas atypiques dont deux variants distincts: le variant dit de type L et celui de type H

(Casalone C. et al, 2004; Biacabe A.-G. et al., 2004). Le type-L est ainsi appelé pour « lower » car le fragment non glycosylé après digestion à la protéinase K a une masse moléculaire plus faible que dans l'ESB classique. Ce type-L est aussi appelé BASE pour « Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy » de part la présence de plaques amyloïdes dans les régions supratentoriales du cerveau (Casalone C. et al., 2004). Le type-H, quant à lui, correspond à « higher », car le fragment non glycosylé obtenu après digestion à la protéinase K est de masse moléculaire supérieure à l'ESB classique (Biacabe A.-G. et al., 2004). On peut noter que récemment la transmission du variant L par passage multiple à des souris de type sauvage, aboutit à l'obtention des profils lésionnel et électrophorétique similaires à ceux de souris de type sauvage inoculées avec de l'ESB classique. Ces résultats sont un nouvel argument en faveur d'une origine liée à un agent sporadique bovin pour l'ESB classique (Capobianco R. et al., 2007).

Etant donné que certaines mutations du gène peuvent modifier les sites de clivage à la protéinase K de la protéine prion pathogène et ainsi le profil électrophorétique, le gène PrP des cas atypiques H européen a été séquencé et aucune différence avec celui de l'ESB classique n'a été constatée (Biacabe A.-G. et al., 2004). Concernant un cas atypique H américain, une mutation a été constatée au niveau du codon 211 avec le remplacement d'un acide glutamique par de la lysine. Cette mutation est similaire à celle existante dans certaines familles de MCJ concernant le codon 200 chez l'homme (Richt J. et Hall S., 2008).

☐ La transmission est indirecte par les FVO dans le cadre de l'ESB dite classique (Bradley R. et Wilesmith J., 1993). Pour le variant H, une transmission génétique est également possible par l'intermédiaire de la mutation du codon 211 transmise à la descendance (Richt J. et Hall S., 2008). Chez les bovins, la transmission par le lait (Everest S. et al., 2007) ou le placenta (Bradley R., 1993) n'a pu être établie.

L'ESB est une maladie affectant principalement les bovins, mais des cas se déclarant chez des ruminants exotiques en zoo tels le nyala, le grand koudou, le bison, l'oryx gemsbok et bien d'autres, sont aussi répertoriés. De même, l'ESB est retrouvée chez des félidés variés incluant le chat domestique, le puma, le tigre, le guépard (Kirkwood J. et Cunningham A., 1994) mais aussi chez deux chèvres (Eloit M. et al., 2005). L'ESB de type-L serait également à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme du vison (Baron T. et al., 2007). La contamination de ces différentes espèces est probablement liée à l'alimentation (Kirkwood J. et Cunningham A., 1994). Expérimentalement, la transmission a pu être obtenue chez le mouton et la chèvre (Foster J. et al., 1993), le porc (Ryder S. et al., 2000), la souris (Fraser H. et al., 1992), le vison (Robinson M. et al., 1994), le ouistiti (Baker H. et al., 1993), le macaque (Lasmézas C. et al., 1996) et d'autres singes.

□ Concernant les caractéristiques de la maladie, l'ESB affecte les animaux des deux sexes sans discrimination avec une atteinte quasi-exclusive des vaches laitières pour l'ESB classique. Ce phénomène s'explique par le fait que les FVO étaient un aliment diététique destiné à complémenter les vaches laitières (Bradley R., 1991 et Wilesmith J. et al., 1992). Au niveau des classes d'âge, l'ESB classique se rencontre chez des bovins âgés de 3 à 7 ans avec un pic à 4-5 ans, le temps d'incubation étant long, de 4 à 5 ans en moyenne (Bradley R., 1991).

B) Clinique

L'ESB a été responsable des deux crises en 1996 et 2000. L'observation des bovins malades a permis d'établir un profil des symptômes de l'ESB dite classique. Mais, avec la surveillance active en abattoir et en équarrissage depuis 2001, des formes atypiques avec les variants H et L ont été identifiées.

1) L'ESB classique

En France, un profil type de la cohorte de symptôme a été établi grâce aux 24 premiers animaux positifs dépistés cliniquement dans les Côtes-d'Armor. L'observation du déroulement de la maladie a permis de montrer une évolution sur 1,5 à 2,5 mois généralement en 4 phases et aboutissant à la mort de l'animal (Collin E., 2002) après un temps d'incubation moyen de 4-5 ans (Bradley R., 1991).

Tableau 4 : Evolution de l'ESB chez les bovins (Collin E., 2002)

Stade I	Début de la maladie	Atteinte légère de la locomotion et/ou				
		modification comportementale peu marquée				
Stade II	Phase d'évolution de la	Myoclonies, excitabilité, atteinte plus				
	maladie	marquée de la locomotion				
Stade III	Fin d'évolution	Chutes, agressivité, hyperexcitabilité				
Stade IV	Stade ante-mortem	Décubitus				

Trois familles de symptômes sont identifiées : troubles du comportement, troubles de la locomotion et troubles sensitifs. On observe habituellement une association d'au moins deux de ces familles de signes cliniques et des signes généraux (Collin E., 2002).

☐ Les signes généraux correspondent à l'évolution subaiguë de la maladie avec un amaigrissement progressif, une baisse de la production laitière voire un tarissement (Bradley R., 1991), l'appétit est conservé. On remarque également une température corporelle normale, une présence fréquente de myoclonies parfois limitées à une région comme bien souvent à la base de la queue et un fonctionnement normal des nerfs crâniens (Collin E., 2002).

☐ Pour les modifications du comportement, on a constaté une crainte et une frayeur excessives, de la nervosité, de l'agressivité envers les congénères et/ou l'homme, un isolement, des réactions excessives, du bruxisme et des léchages répétés (Collin E., 2002).

☐ Concernant les troubles locomoteurs, on note une ataxie avec une hypermétrie ou une hypométrie en fonction des cas, des chutes, de la parésie et en phase terminale un décubitus accompagné d'un coma terminal (Collin E., 2002).

☐ Comme modifications de la sensibilité, on observe une hypersensibilité au contact, au son et à la lumière (Collin E., 2002).

D'autres symptômes sont rapportés mais leur fréquence est faible : atteinte digestive avec un syndrome de Höflund, lapement, position anormale avec un décubitus en grenouille, amaurose (Collin E., 2002).

2) Les ESB atypiques

L'ESB de type-L est observée chez des animaux plus âgés que la plupart de ceux des cas d'ESB classique. Ainsi, les deux premières vaches identifiées avaient 11 et 15 ans (Casalone C. et al., 2004). De même, le variant H est constaté chez des bovins âgés qui ne présentaient pas de signes cliniques rapportés (Biacabe A.-G. et al., 2004).

Mais la clinique reste peu renseignée chez les individus atteints de ces ESB atypiques car bien souvent ces cas L et H ont été diagnostiqués en routine dans le cadre de la surveillance active par des tests de dépistage systématique à l'équarrissage ou à l'abattoir, et non dans le contexte d'une suspicion clinique. Il a donc été réalisés des transmissions intracérébrales du variant de type L à des vaches. On constate alors que les premiers signes neurologiques se manifestent par des trémulations des muscles glutéaux. Le poil est terne et des signes de dépression sont notés avec un port de la tête bas et une baisse des réactions. S'ensuit alors une atrophie musculaire débutant dans la région glutéale et progressant par voie paravertébrale vers les membres antérieurs. On ne note pas d'ataxie ni de difficultés aux déplacements. Les vaches réagissent de manière exagérée à des stimuli tactiles mais pas aux stimuli sonores et visuels. Pour résumer, ce variant L se manifeste plutôt par une atrophie musculaire avec un état dépressif de l'animal (Lombardi G. et al., 2008).

Seulement deux souches distinctes de l'ESB classique ont été actuellement reconnues, à l'inverse de la tremblante où une multidute de souches existe. Que ce soit les formes classiques (ESB C) ou atypiques (ESB L et ESB H), le diagnostic clinique de certitude n'existe pas. Les symptômes permettent d'émettre une suspicion et le diagnostic de certitude se déroule post-mortem avec divers tests décrits dans la partie IV de ce travail. En France, actuellement, les tests de dépistage sont effectués par les laboratoires départementaux d'analyses (LDA) ou privés qui ont reçu un agrément spécifique pour réaliser ces tests. Puis tout résultat non négatif (douteux ou positif) est soumis au contrôle du laboratoire national de référence, soit l'AFSSA Lyon qui est le seul laboratoire pouvant confirmer le diagnostic.

C) Caractéristiques lésionnelles et électrophorétiques de l'ESB

1) Caractéristiques lésionnelles

Comme nous l'avons déjà précisé, les ESST sont caractérisées par une triade de lésions : la dégénérescence neuronale, les modifications spongieuses de la substance grise avec des vacuoles intra- et interneuronales et la gliose (Marsh R., 1972 ; Zlotnik I., 1960 ; Williams E. et Young S., 1980 ; Gajdusek D. C. et Zigas V., 1959 ; Jones D. et Nevin S., 1954).

Dans l'ESB, les lésions de vacuolisation sont particulièrement marquées et historiquement, le diagnostic reposait sur l'observation de ce type de lésions dans quatre sections cérébrales spécifiques : des parties de la moelle allongée, du mésencéphale et de la protubérance annulaire (Wells G. et al., 1989). Le type de vacuolisation prédominante dans la moelle allongée correspond à des vacuolisations du neuropile aboutissant à une spongiose. Moins fréquemment, on a des vacuoles neuronales dans le corps cellulaire (Wells G. et al., 1989). Les vacuoles intracellulaires sont bordées de membranes et contiennent des ribosomes, des petites vacuoles secondaires et du matériel amorphe. Certaines enferment des mitochondries dégénérées et des corps de lysosomes, d'autres des citernes ramifiées ou bien

encore, des amas des vésicules amorphes. Ces vacuoles contribuent à la dégénération neuronale (Liberski P. et al., 2005 ; Liberski P. et al., 1992).

Les lésions se retrouvent essentiellement dans le noyau dorsal du nerf vague, le noyau du tractus solitaire et le noyau du tractus spinal du nerf trijumeau (Wells G. et al., 1989). Les lésions sont généralement symétriques si elles concernent une structure anatomique bilatérale (Casalone C. et al., 2006). Dans l'ESB classique, la distribution et la sévérité des lésions de vacuolisation restent parfaitement identiques entre les pemiers cas de l'épizootie et des cas situés entre 1992 et 1994 d'après l'étude comparative des lésions de M. Simmons (Simmons M. et al., 1996). C'est données sont cohérentes avec l'unicité remarquable de la souche de l'ESB classique démontrée par des expériences de transmission de la maladie à la souris.

Par immunohistochimie (IHC), on observe diverses morphologies de dépôts de la PrPsc dans le tissu cérébral bovin ; six sont illustrées dans la figure 7 ci-dessous (Casalone C. et al., 2006) :

- type granuleux avec accumulation de PrPsc dans le neuropile,
- type coalescent en forme d'agrégats denses et coalescents,
- type glial en forme d'étoile lié à l'accumulation autour des cellules gliales,
- type linéaire avec dépôts le long des axones et des dendrites,
- type intraneuronal en aspect ponctiforme,
- type intraglial en aspect ponctiforme.

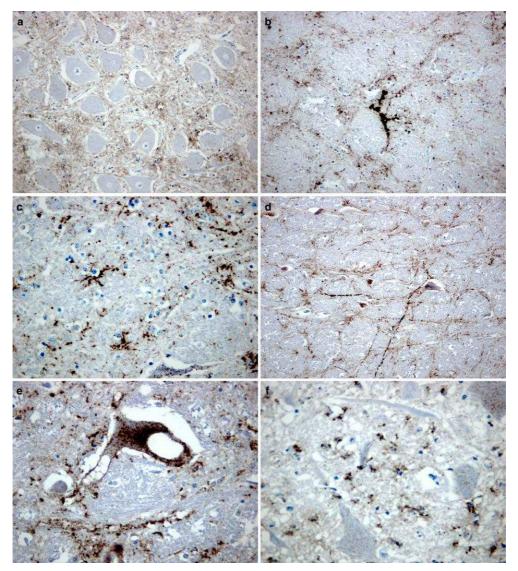


Figure 7 : Morphologie de dépôts de PrPsc révélés par immunohistochimie (Casalone C. et al., 2006)

a: type granuleux (objectif x 20) / b: type coalescent (x 10) / c: type glial (x 20)
d: type linéaire (x 10) / e: type intraneuronal (x 40) / f: type intraglial (x 40)

Dans l'ESB classique, on a des dépôts de type granuleux dans le cytoplasme neuronal et le neuropile de la substance grise des régions thalamiques et du tronc cérébral. On constate aussi des dépôts linéaires et de type glial (Casalone C. et al., 2004).

Dans l'ESB atypique, la distribution des lésions et le type de ces dernières sont différentes de l'ESB classique. Ainsi dans le type-L, on observe principalement des plaques amyloïdes de dépôts de PrP unicentriques et denses, parfois multicentrique (Figure 8). On les retrouve principalement dans le thalamus, la substance blanche subcorticale et aussi dans les couches profondes du cortex cérébral et des bulbes olfactifs. De par la présence de cette amyloïdose qu'on ne retrouve pas dans l'ESB classique, le type-L est aussi appelé BASE. On note également la présence de dépôts de type granuleux extracellulaire et de type glial. On constate une absence de dépôt de PrP dans les noyaux dorsaux du nerf vague alors que ces dépôts sont précoces dans l'ESB classique et représentent une caractéristique majeure de l'ESB C (Casalone C. et al., 2004).

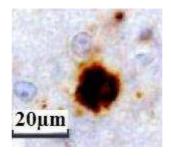


Figure 8 : Dépôts amyloïdes ou plaques amyloïdes (d'après Lombardi G. et al., 2008)

Concernant le type-H, on constate quelques vacuoles dans le neuropile, dans le noyau du tractus solitaire et dans le noyau du tractus spinal du nerf trijumeau comme dans l'ESB classique. En IHC, on constate des dépôts ponctiformes parfois coalescents dans le neuropile et des dépôts diffus dans la substance grise (Gavier-Widén D. et al., 2008).

2) Profil électrophorétique

Le profil électrophorétique en Western blot de l'ESB présente les trois bandes classiques correspondant aux trois formes de glycosylation de la protéine prion (Beekes M. et al., 1995). Ainsi sur la figure 10, la bande supérieure représente la forme biglycosylée, la bande centrale la forme monoglycosylée et, la bande inférieure la forme non glycosylée de la PrPres. Dans l'ESB classique, on constate une prédominance du fragment de masse moléculaire élevée c'est-à-dire de la forme biglycosylée (Biacabe A.-G. et al., 2004).

La migration et l'importance des bandes obtenues en western blot dépendent des anticorps utilisés. En effet, certains anticorps tel le P4 et le 12B2 reconnaissent la région N-terminale, les anticorps Sha31 et RB1 se fixent sur des épitopes situés dans la région centrale (des acides aminés 110 à 164), tandis que les anticorps SAF84 et 12F10 identifient la région C-terminale de la PrP (Biacabe A.-G. et al., 2007).

Cette migration dépend aussi de la souche de l'agent pathogène (Figure 9). Ainsi le type-L par rapport à l'ESB typique a un fragment non glycosylé de masse moléculaire légèrement plus faible. De plus, le ratio des trois formes de glycosylation est lui aussi modifié. On note une prédominance de la bande de poids moléculaire intermédiaire et l'existence d'un fragment résistant à la protéinase K possédant une mobilité électrophorétique plus rapide (Casalone C. et al., 2004).

Dans le type-H, la bande biglycosylée est un peu moins marquée qu'avec l'ESB classique. On observe, par exemple, une variation de la bande non glycosylée avec l'anticorps RB1 par rapport à l'ESB classique : cette bande possède une masse moléculaire de 0,7 à 1,3 kDa plus élevée (Biacabe A.-G. et al., 2004).

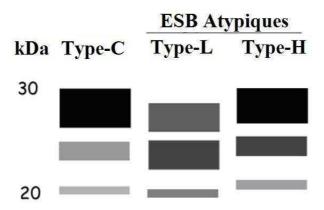


Figure 9 : Représentation des westerns blots obtenus pour l'ESB classique et pour les deux cas atypiques de l'ESB avec un anticorps révélant les épitopes situés sur le segment 110 à 164 acides aminés

(D'après Brown P. et al., 2006).

Pour le type-H, selon les anticorps utilisés, différents profils sont obtenus comme le représente la figure 10 ci-dessous.

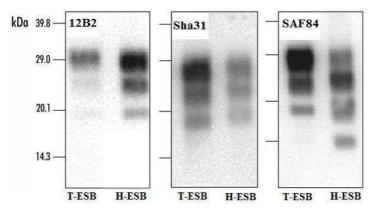


Figure 10 : Comparaison des profils électrophorétiques de l'ESB typique (T-ESB) et de l'ESB de type-H (H-ESB) obtenus avec trois anticorps de famille différente.

(d'après Biacabe A.-G. et al., 2007)

Avec l'anticorps 12B2 on observe les trois bandes classiques de 28, 23 et 19kDa similaire à l'ESB classique. Avec l'anticorps Sha31, on constate le décalage de la bande non glycosylée par rapport à l'ESB classique et finalement avec l'anticorps SAF84, un profil particulier est constaté. On a la présence de quatre bandes de 28, 23, 19 et 14kDa et une prédominance de la bande de 23kDa (Biacabe A.-G. et al., 2007).

3) Caractéristiques par bio essai

Historiquement, deux principaux modèles ont été utilisés : la souris et le hamster. Il existe divers protocoles avec différentes voies d'inoculation aux animaux. La voie la plus courante pour la caractérisation de l'agent infectieux reste la voie intracérébrale qui permet de réduire le temps d'incubation. Les voies orale, parentérale, intraveineuse et sous-cutanée sont plutôt utilisées dans le cadre de la recherche autour des questions relatives à la physiopathologie de ces maladies et à leurs risques de transmission.

L'inoculum peut être de nature variée : cerveau, intestin, rate, sang et autres tissus susceptibles de contenir l'agent infectieux (Fraser H. et al., 1992).

Concernant la souris, celle-ci est inoculée généralement avant six-huit semaines d'âge afin de faciliter l'injection intracérébrale. Diverses lignées de souris existent selon l'objectif :

- souris sauvage n'ayant aucune modification génétique, dont les lignées C57Bl, RIII (Fraser H. et al, 1992) et VM (Hope J. et Hunter N., 1988).
- souris transgénique, qui peuvent surexprimer le gène de la PrP de l'espèce donneuse de l'inoculum. Diverses lignées existent selon les caractéristiques génétiques recherchées et notées sous le terme Tg comme par exemple la lignée Tg540 exprimant le gène bovin (Béringue V. et al, 2006).
- souris KO n'exprimant pas le gène de la PrP murine utilisée essentiellement dans le cadre de la recherche et dans les croisements afin d'obtenir les lignées transgéniques désirées et dépourvues d'expression du gène endogène murin.

Une fois la souris présentant certains critères cliniques, l'euthanasie est réalisée ainsi que la collecte du cerveau (Fraser H. et al., 1992)

Le diagnostic repose sur l'apparition de la maladie et l'observation des signes cliniques. Mais l'inoculation aux animaux de laboratoire permet d'obtenir d'autres informations. Ainsi par le temps d'incubation, on peut évaluer l'infectiosité de la souche. C'est une des seules méthodes permettant d'établir le titre infectieux qui est proportionnel au temps d'incubation. On peut également différencier deux souches. (Fraser H. et al., 1992).

Prenons l'exemple d'une étude réalisée sur une lignée de souris Tg540 exprimant le gène bovin et inoculée avec l'ESB classique et le variant H de l'ESB réalisée par V. Béringue et ses collaborateurs (Béringue V. et al., 2006).

Dans le cas de l'ESB classique, on observe un temps d'incubation de la maladie compris entre 250 et 380 jours environ. Pour le type-H, ce temps d'incubation est augmenté à environ 400 jours ce qui laisse supposer à une moindre infectiosité de ce variant (Béringue V. et al., 2006). Une étude similaire réalisée sur des souris surexprimant le gène bovin aboutit à des conclusions semblables : le variant L possède un temps d'incubation plus court que celui de l'ESB classique tandis que le variant H a un temps d'incubation plus long (Buschmann A. et al., 2006).

On peut noter que ce temps d'incubation, en plus d'être influencé par la souche, dépend de la lignée de souris choisie. Ainsi pour la transmission de l'ESB classique à des souris sauvages C57Bl6, le temps d'incubation passe de 400 à 900 jours lors du premier passage (Fraser H. et al., 1992). Après le troisième passage sur souris, le temps d'incubation est d'environ 180 jours pour l'ESB classique, la souche s'étant adaptée au modèle animal proposé et n'ayant ainsi plus de barrière d'espèce à franchir (Bruce M. et al., 2002).

On observe également que la transmission de l'ESB de type L à des souris exprimant le gène humain se révèle une transmission aisée sans barrière d'espèce, à l'inverse de l'ESB

classique. De plus, le type H n'atteint pas ces souris (Béringue V. et al., 2008). Ces trois souches ont donc bien un comportement distinct.

E) Réglementation française

La réglementation française a évolué parallèlement aux travaux de recherche sur le prion et plus particulièrement par rapport à sa transmissibilité, à sa distribution dans l'organisme et à son diagnostic. Cette réglementation a aussi été corrélée aux mesures européennes mises en place vis-à-vis de l'ESB.

1) Evolution de la réglementation française

- **1989 Août** : interdiction d'importer des FVO du RU, excepté si elles sont destinées aux porcs et aux volailles (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).
- **1990 Juin** : l'ESB devient une maladie à déclaration obligatoire sous la forme de MRC (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).
- **1990 Août :** interdiction de toutes sources de protéines de mammifères dans l'alimentation des bovins hormis les produits lactés pour veaux (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).
- **1990 Décembre** : mise en place d'un dispositif national de lutte contre l'ESB par un réseau d'épidémiosurveillance clinique des bovins suspects, présentant des troubles neurologiques, en élevage et en abattoir avec prélèvement de l'encéphale pour confirmer ou infirmer la suspicion clinique (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).
- **1994 Juin** : interdiction de toutes protéines animales dans l'alimentation des bovins hormis les produits lactés pour veaux (Commission Decision 94/381/EC).
- **1996 Mars**: embargo sur les bovins britanniques et la viande bovine en provenance de Grande-Bretagne (Commission Decision 96/239/EC).
- **1996 Juin**: en France, les matériaux à risques spécifiés sont retirés systématiquement des chaînes alimentaires humaines et animales et détruits par incinération (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).
- **2000 Juin** : mise en place de mesures de surveillance à l'équarrissage de la mortalité bovine avec déclaration de tout bovin mort âgé de plus de 24 mois, et ce quelque soit la cause de la mort. De plus, les inspections ante-mortem sont renforcées en abattoir (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).
- **2000 Novembre** : interdiction de toutes farines animales et de certaines graisses dans l'alimentation de l'ensemble des animaux d'élevage (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).
- **2001 Janvier** : début du dépistage systématique des bovins entrant à l'abattoir et à l'équarrissage et âgés de plus de 30 mois (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).
- **2001 Juin :** programme communautaire d'épidémiosurveillance pour les bovins accidentés abattus à l'abattoir et les taureaux de combat, le dépistage s'effectue sur tout animal de plus de 24 mois. Chaque carcasse est soumise à un prélèvement de tronc cérébral, analysé par des tests rapides. C'est grâce au développement de ces tests que ces mesures ont pu être mises en place (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).
- **2001 Juillet** : l'âge minimum pour le dépistage systématique est décalé à 24 mois pour tous les bovins présentés à l'abattoir (Commission Regulation No 1248/2001).

2002 – **Octobre** : levée de l'embargo sur les viandes d'origine britannique (ESBinfo (1), 2009).

2009 - Janvier: suite à l'amélioration de la situation française, la surveillance active de l'ESB est allégée. A l'abattoir, le dépistage s'effectue pour tout bovin âgé de plus de 48 mois, excepté pour les bovins accidentés et les taureaux de combat où la recherche d'ESB reste à 24 mois. A l'équarrissage, la mesure de juin 2000 reste appliquée et tous les bovins de plus de 24 mois sont testés pour l'ESB (Commission Décision 2008/908/EC).

2) Evolution des mesures de police sanitaire

Depuis 1990: lors de suspicion clinique, le préfet place l'exploitation sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS). L'animal suspect est isolé et son lait détruit. Si la suspicion se maintient, il est euthanasié et les prélèvements nécessaires au diagnostic sont réalisés. Un APMS est aussi décidé lors du dépistage systématique avec un test rapide nonnégatif. Une fois l'APMS déclaré, une enquête épidémiologique est mise en place pour trouver l'origine de la contamination et pour identifier les bovins nés de l'animal suspect, bovins éventuellement commercialisés dans une autre exploitation. Les animaux du cheptel sont recensés et séquestrés dans l'exploitation (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).

Si la suspicion est confirmée, le préfet émet un arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APPDI) et les mesures de police sanitaire sont appliquées. L'APPDI est levé lorsque toutes ces mesures ont été réalisées.

Les mesures de police sanitaire ont évolué au cours des années en fonction du développement des connaissances sur la transmissibilité du prion.

De 1990 à 1994: lors d'APPDI, les autres animaux du troupeau auquel l'animal atteint appartient, sont marqués par une perforation circulaire de 2 cm de l'oreille droite afin d'être reconnus en abattoir. Ainsi les matériaux à risques spécifiés sont saisis et détruits par incinération. Leurs carcasses peuvent être commercialisées mais l'éleveur peut demander un abattage total subventionné (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).

De 1994 à 2002: lors d'APPDI, l'ensemble du troupeau est systématiquement abattu et les carcasses détruites par incinération, ainsi que les autres troupeaux dans lesquels le bovin a séjourné. Officiellement cette mesure de police sanitaire ne prend effet qu'à partir de 1997 mais elle est déjà appliquée à partir de 1994. Les éleveurs perçoivent une indemnisation lors de ces abattages totaux (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).

A partir de 2002 : lors d'APPDI, un abattage sélectif en cohorte est réalisé. Il consiste en l'élimination des bovins nés entre un an après et un an avant celui atteint d'ESB, ainsi que de sa descendance (ESBinfo ⁽²⁾, 2009).

3) Mesures de protection du consommateur

L'Europe ne permet pas la consommation d'une carcasse, en fonction de son âge, sans un résultat négatif à un test de dépistage rapide (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).

De plus, depuis juin 1996 en France, les matériaux à risques spécifiés sont retirés systématiquement de la chaîne alimentaire humaine et animale et détruits par incinération (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).

L'union européenne définit dans un premier temps les matériaux à risques comme étant le crâne, dont l'encéphale, les yeux et les amygdales, et la moelle épinière de tous bovins âgés de plus de 12 mois (Commission Decision 97/534/EC). Par la suite, elle ajoute les intestins, du duodénum au rectum des bovins de tout âge (Commission Décision 2001/2/EC) et la colonne vertébrale excepté les vertèbres de la queue mais comprenant la chaîne des ganglions dorsaux pour les bovins de plus de 12 mois (Commission Décision 2001/233/EC). En 2005, l'âge de retrait des matériaux à risques est décalé à 24 mois excepté pour les intestins et le mésentère qui sont retirés pour les bovins de tous âges (Commission Regulation No 1974/2005) et finalement à 30 mois pour la colonne vertébrale (Commission Regulation No 357/2008). Ajouté à cette liste de matériaux à risques imposée par l'Union européenne, la France avait également retiré le thymus de la commercialisation ; puis après un avis favorable de l'AFSSA, sa commercialisation est à nouveau possible à partir de septembre 2002 si le thymus est issu d'un veau élevé en France et né après le 30 juin 2002 (ESBinfo ⁽¹⁾, 2009).

IV – Méthodes de diagnostic de l'encéphalopathie spongiforme bovine

A) Histopathologie

L'examen histologique du système nerveux central était le premier test utilisé pour la confirmation des diagnostics d'ESST. Dans l'ESB, les lésions de vacuolisation sont particulièrement marquées et, historiquement, le diagnostic reposait sur l'observation de ce type de lésions dans quatre sections cérébrales spécifiques : des parties de la moelle allongée, le mésencéphale et la protubérance annulaire selon la figure 11 (Wells G. et al., 1989).

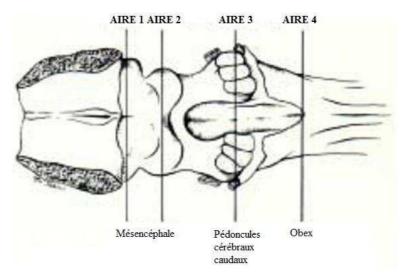


Figure 11 : Principaux sites examinés pour le diagnostic histologique de l'ESB (d'après Davis A. et al., 1991)

Suite à l'accroissement considérable du nombre de cas à diagnostiquer, cette technique a été simplifiée avec l'étude unique de section de la moelle allongée correspondant au

prélèvement d'obex et aboutissant à 99,6% au même résultat (Wells G. et al., 1989). On recherche également les signes caractéristiques de spongiose, de perte neuronale, d'astrogliose réactionnelle et la présence ou non de plaques amyloïdes, bien que dans l'ESB, la gliose soit souvent modérée et la dégénérescence neuronale légère (Deeber S. et al., 2003).

La sévérité des lésions varie d'un animal à l'autre et avec la section de cerveau examinée. Un diagnostic histologique seul n'est donc possible que si la présence des vacuoles est suffisante (Davis A. et al., 1991). De plus, l'état des prélèvements influe considérablement sur le résultat de cette méthode de diagnostic. Pour cette technique, il faut que les structures anatomiques soient conservées, donc que le prélèvement s'effectue rapidement après la mort de l'animal. En effet, l'autolyse empêche tout diagnostic (Race R. et al., 1994). H. Graber décrit ainsi que 5% des bovins présentant des signes cliniques ne peuvent être confirmés ou infirmés pour l'ESB. Grâce au développement d'anticorps contre la protéine prion, il constate qu'un immunomarquage de la PrPsc dans le cadre de l'immunohistochimie permet un diagnostic de ces cas (Graber H. et al., 1995; Race R. et al., 1994). Actuellement, l'himmunohistochimie est préférée à l'histologie pour effectuer un diagnostic.

B) Microscopie électronique et Scrapie Associated Fibrils (SAF)

C'est une des premières méthodes de diagnostic utilisée avec l'histologie. Elle s'effectue par l'utilisation d'un microscope électronique en contraste négatif après avoir réalisé une ultracentrifugation d'un prélèvement de cerveau en présence de détergents (Merz P. et al., 1987).

On observe des structures fibrillaires (Figure 12) de 4-6 nm de large et de 50 à 500 nm de long. Ces fibrilles consistent en l'association soit de 2, soit de 4 filaments et sont nommées SAF pour « Scrapie Associated Fibrils » (Merz P. et al., 1981). Grâce au développement d'anticorps anti-PrP, on a pu mettre en évidence que les SAF sont composés de protéines prion (Merz P. et al., 1987).

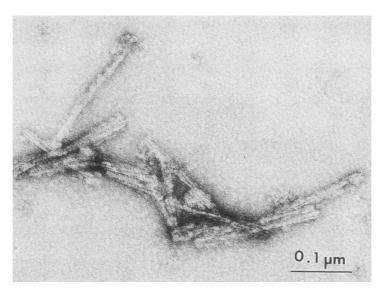


Figure 12 : SAF au microscope électronique (Merz P. et al., 1987)

Mais la sensibilité de cette technique reste faible et est supérieure à 90% principalement dans le tronc cérébral (Scott A. et al., 1990). Elle est préférable à l'histologie pour les prélèvements autolysés, l'autolyse n'affectant pas la détection des SAF (Scott A. et al., 1992).

Le développement des outils de diagnostic a permis d'élaborer des tests plus intéressants. Ainsi W. Cooley a comparé la sensibilité de la recherche de SAF par microscopie électronique avec la recherche de PrPres par Western Blot dans différentes régions de l'encéphale de 106 moutons atteints de tremblante (Cooley W. et al., 1998). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous et révèlent que la détection des SAF est très insuffisante par rapport au Western blot.

Tableau 5 : Sensibilité en pourcentage de la détection des SAF et de la recherche de PrPres par Western blot dans différentes régions de l'encéphale

-	•	
Région étudiée	Détection des SAF	Western blot
Moelle allongée	91	97
Cervelet	76	99
Cortex cérébral frontal	88	95
Cortex cérébral	61	93

(d'après Cooley W. et al., 1998)

De plus, la spécificité dépend de la région anatomique et suggère une association entre l'accumulation de PrPres et des changements vacuolaires dans certaines aires neuroanatomiques (Scott A. et al., 1990).

C) Les méthodes immunohistopathologiques

1) L'immunohistochimie

a) Principe de l'IHC

Ce test associe à l'examen histologique du système nerveux central, un immunomarquage de la PrPsc. Il est employé pour la première fois par J. Miller et son équipe. Ils constatent alors que l'IHC est équivalente, voire supérieure à l'histologie pour le diagnostic surtout concernant les échantillons autolysés (Miller J. et al., 1993). Cette technique était utilisée dans le cadre de la confirmation au sein de l'AFSSA Lyon, mais grâce au développement d'un Western blot (WB) hautement sensible, l'AFSSA n'a plus recours à cette technique que dans le cadre de l'expérimentation.

De nombreux protocoles ont été mis au point par différentes équipes de chercheurs afin d'obtenir de meilleures sensibilités et spécificités. La réalisation de la phase de prétraitement et les anticorps (Ac) utilisés sont les deux points variant le plus d'un protocole à l'autre. Nous allons ici décrire le principe du protocole qui était utilisé à l'AFSSA Lyon, laboratoire de référence national français.

Le prélèvement correspond à un morceau de l'obex fixé dans le formol à 10%. Il subit un prétraitement à l'acide formique à 98-100% afin de diminuer son infectiosité. Par un procédé automatique, il est ensuite inclus en paraffine, coulé dans un bloc de paraffine et découpé en coupes de 5 μ m qui sont placées sur des lames en verre qui reposent une nuit à 55°C (Bencsik A. et al., 2005).

Les coupes subissent un déparaffinage suivi de l'élimination des peroxydases endogènes par H_2O_2 . Elles sont alors réhydratées dans des bains graduels d'alcool et passent à l'autoclave humide à 121° C pendant 20 minutes pour démasquer les épitopes de la PrPsc. Finalement, on réalise un traitement à la protéinase K à 20μ g/mL pendant 15 minutes à 37° C (Bencsik A. et al., 2005).

Une fois ces étapes de prétraitement réalisées, la révélation s'effectue avec l'emploi des Ac selon le principe de la figure 13. De nombreux Ac monoclonaux et polyclonaux peuvent être utilisés en fonction du protocole utilisé et des traitements réalisés afin de garantir la spécificité et la sensibilité de la méthode. A l'AFSSA Lyon, le plus souvent, pour l'Ac primaire, on utilise un Ac de souris monoclonal anti-PrP comme le SAF84. Le second est un Ac anti-souris biotinylé sur lequel est fixé un complexe avidine/enzyme qui capture les peroxydases exogènes. Ces dernières réagissent avec le DAB (diaminobenzidine). On obtient ainsi une coloration brunâtre amplifiée par le chlorure de nickel. Finalement, les coupes sont déshydratées et observées au microscope (Bencsik A. et al., 2005).

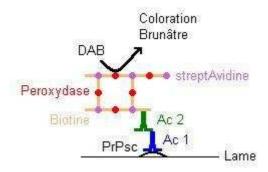


Figure 13: Méthode de révélation de l'IHC utilisé à l'AFSSA (d'après Bencsik A. et al., 2005).

b) Influence de la congélation et de l'état des prélèvements

S. Debeer et l'équipe de l'AFSSA Lyon ont étudié l'influence de la congélation suivie de la fixation des prélèvements de tissus nerveux sur le résultat de l'IHC. La comparaison se réalise avec des échantillons frais issus des mêmes encéphales de mouton. Ils constatent alors que malgré les dommages induits aux structures histologiques, la PrPres reste détectable sans aucun bruit de fond perturbant (Debeer S. et al., 2002).

M. Chaplin et son équipe ont cherché à mettre en évidence l'influence de prélèvements autolysés sur l'IHC. 15 moutons atteints de tremblante et 13 vaches ayant l'ESB sont étudiés ainsi que 10 moutons sains et 5 vaches saines. Pour chaque animal, le prélèvement de l'obex est autolysé à 37°C pendant 6, 12, 24 ou 48 heures. Ensuite une IHC de routine est réalisée et on constate que l'autolyse n'affecte pas le diagnostic (Chaplin M. et al., 2002). Cette étude a été développée avec l'emploi de prélèvements en état d'autolyse avancée c'est-à-dire au stade quasi-liquéfié. L'IHC permet d'obtenir des résultats fiables avec observation de dépôts de type granuleux dans le liquide fixé (Monleón E. et al., 2003).

c) Autres utilisations de l'IHC

L'IHC peut aussi être réalisée sur d'autres tissus que le SNC. Ainsi, sur des moutons atteints de tremblante, la PrPres a été détectée à 98% dans les amygdales ce qui peut permettre un diagnostic précoce (van Keulen L. et al., 1996; Schreuder B. et al., 1998). De même, elle a permis le diagnostic d'un patient atteint du vMCJ à partir de l'appendice de ce dernier (Hilton D. et al., 1998). Mais, l'utilisation de l'IHC en ante mortem sur ces autres tissus n'est pas actuellement une méthode officiellement reconnue dans le diagnostic de certitude et ce dernier ne peut être obtenu que par l'analyse des encéphales.

L'IHC peut aussi être utilisée afin de révéler grâce aux Ac un marqueur de l'extension des astrocytes : les GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). L'IHC est une méthode très spécifique et sensible pour la recherche de ce marqueur. Mais ce dernier ne permet pas de différencier avec certitude les animaux sains et ceux atteints d'ESST, et de plus, on ne peut distinguer une ESST d'une autre maladie neurologique affectant les astrocytes. (Mackenzie A., 1983).

2) Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET-Blot)

Ce test a été mis au point par W. Schulz-Schaeffer et son équipe sur des tissus de patients atteints de MCJ sporadique ainsi que sur des animaux ayant la tremblante ou l'ESB. L'objectif est de combiner certains aspects techniques particuliers de l'IHC avec une technique d'histoblot afin d'augmenter la sensibilité tout en préservant les détails anatomiques (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

a) Principe du PET-Blot

Le PET-blot se réalise sur des cerveaux fixés au formol, et plus particulièrement sur les obex, coupés dans un premier temps en blocs de 2mm. Ces blocs sont décontaminés par une solution d'acide formique concentrée afin de diminuer la pathogénicité du prion. Ils sont ensuite refixés au formol pour être finalement enrobés de paraffine (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

Des coupes de 5 à 7 µm sont ensuite réalisées grâce à un microtome. Elles sont collectées sur une membrane de nitrocellulose, puis asséchée pour permettre l'adhésion entre les deux éléments. Les coupes sont alors déparaffinées, puis les membranes sont séchées et peuvent être stockés plusieurs mois à température ambiante sans affecter la qualité du résultat ultérieur (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

Une fois les coupes préparées, la technique du PET-Blot peut être mise en place. Elle débute par une humidification suivie d'une digestion à la protéinase K à concentration élevée pour détecter uniquement la PrPres. Un tampon spécial permet l'attachement des protéines à la membrane de nitrocellulose. Les protéines sont dénaturées par de l'isothiocyanate de guanidine. Après rinçage, les membranes sont placées en incubation dans une solution bloquante (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

Viennent alors les étapes d'immunodétection. Plusieurs Ac monoclonaux primaires peuvent être employés : 3F4, Göl 38, 3B5 et 12F10. Puis on a recours à un Ac secondaire anti-souris de lapin marqué à la phosphatase alcaline. La réaction immunologique est alors révélée et la coupe observée au microscope (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

b) Résultats du PET-Blot – comparaison avec l'IHC

Elle a été réalisée à partir de 24 patients atteints de MCJ sporadique. On constate que le PET-Blot permet de conserver les détails anatomiques et d'améliorer la coloration de la PrPres. Ainsi le PET-Blot permet de détecter du prion dans le cortex, les ganglions basaux, le tronc cérébral et certaines aires telle l'olive inférieure alors que l'IHC conventionnelle n'apporte aucun résultat concluant sur ces zones (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

Ainsi sur la figure 14, on constate avec l'IHC (A) une coloration foncée péricellulaire alors que le PET-Blot (B) accentue ces dépôts péricellulaires et révèle en plus de discrets dépôts granuleux dans les couches basses.

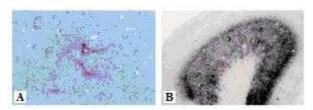


Figure 14 : IHC et PET-Blot de néocortex d'un patient atteint de MCJ (d'après Schulz-Schaeffer W. et al., 2000) A : IHC avec l'Ac primaire 3F4, grossissement x 400 B : PET-Blot avec l'Ac primaire 3F4, grossissement x 50

L'utilisation de grossissement moindre avec le PET-Blot permet une meilleure représentation anatomique. Par contre, le PET-Blot à l'inverse de l'IHC ne permet pas d'obtenir des détails à l'échelle cellulaire sur la localisation des dépôts et le type de ces derniers.

Dans certains cas où l'IHC ne permet pas d'observer des dépôts suffisants de PrPsc et où le diagnostic se réalise alors sur l'observation de vacuoles dans le cerveau, le Pet-Blot peut être une technique intéressante et plus précise que l'IHC (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

c) Intérêt du PET-Blot

Le PET-Blot est une combinaison de techniques préexistantes afin d'améliorer la sensibilité du résultat par rapport à ces dernières. Il apporte aussi une résolution anatomique très satisfaisante sauf à l'échelle cellulaire où l'IHC reste plus intéressante. Il peut être appliqué à des tissus fixés par le formol ou inclus en paraffine. Le principal intérêt est que ce test permettrait de faciliter le diagnostic des cas précliniques ou des stades cliniques précoces. Par contre, c'est une technique très longue ne pouvant s'appliquer au dépistage de masse (Schulz-Schaeffer W. et al, 2000).

Sa sensibilité supérieure et son excellente spécificité en font un test de confirmation intéressant ou un outil pour la recherche et l'expérimentation. Ce test reste actuellement en retrait dans les laboratoires par rapport au WB et à l'IHC dans le cadre du diagnostic.

D) Western blot (WB)

1) Principe du Western blot

Un des premiers Western blot pour le diagnostic de l'ESB est proposé par J. Katz et son équipe. Il permet la détection de la PrPres sur un homogénat de cerveau traité avec de la protéinase K (Katz J. et al., 1992). Ce test est similaire à la détection des SAF et aboutit à des résultats identiques sous une pésentation différente (Scott A. et al., 1990). On observe les agrégats de PrPres après électrophorèse plutôt qu'au microscope électronique.

Actuellement, c'est une méthode largement validée et utilisée. Le WB permet de différencier les différents types de PrPres par l'analyse des masses moléculaires et l'abondance des différentes formes de glycosylation. De plus, sa réalisation est plus rapide que l'IHC et nécessite moins de technicité dans la lecture des résultats. Il peut être également réalisé sur des prélèvements autolysés.

Pour le Western blot, comme pour l'IHC, il existe de nombreux protocoles. Celui décrit ci-dessous correspond au protocole de l'AFSSA Lyon utilisé jusqu'en 2003 et qui sera ensuite remplacé par le protocole validé dans la deuxième partie de ce travail. Un résumé de ce protocole est proposé ci-dessous. Le protocole détaillé se retrouve dans l'annexe 3.

Un homogénat de tissu cérébral à 10% est réalisé auquel on ajoute ensuite la protéinase K à 10µg/mL pendant 1h à 37°C. Une ultra-centrifugation sur un coussin de sucrose 10% permet de concentrer la forme insoluble de la PrP dans l'échantillon et de retirer les débris cellulaires. L'utilisation d'une solution tampon permet de linéariser et d'homogénéiser les charges de toutes les PrPres pour la réalisation de l'électrophorèse. Celleci s'effectue sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées à une membrane de nitrocellulose (Arsac J.-N. et al., 2007).

Viennent alors les étapes de la révélation selon le principe de la figure 15. La membrane est saturée par une solution de blocage riche en protéines. Puis on fait agir un premier Ac qui est un Ac de souris monoclonal anti-PrP tel le SAF84 ou le Sha31. Historiquement, on avait recours à un antiserum de lapin dit RB1. Le second Ac anti-souris est couplé à un conjugué marqué par une peroxydase. La PrPres est révélée par action d'un substrat ECL (Electro ChimiLuminescence) sur l'enzyme. Le signal peut être visualisé par impression sur un film autoradiographique ou directement à l'aide d'un analyseur d'images (Arsac J.-N. et al., 2007).

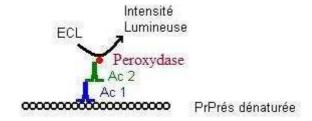


Figure 15: Méthode de révélation du WB à l'AFSSA Lyon (d'après Arsac J.-N. et al., 2007).

2) Influence de l'état des prélèvements

M. Chaplin et son équipe ont cherché à mettre en évidence l'influence de prélèvements autolysés ou congelés sur le Western blot. Pour ce faire, ils ont utilisés 29 échantillons de tissus nerveux positifs confirmés en histologie dont 12 cas d'ESB chez des bovins et 17 cas de tremblante des petits ruminants. De plus, 3 moutons sains et 4 vaches saines ont été ajoutés à l'expérimentation (Chaplin M. et al., 2002).

Pour chaque animal, 4 régions différentes ont été analysées : le cervelet, la moelle allongée, le cortex cérébral frontal et le cortex cérébral occipital. Un des aliquots est congelé à -70°C et les autres sont soumis à un régime d'autolyse de 3 à 7 jours à 25°C ou 37°C. Puis le WB selon la méthode de Prionics-Check test est appliqué. La PrPres a pu être détectée correctement par le WB (Chaplin M. et al., 2002).

Par contre, l'étude d'E. Monleón réalisée avec des prélèvements en état d'autolyse sévère, état quasi-liquéfié, aboutit à de faux-négatifs avec le WB de Prionics. Seule une concentration du prélèvement suivie d'une absence de digestion à la protéinase K permet de conclure correctement (Monleón E. et al., 2003).

E) Tests rapides

1) Principe des tests rapides approuvés par l'Union Européenne

La plupart des tests rapides sont basés sur les différences physico-chimiques des 2 isoformes PrPsens et PrPsc. Dans la majorité des cas, la différence exploitée concerne la résistance aux protéases avec ensuite révélation de la protéine tronquée par des Ac anti-PrP.

Ces tests dits rapides permettent un diagnostic en moins de 24h et bien souvent en quelques heures et peuvent être appliqués à un grand nombre d'échantillons. Ils sont intéressants pour le dépistage de masse. Pour être utilisés en France, ces tests doivent subir une évaluation et être ensuite approuvés par l'Union Européenne. Treize tests ont été évalués par l'EFSA et approuvés par l'Union Européenne (Commission Regulation No 21/2008), mais depuis 2009, l'Union Européenne n'autorise le recours qu'à neuf de ces tests présentés dans le tableau 6 (Commission Regulation No 162/2009).

L'ensemble de ces tests repose sur deux prinicipes : soit un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays), soit un Western blot. Ils sont appliqués sur un prélèvement d'obex, tissu potentiellement le plus riche en PrPsc, dans le cadre du dépistage systématique et sont donc tous réalisés en post-mortem.

Tableau 6 : Principes et caractéristiques des tests rapides pour la détection de l'ESB approuvés par l'Union Européenne

(d'après European Commission, 1999 ; EFSA scientific report, 2005 ; EFSA scientific report⁽²⁾, 2004 ; EFSA scientific report 2002 ; Commission Regulation No 21/2008 ; Commission Regulation No 162/2009 ; EFSA scientific opinion 2009)

Nom du test	Principe du test	Approbation	Sens.	Spé.	Détect.
Bio-Rad TeSeE	ELISA Sandwich	En 2001	100 (99)	100 (99,7)	1:64
Enfer Test v 2 .0	ELISA indirect de chemiluminescence	En 2001	100 (99)	100 (99,7)	1:128
Prionics-Check western test	Western Blot	En 2001	100 (99)	100 (99,7)	1:512
Prionics-Check LIA	ELISA Sandwich par luminescence	En 2003	100 (98,0)	97,9 (90,1)	1:240
Beckman Coulter InPro CDI kit	ELISA Sandwich	En 2003	100 (98,6)	100 (99,97)	
Enfer TSE kit version 2.0 automatisé et Enfer TSE version 3	ELISA indirect de chemiluminescence (version automatisé)	En 2005	100 (98,5)	100 (99,97)	1:64
CediTect BSE test	ELISA de chemiluminescence sur filtre PVDF	En 2005	99,5 (97,7)	100 (99,97)	
IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit (EIA)	ELISA par capture antigénique	En 2005	100 (98,5)	99,99 (99,95)	1:1024
Institut Pourquier Speed'it BSE	ELISA de chemiluminescence	En 2005	100 (98,5)	100 (99,97)	
Prionics-Check PrioSTRIP	ELISA sandwich	En 2005	100 (98,5)	100 (99,97)	1:256
Roboscreen Beta Prion BSE EIA test kit	ELISA	En 2005	100 (98,5)	100 (99,97)	1:256
Roche Applied Science PrionScreen	ELISA sandwich	En 2005	100 (98,5)	100 (99,97)	1:128
Fujirebio FRELISA BSE post-mortem rapid BSE Test	ELISA par capture antigénique	En 2005	100 (98,5)	99,92 (99,86)	

En gras les tests actuellemet autorisés et en italique ceux interdits depuis 2009

Sens. : sensibilité en pourcentage pour l'ESB **Spé.** : spécificité en pourcentage pour l'ESB (...) : intervalle de confiance à 95% pour la sensibilité et la spécificité

Détect.: limite de détection ; n. i. : résultat non interprétable en raison de faux positifs

2) Description des tests rapides approuvés en 2001

Pour la première campagne d'évaluation lancée en 1999, quatre tests ont été soumis et seulement trois approuvés par l'Union Européenne. L'évaluation s'est déroulée sur 1300 prélèvements dont 300 cas d'ESB issus d'animaux présentant des signes cliniques (European Commission, 1999). De plus, une détermination du seuil de détection est réalisée.

Pour les trois tests approuvés, la sensibilité est comprise entre 99 et 100% et la spécificité entre 99,7 et 100%. Il est donc possible d'obtenir des résultats faussement positifs ou négatifs. Mais la valeur prédictive positive (VPP) du résultat positif est très faible (0,000209) et la valeur prédictive négative (VPN) d'un résultat négatif est élevée (0,999999). Donc, la probabilité de conclure à tort qu'un animal est infecté (1-VPP) est très élevée. Inversement, la probabilité de conclure à tort qu'un animal est indemne (1-VPN) est très faible. Ces résultats permettent de fournir le maximum de garantie au consommateur et explique le fait que tout résultat positif doit être soumis à un test de confirmation.

a) Bio-Rad TeSeE dit Platelia test ou ancien test CEA

Ce test français est commercialisé sous le nom de Platelia BSE et consiste en un ELISA sandwich. La première étape correspond à une dénaturation par la protéinase K qui permet d'éliminer la PrPsens puis en une étape de concentration. Ensuite, pour la révélation de la PrPres, deux Ac monoclonaux sont employés. Ce test nécessite moins de 24h pour être réalisé et le temps peut être optimisé à l'aide d'automates pour atteindre moins de 6h (European Commission, 1999).

b) Enfer Test

Ce test irlandais est un ELISA de chemiluminescence réalisé en 4h. Il se déroule sur le surnageant obtenu après homogénéisation et centrifugation d'un fragment de SNC. Il consiste en une extraction rapide faisant intervenir la protéinase K couplée à une technique d'ELISA ayant recours à un sérum polyclonal comme source primaire d'Ac. Le second Ac porte le système de détection enzymatique de chemiluminescence (European Commission, 1999).

c) Prionics-Check western test

Ce test Suisse se réalise sur un échantillon homogénéisé de 0,5g de tissu nerveux de la moelle rostrale qui est ensuite digéré par la protéinase K. Ce dernier est ensuite bouilli en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Après la migration, les protéines sont transférées à une membrane et la PrPres est détectée avec l'Ac monoclonal 6H4 par chemiluminescence (Cooley W. et al., 2001). Il nécessite 6 ou 8 heures pour être réalisé et peut traiter 200 échantillons à la fois (European Commission, 1999).

3) Description des tests rapides approuvés en 2003

Une seconde campagne d'évaluation a été lancée en 2002 sur cinq tests. Deux d'entre eux ont été retenus par l'Union Européenne et finalement un seul est utilisable depuis 2009.

Dans un premier temps, cette évaluation s'est déroulée sur un nombre d'échantillons plus faible c'est-à-dire sur 200 prélèvements de tronc cérébral, dont 48 bovins atteints d'ESB clinique (EFSA Scientific report, 2002). A cette première étape, est ajoutée une détermination du seuil de détection. Puis dans un second temps, les tests sont évalués par des essais terrains afin de comparer leurs performances par rapport aux tests déjà approuvés. Les tests sont soumis à une évaluation sur 10 000 échantillons négatifs consécutifs issus des abattoirs et 200 prélèvements positifs (EFSA scientific report ⁽¹⁾, 2004).

Prionics-Check LIA (Luminescence ImunoAssay)

C'est un test consistant en un dosage ELISA sandwich par luminescence après digestion à la protéinase K de 0,5g de tissu nerveux issu de l'obex. Ce test ne nécessite pas de stade de centrifugation. La révélation se réalise avec l'intervention de deux anticorps monoclonaux. Après la phase de préparation, ce test peut être automatisé et ainsi traiter 240 échantillons homogénéisés en 4h30 (Prionics ⁽¹⁾, 2010).

4) Description des tests rapides approuvés en 2005

Une troisième campagne de validation de test s'est déroulée en 2004. Dix tests y ont participé, sept ont été retenus dans un premier temps, puis un huitième test a été ensuite approuvé. Suite à la révision de la liste des tests rapides par la Commission Européenne, seuls cinq tests sont encore autorisés.

Cette campagne s'est effectuée comme la précédente avec d'abord une première phase sur un faible nombre d'échantillons, 150 négatifs et 50 positifs et détermination du seuil de détection. Puis dans un second temps, les essais terrains sont réalisés sur 10 000 échantillons négatifs et 200 positifs (EFSA scientific report ⁽²⁾, 2004).

a) Enfer TSE kit version 2.0 et enfer TSE version 3

Ce test irlandais est basé sur le même principe que l'Enfer TSE. La société productrice a développé une méthode automatisée de préparation des échantillons. De telles modifications dans le protocole du test à conduit l'Union Européenne a réévalué le test (EFSA scientific report ⁽²⁾, 2004).

L'Enfer TSE version 3 utilise une succession de solutions tampons appliquées à l'échantillon. La première permet de solubiliser les deux formes de la protéine prion. La seconde est appliquée sur le surnageant obtenu après homogénéisation et centrifugation et permet une extraction de la PrPres grâce à la protéinase K. La troisième révèle les épitopes de la PrPres. Puis la révélation par ELISA est effectuée (Enfer scientific, 2010).

b) IDEXX HerdChek BSE Antigen Test Kit (EIA)

Ce test américain est un EIA (Enzyme ImmunoAssay) qui utilise un polymère chimique pour capturer sélectivement la PrPres ce qui permet d'ôter l'étape de digestion à la protéinase K (Commission regulation No 162/2009)

0,25g à 0,35g de tissu sont homogénéisés puis appliqués pendant 2-3 heures sur une plaque contenant le Seprion ligand. La PrPres se fixe sur ces ligands immobilisés. Après un

lavage retirant la PrPsens, la détection se réalise grâce à un Ac monoclonal couplé à une peroxydase de raifort et dirigé contre les régions conservées de la PrPres. Une coloration se développe lors de l'ajout du substrat pour la peroxydase (Leathers V. et al, 2005).

c) Prionics-Check PrioSTRIP

Ce test Suisse est un ELISA sandwich dont la capture de l'Ac est particulière. Il nécessite un traitement des échantillons de 0,5g de tissu nerveux avec la protéinase K. Puis, ces derniers sont mélangés à un premier Ac monoclonal de capture de la PrPres conjugué à des billes de latex bleue. Une bandelette de nitrocellulose contenant l'Ac monoclonal de révélation est plongée dans le mélange précédent et une bande colorée, en plus de celle témoin, y apparaît lors de résultat positif. Ce test s'effectue en 20 minutes après la digestion réalisée et la lecture peut être automatisée (Prionics (2), 2010).

d) Roboscreen Beta Prion BSE EIA test kit

Ce test allemand est très classique. Une première étape consiste en la digestion du prélèvement par la protéinase K puis par une révélation à l'aide de deux Ac monoclonaux. Ces derniers sont dirigés contre deux épitopes présentés lors du déroulement et de l'étalement de la PrPres (Commission regulation No 162/2009).

e) Roche Applied Science PrionScreen

Ce test, également allemand, est un ELISA permettant la detection de la PrPres, après digestion par la protéinase K, sur des microplaques couvertes de streptavidine (EFSA scientific report ⁽²⁾, 2004).

F) Autres tests

1) Le dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFIA)

C'est une immunoessai par fluorescence avec l'utilisation de deux concentrations distinctes d'hydrochlorite de guanidine (GnHCl) pour extraire séquentiellement les deux isoformes de la PrP. Ainsi, le recours à la protéinase K n'est pas nécessaire (Meyer R. et al., 1999; Barnard G. et al., 2000). En effet, avec une concentration de 2M de GnHCl, on extrait la PrP soluble et à une concentration de 6M, on extrait une PrP moins soluble qui est corrélée à l'apparition de la maladie (Dabaghian R. et al., 2006).

Le pourcentage de cette forme insoluble devient un paramètre mesurable, indépendant de la concentration en prion (Barnard G. et al., 2000). On calcule, pour ce faire, le ratio entre la PrP moins soluble et la PrP soluble. L'essai est sensible avec une limite de détection de 10 pg/mL de PrP (Dabaghian R. et al., 2006).

Ce test peut être automatisé et correspondre à un test rapide. Il a d'ailleurs participé à la campagne d'évaluation de 2001, présenté par PerkinElmer Life Sciences, mais l'EFSA a refusé actuellement ce test qui reste moins sensible et moins spécifique que ceux déjà approuvés (EFSA scientific report, 2002).

Un autre intérêt de ce test, de part sa sensibilité pour de faibles quantités de PrPres, serait sa réalisation sur des tissus périphériques tels la rate ou les amygdales pour obtenir ainsi un diagnostic précoce et ante-mortem (Dabaghian R. et al., 2006).

2) Le conformation-dependent immunoassay (CDI)

Ce test à été développé par l'université californienne de San Francisco avec la participation de S. Prusiner et J. Safar. Il ne fonctionne pas sur le même principe que les autres tests rapides qui recherchent la PrPres après digestion à la protéinase K. Il est basé sur la capacité de certains anticorps à réagir avec la PrPsens ou la PrPsc mais pas les deux. On parle d'immunoessai dépendant de la conformation (CDI) (Safar J. et al., 1998).

L'Ac a pour cible spéciale une portion de la protéine qui n'est accessible que dans une seule conformation et qui ne peut pas se fixer dans une autre conformation. Ainsi il n'y a plus besoin d'avoir recours à la protéase. Enlever cette étape permet de conserver la PrP* sensible aux protéases et donc d'éviter de sous estimer la quantité de PrPsc (on pense réaliser une sous-estimation de 90% lors de digestion à la protéinase K) (Prusiner S., 2004).

La mesure du taux de PrPsc s'effectue en comparant le signal obtenu après dénaturation et sans dénaturation de l'échantillon. Pour ce faire on établit le ratio entre les Ac fixés sur la PrPsc et sur la PrPsens. Ce ratio est fonction de la concentration en PrPsc (Safar J. et al., 1998).

Le CDI permet ainsi de détecter de très faibles quantités de PrPres et révèle la quantité de prion pathogène présent dans l'échantillon sans avoir besoin de dégrader au préalable la PrPsens. Elle informe les experts sur le niveau d'infection de l'animal en moins de 5 heures (Prusiner S., 2004). S. Prusiner émet l'hypothèse que le CDI pourrait fonctionner sur des prélèvements sanguins puisqu'il permet de détecter de très faible quantité de PrPsc (Prusiner S., 2004) mais pour le moment aucune validation officielle n'a été réalisée.

Ce test a été commercialisé sous le nom de Beckman Coulter inPro CDI kit ou ancien InPro CDI 5. Il a été approuvé en 2003 par la commission européenne (EFSA scientific report, 2002) mais depuis 2009, il est retiré de la liste des tests autorisés suite à l'arrêt de sa commercialisation (Commission Regulation No 162/2009).

3) Le laser-induced fluorescence immunoassay (LIFIA)

Cette technique correspond à un immunoessai sandwich basé sur des billes magnétiques spécifiques. Il peut être couplé à une spectrofluorométrie réalisée par une fluorescence induite par un laser équipé d'hélium et de néon pour détecter les anticorps (Kim J.-I. et al., 2005).

A partir des homogénats de tissus cérébraux, la PrPsc est extraite grâce à la digestion à la protéinase K et à des centrifugations. La révélation se réalise par deux anticorps : l'un deux dits de capture est couplé à de la biotine sur laquelle vient se fixer de la streptavidine conjugué à des billes magnétiques et l'autre dit de détection possède un marqueur fluorescent (Figure 16). L'application d'un champ magnétique permet d'isoler la PrPsc conjuguée par le biais des Ac de capture aux billes magnétiques. La révélation se fait par lecture de la fluorescence (Kim J.-I. et al., 2005).

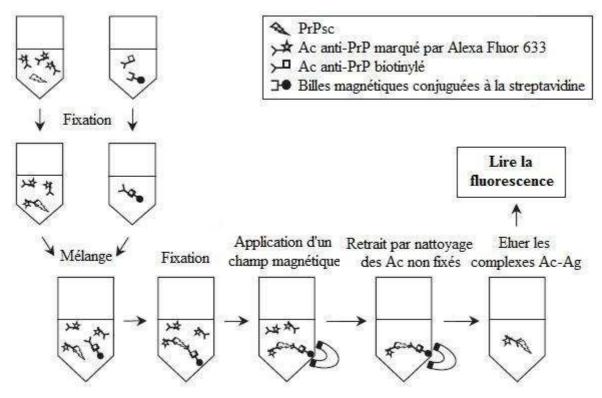


Figure 16: Protocole du LIFIA (d'après Kim J.-I. et al., 2005).

Un ratio est établi par rapport au signal de base et lorsque celui-ci est supérieur à 1.1, le résultat est positif. Ce test est hautement spécifique et sa sensibilité est similaire au Western blot (Kim J.-I. et al., 2005).

Ce test peut être effectué sur d'autres tissus que les tissus cérébraux. En effet, l'étude de J.-I. Kim révèle une spécificité de 100% sur les nœuds lympahtiques de cervidés atteints de maladie du dépérissement chronique (Kim J.-I. et al., 2005).

4) Les aptamères

Les aptamères correspondent à des molécules d'ADN ou d'ARN qui se fixent spécifiquement sur des protéines cibles. Elles permettent de combler le manque d'Ac spécifique de la PrPsc et sont des molécules très spécifiques (Weiss S. et al., 1997).

S. Weiss et son équipe ont identifié in vitro plusieurs aptamères capables de se fixer sur la PrPsens au niveau N-terminal et qui ne peuvent se fixer sur la PrPsc. D'autres aptamères pourraient permettre d'identifier les agrégats amyloïdes ou les plaques fibrillaires de PrPsc (Weiss S. et al., 1997).

5) Le multi-spectral ultraviolet fluorescence spectroscopy (MUFS)

La spectroscopie par fluorescence multi-spectrale des ultra-violets identifie les protéines par un spectre d'émission fluorescent spécifique de la PrPsc lors d'excitation aux ultraviolets. Ainsi l'étape de préparation des échantillons par la digestion à la protéinase K ainsi que les étapes de fixations des Ac sont abolies. De plus, ce test permet non seulement de différencier la PrPsens et la PrPsc mais aussi différentes souches de PrPsc. Mais le MUFS, qui fut décrit en 1998, est pour le moment un test non développé (Rubenstein R. et al., 1998).

6) Le confocal dual-color fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

Le FCS reconnaît la fluorescence des molécules passant dans un rayon laser excitant. A l'aide d'un microscope à grande ouverture, les photons émis sont dirigés vers un compteur à photons. L'échantillon doit subir une étape de préparation préalable qui consiste en la fixation d'un Ac fluorophore spécifique des agrégats de PrPsc (Bieschke J. et al., 2000 ; Giese A. et al., 2000).

Cette méthode est très rapide, ne nécessite qu'une faible quantité d'échantillon et est réalisable sur le LCR. Mais actuellement ce test n'est pas encore validé bien que les premiers résultats révèlent une sensibilité supérieure au Western blot (Bieschke J. et al., 2000).

G) Recherche de la PrPsc dans d'autres tissus que le système nerveux central et test ante-mortem

La PrPsc se retrouve à des taux très faibles dans les fluides corporels et dans les tissus lymphoïdes, ce qui pose depuis longtemps des problèmes concernant sa détection. Pour augmenter la sensibilité des tests, elle doit être d'abord concentrée. Différentes méthodes existent à ce jour dont la Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) mise au point par C. Sotto et son équipe (Sakudo A. et al., 2007).

Les tests réalisés sur le sang, les urines ou les tissus lymphoïdes ne peuvent s'appliquer à l'ESB de part la pathogénèse de la maladie où le transport de la PrPsc de la porte d'entrée au système nerveux central s'effectue par voie nerveuse (Terry L. et al., 2003). Dans les maladies à prion où la pathogénèse est marquée par un lymphotropisme plus important, comme la tremblante (Aguzzi A. et al., 2004) et le vMCJ (Hilton D., 2006), des test sur d'autres tissus que le cerveau sont envisageables.

1) La PrPsc dans le sang et le capillary immunoelectrophoresis (CIE)

Le vMCJ peut se transmettre à partir de transfusion sanguine donc la PrPsc doit être présente au niveau sanguin (Llewelyn C. et al., 2004). Mais sa concentration est très faible et semble être principalement dans la fraction cellulaire du sang (Brown P. et al., 1998) et seul des tests très sensibles peuvent la détecter.

Pour la réalisation du CIE, le sang est prélevé sur tube EDTA et le plasma obtenu après centrifugation est oté. Le test implique ensuite une extraction par un solvant organique ainsi qu'une phase de concentration de la PrPsc. L'échantillon est digéré avec des DNases et

la protéinase K. Pour la révélation, on réalise une compétition pour la fixation d'un Ac par l'utilisation de peptides synthétiques correspondant à la partie N-terminale de la PrP et marqués par la fluorescéine. L'analyse s'effectue par une électrophorèse capillaire différenciant les peptides libres de ceux fixés à l'Ac et ayant recours à une détection par une fluorescence induite par un laser (Schmerr M. et al., 1999).

Le CIE a été testé sur des prélèvements sanguins d'ovins infectés âgés de 7 à 12 mois. La sensibilité obtenue était correcte et le CIE pourrait devenir un test rapide ante-mortem de détection préclinique. Mais pour améliorer le résultat obtenu, le protocole d'extraction ainsi que les conditions de réalisation de l'électrophorèse reste à améliorer (Jackman R. et al., 2006).

Par contre, une autre étude, réalisée sur des patients atteints de MCJ, montre que ce test n'est pas assez fiable pour établir un diagnostic à partir de prélèvement sanguin. En effet, une bonne spécificité est obtenue mais la sensibilité n'est que de 55% (Lourenco P. et al., 2006).

2) La PrPsc dans les urines et les fèces

La transmission horizontale du prion chez les cervidés et les ovins permet d'émettre l'hypothèse qu'il existe une matière infectieuse émise par ceux-ci et capable de contaminer les animaux entre eux. Le plus probable est que la protéine prion se transmet à partir des fèces ou des urines, voire de la salive.

- J. Safar et son équipe ont montré que les fèces étaient une matière virulente. Grâce au CDI, test très sensible, ils ont aussi mesuré le titre infectieux dans les fèces chez des hamsters inoculés oralement. Ainsi, ils observent un pic d'excrétion de PrPres dans les fèces entre 2 et 16 jours post-inoculation puis le taux décroit progressivement pour stagner à des niveaux très faibles (Safar J. et al., 2008).
- G. Shaked et ses collaborateurs ont révélé la présence d'une UPrPres dans les urines (Shaked G. et al., 2001). Par la suite, il a été identifié que le signal révélait la présence de protéines membranaires bactériennes résistantes à la digestion à la protéinase K. Ainsi la contamination bactérienne fausse la détection de la PrPsc et rend difficile un test applicable aux urines (Furukawa H. et al., 2004). De plus, Y. Murayama et son équipe ont évalué la présence de PrPsc dans les urines grâce à la technique de PMCA. Ils constatent alors que quelques jours après l'inoculation la PrPsc est détectée dans les urines mais à l'inverse dans les stades avancés la PrPsc n'est pas retrouvée de manière significative dans les urines (Murayama Y. et al., 2007). Il pourrait éventuellement s'agir d'une élimination par voie rénale de l'inoculum injecté.

Le développement de tests de plus en plus sensibles permet de retrouver la protéine prion dans des matières facilement collectables sur les animaux. Mais la mise au point de tests pouvant s'effectuer sur les urines et les fèces demande encore beaucoup de travail, surtout que l'excrétion dans ces matières semble être intermittente.

3) La PrPsc dans les tissus lymphoïdes

Lors d'études sur des moutons atteints de manière naturelle par la tremblante, il a été constaté que la PrPsc est détectable dans de nombreux tissus lymphoïdes dont la rate, les nœuds lympahtiques rétropharyngiens, les nœuds lymphatiques mésentériques et les amygdales. ce sont les amygdales qui possèdent la taux le plus élevés en PrPsc par rapport aux autres tissus lymphoïdes (van Keulen L. et al., 1996). De plus la biopsie d'amygdales est un acte assez aisé à réaliser en pratique. L'amygdale serait donc un tissu de choix pour la réalisation de test ante-mortem dans le cadre de la tremblante et du vMCJ. La biopsie réalisée est ensuite analysés par immunohistochimie afin de confirmer ou infirmer la présence de PrPsc.

Actuellement, bien que prometteur, la réalisation de ce test n'est pas validée en médecine humaine ou animale. En effet, il ne s'adresse dans le cadre de la médecine humaine qu'à un très faible pourcentage de la population atteint de maladie à prion puisque seuls les vMCJ peuvent être détectés. Un test positif permet une conclusion, mais un test négatif ne permet pas d'exclure une maladie à prion.

De même, chez l'homme, l'appendice est un tissu contenant de la PrPsc de manière inconstante chez les patients atteints de vMCJ (Joiner S. et al., 2002). Lors d'une appendicectomie, il a été possible de diagnostiquer un cas de vMCJ chez un patient en stade préclinique (Hilton D. et al., 1998). Mais à ce jour, aucun test de diagnostic n'a pu être validé à partir de cette structure anatomique.

H) Détection d'autres marqueurs des ESST et test ante-mortem

La PrPsc est détectée en faible quantité, dans la plupart des tissus et pour le vMCJ et la tremblante dans le sang, rendant difficile la réalisation de test ante-mortem. La recherche d'autres marqueurs des ESST est donc indispensable pour permettre l'élaboration de ces tests.

Les lésions dans les ESST affectent le système nerveux central. Les scientifiques se sont donc orientés vers la recherche de marqueurs de ces lésions cérébrales par l'intermédiaire de taux protéiques. Divers marqueurs ont été avancés comme l'énolase spécifique des neurones, la protéine S100b. Leur taux augmente en phase pré-clinique mais chute ou reste élevé lors de l'apparition des premiers signes cliniques (Jimi T. et al., 1992).

Mais la plupart des marqueurs connus à ce jour ne sont pas spécifiques des ESST et leur augmentation, ou diminution, peut être aussi observée dans les pathologies affectant le système nerveux central. Des combinaisons utilisant ces différents marqueurs permettent d'améliorer la suspicion et ces tests d'orientation diagnostique sont principalement employés chez l'homme. Ils ne sont pas adaptés aux bovins chez lesquels peu de données de comparaison sont disponibles. Le diagnostic définitif reste post-mortem.

1) Recherche de marqueurs dans le liquide céphalorachidien

a) La protéine 14-3-3

La protéine 14-3-3 est impliquée dans la transduction des signaux au niveau du SNC. Cette protéine se retrouve de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes dont les neurones et les cellules gliales.

Des tests réalisés sur 45 patients atteints de vMCJ et sur 34 patients sains ont permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'utilisation de cette protéine comme marqueur. Sa détection se réalise soit par une électrophorèse bidimensionnelle sur un gel SDS de polyacrylamide, soit par un Western blot avec révélation par chemiluminescence (Green A. et al., 2001).

Sur 22 patients parmi les 45 positifs, la protéine 14-3-3 est retrouvée et elle est aussi détectée sur 3 patients parmi les 39 sains (Green A. et al., 2001). La spécificité est de 96% avec un intervalle de confiance compris entre 95 et 99% (Hsich G et al., 1996). La valeur prédictive positive (VPP) est de 86% et la valeur prédictive négative (VPN) de 63% (Green A. et al., 2001). Chez les animaux, les résultats sont similaires, avec une sensibilité de 87% et une spécificité de 99% (Hsich G et al., 1996).

L'augmentation de cette protéine est aussi détectée chez des patients atteints de démence due à des encéphalites, des méningites et des myélites d'origine virale ou bactérienne mais aussi lors d'accidents vasculaires, de sclérose en plaques, de syndromes paranéoplasiques et de maladies mitochondriales (Hsich G et al., 1996).

Mais la protéine 14-3-3 ne peut servir de marqueur fiable dans les stades précliniques de la maladie et sa spécificité reste très controversée.

b) La protéine tau

La recherche de l'augmentation de la protéine tau se réalise par un ELISA et présente les mêmes avantages et limites que la détection de la protéine 14-3-3. Avec ce marqueur, pour une valeur seuil de 1300 pg/mL, la sensibilité est de 94% et la spécificité de 90% (Otto M. et al., 2002). La VPP est de 93% et la VPN de 81% (Green A. et al., 2001).

Bien souvent on réalise un couplage de la recherche de ces deux marqueurs pour améliorer la sensibilité et la spécificité du test. On obtient alors une VPP de 91% et à une VPN de 84% (Green A. et al., 2001).

c) La protéine S100b

La protéine S100 est une protéine de liaison du calcium dont l'hétérodimère S100b se retrouve au niveau des cellules gliales. Une concentration supérieure ou égale à 8 ng/mL dans le liquide céphalorachidien permet de différencier les ESST des autres affections nerveuses.

Cette protéine peut-être aussi recherchée dans le sérum comme le montre M. Otto et son équipe. Ils ont réalisé des travaux portant sur 224 patients atteints de démence dont 108 cas ont été confirmés ou fortement suspects d'être atteints de MCJ et 74 sont atteints d'une autre pathologie. De plus 35 patients sans symptômes ont servis de témoin (Otto M. et al., 1998).

La concentration de la protéine S100b dans le sérum est de 395 pg/mL en moyenne chez les 108 patients confirmés et suspects contre une concentration de 109 pg/mL en moyenne chez les 74 patients atteints d'une autre maladie. L'augmentation de la concentration en S100b dans le sérum est significative chez les patients atteints de MCJ par rapport aux autres malades avec un p=0,0001. En prenant comme valeur seuil 213 pg/mL pour statuer sur un résultat négatif ou positif, la sensibilité est de 77,8% avec un intervalle de confiance à 95% entre 68,8% et 85,2% et la spécificité est de 81,1% et l'intervalle de confiance à 95% est de 70,3% à 89,3% (Otto M. et al., 1998).

Cette protéine S100b semble être un marqueur intéressant permettant une orientation diagnostic précise. De plus sa détection sur sérum permet de réaliser des examens moins invasifs que la recherche dans le liquide cérébrospinal. Mais le diagnostic de certitude reste l'immunohistochimie ou la réalisation d'un Western blot (Otto M. et al., 1998).

d) L'énolase spécifique des neurones (ESN)

L'ESN s'élève dans le liquide cérébrospinal au fur et à mesure de la perte rapide des cellules nerveuses (Kropp S. et al., 1999). Cette élévation est donc constatée dans les ESST mais aussi lors de tumeurs cérébrales, d'infarctus ou de traumatismes.

La mesure quantitative de l'ESN corrélerait avec la progression de la maladie (Kropp S. et al., 1999). Une concentration supérieure à 25 ng/mL est en faveur d'un résultat positif pour la MCJ avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 91% (Beaudry P. et al., 1999).

Ce marqueur semble bien spécifique mais il a une très faible sensibilité. Il n'est pas intéressant par rapport aux autres marqueurs.

e) L'apoprotéine E (ApoE)

L'ApoE est produite par les astrocytes du SNC et jouerait un rôle dans la mobilisation et la redistribution des lipides lors de croissance et de réparation cellulaire. Elle est parfois retrouvée dans les dépôts de PrPres (Amouyel P. et al., 1994) et un article suggère son augmentation lors d'ESB. En effet, des niveaux élevés sont constatés dans le liquide cérébrospinal de bovins atteints d'ESB (Hochstrasser D. et al., 1997). Mais cette voie reste à explorer.

On peut également noter que cette protéine existe sous trois isoformes différents, chacun codé par un gène différent. Certains isoformes dont la forme epsilon 4 est plus souvent corrélée avec les maladies à prions que les autres isoformes (Amouvel P. et al., 1994), mais le rôle de cette protéine comme facteur de risque est très controversé.

2) Recherche de marqueurs dans le sang

a) Le DiaSpec's rapid ante mortem BSE test ou l'AquaSpec BSE rapid ante mortem test

Deux sociétés allemandes, Scil Diagnostics et DiaSpec, ont mis au point ensemble un test rapide ante mortem se réalisant sur du sérum de bovins et recherchant des traits caractéristiques associés à la maladie (EFSA scientific report, 2006).

Le prélèvement sanguin doit être réalisé sur un bovin âgé de plus de 24 mois, sans exposer le sang au CO₂. L'acheminement doit se faire dans la glace afin de limiter le degré d'hémolyse. Les prélèvements sont ensuite préparés puis injectés dans une cuvette à microflux de l'AquaSpec. Cette cuvette permet de réaliser des mesures reproductibles sur l'échantillon primaire. Ensuite l'analyse se fait par spectroscopie infrarouge modifiée par Fourier dans le milieu de la gamme infrarouge. On obtient ainsi un résultat en 1h. Après une première série d'évaluation, le test à été amélioré par un correcteur de pH afin d'augmenter sa spécificité (EFSA scientific report, 2006).

On obtient donc, après l'évaluation réalisée par l'EFSA, une sensibilité de 88,2% (74,4 à 95,7%) et une spécificité de 78,4% (de 74,3 à 82,3%). Par manque de spécificité et l'incohérence de certains résultats, l'EFSA ne recommande pas le recours à ce test ante mortem pour la réalisation de diagnostic. Mais, on peut noter la considérable avancée que ce test apporte au diagnostic ante mortem de masse (EFSA scientific report, 2006).

b) Les acides nucléiques

Par des études d'ARN réalisées par G. Miele et son équipe, un nouveau transcrit codant un facteur de différentiation des cellules érythroïdes (EDRF pour erythroïd differentiation related factor) a été identifié. Ce facteur s'exprime principalement dans les cellules de la lignée rouge et peut être recherché dans le sang ou la moelle osseuse et est détecté par un Northern Blot. L'EDRF diminue progressivement au cours du développement de la tremblante chez des souris et ce résultat est également constaté pour diverses ESST naturelles ou expérimentales (Miele G. et al., 2001).

Sur le même principe, des acides nucléiques cellulaires ont été identifiés dans le sérum de vaches atteintes d'ESB et il semblerait qu'il y ait une corrélation avec la progression de la maladie (Brenig B. et al., 2002).

3) Autres méthodes d'orientation diagnostic

a) L'électrocardiographie

Une signature des ESST est notée par une variation unique du rythme cardiaque dans les premiers stades de l'infection. Pour observer cette variation il faut réaliser un électrocardiogramme avec une haute résolution. Ainsi 150 vaches infectées expérimentalement avec l'ESB ont été testées. Une augmentation de l'arythmie sinusale respiratoire a été observée chez deux bovins qui ont succombés à la maladie 8 mois plus tard. (Austin A. et al., 1996).

b) L'électroencéphalogramme

Chez les patients atteints de MCJ, on constate après quelques temps d'évolution de la maladie, des anomalies électroencéphalographiques caractéristiques avec la présence de décharges périodiques bi- ou tri-phasiques. Ces anomalies sont présentes pendant quelques semaines puis disparaissent tandis que le tracé s'appauvrit progressivement (Jones D. et Nevin S., 1954). Mais elles ne sont constatées que chez 70% des cas des MCJ et principalement chez les patients atteints de MCJ sporadique ou secondaire à des greffes durales (Malin J. et al., 1987).

L'apparition de ces signes étant très précoces, ils sont intéressants pour l'orientation du diagnostic.

c) L'imagerie médicale

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) révèle une atteinte sévère des ganglions de la base relativement spécifique de la MCJ sporadique. A l'invers dans le vMCJ, on note plutôt une atteinte du pulvinar postérieur dans la région thalamique (Krasnianski A. et al.,

2004). L'IRM permet ainsi de différencier le vMCJ de la MCJ sporadique et des autres ESST. Mais c'est une technique tardive avec une sensibilité et une spécificité limitées. Et le principal intérêt de l'imagerie médicale reste pour écarter les autres affections du SNC comme cause de symptômes.

La combinaison de l'IRM avec l'électroencéphalogramme permet d'établir facilement un diagnostic de MCJ pour les neurologues expérimentés.

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

CONTRIBUTION A LA VALIDATION D'UN TEST DE CONFIRMATION NATIONALE DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE

I - Objectif

L'objectif de cette étude est de valider le test de Western blot Bio-Rad TeSeE® commercial en tant que test de confirmation français pour le diagnostic des maladies à prion bovines. Pour ce faire, nous avons comparé le Western blot TeSeE® au Western Blot de confirmation jusqu'alors utilisé. Par ailleurs, nous avons également comparé la sensibilité analytique du Western blot TeSeE® à celle des deux tests rapides de dépistage ayant démontrés la meilleure sensibilité analytique lors d'une évaluation européenne (TeSeE® ELISA et le HerdChek® BSE). En effet, avec la commercialisation des tests rapides de plus en plus sensibles, les tests de confirmation doivent eux aussi augmenter leur sensibilité afin d'apporter un résultat au moins aussi fiable que les tests rapides utilisés en première intention. Enfin, nous avons aussi pris en compte dans cette étude, la capacité du Western blot TeSeE® à diagnostiquer les deux formes atypiques de l'ESB : les variants H et L.

II - Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée sur 77 prélèvements d'obex de bovins collectés au cours de l'épidémiosurveillance passive et active en abattoir et à l'équarrissage durant le second semestre 2003. Chaque prélèvement reçu par l'AFSSA en 2003 était analysé par western blot et selon le résultat obtenu, une seconde méthode de confirmation par IHC était utilisée. Parmi ces cas, il a été diagnostiqué une ESB de type L et deux ESB de type H. L'ensemble des prélèvements et des tests réalisés en 2003 est reportés en annexe 2 et sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7: Echantillons utilisés pour l'étude et classés en fonction de leurs résultats pour le Western blot AFSSA et l'IHC, ainsi que les résultats obtenus avec le Western blot TeSeE® pour ces différentes catégories

Résultats et type d'analyse de confirmation en 2003	Nombre de cas	Résultats Western blot TeSeE®	
		Positif	Négatif
WB AFSSA positif (IHC non réalisé)	52	52	0
WB AFSSA négatif et IHC positive	5	2	3
WB AFSSA négatif (IHC non réalisé)	15	0	15
WB AFSSA négatif et IHC négative	5	2	3

Ces 77 cas dont 57 statués positifs et 20 statués négatifs ont donc été analysés avec le Western Blot TeSeE®.

Pour l'étude de la sensibilité comparée aux deux autres tests rapides, des séries de dilution ont été établies. Trois bovins positifs issus de prélèvement à l'abattoir, avec différents taux d'infectisosité (faible, moyen et fort), ont été sélectionnés pour la préparation des dilutions d'échantillons positifs. Un bovin âgé de moins de 24 mois a été utilisé au titre de témoin négatif.

Les protocoles détaillés concernant le Western blot AFSSA et le Western blot TeSeE® se retrouvent respectivement en annexes 3 et 4 de ce travail, et un récapitulatif rapide des principales étapes est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Récapitulatif des étapes comparées de la réalisation du Western blot AFSSA et du Western blot TeSeE®

	Purification Concentration	Electrophorèse	Révélation
Western blot AFSSA	 Homogénat à 10% Utilisation de protéinase K et de deux centrifugations 	Gel d'acrylamide SDS-PAGEMembrane de nitrocellulose	 1^{er} Ac : SAF 84 (sur aa 175-180) 2nd Ac couplé à une péroxydase Substrat ECL
Western Blot TeSeE®	Homogénat à 20% Utilisation de protéinase K et de deux centrifugations	Gel Criterion Bis-TrisMembrane PVDF hydrophobe	 1^{er} Ac : Sha31 (sur aa 156-163) 2nd Ac couplé à une péroxydase Substrat ECL

Pour les tests rapides TeSeE® ELISA et le HerdChek® BSE, les protocoles recommandés par les fabricants ont été suivis. Ils sont tous les deux réalisés sur un homogénat à 20% de cerveau dans une solution de glucose à 5%.

Pour le TeSeE® ELISA, une purification et concentration de la PrPres est réalisée. Les échantillons sont ensuite placés dans des plaques avec des microcuvettes et recouverts d'un anticorps monoclonal spécifique de la PrP. Après plusieurs lavages, le conjugué de cet

anticorps est ajouté et la révélation se fait par un signal coloré mesuré en densité optique dont l'absorbance est mesurée à 450 et 620nm.

Pour le HerdChek® BSE, les échantillons sont placés sur une plaque de travail contenant du diluant. Puis ils sont mis sur une plaque contenant un composé non biologique de capture de marqueurs des ESST et placés en incubation pendant deux heures à température ambiante. Après plusieurs lavages, les échantillons sont incubés avec un anticorps anti-PrP conjugué à la peroxydase de raifort. Le signal colorimétrique est mesuré par densité optique avec une absorbance à 450 et 620nm.

III - Résultats

1) Comparaison du Western blot TeSeE® et du Western blot AFSSA

Les résultats sont présentés dans le tableau 7 et en annexe 2 pour le détail de chaque prélèvement. On constate que le Western blot TeSeE® identifie comme positifs les 52 échantillons statués positifs en 2003 avec le Western blot de l'AFSSA. Pour les échantillons statués positifs après IHC, deux des cinq isolats sont identifiés positifs avec le Western blot TeSeE®. A l'inverse, deux échantillons, A et B, statués négatifs en 2003 après analyses par le Western blot AFSSA et l'IHC, sont identifiés comme positifs avec le Western blot TeSeE® avec la présence des trois glycoformes de la protéine sur la membrane de révélation selon la figure 17.

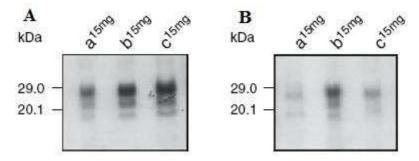


Figure 17 : Echantillons positifs (A et B) avec le Western blot TeSeE® qui était négatif avec le Western blot AFSSA (non représenté ici) et en IHC

a, b et c représentent le résultat dans trois régions différentes du prélèvement

On note également que le Western blot TeSeE® permet d'identifier trois formes d'ESST bovines comme on le constate sur la figure 18. On retrouve en particulier les différences de signature moléculaire décrites dans la littérature : un plus haut poids moléculaire pour la PrPres de l'ESB-H et une plus faible proportion de la forme biglycosylée de la PrPres de l'ESB-L, en comparaison à la PrPres identifiée lors d'un cas d'ESB classique.

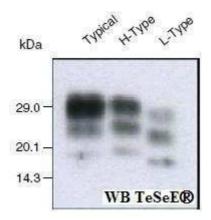


Figure 18 : Résultats des différentes souches d'ESB avec le test Western blot TeSeE®

Une des différences majeures entre le Western blot de l'AFSSA et le Western blot TeSeE® réside dans le choix de l'anticorps primaire. Comme il est décrit dans les protocoles en annexe, le Western blot AFSSA utilise l'anticorps monoclonal SAF84 et le Western blot TeSeE® l'anticorps monoclonal Sha31. L'influence de ces anticorps sur la sensibilité du test a été étudiée au cours de cette étude par l'utilisation d'une série de dix dilutions sur un cas de bovin positif et sur un bovin négatif. Une première comparaison s'effectue entre les deux tests sans modification du protocole puis en remplaçant l'anticorps SAF84 par le Sha31 dans le Western blot AFSSA.

On constate une différence de sensibilité de huit dilutions entre le Western blot AFSSA et le Western blot TeSeE® selon la figure 19. Quand le même anticorps primaire est utilisé, la différence de sensibilité n'est plus visible sur les films radiographiques de révélation (figure 19). Ainsi les méthodes d'extraction du Western blot de l'AFSSA et du Western blot TeSeE® donnent des résultats similaires et la différence de sensibilité résulte principalement dans le choix de l'anticorps primaire.

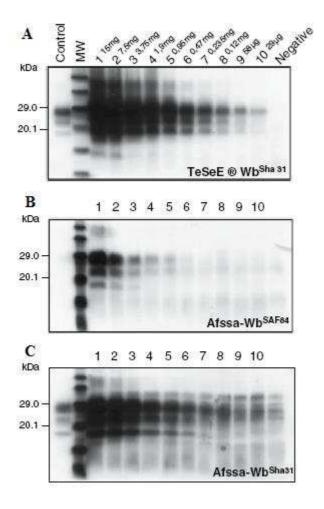


Figure 19: Série de dix dilutions d'un échantillon positif (colonnes 1 à 10) et un échantillon négatif analysé avec le Western blot TeSeE® (A), avec le Western blot AFSSA (B) et avec le Western blot AFSSA dont l'anticorps primaire a été remplacé par le Sha31 (C)

2) Comparaison du Western blot TeSeE® avec deux tests rapides très sensibles

La comparaison de la sensibilité de ces trois tests a été effectuée sur des dilutions de trois échantillons positifs de niveaux de positivité différents.

La sensibilité du Western blot TeSeE® est supérieure à celle du TeSeE® ELISA. En effet, le Western blot permet une détection jusqu'à des dilutions de 1:512 tandis que l'ELISA aboutit a un résultat positif jusqu'à une dilution de 1:32 (figure 20). De même, le HerdChek® est moins sensible que le Western blot TeSeE® puisqu'il ne permet de conclure à un résultat positif jusqu'à des dilutions 1:64 pour les mêmes échantillons (figure 20).

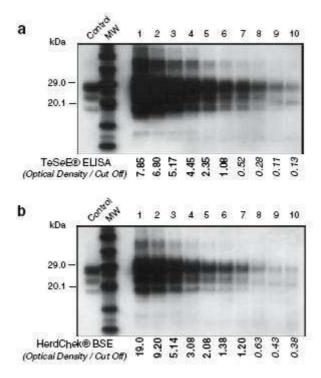


Figure 20 : Comparaison d'une série de dilution d'un échantillon positif entre le Western blot TeSeE® et le TeSeE® ELISA (a) et avec le HerdChek® BSE (b)

IV - Discussion

Depuis les années 1990, avec le développement des tests rapides afin de permettre d'analyser un grand nombre d'échantillons pour améliorer la sécurité alimentaire, la sensibilité et la spécificité des tests se sont accrues. Pour permettre la confirmation des échantillons positifs et douteux, les laboratoires ont développé des tests plus aisés à mettre en œuvre que l'histologie et ayant une bonne spécificité et sensibilité. C'est ainsi, qu'en France, à l'AFSSA-Lyon, a été développé un test Western blot de référence utilisé de 1998 à 2004.

Les avancés technologiques ont permis d'obtenir des tests rapides de plus en plus sensibles et les tests de confirmation ont dû suivre cette évolution. C'est pourquoi l'AFSSA-Lyon s'est tourné vers un test commercialisé par Bio-Rad, le Western blot TeSeE®, en tant que test de confirmation.

L'évaluation de ce test montre une sensibilité plus importante que le Western blot AFSSA et cette différence semble en grande partie liée au choix de l'anticorps primaire Sha31. Sa grande sensibilité et spécificité lui ont permis de diagnostiquer des cas positifs qui n'étaient pas diagnostiquables avec le Western blot AFSSA et même avec l'IHC. La qualité des images de Western blot TeSeE® est également supérieure au Western blot AFSSA en particulier sur les échantillons ayant une faible quantité de PrPres. Ainsi l'interprétation des résultats est meilleure avec ce test.

Ce test est également plus sensible que deux autres tests très sensibles commercialisés. Son emploi et donc intéressant dans le cadre d'un diagnostic de confirmation. L'intérêt porté sur ce test est aussi lié à sa capacité à diagnostiquer et à différencier les deux variants de l'ESB, différenciation indispensable pour permettre une interprétation du résultat au niveau épidémiologique.

Grâce à tous ces points forts, le Western blot TeSeE® est le test de confirmation actuel le plus intéressant. Il est donc mis en service au niveau de l'AFSSA-Lyon depuis 2004 et cette étude valide le recours à ce test en tant que test de confirmation.

Conclusion

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles sont des maladies neurodégénératives rares et qui demeurent par quelques aspects, encore mal connues. L'agent responsable, bien qu'actuellement discuté, semble correspondre à une forme pathologique (PrPsc) d'une protéine endogène : la protéine prion, en abrégé : PrPc ou PrPsens. De nombreux points de la pathogénie de ces maladies restent non élucidés et en particulier la conversion de la forme non pathogène en la forme pathogène.

L'encéphalopathie spongiforme bovine est une de ces maladies dites à prion qui a été largement médiatisée d'une part, par le nombre important de cas constatés dans les années 1990 et d'autre part, par sa transmission à l'homme sous forme d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Afin d'évaluer l'incidence de cette maladie et de protéger le consommateur en assurant l'innocuité des carcasses bovines, de nombreux tests de diagnostic se sont développés et en particulier les tests dits rapides permettant en quelques heures de tester un nombre d'échantillons considérables. Ces derniers sont très sensibles et très spécifiques et le test national de confirmation a également dû évoluer pour assurer un résultat au moins aussi sensible.

Dans cette étude, nous avons étudié l'aptitude du test Western blot TeSeE® de Bio-Rad en tant que test de confirmation pour l'AFSSA-Lyon, laboratoire français de référence. Nous avons démontré qu'il possède une sensibilité supérieure aux autres tests rapides actuellement commercialisés, que les résultats obtenus sont fiables et qu'il permet également de déceler les trois formes des encéphalopathies spongiformes bovines, à savoir l'ESB dite classique et les souches H et L.

Suite à cette étude et à la validation de l'emploi du test Western blot TeSeE® en tant que test de confirmation, ce dernier est actuellement utilisé depuis 2004 au sein de l'AFSSA-Lyon.

Le Professeur responsable de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon Vu : Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Par délégation

Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup Campus Vétérinaire

PR ANGELI KODJO

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 3 0 MARS 2010

Pour le Président de l'Université

-LANDROIS

Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,

Professeur F.N GILLY

Bibliographie

- **Abrial D., Calavas D., Jarrige N. et Ducrot C.**, Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the ban of meat and bone meal in cattle feed, Prev. Vet. Med., 2005, 67(1), 69-82.
- **Aguzzi A., Heikenwalder M. et Miele G.**, *Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases*, J. Clin. Invest., 2004, 114(2), 153-160.
- Alper T., Cramp W., Haig D. et Clarke M., Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?, Nature, 1967, 214, 764-766.
- **Alper T.**, The scrapie enigma: insights from radiation experiments, Radiat. Res., 1993, 135(3), 283-292.
- Amouyel P., Vidal O., Launay J.-M. et Laplanche J.-L., The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease; The French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies, Lancet, 1994, 344(8933), 1315-1318.
- Aronoff-Spencer E., Burns C., Avdievich N., Gerfen G., Peisach J., Antholine W., Ball H., Cohen F., Prusiner S. et Millhauser G., Identification of the Cu2+ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy, Biochemistry, 2000, 39(45), 13760-13771.
- Arsac J.-N., Biacabe A.-G., Nicollo J., Bencsik A. et Baron T., Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle, Acta Neuropathol, 2007, 114(5), 509-516.
- **Austin A., Meek S., Webster S. et Pomfrett C.**, *Heart rate variability in BSE*, Vet. Rec., 1996, 139(25), 631.
- **Baker H., Ridley R. et Wells G.**, Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset, Vet. Rec., 1993, 132(16), 403-406.
- Barnard G., Helmick B., Madden S., Gilbourne C. et Patel R., The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE, Luminescence, 2000, 15(6), 357-362.
- Baron T., Bencsik A., Biacabe A.-G., Morignat E. et Bessen R., Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model, Emerg. Infect. Dis., 2007, 13(12), 1887-1894.
- Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Wälchli M., Groth D., McKinley M., Prusiner S. et Weissmann C., Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene, Cell., 1986, 46(3), 417-428.
- Beaudry P., Cohen P., Brandel J.-P., Delasnerie-Lauprêtre N., Richard S., Launay J.-M. et Laplanche J.-L., 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease, Dement. Geriatr. Cogn. Disord., 1999, 10(1), 40-46.
- Beekes M., Baldauf E., Cassens S., Diringer H., Keyes P., Scott A., Wells G., Brown P., Gibbs Jr. C. et Gajdusek D. C., Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method, J. Gen Virol., 1995, 76(10), 2567-2576.

- Bencsik A., Debeer S. et Baron T., An alternative pretreatment procedure in animal transmissible spongiform encephalopathies diagnosis using PrPsc immunohistochemistry, J. Histochem. Cytochem., 2005, 53(10), 1199-1202.
- Béringue V., Bencsik A., Le Dur A., Reine F., Laï T.-L., Chenais N., Tilly G., Biacabe A.-G., Baron T., Vilotte J.-L. et Laude H., Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy, PLoS Pathog., 2006, 2(10), e112.
- Béringue V., Herzog L., Reine F., Le Dur A., Casalone C., Vilotte J.-L. et Laude H., *Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein*, Emerg. Infect. Dis., 2008, 14(12), 1898-1901.
- **Biacabe A.-G., Jacobs J., Bencsik A., Langeveld J. et Baron T.,** H-type bovine spongiform encephalopathy: complex molecular features and similarities with human prion diseases, Prion, 2007, 1(1), 61-68.
- **Biacabe A.-G., Laplanche J.-L., Ryder S. et Baron T.**, *Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases*, EMBO Rep. 2004, 5(1), 110-115.
- Bieschke J., Giese A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I., Poser S., Eigen M. et Kretzschmar H., Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(10), 5468-5473.
- Billinis C., Panagiotidis C., Psychas V., Argyroudis S., Nicolaou A., Leontides S., Papadopoulos O. et Sklaviadis T., Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie, J. Gen. Virol., 2002, 83, 713-721.
- Bolton D., Bendheim P., Marmorstein A. et Potempska A., Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein, Arch. Biochem. Biophys., 1987, 258(2), 579-590.
- **Bolton D., McKinley M et Prusiner S.**, *Identification of a protein that purifies with the scrapie prion*, Science, 1982, 218(4579), 1309-1311.
- **Bolton D., McKinley M. et Prusiner S.**, *Molecular characteristics of the major scrapie prion protein*, Biochemistry, 1984, 23(25), 5898-5906.
- **Bolton D., Meyer R. et Prusiner S.**, *Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein*, J. Virol., 1985, 53(2), 596-606.
- Borchelt D., Scott M., Taraboulos A., Stahl N. et Prusiner S., Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells, J. Cell. Biol., 1990, 110(3), 743-752.
- **Bosque P. et Prusiner S.**, Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection, J. Virol., 2000, 74(9), 4377-4386.
- **Bradley R. et Wilesmith J.**, *Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy* (*BSE*), Br. Med. Bull., 1993, 49(4), 932-959.
- **Bradley R.**, *Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the current situation and research*, Eur. J. Epidemiol., 1991, 7(5), 532-544.
- **Bradley R.**, The research programme on transmissible spongiform encephalopathies in Britain with special reference to bovine spongiform encephalopathy, Dev. Biol. Stand., 1993, 80, 157-170.
- Brazier M., Davies P., Player E., Marken F., Viles J. et Brown D., Manganese binding to the prion protein, J. Biol. Chem., 2008, 283(19), 12831-12839.

- Brenig B., Schütz E. et Urnovitz H., [Cellular nucleic acids in serum and plasma as new diagnostic tools], Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 2002, 115(3-4), 122-124.
- **Brown D. et Besinger A.**, *Prion protein expression and superoxide dismutase activity*, Biochem. J., 1998, 334(2), 423-429.
- **Brown D.**, *Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper*, J. Neurosci. Res., 1999, 58(5), 717-725.
- **Brown P. et Bradley R.**, 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy, BMJ, 1998, 317, 1688-1692.
- **Brown P. et Gajdusek C.**, Survival of scrapie virus after 3 years' interment, Lancet., 1991, 337(8736), 269-270.
- **Brown P., Liberski P., Wolff A. et Gajdusek D.**, Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications, J. Infect. Dis., 1990, 161(3), 467-472.
- **Brown P., McShane L., Zanusso G. et Detwiler L.**, *On the Question of Sporadic or Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob Disease*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006, 12(12), http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no12/06-0965-G3.htm
- Brown P., Rohwer R., Dunstan B., MacAuley C., Gajdusek D. C. et Drohan W., The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy, Transfusion, 1998, 38(9), 810-816.
- **Brown P.**, Transmissible spongiform encephalopathies in humans: Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, Can. J. Vet. Res., 1990, 54, 38-41.
- Bruce M., Boyle A., Cousens S., McConnell I., Foster J., Goldmann W. et Fraser H., Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE, J. Gen. Virol., 2002, 83(3), 695-704.
- Bruce M., McConnell I., Fraser H. et Dickinson A., 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., 1991, 72(3), 595-603.
- **Bruce M.**, *TSE strain variation*, Br. Med. Bull., 2003, 66, 99-108.
- Bruce M., Will R., Ironside J., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. et Bostock C., *Transmission to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*, Nature, 1997, 389(6650), 498-501.
- Brunelle B., Hamir A., Baron T., Biacabe A.-G., Richt J., Kunkle R., Cutlip R., Miller J. et Nicholson E., Polymorphisms of the prion gene promoter region that influence classical bovine spongiform encephalopathy susceptibility are not applicable to other transmissible spongiform encephalopathies in cattle, J. Anim. Sci., 2007, 85, 3142-3147.
- Büeler H., Fischer M., lang Y., Bluethmann H., Lipp H., DeArmond S., Prusiner S., Aguet M. et Weissmann C., Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, Nature, 1992, 356(6370), 577-582.
- Büeler H., Raeber A., Sailer A., Fischer M., Aguzzi A. et Weissmann C., High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene, Mol. Med., 1994, 1(1), 19-30.

- Buschmann A., Gretzschel A., Biacabe A.-G., Schiebel K., Corona C., Hoffmann C., Eiden M., Baron T., Casalone C. et Groschup M., Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization, Vet. Microbiol., 2006, 117(2-4), 103-116.
- Capobianco R., Casalone C., Suardi S., Mangieri M., Miccolo C., Limido L., Catania M., Rossi G., Di Fede G., Giaccone G., Bruzzone M., Minati L., Corona C., Acutis P., Gelmetti D., Lombardi G., Groschup M., Buschmann A., Zanusso G., Monaco S., Caramelli M. et Tagliavini F., Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE?, PLoS Pathog., 2007, 3(3), e31.
- Casalone C., Caramelli M., Crescio M., Spencer Y. et Simmons M., BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a compariosn between UK and Italian cases, Acta Neuropathol., 2006, 111(5), 444-449.
- Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., Tagliavini F., Monaco S. et Caramelli M., Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101(9), 3065-3070.
- **Caughey B. et Raymond G.**, The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive, J. Biol. Chem., 1991, 266(27), 18217-18223.
- Caughey B., Neary K., Buller R., Ernst D., Perry L., Chesebro B. et Race R., Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and protease in intact neuroblastoma cells, J. Virol., 1990, 64(3), 1093-1101.
- Caughey B., Race R., Ernst D., Buchmeier M. et Chesebro B., *Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells*, J. Virol., 1989, 63(1), 175-181.
- **Chandler R.**, Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material, Lancet., 1961, 1(7191), 1378-1379.
- Chaplin M., Barlow N., Ryder S., Simmons M., Spencer Y., Hughes R. et Stack M., Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrP(sc) by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE, Res. Vet. Sci., 2002, 72(1), 37-43.
- Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J.-M, et al., *Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain*, Nature, 1985, 315(6017), 331-333.
- Chesebro B., Trifilo M., Race R., Meade-White K., Teng C., Lacasse R., Raymond L., Favara C., Baron G., Priola S., Caughey B., Masliah E. et Oldstone M., Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie, Science, 2005, 308, 1435-1439.
- **Chou S. et Martin D.**, *Kuru-plaques in a case of Creutzfeldt-Jakob disease*, Acta Neuropathol., 1971, 17, 150-155.
- Coles P., BSE. First vache folle, Nature, 1991, 350(6313), 4.
- **Collin E.**, Neurologie bovine. Troubles nerveux chez les bovines et ESB, Point Vét., 2002, 33(229), 40-41.
- Collinge J., Gorham M., Hudson F., Kennedy A., Keogh G., Pal S., Rossor M., Rudge P., Siddique D., Spyer M., Thomas D., Walker S., Webb T., Wroe S. et Darbyshire J.,

Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial, Lancet Neurol., 2009, 8(4), 334-344.

Collinge J., Sidle K., Meads J., Ironside J. et Hill A., Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD, Nature, 1996, 383(6602), 685-690.

Commission Decision 2001/2/EC, amending Decision 2000/418/EC regulating the use of material presenting risks as regards transmissible spongiform encephalopathies, O. J. L. 001, 2001, 21

Commission Decision 2001/233/EC, amending Decision 2000/418/EC as regards mechanically recovered meat and bovine vertebral column, O. J. L. 84, 2001, 59.

Commission Decision 2008/908/EC, authorising certain Member States to revise their annual BSE monitoring programme, O. J. L. 327, 2008, 24.

Commission Decision 94/381/EC, concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein, O. J. L. 172, 1994, 23.

Commission Decision 96/239/EC, on emergency measures to protect against bovine spongiform encephalopathy, O. J. L. 78, 1996, 47.

Commission Decision 97/534/EC, on the prohibition of the use of material presenting risks as regards transmissible spongiform encephalopathies, O. J. L. 216, 1997, 95.

Commission Regulation No 1248/2001, amending Annexes III, X and XI to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards epidemiosurveillance and testing of transmissible spongiform encephalopathies, O. J. L. 173, 2001, 12.

Commission Regulation No 162/2009, amending Annexes III and X to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, O. J. L. 55, 2009, 11.

Commission Regulation No 1974/2005, amending Annexes X and XI to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards national reference laboratories and specified risk material, O. J. L. 317, 2005, 4.

Commission Regulation No 21/2008, amending Annex X to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards the lists of rapid tests, O. J. L. 9, 2008, 3.

Commission Regulation No 357/2008, amending Annex V to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies, O. J. L. 111, 2008, 3.

Cooley W., Clark J. et Stack M., Comparison of scrapie-associated fibril detection and Western immunoblotting for the diagnosis of natural ovine scrapie, J. Comp. Pathol., 1998, 118(1), 41-49.

Cooley W., Clark J., Ryder S., Davis L., Farrelly S. et Stack M., Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in the UK, J. Comp. Path., 2001, 125, 64-70.

Cuillé J. et Chelle J.-P., *Transmission expérimentale de la tremblante chez la chèvre*, C. R. Acad. Sci. Paris, 1939, 208, 1058-1060.

- **Dabaghian R., Barnard G., McConnell I. et Clewley J.**, An immunoassay for the pathological form of the prion protein based on denaturation and time resolved fluorometry, J. Virol. Methods, 2006, 132(1-2), 85-91.
- **Daude N., Lehmann S. et Harris D.**, *Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cell*, J. Biol. Chem., 1997, 272(17), 11604-11612.
- **Davis A., Jenny A. et Miller L.,** Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy, J. Vet. Diagn. Invest., 1991, 3(3), 266-271.
- **DebBurman S., Raymond G., Caughey B. et Lindquist S.**, Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 13938-13943.
- **Debeer S., Baron T. et Bencsik A.**, Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples, J. Histochem. Cytochem., 2002, 50(5), 611-616.
- **Deeber S., Baron T. et Bencsik A.**, Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases, Histochem Cell. Biol., 2003, 120(6), 513-521.
- **Demaimay R., Adjou K., Lasmézas C., Lazarini F., Cherifi K., Seman M., Deslys J.-P. et Dormont D.**, *Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie*, J. Gen. Virol., 1994, 75(9), 2499-2503.
- **DeVoe A.**, Complications of keratoplasty, Am. J. Ophthalmol., 1975, 79(6), 907-912.
- **Doh-ura K., Tateishi J., Sasaki H., Kitamoto T. et Sakaki Y.**, Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 163(2), 974-979.
- **EFSA scientific opinion**, on analytical sensitivity of approved TSE rapid tests, 2009, 7(12), 1-32.
- **EFSA scientific report**, the evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines (2^{nd} study), 2002, 1-95.
- **EFSA scientific report** ⁽¹⁾, on the design of a field trail protocol for the evaluation of new rapid BSE post mortem tests, 2004, 1, 1-10.
- **EFSA scientific report** ⁽²⁾, on the evaluation of seven new rapid post-mortem BSE tests, 2004, 18, 1-13.
- **EFSA scientific report**, evaluation of a apid ant-mortem BSE test, 2006, 95, 1-14.
- **EFSA scientific report**, on the evaluation of two post mortem BSE tests, 2005, 48, 1-10.
- **Eiden M., Palm G., Hinrichs W., Matthey U., Zahn R. et Groschup M.**, Synergistic and strain-specific effects of bovine spongiform encephalopathy and scrapie prions in the cell-free conversion of recombinant prion protein, J. Gen. Virol., 2006, 87(12), 3753-3761.
- Eloit M., Adjou K., Coulpier M., Fontaine J.-J., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe A.-G., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Vilotte J.-L., Comoy E., Deslys J.-P., Grassi J., Simon S., Lantier F. et Sarradin P., BSE agent signatures in a goat, Vet. Rec., 2005, 156(16), 523-524.
- Endo T., Groth D., Prusiner S. et Kobata A., *Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein*, Biochemistry, 1989, 28(21), 8380-8388.

- Enfer scientific, *Products TSE version 3*, 2010, http://www.enferscientific.com/main.php?x=sci&p=6.
- **ESBinfo** ⁽¹⁾, *dates clés (chronologie), l'ESB en France*, mise à jour le 6 octobre 2009, http://esbinfo.agriculture.gouv.fr/article.php3?id_article=9 et http://esbinfo.agriculture.gouv.fr/article.php3?id_article=8
- **ESBinfo** ⁽²⁾, La réglementation, les mesures réglementaires françaises en matière de santé animale ; les mesures réglementaires françaises en matière de protection du consommateur vis-à-vis de l'ESB, mise à jour le 7 octobre 2009,

http://esbinfo.agriculture.gouv.fr/rubrique.php3?id_rubrique=14 et http://esbinfo.agriculture.gouv.fr/rubrique.php3?id_rubrique=13.

European Commission, the evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovine, 1999, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/bse/bse12_en.pdf.

- Everest S., Thorne L., Hawthorn J., Jenkins R., Hammersley C., Ramsay A., Hawkins S., Venables L., Flynn L., Sayers R., Kilpatrick J., Sach A., Hope J. et Jackman R., No abnormal prion protein detected in the milk of cattle infected with the bovine encephalopathy agent, J. Gen. Virol., 2007, 87, 2433-2441.
- Fichet G., Comoy E., Duval C., Antloga K., Dehen C., Charbonnier A., McDonnell G., Brown P., Lasmézas C. et Deslys J.-P., Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices, Lancet., 2004, 364(9433), 521-526.
- **Field E. et Peat A.**, *Structural changes in scrapie-affected brain*, Biochem. J., 1969, 114(2), 19-20.
- Forloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmona M., Bugiani O. et Tagliavini F., Neurotoxicity of a prion protein fragment, Nature, 1993, 362(6420), 543-546.
- **Foster J., Hope J. et Fraser H.**, *Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats*, Vet. Rec., 1993, 133(14), 339-341.
- Fournier J., Escaig-Haye F., Billette de Villemeur T., Robain O., Lasmézas C., Deslys J.-P., Dormont D. et Brown P., Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrPc) in extracerebral tissues, Cell. Tissue Res., 1998, 292(1), 77-84.
- Fraser H., Bruce M., Chree A., McConnell I. et Wells G., Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice, J. Gen. Virol., 1992, 73(8), 1891-1897.
- Furukawa H., Doh-ura K., Okuwaki R., Shirabe S., Yamamoto K., Udono H., Ito T., Katamine S. et Niwa M., A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins, J. Biol. Chem., 2004, 279(22), 23661-23667.
- **Gajdusek D. C. et Zigas V.**, Kuru; clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea, Am. J. Med., 1959, 26(3):442-469.
- Gajdusek D. C., Gibbs C. Jr., Asher D. et David E., Transmission of Experimental Kuru to the Spider Monkey (Ateles geoffreyi), Science, 1968, 162(3854), 693-694.
- Gavier-Widén D., Nöremark M., Langeveldt J., Stack M., Biacabe A.-G., Vulin J., Chaplin M., Richt J., Jacobs J., Acín C., Monleón E., Renström L., Klingeborn B. et Baron T., Bovine spongiform encephalopathy in Sweden: an H-type variant, J. Vet. Diagn. Invest., 2008, 20(1), 2-10.

- Geoghegan J., Miller M., Kwak A., Harris B. et Supattapone S., Trans-dominant inhibition of prion propagation in vitro is not mediated by an accessory cofactor, PLoS Pathog., 2009, 5(7), e1000535.
- Gibbons R. et Hunter G., Nature of the scrapie agent, Nature, 1967, 215, 1041-1043.
- Gibbs C. Jr., Asher D., Kobrine A., Amyx H., Sulima M. et Gajdusek D. C., Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery, J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1994, 57, 757-758.
- Gibbs C. Jr., Gajdusek D. C. et Latarjet R., Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Crautzfeldt-Jakob disease, and scrapie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1978, 75(12), 6268-6270.
- Gibbs C. Jr., Gajdusek D. C., Asher D., Alpers M., Beck E., Daniel P. et Matthews W., Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee, Science, 1968, 161(839), 388-389.
- Giese A., Bieschke J., Eigen M. et Kretzschmar H., Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases, Arch. Virol. Suppl., 2000, 16, 161-171.
- Gohel C., Grigoriev V., Escaig-Haye F., Lasmézas C., Deslys J.-P., Langeveld J., Akaaboune M., Hantaï D. et Fournier J., Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) at the neuromuscular junction, J. Neurosci. Res, 1999, 55(2), 261-267.
- **Goldfarb L. et Brown P.**, *The transmissible spongiform encephalopathies*, Annu. Rev. Med., 1995, 46, 57-65.
- Goldfarb L. ⁽¹⁾, Brown P., Vrbovská A., Baron H., McCombie W., Cathala F., Gibbs Jr C. et Gajdusek D. C., An insert mutation in the chromosome 20 amyloid precursor gene in a Gerstmann-Sträussler-Scheinker family, J. Neurol. Sci., 1992, 111(2), 189-194.
- Goldfarb L. ⁽²⁾, Petersen R., Tabaton M., Brown P., LeBlanc A., Montagna P., Cortelli P., Julien J., Vital C., Pendelbury W. et al., Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism, Science. 1992, 258(5083), 806-808.
- **Goldhammer Y., Bubis J., Sarova-Pinhas I. et Braham J.**, Subacute spongiform encephalopathy and its relation to Jakob-Creutzfeldt disease: report on six cases, J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1972, 35(1), 1-10.
- Goldmann W., Hunter N., Foster J., Salbaum J. M., Beyreuther K. et Hope J., Two alleles of neural protein gene linked to scrapie in sheep, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1990, 87, 2476-2480.
- Goldmann W., Martin T., Foster J., Hughes S., Smith G., Hughes K., Dawson M. et Hunter N., Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period, J. Gen. Virol., 1996, 77(11), 2885-2891.
- Gomes M., Millen T., Ferreira P., e Silva N., Vieira T., Almeida M., Silva J. et Cordeiro Y., Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells, J. Biol. Chem., 2008, 283(28), 19616-19625.
- Goto K., Umezaki H. et Suetsugu M., Electroencephalographic and clinicopathological studies on Creutzfeldt-Jakob syndrom, J. Neuol. Neurosurg. Psychiatry, 1976, 39, 931-940.

- Graber H., Meyer R., Fatzer R., Vandevelde M. et Zurbriggen A., In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine spongiform encephalopathy (BSE), Zentralbl. Veterinarmed. A., 1995, 42(7), 453-459.
- Green A., Thompson E., Stewart G., Zeidler M., McKenzie J., MacLeod M., Ironside J., Will R. et Knight R., Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2001, 70(6), 744-748.
- Haase B., Doherr M., Seuberlich T., Drögemüller C., Dolf G., Nicken P., Schiebel K., Ziegler U., Groshup M., Zurbriggen A. et Leeb T., PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle, BMC Genet, 2007, 8, 15.
- **Hadlow J., Kennedy R. et Race R.**, *Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus*, J. Infect. Dis., 1982, 146(5), 657-664.
- Hadlow W. ⁽¹⁾, Kennedy R., Race R. et Eklund C., Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie, Vet. Pathol., 1980, 17(2), 187-199.
- **Hadlow W.** ⁽²⁾, **Prusiner S., Kennedy R. et Race R.**, Brain tissue from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease causes scrapie-like encephalopathy in goats, Ann. Neurol., 1980, 8(6), 628-632.
- Hadlow W., Scrapie and kuru, Letters, Lancet., 1959, 5, 289-290.
- Hanson R., Eckroade R., Marsh R., Zu Rhein G., Kanitz C. et Gustafson D., Susceptibility of mink to sheep scrapie, Science, 1971, 172(985), 859-861.
- Henriques S., Pattenden L., Aguilar M. et Castanho M., *PrP*(106-126) does not interact with membranes under physiological conditions., Biophys. J. 2008, 95(4), 187718-89.
- Hilton D., Fathers E., Edwards P., Ironside J. et Zajicek J., Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease, Lancet, 1998, 352(9129), 703-704.
- **Hilton D.**, Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease, J. Pathol., 2006, 208(2), 134-141.
- **Hochstrasser D., Frutiger S., Wilkins M., Hughes G. et Sanchez J.-C.**, *Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE*, FEBS Lett., 1997, 416(2), 161-163.
- **Hope J. et Hunter N.**, *Scrapie-associated fibrils, PrP protein and the Sinc gene*, Ciba. Found. Symp., 1988, 135, 146-163.
- Hope J., Reekie L., Hunter N., Multhaup G., Beyreuther K., White H., Scott A., Stack M., Dawson M. et Wells G., Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein, Nature, 1988, 336(6197), 390-392.
- Horiuchi M., Yamazaki N., Ikeda T., Ishiguro N. et Shinagawa M., A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep, J. Gen. Virol., 1995, 76(10), 2583-2587.
- Hornemann S., Korth C., Oesch B., Riek R., Wider G., Wüthrich K. et Glockshuber R., Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization, FEBS Lett., 1997, 413(2), 277-281.
- **Howells L., Anderson S., Coldham N. et Sauer M.**, *Transmissible spongiform encephalopathy strain-associated diversity of N-terminal proteinase K cleavage sites of PrP(Sc) from scrapie-infected and bovine spongiform encephalopathy-infected mice,* Biomarkers, 2008, 13(4), 393-412.

- Hsiao K., Baker H., Crow T., Poulter M., Owen F., Terwilliger J., Westaway D., Ott J. et Prusiner S., Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome, Nature, 1989, 338(6213), 342-345.
- Hsiao K., Scott M., Foster D., DeArmond S., Groth D., Serban H. et Prusiner S., Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline---leucine substitution, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1991, 640, 166-170.
- **Hsich G., Kenney K., Gibbs C. J., Lee K. et Harrington M.**, *The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies*, N. Engl. J. Med., 1996, 335(13), 924-930.
- **Hunter G. et Millson G.**, Studies on the heat stability and chromatographic behaviour of the scrapie agent, J. Gen. Microbiol., 1964, 37, 251-258.
- **Hunter G., Millson G. et Meek G.**, *The intracellular location of the agent of mouse scrapie*, J. Gen. Microbiol., 1964, 34, 319-325.
- Hunter N., Foster J., Chong A., McCutcheon S., Parnham D., Eaton S., MacKenzie C. et Houston F., Transmission of prion disease by blood transfusion, J. Gen. Virol., 2002, 83, 2897-2905.
- **InVS** (**Institut de veille sanitaire**), *Maladie de Creutzfledt-Jakob et maladie apparentées : Nombre de cas décédés certains ou probables de MCJ en France*, mise à jour 2 novembre 2009, http://www.invs.sante.fr/publications/mcj/donnees_mcj.html.
- **Jackman R., Everest D., Schmerr M., Khawaja M., Keep P. et Docherty J.**, Evaluation of a preclinical blood test for scrapie in sheep using immunocapillary electrophoresis, J. AOAC. Int., 2006, 89(3), 720-727.
- Jackson G., Murray I., Hosszu L., Gibbs N., Waltho J., Clarke A. et Collinge J., Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98(15), 8531-8535.
- James T., Liu H., Ulyanov N., Farr-Jones S., Zhang H., Donne D., Kaneko K., Groth D., Mehlhorn I., Prusiner S. et Cohen F., Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 10086-10091.
- Jellinger K., Heiss W. et Deisenhammer E., The ataxic (cerebellar) form of Creutzfeldt-Jakob disease, J. Neurol., 1974, 207(4), 289-305.
- Jimi T., Wakayama Y., Shibuya S., Nakata H., Tomaru T., Takahashi Y., Kosaka K., Asano T. et Kato K., High levels of nervous-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease, Clin. Chim. Acta., 1992, 211(1-2), 37-46.
- **Joiner S., Linehan J., Brandner S., Wadsworth J. et Collinge J.**, *Irregular presence of abnormal prion protein in appendix in variant Creutzfeldt-Jakob disease*, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2002, 73(5), 597-598.
- **Jones D. et Nevin S.**, Rapidly progressive cerebral degeneration (subacute vascular encephalopathy) with mental disorder, focal disturbances, and myoclonic epilepsy, J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1954, 17, 148-159.
- **Kapur N., Ironside J., Abbott P., Warner G. et Turner A.**, A neuropsychological-neuropathological case study of variant Creutzfeldt-Jakob disease, Neurocase., 2001, 7(3), 261-267.

- **Katz J., Pedersen J., Jenny A. et Taylor W.**, Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE), J. Vet. Diagn. Invest., 1992, 4, 447-449.
- Kawasaki K., Wakabayashi K., Kawakami A., Higuchi M., Kitamoto T., Tsuji S. et Takahashi H., Thalamic form of Creutzfeldt-Jakob disease or fatal insomnia? Report of a sporadic case with normal prion protein genotype, Acta Neuropathol., 1997, 93(3), 317-322.
- Kelly A., Mateus-Pinilla N., Diffendorfer J., Jewell E., Ruiz M., Killefer J., Shelton P., Beissel T. et Novakofski J., Prion sequence polymorphisms and chronic wasting disease resistance in Illinois white-tailed deer (Odocoileus virginianus), Prion., 2008, 2(1), 28-36.
- Kim J.-I., Wang C., Kuizon S., Xu J., Barengolts D., Gray P. et Rubenstein R., Simple and specific detection of abnormal prion protein by a magnetic bead-based immunoassay coupled with laser-induced fluorescence spectrofluorometry, J. Neuroimmunol., 2005, 158(1-2), 112-119.
- **Kimberlin R. et Millson G.**, *Some biochemical aspects of mouse scrapie*, J. Comp. Pathol., 1967, 77(4), 359-366.
- **Kirkwood J. et Cunningham A.**, Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles, Vet. Rec., 1994, 135(13), 296-303.
- Kirkwood J., Wells G., Wilesmith J., Cunningham A. et Jackson S., Spongiform encephalopathy in an Arabian oryx (Oryx leucoryx) and a greater kudu (Tragelaphus strepsiceros), Vet. Rec., 1990, 127(17), 418-420.
- Kitamoto T., Ohta M., Doh-ura K., Hitoshi S., Terao Y. et Tateishi J., Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Sträussler syndrome, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 191(2), 709-714.
- Kocisko D., Priola S., Raymond G., Chesebro B., Lansbury P. et Caughey B., Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: A model for the scrapie species barrier, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 3923-3927.
- Krasnianski A., Meissner B., Heinemann U. et Zerr I., Clinical findings and diagnostic tests in Creutzfeldt-Jakob disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease, Folia Neuropathol., 2004, 42 Suppl B, 24-38.
- Kretzschmar H., Prusiner S., Stowring L. et DeArmond S., Scrapie prion proteins are synthesized in neurons, Am. J. Pathol., 1986, 22(1), 1-5.
- Kropp S., Zerr I., Schulz-Schaeffer W., Riedmann C., Bodemer M., Laske C., Kretzschmar H. et Poser S., Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease, Neurosci. Lett., 1999, 261(1-2), 124-126.
- **Kuczius T., Haist I. et Groschup M.**, *Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation*, J. Infect. Dis., 1998, 178(3), 693-699.
- Laplanche J., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugère-Picoux J. et Launay J., PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis, Genomics, 1993, 15(1), 30-37.
- Lasmézas C., Deslys J.-P., Demaimay R., Adjou K., Lamoury F., Dormont D., Robain O., Ironside J. et Hauw J., BSE transmission to macaques, Nature, 1996, 381(6585), 743-744.

- **Leathers V., Velek K., Koller S., Plourde L., Toomik R. et Estey L.,** *Use of seprion capture technology for the detection of PrPsc in scrapie-infected tissues-IDEXX BSE-scrapie EIA*, 2005, http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/seprioncapture.pdf.
- **Leggett M., Dukes J. et Pirie H.**, A spongiform encephalopathy in a cat, Vet. Rec., 1990, 127(24), 586-588.
- **Legifrance**, Arrêté du 10 septembre 1996 relatif aux conditions sanitaires régissant la commercialisation et l'importation des aliments pour animaux et modifiant l'arrêté du 25 septembre 1995 relatif aux conditions sanitaires régissant les échanges intracommunautaires de certains produits d'origine animale, NOR: AGRG9601761A, 1996, http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000745483&categori eLien=cid
- **Liberski P., Streichenberger N., Giraud P., Soutrenon M., Meyronnet D., Sikorska B. et Kopp N.,** *Ultrastructural pathology of prion diseases revisited: brain biopsy studies*, Neuropathol. Appl. Neurobiol., 2005, 31(1), 88-96.
- Liberski P., Yanagihara R., Wells G., Gibbs C. Jr et Gajdusek D. C., Comparative ultrastructural neuropathology of naturally occurring bovine spongiform encephalopathy and experimentally induced scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease, J. Comp. Pathol., 1992, 106(4), 361-381.
- Liu M., Yu S., Yang J., Yin X. et Zhao D., RNA and CuCl2 induced conformational changes of the recombinant ovine prion protein, Mol. Cell. Biochem., 2007, 294(1-2), 197-203.
- Llewelyn C., Hewitt P., Knight R., Amar K., Cousens S., Mackenzie J. et Will R., Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion, Lancet, 2004, 363(9407), 417-421.
- **Locht C., Chesebro B., Race R. et Keith J.**, Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with scrapie agent, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 6372-6376.
- Lombardi G., Casalone C., D'Angelo A., Gelmetti D., Torcoli G., Barbieri I., Corona C., Fasoli E., Farinazzo A., Fiorini M., Gelati M., Iulini B., Tagliavini F., Ferrari S., Caramelli M., Monaco S., Capucci L. et Zanusso G., Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes, PLoS Pathog., 2008, 4(5), e1000075.
- **Lourenco P., Schmerr M., MacGregor I., Will R., Ironside J. et Head M.**, Application of an immunocapillary electrophoresis assay to the detection of abnormal prion protein in brain, spleen and blood specimens from patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease, J. Gen. Virol., 2006, 87(10), 3119-3124.
- **Mabbott N., Brown K., Manson J. et Bruce M.**, *T-lymphocite activation and the cellular form of the prion protein*, Immunology, 1997, 92(2), 161-165.
- **Mackenzie** A., *Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in scrapie*, J. Comp. Pathol., 1983, 93(2), 251-259.
- Maignien T., Lasmézas C., Béringue V., Dormont D. et Deslys J.-P., Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents, J. Gen. Virol., 1999, 80, 3035-3042.
- Malin J., Weissenborn K., Haas J. et Walter G., Unusual EEG findings in a case of Creutzfeldt-Jakob disease, J. Neurol., 1987, 234(1), 55-58.

- Manetto V., Medori R., Cortelli P., Montagna P., Tinuper P., Baruzzi A., Rancurel G., Hauw J., Vanderhaeghen J., Mailleux P. et al., Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases, Neurology. 1992, 42(2), 312-319.
- Marijanovic Z., Caputo A., Campana V. et Zurzolo C., *Identification of an intracellular site of prion conversion*, PLoS Pathog., 2009, 5(5), e1000426.
- Marsh R. et Bessen R., Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy, Dev. Biol. Stand., 1993, 80, 111-118.
- **Marsh R. et Hanson R.**, *Physical and chemical properties of the transmissible mink encephalopathy agent*, J. Virol., 1969, 3(2), 176–180
- **Marsh R.**, Animal model of human disease: Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (slow virus infections). Animal model: transmissible mink encephalopathy, scrapie-like disease of mink, Am. J. Pathol., 1972, 69(1), 209-212.
- Marsh R., Bessen R., Lehmann S. et Hartsough G., Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy, J. Gen. Virol., 1991, 72, 589-594.
- Masujin K., Matthews D., Wells G., Mohri S. et Yokoyama T., Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle, J. Gen. Virol., 2007, 88(6), 1850-1858.
- **Matthews D. et Cooke B.**, *The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish*, Rev. sci. Tech., 2003, 22(1), 283-296.
- **McKinley M, Bolton D. et Prusiner S.**, A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion, Cell., 1983, 35(1), 57-62.
- **Medori R. et Tritschler H.**, Prion protein gene analysis in three kindreds with fatal familial insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism., Am. J. Hum. Genet., 1993, 53(4), 822-827.
- Medori R., Tritschler H., LeBlanc A., Villare F., Manetto V., Chen H., Xue R., Leal S., Montagna P., Cortelli P. et al., Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene, N. Engl. J. Med., 1992, 326(7), 444-449.
- Merz P., Kascsak R., Rubenstein R., Carp R. et Wisniewski H., Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils, J. Virol., 1987, 61(1), 42-49.
- Merz P., Somerville R., Wisniewski H. et Iqbal K., Abnormal fibrils from scrapie-infected brain, Acta Neuropathol., 1981, 54(1), 63-74.
- Meyer R., McKinley M., Bowman M., Braunfeld M., Barry R. et Prusiner S., Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 2310-2314.
- Meyer R., Oesch B., Fatzer R., Zurbriggen A. et Vandevelde M., Detection of bovine spongiform encephalopathy-specific PrPsc by treatment with heat and guanidine thiocyanate, J. Virol., 1999, 73(11), 9386-9392.
- **Miele G., Manson J. et Clinton M.**, A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies, Nat. Med., 2001, 7(3), 361-364.

- Miller J., Jenny A., Taylor W., Marsh R., Rubenstein R. et Race R., Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie, J. Vet. Diagn. Invest., 1993, 5, 309-316.
- Monleón E., Monzón M., Hortells P., Vargas A. et Badiola J., Detection of PrPsc in samples presenting very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunochemistry, J. Histochem. Cytochem., 2003, 51(1), 15-18.
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J.-L., Lehmann S., Launay J.-M. et Kellermann O., Signal transduction through prion protein, Science, 2000, 289(5486), 1925-1928.
- Murayama Y., Yoshioka M., Okada H., Takata M., Yokoyama T. et Mohri S., *Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters*, J. Gen. Virol., 2007, 88(10), 2890-2898.
- **Narang H.**, The nature of the scrapie agent: the virus theory, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1996, 212(3), 208-224.
- Oesch B., Westaway D., Wälchli M., McKinley M., Kent S., Aebersold R., Barry R., Tempst P., Teplow D., Hood L. et al., A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein, Cell., 1985, 40(4), 735-746.
- OIE ⁽¹⁾ (Organisation Mondiale de la Santé Animale), Nombre de cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) signalés chez les bovins d'élevage dans le monde, hors Royaume-Uni, mise à jour le 5 mars 2010, http://www.oie.int/fr/info/fr_esbmonde.htm.
- **OIE** ⁽²⁾ (**Organisation Mondiale de la santé Animale**), *Géographical distribution of countries reported at least one BSE confirmed case since 1989*, mise à jour le 5 janvier 2010, http://www.oie.int/eng/info/en_esbcarte.htm.
- **OIE** (**Organisation Mondiale de la Santé Animale**), *Encéphalopathie spongiforme bovine*, *résistance aux agents physiques et chimiques*, mise à jour le 22 avril 2002, http://www.oie.int/fr/maladies/fiches/f_B115.htm.
- Onodera T., Ikeda T., Muramatsu Y. et Shinagawa M., Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan, Microbiol. Immunol., 1993, 37(4), 311-316.
- **Onodera T., Sakudo A., Wu G. et Saeki K.**, Bovine spongiform encephalopathy in Japan: history and recent studies on oxidative stress in prion diseases, Microbiol. Immunol. 2006, 50(8), 565-578.
- **Otto D.**, *Jakob-Creutzfeldt disease associated with cadaveric dura*, J. neurosurg., 1987, 67(1), 149.
- Otto M., Wiltfang J., Cepek L., Neumann M., Mollenhauer B., Steinacker P., Ciesielczyk B., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H. et Poser S., *Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease*, Neurology, 2002, 58(2), 192-197.
- Otto M., Wiltfang J., Schütz E., Zerr I., Otto A., Pfahlberg A., Gefeller O., Uhr M., Giese A., Weber T., Kretzschmar H. et Poser S., Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study, BMJ., 1998, 316(7131), 577-582.
- Pan K.-M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R., Cohen F. et Prusiner S., Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1993, 90(23), 10962-10966.

- **Parry H.**, Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep, Herdity, 1962, 17, 75-105.
- **Pattison I. et Millson G.**, *Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome*, J. Comp. Pathol., 1961, 71, 101-109.
- Peretz D., Williamson R., Matsunaga Y., Serban H., Pinilla C., Bastidas R., Rozenshteyn R., James T., Houghten R., Cohen F., Prusiner S. et Burton D., A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform, J. Mol. Biol., 1997, 273, 614-622.
- **Porter D., Porter H. et Cox N.**, Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice, J. Immunol., 1973, 111, 1407-1410.
- Powell-Jackson J., Weller R., Kennedy P., Preece M., Whitcombe E. et Newsom-Davis J., Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human growth hormone, Lancet, 1985, 2(8449), 244-246.
- **Priola S., Caughey B., Wehrly K. et Chesebro B.**, A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP, J. Biol. Chem., 1995, 270(7), 3299-3305.
- **Priola S.**, Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies, Biomed. Pharmacother., 1999, 53 (1), 27-33.
- **Prionics** (1), *Prionics*®-*Check LIA*, mise à jour le 03 janvier 2010, http://www.prionics.com/diseases-solutions/tse/Prionics-Check_LIA/.
- **Prionics** (2), *Prionics*®-*Check PrioSTRIP*, mise à jour le 03 janvier 2010, http://www.prionics.com/diseases-solutions/tse/Prionics-Check_PrioSTRIP/.
- Prusiner S., Detecting mad cow disease, Sci. Am., 2004, 291(1), 86-93.
- Prusiner S. ⁽¹⁾, Füzi M., Scott M., Serban D., Serban H., Taraboulos A., Gabriel J.-M., Wells G., Wilesmith J., Bradley R. et al., *Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy*, J. Infect. Dis., 1993, 167(3), 602-613.
- Prusiner S. ⁽²⁾, Groth D., Serban A., Koehler R., Foster D., Torchia M., Burton D., Yang S.-L. et DeArmond S., Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies, Proc. Natl., Acad., Sci. USA, 1993, 90, 10608-10612.
- Prusiner S., Garfin D., Cochran S., McKinley M., Groth D., Hadlow W., Race R. et Eklund C., Experimental scrapie in the mouse: electrophoretic and sedimentation properties of the partially purified agent, J. Neurochem., 1980, 35(3), 574-582.
- **Prusiner S., Hadlow W., Eklund C. et Race E.**, Sedimentation properties of the scrapie agent, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1977, 74(10), 4656–4660.
- Prusiner S., McKinley M.,Groth D., Bowman K., Mock N., Cochran S. et Masiarz F., Scrapie agent contains a hydrophobic protein, Porc. Natl. Acad. Sci. USA., 1981, 78(11), 6675-6679.
- **Prusiner S.**, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, Science, 1982, 216(4542), 136-144.
- Prusiner S., Scott M., Foster D., Pan K.-M., Groth D., Mirenda C., Torchia M., Yang S.-L., Serban D., Carlson G., Hoppe P., Westaway D. et DeArmond S., *Transgenetic studies*

- implicate interactions between homologuous PrP isoforms in scrapie prion replication, Cell., 1990, 63, 673-686.
- Puckett C., Concannon P., Casey C. et Hood L., Genomic structure of the human prion protein gene, Am. J. Hum. Genet., 1991, 49, 320-329.
- Race R., Ernst D. et Sutton D., Severe autolysis does not prevent scrapie diagnosis in sheep, J. Vet. Diagn. Invest., 1994, 6(4), 486-489.
- **Richt J. et Hall S.**, *BSE case associated with prion protein gene mutation*, PLoS Pathog, 2008, 4(9), e1000156.
- Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R. et Wüthrich K., NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321), Nature, 1996, 382(6587), 180-182.
- **Riek R., Hornemann S., Wider G., Glockshuber R. et Wüthrich K.**, *NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)*, FEBS Lett., 1997, 413(2), 282-288.
- Robinson M., Hadlow W., Huff T., Wells G., Dawson M., Marsh R. et Gorham J., Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy, J. Gen. Virol., 1994, 75(9), 2151-2155.
- Rosenmann H., Vardi J., Finkelstein Y., Chapman J. et Gabizon R., *Identification in Israel of 2 Jewish Creutzfeld-Jakob disease patients with a 178 mutation at their PrP gene*, Acta. Neurol. Scand., 1998, 97(3), 184-187.
- **Rosenthal N., Keesey J., Crandall B. et Brown W.,** Familial *neurological disease associated with spongiform encephalopathy*, Arch. Neurol., 1976, 33(4), 252-259.
- **Rubenstein R., Gray P., Wehlburg C., Wagner J. et Tisone G.,** *Detection and discrimination of PrPSc by multi-spectral ultraviolet fluorescence*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 246(1), 100-106.
- **Ryder S., Hawkins S., Dawson M. et Wells G.**, *The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig*, J. Comp. Pathol., 2000, 122(2-3), 131-143.
- Safar J., Lessard P., Tamgüney G., Freyman Y., Deering C., Letessier F., DeArmond S. et Prusiner S., Transmission and detection of prions in feces, J. Infect. Dis., 2008, 198(1), 81-89.
- Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F. et Prusiner S., Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations, Nat. Med., 1998, 4(10), 1157-1165.
- **Sakudo A., Nakamura I., Ikuta K. et Onodera T.**, Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models, J. Vet. Med. Sci., 2007, 69(4), 329-337.
- **Schlote W., Boellaard J.-W., Schumm F. et Stöhr M.**, Gerstmann-Sträussler-Scheinker's disease. Electron-microscopic observations on a brain biopsy, Acta Neuropathol., 1980, 52(3), 203-211.
- Schmalzbauer R., Eigenbrod S., Winoto-Morbach S., Xiang W., Schütze S., Bertsch U. et Kretzschmar H., Evidence for an association of prion protein and sphingolipid-mediated signaling, J. Neurochem., 2008, 106(3), 1459-1470.

- Schmerr M., Jenny A., Bulgin M., Miller J., Hamir A., Cutlip R. et Goodwin K., Use of capillary electrophoresis and fluorescent labelled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy, J. chromatogr. A., 1999, 853(1-2), 207-214.
- **Schreuder B.**, *General aspects of transmissible spongiform encephalopathies and hypotheses about the agents*, Vet. Q., 1993, 15(4), 167-174.
- Schreuder B., van Keulen L., Vromans M., Langeveld J. et Smits M., Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie, Vet. Rec., 1998, 142(21), 564-568.
- Schulz-Schaeffer W., Tschöke S., Kranefuss N., Dröse W., Hause-Reitner D., Giese A., Groschup M. et Kretzschmar H., The Paraffin-Embedded Tissue Blot detects PrP^{Sc} early in the incubation time in prion diseases, Am. J. Pathol., 2000, 156, 51-56.
- Schumm F., Boellaard J.-W., Scholte W. et Stöhr M., Morbus Gerstmann-Sträussler-Scheinker. The Sch. family-a report of three cases, Arch. Psychiatr. Nervenkr., 1981, 230(3), 179-196.
- Scott A., Wells G., Chaplin M. et Dawson M., Bovine spongiform encephalopathy: detection of fibrils in the central nervous system is not affected by autolysis, Res. Vet. Sci., 1992, 52(3), 332-336.
- **Scott A., Wells G., Stack M., White H. et Dawson M.**, Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantitation of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain, Vet. Microbiol., 1990, 23(1-4), 295-304.
- **Shaked G., Shaked Y., Kariv-Inbal Z., Halimi M., Avraham I. et Gabizon R.**, *A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases*, J. Biol. Chem., 2001, 276 (34), 31479-31482.
- **Shamsir M. et Dalby A.**, One gene, two diseases and three conformations: molecular dynamics simulations of mutants of human prion protein at room temperature and elevated temperatures, Proteins, 2005, 59(2), 275-290.
- **Shyng S.-L., Heuser J. et Harris D.**, *A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits*, J. Cell. Biol., 1994, 125(6), 1239-1250.
- **Shyng S.-L., Huber M. et Harris D.**, A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells, J. Biol. Chem., 1993, 268(21), 15922-15928.
- **Sigurdson C.**, A prior disease of cervids: chronic wasting disease, Vet. Res., 2008, 39(4), 41.
- Simmons M., Harris P., Jeffrey M., Meek S., Blamire I. et Wells G., BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases, Vet. Rec., 1996, 138(8), 175-177.
- Sofianidis G., Psychas V., Billinis C., Spyrou V., Argyroudis S., Papaioannou N. et Vlemmas I., Histopathological and immunohistochemical features of natural goat scrapie, J. Comp. Path., 2006, 135, 116-129.
- Sparkes R., Simon M., Cohn V., Fournier R., Lem J., Klisak I., Heinzmann C., Blatt C., Lucero M., Mohandas T., DeArmond S., Westaway D., Prusiner S. et Weiner L., Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(19), 7358-7362.

- **Stahl N., Boerchelt D., Hsiao K. et Prusiner S.**, Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid, Cell., 1987, 51(2), 229-240.
- **Steele A., Emsley J., Ozdinler P., Lindquist S. et Macklis J.**, *Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(9), 3416-3421.
- Tanji K., Saeki K., Matsumoto Y., Takeda M., Hirasawa K., Doi K., Matsumoto Y. et Onodera T., Analysis of PrPc mRNA by in situ hybridization in brain placenta, uterus and testis of rats, Intervirology, 1995, 38(6), 309-315.
- **Taylor D., Fernie K. et McConnell I.**, *Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxide*, Vet. Microbiol., 1997, 58(2-4), 87-91.
- **Taylor D., Fraser H., McConnell I., Brown D., Brown K., Lamza K. et Smith G.,** *Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie*, Arch. Virol., 1994, 139(3-4), 313-326.
- **Taylor D.**, *Inactivation of BSE agent*, Dev. Biol. Stand., 1991, 75, 97-102.
- **Taylor D.**, *Inactivation of the BSE agent*, C. R. Biol., 2002, 325(1), 75-76.
- Telling G., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F., DeArmond S. et Prusiner S., Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, Cell. 1995, 83 (1), 79-90.
- Terry L., Marsh S., Ryder S., Hawkins S., Wells G. et Spencer Y., Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy, Vet. Rec., 2003, 152(13), 387-392.
- **Theil D., Fatzer R., Meyer R., Schobesberger M., Zurbriggen A. et Vandevelde M.,** *Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy*, J. Comp. Pathol., 1999, 121(4), 357-367.
- **Turk E., Teplow D., Hood L. et Prusiner S.**, *Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins*, Eur. J. Biochem., 1988, 176, 31-30.
- van Keulen L., Schreuder B., Meloen R., Mooij-Harkes G., Vromans M. et Langeveld J., Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie, J. Clin. Microbiol., 1996, 34(5), 1228-1231.
- van Keulen L., Vromans M. et van Zijderveld F., Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep, APMIS, 2002, 110(1), 23-32.
- **Vorberg I., Chan K. et Priola S.**, *Deletion of beta-strand and alpha-helix secondary structure in normal prion protein inhibits formation of its protease-resistant isoform*, J. Virol., 2001, 75(21), 10024-10032.
- Weiss S., Proske D., Neumann M., Groschup M., Kretzschmar H., Famulok M. et Winnacker E.-L., RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP, J. Virol., 1997, 71(11), 8790-8797.
- Wells G., Hancock R., Cooley W., Richards M., Higgins R. et David G., Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata, Vet. Rec., 1989, 125, 521-524.
- **Westaway D. et Prusiner S.**, Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein, Nucleic Acid Res., 1986, 14(5), 2035-2044.

- **Wilesmith J.**, Bovine spongiform encephalopathy and related diseases: an epidemiological overview, N. Z. Vet. J., 1994, 42(1), 1-8.
- Wilesmith J., Ryan J. et Atkinson M., Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin, Vet. Rec., 1991, 128(9), 199-203.
- Wilesmith J., Ryan J., Hueston W. et Hoinville L., Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990, Vet. Rec., 1992, 130(5), 90-94.
- Wilesmith J., Wells G., Cranwell M. et Ryan J., Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies, Vet. Rec., 1988, 123(25), 638-644.
- Will R., Ironside J., Zeidler M., Cousens S., Estibeiro K., Alperovitch A., Psoer S., Pocchiari M., Hofman A et Smith P., A new variant of Creutzfledt-Jakob disease in the UK, Lancet, 1996, 347(9006), 921-925.
- Williams E. et Young S., Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy, J. Wildl. Dis., 1980, 16(1), 89-98.
- **Williams E. et Young S.**, *Spongiform encephalopathies in Cervidae*, Rev. Sci. Tech., 1992, 11(2), 551-567.
- Wyatt J., Pearson G., Smerdon T., Gruffydd-Jones T., Wells G. et Wilesmith J., *Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats*, Vet. Rec., 1991, 129 (11), 233-236.
- Xi Y.-G., Ingrosso L., Ladogana A., Masullo C. et Pocchiari M., Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation, Nature, 1992, 356(6370), 598-601.
- Ye J., Han J., Shi Q., Zhang B.-Y., Wang G.-R., Tian C., Gao C., Chen J.-M., Li C.-J., Liu Z., Li X.-Z., Zhang L.-Z. et Dong X.-P., Human prion disease with a G114V mutation and epidemiological studies in a Chinese family: a case series, J. Med. Case Reports., 2008, 2, 331.
- Yehiely F., Bamborough P., Da Costa M., Perry B., Thinakaran G., Cohen F., Carlson G., Prusiner S., *Identification of candidate proteins binding to prion protein*, Neurobiol. Dis. 1997, 3(4), 339-355.
- Young K., Clark B., Piccardo P., Dlouhy S. et Ghetti B., Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with the PRNP P102L mutation and valine at codon 129, Brain. Res. Mol. Brain. Res., 1997, 44(1), 147-150.
- Zhang C., Steele A., Lindquist S. et Lodish H., Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(7), 2184-2189.
- **Zlotnik I.**, Cerebellar and midbrain lesions in scrapie, Nature, 1960, 185, 785.
- **Zlotnik I.**, Experimental transmission of scrapie to golden hamsters, Lancet., 1963, 282(7316), 1072.
- **Zobeley E., Flechsig E., Cozzio A., Enari M. et Weissmann C.**, *Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface*, Mol. Med., 1999, 5, 240-243.

Annexe 1 : Evaluation du Western blot TeSeE® en tant que test de confirmation

Acta Neuropathol DOI 10.1007/s00401-007-0270-1

ORIGINAL PAPER

Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle

Jean-Noël Arsac · Anne-Gaëlle Biacabe · Julia Nicollo · Anna Bencsik · Thierry Baron

Received: 15 April 2007 / Revised: 22 June 2007 / Accepted: 12 July 2007 Springer-Veding 2007

Abstract Important changes have occurred in the postmortem diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in recent years. We have evaluated a commercially available Western blot method (TeSeE® Wb) as a potential means of confirming BSE. This method was (i) highly sensitive, compared with a biochemical confirmatory Western blot method (AFSSA-Wb) previously used in France and (ii) more sensitive than two routinely used highly sensitive rapid tests (TeSeE® ELISA, HerdCheck® BSE). We show that this high sensitivity is mainly due to the antibody used. (Sha31). Interestingly, TeSeE® Wb was also able to diagnose the two currently recognised deviant BSE phenotypes (H-type and L-type or BASE). The initially described molecular features of these atypical forms of BSE were also readily recognised, although sensitivity of the method may be differently affected by the chosen Ab compared with typical BSE. This method is thus of potential interest for future evaluations of BSE confirmatory methods.

Keywords BASE · BSE · H-type · L-type · Prion · Western blotting

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are infectious neurodegenerative diseases including scrapie in small ruminants, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, feline spongiform encephalopathy (FSE) in

J.-N. Arsac · A.-G. Biacate · J. Nicolio · A. Benotik · T. Baron(□) Agence Française de Sécurité Sankaire des Aliments (AFSSA), Unité ATNC, 31 Avenue Tony Gamier, 69364 Lyon Cedex 07, France e-mail: tharon@lyon afsta.fr domestic cats and wild felines, chronic wasting disease (CWD) in deer and elk, transmissible mink encephalopathy (TME) in mink, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans.

The BSE epidemic was first identified in 1986 in the United Kingdom [47]. The need to control the disease was reinforced by the recognition of a link between BSE and the so-called variant Creutzfeld-Jakob disease (vCID) [12, 18, 32, 50] and numerous control measures were brought in to reduce the risk of BSE transmission to both humans and ruminants. First, the rendered carcasses of livestock were no longer fed to ruminants, and second the use of specified risk insterials (SRM), i.e. bovine tissues with known or potential infectivity, was banned from the food chain. Moreover, since 2001, the active surveillance of BSE in adult cattle in Europe has been mandatory to determine more precisely the scale of the epidemic and avoid any consumption of tissues from BSE-infected cattle.

BSE diagnosis was initially based on the histological identification of characteristic vacuolation in precise unatomical regions of the brain [48] than on the accumulation of a disease-specific protein called PrPsc [10, 17, 37]. This pathological isoform is detectable by biochemical methods thanks to its specific biochemical properties or can be detected by immunohistochemical analysis of fixed brain tissues [4, 19, 27, 31, 34, 44, 49]. Both methods must ensure the specific detection of the disease-associated protein, but not of the normal host prion protein, and precise targeting of the disease-associated protein, especially in the brain stem, is a critical pathogenic feature of BSE diagnosis.

The extensive surveillance of BSE, implemented since 2001, became possible because (i) rapid tests (Western blot or ELISA) allowing screening of large numbers of brain samples had been developed (ii) only samples that were

2 Springer

positive in rapid tests needed to undergo confirmatory diagnosis of BSE with one of the more lengthy reference methods (histologic examination, IHC analysis, SAF immunoblot) listed in the TSE chapter of the OIE manual [38].

BSE surveillance has recently been confronted with new challenges. First, new rapid tests for BSE surveillance have been approved since 2001 [26] and the high analytical sensitivity of some of them requires any confirmatory method to be at least as sensitive. Second, compared with the typical BSE recognised throughout the epidemic, a few cases of BSE with deviant phenotypic features have been recognised in the past few years [7, 15, 39, 41, 51]. Although their origins remain unknown, their behaviours in the different BSE diagnostic tests need to be clarified.

In this context, the objective of this study was to assess a recently developed and commercially available Western blot method (Bio-Rad TeSeE® Wb), as a potential confirmatory technique, in comparison with a previously used home-made AFSSA-Western blot [3:5]. Our study included a comparative analysis of the sensitivity of TeSeE® Wb with that of two highly sensitive rapid tests [TeSeE® ELISA (Bio-Rad) and Herdcheck® BSE (Idexx.)]. Finally, the ability of the TeSeE® Wb to detect the two recently identified deviant TSEs in cattle, i.e. the H-type and L-type (or BASE) BSE, was taken into account.

Materials and methods

Cattle isolates

In this study, the biological samples (Table I) included a series of all the 77 brain stems from French cattle collected during active and passive surveillance programs between 01 July and 31 December 2003. In 2003, the confirmation process in France included (i) a systematic analysis with the AFSSA-Wb method using SAF84 antibody (AFSSA-Wb^{3,4784}) [35], (ii) IHC studies on previously frozen and post-fixed brain fragments using SAF84 antibody [5] in any case (n=10) of discrepancies between the AFSSA-Wb^{3,4784} method and the initial rapid test. Cases were

classified as positive or negative according to presence or not of specific immunolabelling, including size and proportions of the bands by Western blot and location and features of immunolabelling by immunohistochemistry as previously described [5, 35]. The obex region was preferentially sampled for BSE diagnosis, when possible. However, in many cases, especially from rendering plants, the quality of the samples (autolysed or putrefied) did not allow a precise recognition of the anatomic region analysed.

Serial dilutions were prepared from the brain homogenates from BSE-diagnosed cattle in brain homogenate from PrPres negative cattle. The negative brain stem tissues used for the serial dilutions series were collected at abattoirs. They were negative according to the TeSeE® ELISA (Bio-Rad), HerdCheck® BSE (Idexx) and TeSeE® Wb (Bio-Rad) methods. The negative cattle were less than 24 months old.

TeSell® Western blotting

Twenty percent homogenates in 5% (w/v) glucose were prepared and used for each method. Samples were examined by TeSeE® Wb (Bio-Rad) following the manufacturer's recommendations. Buffers used were commercial in confidence. Briefly, 20% brain homogenate was incubated (Proteinase K. and detergent solution) for 10 min at 37°C before addition of Buffer B. Samples were then centrifuged at 15,000 g for 7 min. The pellet was solubilised by incubating at 100°C for 5 min in 100 µl of Laemmli solution completed with 5% (v/ v) β-mercaptoethanol and 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS). Samples were centrifuged at 15,000g for 15 min. Supernatants were heated at 100°C for 5 min before electrophoresis. Electrophoretic separation was achieved with Criterion XT Bis-tris gels, 12% resolving gel (Bio-Rad) and XT MES running buffer (Bio-Rad) at 80 V, 30 min, then 150 V, 60 min. Proteins were transferred onto a PVDF membrane at 115 V, 60 min. Following transfer, the membrane was scaled successively with PBS buffer, ethanol and distilled water, and was saturated for 30 min with blocking solution. The membrane was incubated for 30 min at room temperature with Sha 31 (diluted 1:10 PBST) against YEDRYYRE (156-163) bovine PrP sequence [28]. The membrane was

Table 1 BSE diagnostic results on the panel of 77 cattle isolates

Original diagnostic results	Number of isotnes	TeSeE [®] We results	
		Positive	Negative
Afssa-Wh ^{TAPES} positive and IHC not analysed	a = 52	s = 52	a-0
Afsia-Wb ¹⁴⁵⁰⁴ aegative and IHC positive	n = 5	g = 2	a = 3
Afsta-Wb ^{54P84} negative and IHC not analysed	e = 15	a = 0	e = 15
Afsia-Whitana aegative and IHC degative	a = 5	a = 2	A = 3

TSE status ("+"positive, "-"negative) was established considering APSSA-Wb using Saf34 monoclocal antibody (AFSSA-Wb^(eff), immunohistochemistry (IHC) and TeSeE[®] Western blot (TeSeE[®] Wb) methods. Samples are all those that have been received, by the French NRL, for confirmatory diagnosis following active and passive surveillance of BSE from 1 July 2003 to 31 December 2003



washed with PBST, and incubated for 20 min with goat antimouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase diluted 1:10 in PBST. The ECL Western Blotting detection system by enhanced chemiluminescent reaction (ECL, Amerisham or Supersignal, Pierce) was used after the washing steps. Visualisation was by the Versa Doc image analysis system (Bio-Rad).

AFSSA-Western blot

Immunoblot analysis was carried out as previously described [35, 36]. Briefly, a 10% homogenate in 5% (w/v) glucose was prepared from 20% brain homogenate. Proteinase K was added to a concentration of 10 µg/ml and samples were incubated at 37°C for 1 h. N-Laurylsarcosyl was added at a final concentration of 10% (w/v). The samples were then centrifuged at 465,000 x g for 2 h over a 10% (w/v) sucrose cushion. The pellet was resuspended in 100 μl sample buffer (4%(w/v) SDS, 2% (w/v) β-mercaptoethanol, 192 mM glycine, 25 mM Tris, 5% (w/v) sucrose). Proteins were separated on home made acrylamide SDS-PAGE gels: 15% (resolving gel) and 4% (stacking gel), and transferred to nitrocellulose membranes in a 25 mM Tris. 192 mM glycine and 10% 2-propanol buffer constantly at 400 mA for 1 h. For immunoblotting, the membranes were blocked for 1 h with 5% (w/v) milk in PBST, then incubated for 1 h at room temperature with mAbs Saf 84 (2 µg/ ml in PBST) against 175-RPVDQY-180, Sha 31 (4 µg/ml in PBST) against 156-YEDRYYRE-163 or polyclonal antibody RB1(1:2,500 in PBST) against 110-WNKP-113 bovine PrP sequences, After washes in PBST, the membranes were incubated for 30 min at room temperature with peroxidase-labelled conjugates (Cliniscience) against mouse IgG (1:2,500 in PBST). The membranes were finally washed three times in PBST and once in PBS, and bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences) or supersignal (Pierce). PrPres signals were visualised either on film (Biomax; Kodak) or directly in an image-analysis system (Versadoc; Bio-Rad).

BSE rapid tests

BSE rapid tests were performed on 20% homogenates in 5% (w/v) glucose following the manufacturer's instructions. Buffers used are commercial in confidence.

For the Bio-Rad TeSeE* ELISA rapid test, after purification and concentration of PrPres, samples were loaded on a microtiter plate that was coated with a PrP-specific monoclonal antibody. The plate was then washed and incubated with the conjugate, and the colorimetric signal was developed. The reaction was stopped using 1 N sulphuric acid after 30 min prior to measurement of the absorbance at 450 and 620 nm. The cut-off value to determine positive results was calculated by adding a fixed value of 0.21 to the mean optical density of the negative controls.

For the Idexx HerdCheck® BSE rapid test, after an addition of the working plate diluent, samples were loaded on BSE antigen-capture plates and incubated 2 h at room temperature. After washing the plate and incubation with the conditioning buffer (10 min at room temperature), samples were washed and incubated with an HRPO-conjugated anti PrP antibody for 1 h at room temperature. The colorimetric signal was developed and the reaction stopped using 1 N HCl after 15 min prior to measurement of the absorbance at 450 and 620 nm. The cut-off value to determine positive results was calculated by adding a fixed value of 0.12 to the mean optical density of the negative controls.

Results

Antibodies as a major determinant of sensitivity in Western detection of PrPres

We compared the analytical sensitivity of the home-made AFSSA-Wb, using different antibodies, with a recently developed and commercially available Western blot method (TeSeE® Wb Biorad), using the Sha31 monoclonal antibody.

First, we used both Western blot methods to examine two different series each constituted of ten independent dilutions of a brain homogenate from a BSE-diagnosed bovine in brain material from PtPres negative cattle, for which the ratio of positive to negative brain tissues ranged from 1:1 to 1:512.

The differences in analytical sensitivities between TeSeE® Wb and AFSSA-Wb are illustrated in Fig. 1. In the 1:2 dilution series, comparison of the two methods for the last dilution point at which PrPres was detectable showed a difference of eight dilutions (i.e. difference between dilution 10 in TeSeE® Wb and dilution 2 in AFSSA-WbRB1) when the RB1 antibody was used for PrPres detection in Afssa-WbRB1 (Fig. la, b). As a result, approximately 300 fold less PrPres positive brain equivalent material was required to detect PrPres with TeSeE® Wb than with AFSSA-WbR61. This difference was smaller, but still visually detectable, when monoclonal antibody SAF84 was used instead of RB1 in the AFSSA-Wb^{SAFB4} method (Fig. 1a, c), approximately 40 fold less brain material was required to detect PrPres with TeSeE® Wb (i.e. difference between dilution 10 in TeSeE® Wb and dilution 5 in AFSSA-Wb^{SAFE4}). Finally, when the same Sha31 antibody was used in the two methods, the analytical sensitivities were no longer visually different (Fig. 1a, d), showing that the PrFres extraction methods gave similar yields of PrPres.

Nevertheless, additional bands were observed after the ultracentrifugation preceding the APSSA-Wb^{Shall}, which



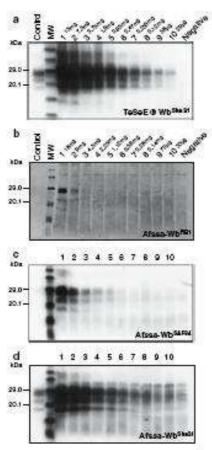


Fig. 1. Differences in analytical sensitivities between TeSeE* and AF-SSA-Wb using different antifordies. Each series represents 10 independent dilutions (kness 1 to 10) of a brain homogenate from a BSE-positive bowine in brain material from PtPres negative cattle that was analysed with TeSeE* using Sha31 mAb (n), AFSSA-Wb using RB1 polytional antibody (b), AFSSA-Wb using ShB4-mAb (c) or AFSSA-Wb using Sha31 mAb (d). The ratio of positive to negative brain tissues from lanes 1 to 10 magest from 1:1 to 1:512 and the quantity of equivalent brain material loaded in each tane is indicated. The result from brain material from PtPres negative cuttle is shown in the lane "arguithe". A typical cattle-BSE positive control has been added in each panel (lane Control). Molecular weight standard (lane MW)

might hamper correct interpretation of the analysis, at least when small amounts of PrPres are present. In contrast, no background was observed after the TeSeE® Wb analyses using this same Sha31 antibody.

Similar results were obtained in the second series with identical differences in the antibodies-linked sensitivities and extraction-associated backgrounds (data not shown). Efficiency of TeSeE® Western blot method for analysis of field bovine samples

The TeSeE® Wb method was assessed by blinded analysis of the series of samples received for confirmatory diagnosis following active and passive surveillance of BSE from 01 July 2003 to 31 December 2003 (Table 1).

The original diagnoses of the 77 samples included 52 positive and 25 negative samples using the AFSSA-Wb^{SAFM}. IHC was used for 10 of the AFSSA-Wb^{SAFM} negative cases and 5 of these were positive. When the TeSeE® Wb with Sha31was applied to the 52 samples, which were AFSS A-Wb^{SAPSH} positive, but also two of the five IHC positive cases were confirmed as positive (Fig. 2a, b). In one of these two cazes, the three PrPres glycoforms were detected in three different brain fragments (Fig. 2 a), whereas in the other one only the diglycosylated band was clearly identified in three different brain fragments (Fig. 2b). The remaining three cases IHC positive cases could not be confirmed with the TeSeE* Wb test. However, two of the five other samples which were originally negative by both APSSA-WbSAFSH and IHC gave positive results using the TeSeE® Wb, with the typical 3 band PrPres pattern (Fig. 2c, d).

Western blot diagnosis of atypical forms of BSE

Since 2004, two molecular patterns different from typical BSE have been reported in TSE positive cattle, referred to as the L-type (or BASE) and H-type according to the lower or higher apparent molecular masses of unglycosylated

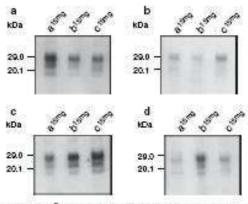


Fig. 2. TeSeE[®] Western blot results on four different cutile isolates. Three different brain stem regions have been analysed from each sample (laser a, b and c) and 15 ang equivalent of those were loaded on each tane. Two isolates were classified as positive by IHC but negative by AFSSA-Wb^{SAFM} (a, b). Two isolates were classified as negative by IHC and AFSSA-Wb^{SAFM} (c, d)

PrPres, respectively. The decreased level of the diglycosylated band was however the most prominent molecular feature described for BASE.

On-going retrospective studies of this series of French BSE-positive samples have led to the classification of 49 cases as typical, 2 as H-type and one as L-type. Seven TSEpositive cattle could not be classified due to their low levels of PrPres preventing detailed analysis of the PrPres pattern.

TeSeE® Western blot reliably identified as positive not only the typical BSE cases but also the H-type and L-type cases. Typical examples of Western blot patterns produced by Sha31 mAb for positive samples of the different molecular types are shown in Fig. 3. As a result of differences in the proportions of glycoforms between the different molecular types in BSE-positive samples, the three glycoforms are more consistently detected in the L-type even after dilution of the sample, while in faintly positive typical BSE only the diglycosylated band can sometimes be detected. The H-type has intermediate features. Interestingly, when the sensitivities with Sha31 and SAF84 mAbs are compared (Fig. 3), Sha31 presents a higher sensitivity for typical BSE as previously stated (Fig. 1), which is not the case for L-type BSE, in contrast SAF84 is clearly more sensitive for H-type BSE. Moreover the PrPres pattern in the only Htype BSE with SAF84 is clearly different with an additional band at # 14 kDa.

Comparison of TeSeE® Western Blot and two highly sensitive rapid BSE-diagnosis tests

The sensitivity of some of the new rapid tests used for BSE surveillance has been strongly increased in recent years, requiring increased sensitivity of the confirmatory methods. We therefore compared the sensitivity of the TeSeE® Western blot method with that of the Bio-Rad TeSeE® ELISA or Idexx HerdChek® BSE rapid tests that had shown the highest analytical sensitivities during the European validation of rapid diagnostic tests [25, 26].

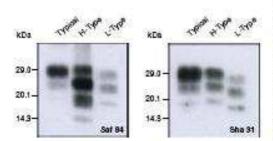


Fig. 3 Western blot results on different BSE types with Sha31 and Saf84 mAbs. One L-type (or BASE), 1 H-type and 1 typical BSE isolates have been analyzed by Western blot with Sha31 and Saf84 mAbs

We estimated the analytical sensitivities on four different dilution series from four different BSE-infected cattle. These series had been prepared by dilution of a BSE-positive brain homogenate in brain material from PrPres-negative cattle.

The analytical sensitivity was higher with the TeSeE[®]
Western blot than with the TeSeE[®] HLISA test (Fig. 4a).

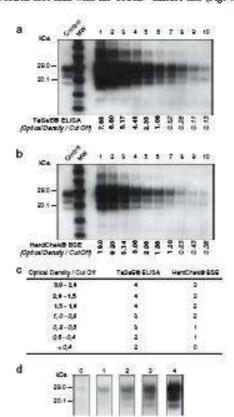


Fig. 4 Comparative sensitivities of TeSeE* Western blot and TeSeE* ELISA or HerdChet* BSE rapid tests. Analytical sensitivity of TeSeE* Whis compared with TeSeE* ELISA (a) or HerdChet* BSE (b) results, on two dilutions series from two different BSE-infected cuttle. Series have been prepared by cilution of BSE-positive brain homogenates in brain material from PrPres-negative cuttle. For each dilution, rapid lest result is expressed by optical density divided by the cut-off value, and results indicated in bold are positive. A typical cattle-BSE positive control has been added in each panel (lane Control). Moterator weight standard (lane MW). Comparative sensitivity was estimated after analyses of 14 BSE-positive cases, Different brain stem regions have been analysed with TeSeE* Wb, TeSeE* ELISA anal/or HerdChek* BSE. Quantitative ELISA results (optical density divided by the cut-off) were compared with TeSeE* Wb as assessed by a score from 0 to 4, for each of the two ELISA tests (c). TeSeE* Wb score corresponded to the patterns indicated is cl. according to the detectability and intensity of the three PrPres glycofforms.



When the dilution became negative with TeSeE® ELISA (optical density (OD/cut-off< 1), we still observed a strong three-band pattern with TeSeE® Western blot. An identical result was obtained with all four dilution series analysed. The differences in analytical sensitivity with the HerdChek® BSE rapid test were smaller but still visually detectable (Fig. 4b). When the dilution became negative with the HerdChek® BSE rapid test (OD/cut-off< 1). PrPres could still be detected with TeSeE® Western blot; however, this corresponded to the dilution in which only the diglycosylated PrPres form was clearly detectable. Identical results were obtained for the four other dilution series analysed.

The comparative sensitivities of the TeSeE® Western blot and of the ELISA rapid tests were analysed more precisely by then analysing different samples of the brain stem from 14 BSE-positive cases. Western blot results were expressed as a score from 0 to 4, as illustrated in Fig. 4c, and ELISA results were expressed by comparison with the cut-off levels determined for each of the ELISA rapid tests. In agreement with the previously described analytical sensitivities of the tests, TeSeE Western blot could detect a strong three-band pattern (Western blot score > 2) for values clearly below the cut-off with the TeSeE® ELISA rapid test, whereas in the HerdChek® BSE test, only the diglycosylated and faintly the monoglycosylated PrPres bands, were detectable (Western blot score = 1) for values near the cut off.

Given the initial amount of brain tissues used in the different tests, samples with a strong TeSeE® ELISA signal (e.g., OD > 2.5 or OD/cut off > 11 in TeSeE® Elisa) were positive when 30 μ g of tissue were tested by TeSeE® Western blot. Samples with a lower TeSeE® Elisa signal (e.g. OD near the cut off value or OD/cut off = 1) were positive (three-band pattern) with 4 mg of tissue with TeSeE® Western blot.

Samples with low positive HerdChek® BSE immunoreactivity (e.g. OD near to the cut off value or OD/cut off = 1) were positive (three-band pattern) with 30 mg of tissue with TeSeE® Western blot or faintly positive (1 or 2 band pattern) with 15 mg of tissue.

Discussion

During the post few years, important changes have occurred in the post-montem diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle due to the development of different rapid tests allowing the detection of the protease-resistant PrP (PrPres) associated with the disease [24, 30]. After the early period of the BSE epidemic, during which only histological diagnosis of clinically affected animals was possible (passive surveillance), rapid tests were developed for the large scale testing of cattle to prevent BSE-affected animals from entering the food chain [23]. This also allowed the

analysis of brain samples collected long after death under conditions of severe autolysis, and also the potential detection of BSE-infected animals at an earlier stage during the incubation period [29]. As a result a large-scale active surveillance of the bovine population was set up in Europe and elsewhere, at abattoirs and in rendering plants. The sensitivity, specificity, and detection limits of tests for BSE diagnosis were evaluated at the European level, but only for the commercial rapid tests used for large scale testing [9].

At the early stages of active surveillance in cattle, we described an AFSSA-Wb, based on ultracentrifugation concentration of PrPres obtained after proteinose K treatment [36], that had been challenged against the previously used reference histological diagnosis method and that we used as a biochemical confirmatory method between 1998 and 2004. We have now compared this method with a commercially available Western blot method, the TeSeE® Western blot (Bio-Rad). We show that this latter method is much more sensitive for BSE diagnosis and also that this increased sensitivity is mainly due to the choice of a more sensitive monoclonal antibody (Sha31) [35, 36] However, although the concentration procedure used in the TeSeE Western blot gives comparable amounts of PrPres from a same quantity of brain material, it also produces better quality Western blot pictures when large amounts of materials need to be loaded. Non-specific bands, in addition to the PrPres specific bands, are indeed observed after PrPres concentration by ultracentrifugation, whereas, whatever the quality of the brain samples (bloody, autolysed or putrefied), this was not observed with TeSeE® Western blot. This facilitates the interpretation of results in cases where the levels of PrPres in the brain fragment examined are low.

According to the OIE manual recommendations for SAF-immunoblot confirmatory diagnosis of BSE, 1 g brain tissue is required to confirm a suspect sample showing a "strong test signal (e.g. OD > 2.5 in TeSeE® Elisa)" using SAF-immunoblot, and up to 4 g for a "weak rapid test signal (e.g. OD < 2.5 in TeSeE® Elisa)". However, the OfE manual does not indicate a particular antibody for PrPres detection and the availability of anti PrP antibodies has considerably increased in recent years. With TeSeE® Wb 30 µg and 4 mg of tissues were found sufficient for BSE diagnosis from samples with a "strong test signal" and "weak rapid test signal", respectively. The sensitivity of TeSeE® Western blot may be comparable with that of the second OIE reference method, i.e. IHC [5, 21, 22] although a detailed comparison of the two methods was not possible in this study. An accurate comparison is intrinsically difficult, because it involves the analysis of different brain regions from a same animal. However, in our series of 10 bovine samples, TeSeE® Western blot allowed PrPres to be detected in two cases, which had been found negative by IHC, but also failed to detect PrPres in three IHC positive

2 Springer

cattle. Given the major limitation of the study which is the uncertainty regarding the brain region analysed in a number of poorly preserved samples, the genuine BSE status of these latter three cases could not be definitely ascertained in the absence of complementary data, such as examination of infectivity by bioassay. Is indeed well established that the beterogeneous distribution of PrPd can explain a failure to detect PrPd in some brain samples [16, 20, 40, 45, 46]. It should be emphasised that, especially in samples from animals collected at rendering plants, recognition of the precise brain regions sampled may be difficult, whereas precise targeting of PrPres in the central nervous system is a major ballmark of BSE [49].

Changes in the reagents and methods available for BSE diagnosis in recent years have led to the development of rapid tests with increased senautivity. In this context, it is essential to ensure that confirmatory methods are sufficiently sensitive to confirm BSE diagnosis in cases with low levels of PrPd. We also demonstrated in this study that TeSeE® Western blot has higher sensitivity than two highly sensitive rapid tests (TeSeE® ELISA, HerdCheck® BSE). This should allow confirmatory BSE diagnosis even in cases where the levels of positivity are close to the cut-offs for these rapid tests.

Finally, although the BSE epidemic is now decreasing in most affected countries and should be controlled within the next few years [1, 14, 42, 43], the recent identification of "unusual" BSE cases [7, 15, 33] has raised some concern that other forms of prion diseases, possibly with a different etiology, might affect cattle. Whereas this is supported by a number of recent experimental studies, which suggest that at least two TSE strains exist in cattle that differ from the one initially isolated during the BSE epidemic in the UK, [2, 6, 8, 13], the question of possible "sporadic" cases of BSE has been raised [3, 11]. In such a situation, these cases would be detected and would still potentially represent some health concern even after the end of the current BSE food-borne epidemic, and any diagnostic methods should be able to detect such "unusual" cases in the future. Interestingly, our series of BSE samples contained one or two samples of each of the deviant BSE phenotypes, which have been described so for, and we were able to determine the features of each case. Not only were such cases readily confirmed by the TeSeE Western blot method, but the unusual features initially described in such cases were also recognised whatever the positivity level of the sample. Interestingly, an unusual PrPres pattern is specifically observed in H-type BSE with C-terminal antibodies such as SAF84 which was previously shown to be the result of the presence of an additional, more C-terminally cleaved and either glycosylated or not, PrPres form [8]; this was accompanied with an increased sensitivity of such antibodies for this particular BSE type, illustrating potential strain-specific differences between the performances of diagnostic methods.

All together, our data describe the features of a highly sensitive and readily available biochemical confirmatory approach for BSE diagnosis that could help in the future assessment of confirmatory methods.

Arknowledgments. The authors are grateful to J-M. Bilhende for his technical support and helpful discussions. We also wish to thank M. Lavoine for her excellent technical assistance. This work was parity supported by NEUROPRION European setwork of excellence (EUROSTRAINS project).

References

- Abrial D, Calavas D, Jarrige N, Duorot C (2005) Spatial heterogeneity of the risk of BSE in France following the bus of meat and bone ment in cuttle feed. Prev Vet Med 6:69-82
- Baron T, Biacabe AG (2006) Origin of bovine spongiform encephalogothy. Lancet 36:297–298. Author reply 298–299
- Baroa T, Biacabe AG, Arsac JN, Benestad S, Groschup MH (2006) Atypical imasmissible apongiform excephalopathies (TSEs) in ruminants. Vaccine 25:5625-5630
- Beekes M, Baldauf E, Cassens S, Diringer H, Keyes P, Scott AC, Wells GA, Brown P, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC (1995) Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield partification method. J Gen Virol 76(P) 10):2567–2576
- Beacsik AA, Debeer SO, Baroa TG (2005) An alternative pretreatment procedure in animal transmissible spongiform enceptulopatiles diagnosis using PrPsc immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 5:1199–1202
- Beringue V, Benesik A, Le Dur A, Reine F, Lai TL, Chenais N, Tilly G, Biacute AG, Baron T, Vilotte JL, Laude H (2006) Isolation from cuttle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform exceptual opathy. PLoS Pathog 2:e112
- Biacube AG, Lapianche JL, Ryder S, Baron T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prior diseases. EMBO Rep 5:110–115
- Bindube AÖ, Jacobs JG, Benosik A, Langeveld JP, Baron T (2007)
 H-type bovine spongiform escephalopathy: complex molecular features and similarities with human prior diseases. Prior 1:61–68
- Bird SM (2003) European Union's rapid TSE testing in adult cuttle and sheep: implementation and results in 2001 and 2002. Stat Methods Med Res 1:261–278
- Botton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prior. Science 21:1309–1311
- Brown P, McShane LM, Zanosso G, Detwiler L (2006) On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob Disease. Emerg Inf Dis 12:1816–1821
- Bruce ME, Will RC, Ironside JW, McConcell I, Drummond D, Suttle A, McCardie L. Chree A. Hope J, Birket C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature 38:498–501
- Baschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eidea M, Baron T, Cacalone C, Groschup MH (2006) Atypical BSE to Germany-Proof of transmissibility and biochemical characterization. Vet Microbiol 117:103-116
- ical characterization. Vet Microbiol 117:103–116
 Calavas D, Ducroi C, Baron TG (2004) Past, present and future of boxine spongiform encephalopathy in France. Curr Top Microbiol Innunol 23:51–63
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M (2004) Identification of a second

D Springer

- bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with spondic Creutzfeldt-Jakob disease, Proc Nati Acad Sci USA 10:3065-3070
- Chaplin MJ, Bartow N, Ryder S, Simmons MM, Spencer Y, Hughes R, Stack MJ (2002) Evaluation of the effects of controlled autolysis on the international controlled autolysis on the international controlled automatohistochemistry from natural cases of scraple and BSE. Res. Vet Sci 7:37–43
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbion K, Mayer L, Keift JM, Garoa C, Haase A (1985) Identification of scrapie prion protein-specific raRNA in scrapie-infected and uninfected brain. Nature 31:331–333
- Collinge J, Rossor M (1996) A new variant of prior disease. Lancet 34:916-917
- Cooley WA, Clark JK, Stack MJ (1998) Comparison of scrapleassociated fibril detection and Western immunoblotting for the diagnosis of natural owine scraple. J Comp Pathol 11:41-49
- Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farretty SS, Stack MJ (2001) Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine apongitorin encephalopathy (BSE) in the UK. J Comp Pathol 12:64–70
- Debeer SO, Barco TG, Bencsik AA (2001) Immunohistochemistry of PrPsc within bowine spongiform encephalopathy brain samples with graded intolysis. J Histochem Cytochem 4:1519–1524
- Debeer SO, Baron TG, Beacsik AA (2002) Transmissible spongiform exceptulopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. J Histochem Cytochem Scill-616
- Destys JP, Comoy E, Hawkins S, Simon S, Schimmet H, Welts G, Grassi J, Moynagh J (2001) Screening thanghtered cuttle for BSE. Nature 40:476–478
- Desiys JP, Grassi J (2005) [Screening tests for animal TSE: present and future]. Pathol Biol (Paris) 5:221–228
- European Commission (1999) The evaluation of lests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. http://europa.eu/art/comm/food/fs/bsebse12_en.pdf
- European Commission (2002) The evaluation of five rapid tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in boxines (2nd study). http://europa.eu/in/comm/food/fs/bse/ box42_en.odf
- Farquhar CF, Somerville RA, Ritchie LA (1989) Post-moriem immacodiagnosts of scrapie and bovine spongiform escephalopathy. J Virol Methods 2:215–221
- Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Creminon C, Vilette D, Lehmann S, Grassi J (2005) Screening of 145 arti-PcP monoclosal antibodies for their capacity to inhibit PrPS: repticution is infected cells. J Biol Chem. 28:11247-41258
- Grassi J (2003) Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests. Transfus Clin Biol 1:19-22
- Grassi J, Comoy E, Simon S, Creminon C, Frobert Y, Trapmann S, Schimmel H, Hawkins SA, Moyaagh J, Destys JP, Wells GA (2001) Rapid lest for the preclinical postmorters diagnosis of BSE in central nervous system tissue. Vet Rec 14:577–582
- Haritani M, Spencer YI, Wells GA (1994) Hydrated autoclave pretreatment enhancement of priori protein immunoreactivity in formatio-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. Acta Neuropathol (Berl) 828–90
- Hill AF, Destrustais M, Joiner S, Sidle KC, Gowtand I, Collinge J, Doey LJ, Lautos P (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature 38:448-450
- 33. Jacobs JG, Langeveid JP, Biacabe AG, Acutis PL, Potak MP, Gavier-Widen D, Buschman A, Caramelli M, Casalooe C, Mazza M, Groochup M, Erkeus JH, Davidse A, van Zijderveid FG, Baron T (2007) Molecular discrimination of atypical bovine spongilorm encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in europe. J Clin Microbiol 4:1821–1829

- Katz JB, Pedersen JC, Jenny AL, Taylor WD (1992) Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine sample and bovine spongiform encephalopathy (BSE). J Vet Diagn Invest 4:447–449
- Madec JY, Gooschap MH, Buschmann A, Beili P, Calavas D, Baron T (1998) Sensitivity of the Western blot detection of prior protein PtPres in natural steep tompie. J Vicol Methods 7:169–177
- Madec JY, Belli P, Calavas D, Baron T (2000) Efficiency of Westera bioting for the specific immunodetection of proteinase Kresistant prior protein in BS E diagnosts in France, Vet Rec 14:74-
- Oesch B, Westaway D, Walchii M, McKinley MP, Keni SB, Aebersold P, Bany RA, Temput P, Teptow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissman C (1985) A cellular gene encodes scrapic PVP 27—30 protein. Cell 47:35–746
- OE (2004) Boyine Spogiform Eocephalopathy, Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office laternational des Epizooties update 23.07.2004
- Richt JA, knotte RA, Alt D, Nicholson EM, Hamir AN, Czab S, Kinge J, Davis A3, Hall SM (2007) Identification and characterization of two bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in the United States: J Vet Diaga Invest 19:142–154
- Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Dobert M, Vandevelde M, Heim D, Oesch B, Moser M (1999) Validation of a western immunotifoling procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a mpid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Acta Neuropathol (Berl) 9:437-443
- Seuberlick T (2006) Spongiform encephalopathy in a ministure zebu. Emerg Infect Dis 1:1950–1953
- 42. Supervie V, Costagliola D (2004) The unecognised French BSE
- epidemic. Vet Res 3:349–362
 43. Supervie V, Contaglion D (2006) How was the French BSE epidemic mederestimated? C R Biol 32:106–116
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Meioen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vroman ME, Langeveld JP (1995) immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain ligate of these with natural schools. Vet Pathol 3:250, 308.
- tissue of sheep with natural temple. Vet Pathol 3:290-308
 45. Vidal E, Masquez M, Ordonez M, Raeber AJ, Struckmeyer T, Oesch B, Siso S, Pamarola M (2005) Comparative study of the PVPB-SE distribution in braits from BSE field cases using rapid less. J Virol Methods 12:24-32
- Vidal E, Marquez M, Tortosa R, Costa C, Seraño A, Pumarola M (2006) Immurohistochemical approach to the pathogenesis of bowire spongiform encephalopathy in its early stages. J Virol Methois 13:15–29
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Duwson M, Bradley R (1987) A novel progressive spongiform excephalopathy in cutile. Vet Rec. 12:419

 –420
- Wells GA, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgion RJ, David GP (1989) Bovine spongiform exceptualoguity: diagnostic significance of vacuolar changes in selected anciei of the medulla oblonguta. Vet Rec 12:521–524
- Wells GA, Spencer YI, Harimai M (1994) Configurations and topographic distribution of PrP in the central services system in bovine spongiform exceptualopathy: an immunohistochemical study. Ann N Y Acad Sci 72:350-352
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poter S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 34:921-025
- Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T (2003) Atypical proteinase K-resittant prior protein (Prfres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein siter. Jpn J Infect Dis 5:221–221

Annexe 2 : Matériels de l'étude et résultats

	Type d'analyse- confirmation en 2003		Résultat statut de l'animal	Résultat avec le nouveau western blot	Remarques
	WB AFSSA	IHC/ELISA			
1	WB AFSSA +		Positif	Positif	
2	WB AFSSA +		Positif	Positif	
3	WB AFSSA +		Positif	Positif	
4	WB AFSSA +		Positif	Positif	
5	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
6	WB AFSSA +		Positif	Positif	
7	WB AFSSA +		Positif	Positif	Variant H
8	WB AFSSA +		Positif	Positif	
9	WB AFSSA -	IHC -	Négatif	Positif	
10	WB AFSSA +		Positif	Positif	
11	WB AFSSA +		Positif	Positif	
12	WB AFSSA +		Positif	Positif	
13	WB AFSSA +		Positif	Positif	
14	WB AFSSA -	IHC + ELISA -	Positif	Négatif	
15	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
16	WB AFSSA +		Positif	Positif	
17	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
18	WB AFSSA +		Positif	Positif	
19	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
20	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
21	WB AFSSA +		Positif	Positif	
22	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
23	WB AFSSA -	IHC +	Positif	Négatif	
24	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
25	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
26	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
27	WB AFSSA +		Positif	Positif	Variant L
28	WB AFSSA +		Positif	Positif	
29	WB AFSSA +		Positif	Positif	
30	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
31	WB AFSSA +		Positif	Positif	
32	WB AFSSA +		Positif	Positif	
33	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
34	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
35	WB AFSSA -		Négatif	Négatif	
36	WB AFSSA +		Positif	Positif	
37	WB AFSSA +		Positif	Positif	
38	WB AFSSA -	IHC +	Positif	Positif	
39	WB AFSSA +	пс т	Positif	Positif	Variant H

	Type d'analyse- confirmation en 2003		Résultat statut de l'animal	Résultat avec le nouveau western blot
	WB AFSSA	IHC/ELISA		
40	WB AFSSA +		Positif	Positif
41	WB AFSSA +		Positif	Positif
42	WB AFSSA +		Positif	Positif
43	WB AFSSA +		Positif	Positif
44	WB AFSSA +		Positif	Positif
45	WB AFSSA +		Positif	Positif
46	WB AFSSA +		Positif	Positif
47	WB AFSSA -	IHC + ELISA -	Positif	Négatif
48	WB AFSSA -	IHC -	Négatif	Négatif
49	WB AFSSA +		Positif	Positif
50	WB AFSSA -	IHC -	Négatif	Positif
51	WB AFSSA -	IHC +	Positif	Positif
52	WB AFSSA -		Négatif	Négatif
53	WB AFSSA -	IHC -	Négatif	Négatif
54	WB AFSSA +		Positif	Positif
55	WB AFSSA +		Positif	Positif
56	WB AFSSA +		Positif	Positif
57	WB AFSSA +	ELISA -	Positif	Positif
58	WB AFSSA +		Positif	Positif
59	WB AFSSA -		Négatif	Négatif
60	WB AFSSA +		Positif	Positif
61	WB AFSSA +		Positif	Positif
62	WB AFSSA +		Positif	Positif
63	WB AFSSA +		Positif	Positif
64	WB AFSSA +		Positif	Positif
65	WB AFSSA +		Positif	Positif
66	WB AFSSA +		Positif	Positif
67	WB AFSSA +		Positif	Positif
68	WB AFSSA +		Positif	Positif
69	WB AFSSA +		Positif	Positif
70	WB AFSSA +		Positif	Positif
71	WB AFSSA +		Positif	Positif
72	WB AFSSA +		Positif	Positif
73	WB AFSSA +		Positif	Positif
74	WB AFSSA +		Positif	Positif
75	WB AFSSA +		Positif	Positif
76	WB AFSSA -	IHC -	Négatif	Négatif
77	WB AFSSA +		Positif	Positif

Annexe 3: Protocole du Western blot de l'AFSSA

Un homogénat à 10% est réalisé à partir d'un homogénat à 20% de cerveau dans du glucose 5%. On ajoute ensuite la protéinase K à $10\mu g/mL$ pendant 1h à 37°C. Après réaction, on rajoute du N-Laurylsarcosyl à une concentration final de 10% puis l'échantillon subit une centrifugation à 465 000 g pendant 2h avec du sucrose 10%. Le culot contenant la PrPres est remis en suspension dans $100\mu L$ d'une solution tampon composée de 4% de sodium dodecylsulfate (SDS), de 2% de β -mercaptoéthanol, de 192mM de glycine, de 25mM de Tris et de 5% de sucrose. Ce tampon permet de linéariser et d'homogénéiser les charges de toutes les PrPres. Une nouvelle centrifugation est opérée pour éliminer les débris cellulaires restants et le surnageant est récupéré.

L'étape suivante correspond à l'électrophorèse réalisée sur un gel de fabrication de l'AFSSA: un gel d'acrylamide SDS-PAGE composé de 15% de gel de résolution et de 4% de gel d'empilement. Après migration, les protéines sont transférées à une membrane de nitrocellulose dans un tampon contenant 25mM de Tris, 192mM de glycine et 10% de propan-2-ol pendant 1h à 400 milliampère.

Viennent alors les étapes de la révélation. La membrane est saturée par une solution de blocage riche en protéine à base de 5% de lait dans du PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween-20) pendant 1 heure. Ensuite on fait agir 2µl/ml dans du PBST d'un premier anticorps, qui est un anticorps de souris monoclonal anti-PrP, le SAF84, pendant une heure. Ce dernier reconnaît les acides aminés 175-180 de la PrP bovine. Après rinçage au PBST, la membrane est incubée pendant 30 minutes avec un second Ac anti-souris couplé à un conjugué marqué par une peroxydase. La PrPres est révélée par action d'un substrat ECL (Electro ChimiLuminescence) sur l'enzyme après trois rinçages au PBST et un au PBS.

Le signal peut être visualisé par impression sur un film radiographique ou directement à l'aide d'analyseur d'image Versa Doc de Bio-Rad.

Annexe 4 : Protocole du Western blot TeSeE® commercialisé par Bio-Rad

Un homogénat de 20% de tissu cérébral est préparé dans une solution de glucose 5%. Cet homogénat est incubé avec de la protéinase K et une solution détergente pendant 10 min à 37°C. Un tampon nommé B par le fabricant et de composition gardée en confidence commerciale est ajouté. L'échantillon est alors centrifugé à 15 000 g pendant 7 min. Le culot est resolubilisé dans 100μ L de solution de Laemmli à laquelle est ajoutée 5% de β -mercaptoéthanol et 2% de sodium dodecylsulfate à 100°C pendant 5 min. Une nouvelle centrifugation est réalisée à 15 000 g pendant 15 min. Le surnageant est alors récupéré et chauffé pendant 5min à 100°C. Il est ensuite prêt pour la réalisation de l'électrophorèse.

Celle-ci se réalise sur un gel Criterion XT Bis-Tris avec 12% de gel de résolution et un tampon de marche XT MES. Elle se fait à 80 Volt pendant 30min puis à 150 Volt pendant 60 min. Les protéines sont alors transférées sur une membrane hydrophobe de PVDF (Polyvinylidene difluoride) pendant 60 min à 115 Volt.

Suite à ce transfert, la membrane est trempée avec d'abord du PBS puis de l'éthanol et finalement avec de l'eau distillée pour perdre l'hydrophobicité de la membrane. Elle est ensuite saturée pendant 30 min avec une solution bloquante. L'anticorps monoclonal primaire de souris Sha31 dilué à 1:10 dans du PBST est mis sur la membrane qui est incubée à température ambiante pendant 30 min. Cet anticorps se fixe au niveau des acides aminés 156-163 de la PrP bovine. La membrane est alors rincée avec du PBST et incubée 20 min avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à une peroxydase de raifort à une dilution de 1:10 dans du PBST.

La révélation se réalise avec un substrat electrocheminulescent (ECL) après plusieurs étapes de nettoyage. La visualisation peut s'effectuer sur film radiographique ou grâce au système d'analyse d'image Versa Doc commercialisé par Bio-Rad.

NICOLLO JULIA

METHODES DE DIAGNOSTIC DE L'ENCEPHALOPATHIE SPONGIFORME BOVINE (ESB) CHEZ LES BOVINS : CONTRIBUTION A LA VALIDATION D'UN TEST DE CONFIRMATION NATIONAL

Thèse Vétérinaire : Lyon, 21 avril 2010

RESUME:

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles sont des pathologies neurodégénératives fatales et rares qui affectent l'homme et les animaux. Parmi celles-ci, l'encéphalopathie spongiforme bovine a été largement médiatisée de part le nombre de cas important constatés dans les années 1990 et de part sa transmission à l'homme sous forme du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Dans ce travail, après un point sur les données actuelles des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles et sur la protéine prion comme agent pathogène, l'encéphalopathie spongiforme bovine et en particulier son diagnostic sont développés. Puis nous présentons le test de confirmation actuel de l'AFSSA-Lyon, laboratoire français de référence et nous validons ce test au niveau international en le comparant à l'ancien test de confirmation de l'AFSSA-Lyon et à d'autres tests dits rapides, très sensibles et spécifiques.

MOTS CLES:

- Prion - Western blot

- Encéphalopathie spongiforme bovine - Bovin

- Diagnostic

JURY:

Président : Monsieur le professeur FLANDROIS

1^{er} Assesseur : Monsieur le professeur KODJO

2^{ème} Assesseur : Madame la maître de conférence ARCANGIOLI

Membre invité : Monsieur BARON, de l'AFSSA-Lyon

DATE DE SOUTENANCE : 21 avril 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR:

« La Passagère » Haut Place du Foirail 63 680 LA TOUR D'AUVERGNE