



131THV-2

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCR.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRE ET BIOLOGIQUE
Département des sciences vétérinaires

Projet de fin d'étude en vue d'obtention
Du Diplôme de Docteur Vétérinaire

Thème :

Etude Bibliographique
Sur le Prion

Présenté par :
Melle **BENCHERIFA Yasmina**

Date de soutenance : 04/11/2007

Mr **BERBERE A.**
Mr **AKLOUL K.**
Mr **DELLALI R.**
Mr **YAHIMI A.**

Devant le jury :
Maître de conférence, Université de Blida
Chargé de TP, Université de Blida
Chargé de TP, Université de Blida
Chargé de cours, Université de Blida

Président
Examineur
Examineur
Promoteur

Année universitaire : 2006/ 2007

REMERCIEMENT

Au terme de ce modeste travail je tiens à remercier du fond du cœur :

*Mon promoteur Mr.YAHIMI ABDEL KARIM pour son aide qui m'était très utile.

*Mes guides et examinateurs Mr.DELLALI RAMZI et Mr.AKLOUL ; pour leurs conseils et leur patience et gentillesse.

*Notre chef de département Mr.BERBERE.A ;pour ce qu'il a apporté à notre institut.

*Mes chers enseignants qui m'ont enrichi tout au long de mon parcours.

*Mes chères amies : MOUNA, NASSIMA, AFAF, LEYLA.

*Mes chères cousines : ZINEB, NADIA, LAMYA et NESRINE.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leur soutien tout au long de mon parcours.

Mes chers frères :AMINE et FAROUK.

Mes chères sœurs :HADJIRA et KHAOULA.

Mon cher beau frère :SIDALI

Mon cher neveu SAMY et ma nièce FARAH.

A Mr.TIRAOUI Amine.

A toute la famille BENCHERIFA et la famille MEHOR.

Résumé :

Le prion ; agent transmissible non conventionnel (protéine), occasionnant de nombreuses maladies humaines (**maladie de Creutzfeldt Jakob, l'insomnie Familiale Fatale, le syndrome de Gerstmann Straussler Scheincker et le kuru**) et animales (**l'Encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton**) communes, se caractérisant par des troubles comportementaux, troubles des fonctions cognitives et d'autres.

Son diagnostic est peu évident, il repose sur l'examen du LCR du vivant du malade, lequel révèle quelques modifications biochimiques; ou sur un diagnostic de certitude basé sur l'examen du cerveau ou d'une coupe de ce dernier en post-mortum pour une étude histologique.

Les mots clés : **Prion, Lésion, ESST, Spongiose, Gliose, ATNC.**

capitulation :

The prion is a unconventional transmissible agent (protein), able to cause several human illnesses (creutzfeldt jakob disease, fatal familial insomnia, the syndrome of Gerstmann straussler scheinken, the kuru), And animal illnesses (the bovine spongy encephalopathy, the ovine and goats trembling), all are characterized by troubles in behavior and cognitive functionsext.

It is not so obvious to make diagnostic about the prion, it limited either on the cerebrospinal fluid test applied on living ill, to detect any biochemical changes; or on the histological examination of animals on post-mortum.

Some key words: - prion

- Lésion

- ETSS

- spongiosis

- gliosis

- AUCT:

الخلاصة:

يعد بروتين "prion" عامل مرضي متنقل غير تقليدي قادو على التسبب بعدة أمراض فمثلا يمكنه أن يسبب للبشر مرض

" Creutzfeldt Jakob و Insomnie fatale familiale، أو

أعراض

gerstmann staussler scheinker و "kuru"، أما بالنسبة

للحيوانات فيمكنه أن يسبب Encéphalopathie spongiforme bovine و Tremblante du mouton. تظهر على شكل اضطرابات في السلوك و الوظائف المعرفية و غيرها .

تشخيص المرض إما عن طريق إجراء اختبار "LCR" يظهر أي إختلالات بيوكيميائية يمكن أن تظهر على مصل دم المريض و هو حي، أو بإجراء الفحوص على عينات من خلايا دماغه بغير كشف أي أعراض غير طبيعية يمكن أن تطرأ عليها بعد موت المريض .

كلمات مفتاحية : prion-

ESST-

Spongiose-

Gliose -

ATNC-

Glossaire

- ❖ ***CJ** (maladie de Creutzfeldt-Jakob): maladie à prion chez l'homme décrite en Allemagne en 1921. La majorité des cas sont sporadiques, 10% sont héréditaires.
- ❖ ***ESB** (encéphalopathie spongiforme bovine): maladie à prion transmissible des bovins dite aussi maladie de la vache folle
- ❖ ***GSS** (syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker): maladie à prion héréditaire chez l'homme décrite pour la première fois en 1936
- ❖ ***IFF** (Insomnie Fatale Familiale): maladie à prion héréditaire chez l'homme signalée pour la première fois en 1992
- ❖ ***prion** (PROteinaceous INfectious particles): concept introduit pour désigner un agent infectieux protéique qui serait responsable de nombreuses maladies neurodégénératives. Depuis la découverte de la PrP^{sc}, on emploie souvent le terme de prion pour désigner la PrP^{sc} et même de façon abusive pour désigner la PrP^{sc}.
- ❖ ***PrP 106-126**: oligonucléotide correspondant aux acides aminés 106 à 126 de la PrP.
***PrP 27-30** (Protease-Resistant Polypeptide of 27 to 30kD): Cette protéine résistante aux protéases fut découverte dans les cellules infectées par la tremblante du mouton. Il s'agit en fait d'un résidu de la PrP^{sc}
- ❖ ***PrP^c (PrP clone)**: protéine ubiquitaire normalement exprimée chez les mammifères. Elle possède la même séquence que la PrP^{sc}, ce qui lui a valu son nom de clone. On indique si nécessaire la nature de l'espèce dont elle provient: hPrP^c(human PrP^c) pour la PrP^c humaine, bPrP^c(bovin PrP^c), mPrP^c(mouse PrP^c), shPrP^c(syrian hamster PrP^c)
***PrP^{sc}(PrP scrapie)**: protéine pathogène spécifique des maladies à prions. Si elle fut trouvée au départ chez des moutons atteints de la tremblante (scrapie en anglais), ce terme est en fait utilisé aujourd'hui pour désigner les conformations pathogènes de la PrP^c.
- ❖ ***Spongiose**: vacuolisations présentes dans le système nerveux des sujets atteints d'ESST.
- ❖ ***Gliose astrocytaire**: prolifération exagérée des cellules gliales.
- ❖ ***ESST**(Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissibles): maladies à prion, dites dégénératives du système nerveux.

ABREVIATIONS

ATNC :	Agents Transmissibles Non Conventionnels
Ca :	Calcium
Da :	Daltons
DNF :	Dégénérescences NeuroFibrillaires
EEG :	ElectroEncéphaloGramme
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENS :	Enolase Neurone Spécifique
ESB :	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESST :	Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles
GPI :	GlycoPhosphatidyl Inositol
IFF :	Insomnie Familiale Fatale
IHC :	ImmunoHistoChimie
IRM :	Imagerie à Résonance Magnétique
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
MCJ :	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MCJf :	MCJ familiale
MCJi :	MCJ iatrogène
MCJv :	nouveau variant de la MCJ
MCJs :	MCJ sporadique
NSB :	Niveau de Sécurité Biologique
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PK :	Protéinase K
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C

PRNP : Gène humain codant pour la protéine prion.

PrP : Protéine prion.

PrPc : Protéine prion cellulaire.

PrPres ou PrP27-30 ou PrPsc : Protéine prion pathologique résistante à la protéinase K.

SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

SGSS : Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

SNC : Système nerveux central.

WB : Western-Blot.

LISTE DES FIGURES

<u>FIGURES</u>	<u>PAGES</u>
Figure N° 1 : (à gauche) modèle proposé pour la PrPc (à droite) modèle proposé pour la PrPsc.	05
Figure N° 2 : Structure tertiaire de la PrPc humaine (hPrPc).	06
Figure N° 3 : Couplage de la PrPc à une voie de transduction dans les cellules neuronales.	08
Figure N° 4 : Mini prion.	11
Figure N° 5 : Coupe histologique dans le cortex d'un cerveau humain atteint de la maladie de Creutzfeldt Jakob.	19
Figure N° 6 : Coupe histologique d'un cerveau humain atteint par le Kuru.	23
Figure N° 7 : Coupe histologique d'un cerveau humain atteint par le Kuru ; on y distingue les plaques amyloïdes dans les espaces intercellulaire.	24
Figure N° 8 : Vache atteinte d'encéphalopathie spongiforme bovine.	25
Figure N° 9 : Coupe histologique dans une moelle de vache atteinte d'encéphalopathie spongiforme bovine.	27
Figure N° 10 : Mouton atteint de tremblante ; lésions de grattage.	30
Figure N° 11 : Coupe histologique dans la substance grise d'un cerveau de mouton atteint de tremblante.	32

SOMMAIRE

-INTRODUCTION.....p1

-CHAPITRE 1 : Généralités.

1-Généralités sur les ESST	p2
1-1-Notion d'agent transmissible non conventionnel.....	p2
1-2-Propriétés physico-chimiques.....	p2
1-3-Conséquences biologiques.....	p2
2-Généralités sur le prion :	p2
2-1-Historique.....	p2
2-2-Définition.....	p4
2-3-Structure :	p4
2-3-1-Structure primaire.....	p4
2-3-2-Structure secondaire.....	p4
A-Modélisation numérique.....	p4
B-Spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire.....	p5
2-3-3-structure tertiaire.....	p6
2-4-Localisation du prion.....	p6
3-Rôle de la PrPc.....	p7
a- une protéine de membrane.....	p7
b- fixe le cuivre.....	p7
c- rôle de récepteur/transducteur.....	p8
4-Rôle de la PrPsc.....	p9
a- formation de plaques amyloïdes.....	p9
b- stress oxydatif.....	p9
c- parallèle avec la maladie d'alzheimer.....	p9
5-Passage de la PrPc à la PrPsc.....	p10
a- interaction entre la PrPc et la PrPsc.....	p10
b- expérience des peptides modèles.....	p10

-CHAPITRE 2 : Eléments utilisés pour le diagnostic des ESST.

1-Les critères cliniques.....	p12
2-Les critères paracliniques.....	p12
2-1L'électroencéphalogramme.....	p12

2-2-L'imagerie.....	p12
3-Les critères génétiques.....	p12
3-1-Les mutations présentes sur le gène PRNP.....	p12
3-2-Les prédispositions.....	p13
4-Les critères neuropathologiques :.....	p13
4-1-La spongiose.....	p13
4-2-La gliose astrocytaire.....	p13
4-3-La perte neuronale.....	p14
4-4L'amylose.....	p14
5-Les critères biochimiques :.....	p14
5-1-La protéine S100.....	p14
5-2-La protéine Tau.....	p15
5-3-L'enolase neurone spécifique.....	p15
5-4-Les protéines 14, 3,3.....	p15

-CHAPITRE 3 : Transmission des ESST et maladies causées par le prion .

1-Trasmission des ESST.....	p17
1-1-Transmission horizontale par voie alimentaire.....	p17
1-2-Transmission verticale (de la mère à l'embryon).....	p17
1-3-Transmission verticale (de la mère au veau).....	p17
1-4-Transmission iatrogène.....	p17
1-5-Transmission expérimentale.....	p18
1-6-Transmission par le milieu extérieur.....	p18
1-7-La barrière d'espèce.....	p18
1-7-1-Le cas de l'agent des ESST.....	p18
1-7-2-Le cas de l'agent de l'ESB dans les conditions naturelles.....	p18
A-Les maladies humaines à prion	p18
A-1-La maladie de Creutzfeldt Jakob.....	p18
A-1-1-La MCJ sporadique	p19
A-1-1-1- Les données cliniques, neuropathologiques et biochimiques.....	p19
A-1-1-2- Le diagnostic paraclinique.....	p20
A-1-2-La MCJ familiale.....	p20
A-1-3-La MCJ iatrogène.....	p20
A-1-4-La MCJ nouveau variant	p20
A-1-4-1-Les données cliniques.....	p21
A-1-4-2-Les données neuropathologiques.....	p21

A-1-4-3-Les données paracliniques.....	p21
A-1-4-4-La biopsie d'amygdale.....	p21
A-2- Le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.....	p21
A-3-L'Insomnie Familiale Fatale.....	p22
A-4-Le Kuru.....	p22
B-Les maladies animales à prion	p24
B-1-L'encéphalopathie spongiforme bovine	p24
B-1-1-Présentation.....	p24
B-1-2-Origine.....	p25
a-1 ^{ère} hypothèse.....	p26
b-2 ^{ème} hypothèse.....	p26
B-1-3-Symptomatologie.....	p26
B-1-4-Diagnostic.....	p27
*Tissus infectants.....	p27
B-1-5-Assainissement des élevages infectés.....	p28
B-2-La tremblante du mouton.....	p29
B-2-1-Origine.....	p29
B-2-2-Symptomatologie.....	p30
B-2-2-1-La forme prurigineuse.....	p30
B-2-2-2-La forme paralytique.....	p31
B-2-3-Lésions.....	p31
B-2-4-Diagnostic de la maladie.....	p31

Introduction

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUEINTRODUCTION :

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), encore appelées maladies à prion, sont des affections neurologiques dites dégénératives dont l'issue est irrémédiablement fatale. Ces pathologies sont caractérisées par la longueur de leur phase d'incubation asymptomatique, par les lésions confinées au niveau du système nerveux central, par une absence de signe biologique ou clinique d'une réaction inflammatoire classique à la phase d'état et par l'existence d'une modification conformationnelle de la protéine prion normale de l'hôte en protéine prion pathologique (**Richard Marlène 2001**).

Ces maladies touchent aussi bien l'homme que l'animal. Elles regroupent, chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS), l'insomnie fatale familiale (IFF) et le Kuru. Chez l'animal, appartiennent à ce groupe, la tremblante naturelle du mouton et de la chèvre, la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, l'encéphalopathie spongiforme du chat, l'encéphalopathie du vison et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). L'information sur l'ESB a été compilée et diffusée par plusieurs publications officielles au Royaume-Uni, aux États-Unis d'Amérique ainsi que dans d'autres pays européens, y compris celles de l'Union européenne. Parmi ces documents figurent : **le rapport Phillips publié en 2000** au Royaume-Uni, **le rapport Harvard, publié en 2001** aux États-Unis d'Amérique, ainsi que les nombreux rapports et communiqués émanant du Comité scientifique directeur de la Commission européenne. Ces textes se réfèrent en priorité aux conséquences de l'ESB sur une région ou un pays particuliers. Aucun d'eux n'adopte une approche englobant la scène mondiale (**OIE**). L'intérêt que suscite, ces maladies ne fait que s'accroître au fil des ans en raison de l'apparition dès 1985, des formes iatrogènes de la MCJ qui se sont développées chez des enfants suite à des injections d'hormone de croissance naturelle contaminée. Puis, en 1986, se déclare en Grande-Bretagne, l'épidémie de l'ESB débouchant en 1996 sur l'émergence de la nouvelle variante de la MCJ (MCJv). De nombreux arguments scientifiques sont en faveur d'un lien entre l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et la MCJv. En raison du caractère infectieux de ces pathologies, il est important de pouvoir établir un diagnostic de certitude et celui-ci n'est possible, à l'heure actuelle, que par l'obtention et l'analyse de tissu cérébral, ce dernier étant obtenu par autopsie ou plus rarement par biopsie cérébrale du vivant du malade. Cependant, la biopsie cérébrale reste un geste invasif et localisé, et est limitée dans ses indications pour des raisons éthiques. Il est donc nécessaire de développer des tests diagnostiques peu ou non invasifs du vivant du malade (**Richard Marlène 2001**).

Chapitre I:

Généralités

-CHAPITRE1 : Généralités**1-Généralités sur les ESST :****1-1-Notion d'agent transmissible non conventionnel :**

Actuellement, le seul vecteur identifié lié aux ATNC et indispensable à leur infectiosité est la protéine prion, notée PrP. L'identification de ces ATNC a été approchée en premier lieu par leurs propriétés atypiques (**RICHARD MARLENE 2001**).

1-2-Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés physico-chimiques des ATNC sont en effet très atypiques. Les ATNC sont de petite taille, estimée entre 15 et 40 nm, et très agrégables du fait de leur hydrophobicité. Ils sont également d'une résistance accrue vis-à-vis de la chaleur : seul un chauffage à 134°C pendant 18 minutes en chaleur humide permet d'inactiver a priori les ATNC par action physique. Ils sont de plus résistants aux ultrasons, radiations ionisantes, nucléases, formol, désinfectants et détergents non ioniques. Seuls des traitements à la soude ou à l'hypochlorite de sodium pendant une heure à température ambiante permettent d'obtenir une inactivation compatible avec un bon niveau de sécurité (**RICHARD 1999 ; DESLYS 1999**). En raison de la résistance des ATNC, le niveau de sécurité biologique (NSB) des locaux où se manipulent des tissus à haute infectiosité comme le cerveau doit être de protection microbiologique 3 (NSB3) pour les ATNC humains (**RICHARD 1999**).

1-3-Conséquences biologiques :

Les maladies induites par les ATNC sont caractérisées par une phase d'incubation cliniquement silencieuse d'environ 10 ans et par une phase clinique subaiguë. Aucune réaction inflammatoire humorale ou cellulaire n'est observée au cours de la phase clinique. Il n'est pas non plus observé de structure évoquant un micro-organisme quelconque dans le cerveau des patients infectés. Les tests biochimiques ou cellulaires du sang et LCR ne montrent aucune anomalie, à l'exception de l'augmentation de protéines marqueurs de lyse neuronale comme l'énolase neurone spécifique (ENS) ou les protéines 14.3.3 (**RICHARD MARLENE 2001**).

2-Généralités sur le prion :**2-1-Historique :**

- **vers 1730**, apparition de la tremblante du mouton (France, Grande Bretagne, Allemagne), transmise à l'Australie vers 1750 (importation de moutons anglais), mais jamais transmise à l'homme depuis le XVIII^{ème} siècle.
- **En 1920-21**, 2 neuropathologistes, **Hans Gerhardt Creutzfeldt puis Alfons Maria Jakob (Autriche)** décrivent cliniquement et neuropathologiquement la maladie de CJ, elle sembla avoir les mêmes lésions que la tremblante.
- **1930** on commença à utiliser les farines animales dans l'alimentation des bovins.

- **1930-40 Jean Cuillé et Paul-Louis Chelle (vétérinaires, Toulouse)** découvrirent la transmission de la tremblante du mouton au mouton, à la chèvre, avec très longue incubation (Z 24 mois).
- **1950-60 D. Carleton Gajdusek** décriva le kuru en Papouasie Nouvelle Guinée, causé par le cannibalisme à l'occasion de rites funéraires chez le peuple Fore.
- **1960-70 Alper (1967, Nature, 214, 764-6)** procéda à des essais d'inactivation par irradiation de "agent infectieux" qui semble ne pas comporter d'acide nucléique.
- **1974-88** ; apparition des maladies de CJ iatrogènes suite aux greffes de cornée, de dure-mère, mauvaise stérilisation des instruments chirurgicaux, traitements par hormone de croissance d'origine hypophysaire humaine...
- **En 1981 Stanley Prusiner** posa l'hypothèse de l'agent transmissible non conventionnel (ATNC) = prion (protein infectious agent).
 - C'est une protéine "normale",
 - Cette même protéine "modifiée" entraînant la pathologie et transmettant la maladie (à un autre animal de la même espèce ou d'une autre espèce) par sa capacité à modifier la protéine "normale" endogène (en l'absence de tout acide nucléique)
- **Vers 1986** manifestation des premiers cas d'ESB en Grande Bretagne après utilisation de farines animales contaminées (après un traitement déficient, "simplifié" des farines) pour l'alimentation des animaux ; les lésions neuropathologiques sont identiques à celles de la tremblante, du kuru, de la maladie de CJ.
- **3 décembre 1995**; Une parole historique:
Stephen Durrel, Ministre de la Santé, Her Majesty's Government
"There is no conceivable risk of BSE being transmitted from cows to people». C'est à dire qu'il n'y a aucun risque de transmission de l'ESB des bovines à l'homme.
- **En Avril 1996** on nota l'apparition du premier cas de maladie de CJ chez un sujet jeune (30 ans) en Grande Bretagne = nouveau variant de CJD (nvMCJ).
- **Octobre 1996 Collinge (Nature, 383, 685-90)** découvra qu'il existait de très grandes similitudes biochimiques entre le prion de l'ESB et celui du nouveau variant de CJD (nvMCJ).
- **En 2000** de très nombreuses espèces contaminées :
 - animaux domestiques (chat), carnivores des zoos, primates (d'élevage, exemple : lémuriens en France) via farines animales contaminées
 - Animaux sauvages (USA, Afrique australe) et d'élevage (Europe)
 - Australie et Nouvelle Zélande indemnes (mais quarantaine très sévère)
- **depuis 2000** de nombreux travaux épidémiologiques contradictoires :
 - sous-estimation du nombre de cas d'ESB avant dépistage.
 - efficacité du dépistage et de l'élimination des bovins contaminés de la chaîne alimentaire estimée à 80%

- durée d'incubation de la maladie mal connue.

2-2-Définition:

Le Prion est une petite particule protéique infectieuse (*proteinaceous infectious particles*) résistant aux inactivations par des procédés modifiant les acides nucléiques. Puis Prusiner précise sa définition en rajoutant que ce sont des éléments propageant la variabilité conformationnelle. (STANLEY B. PRUSINER, *Science*, 1982).

2-3-Structure:

Les maladies dites à prion s'accompagnent toutes de l'accumulation d'une protéine pathogène qui diffère uniquement par sa conformation d'une protéine normalement exprimée à la surface des cellules telle la PrP chez les mammifères. Ainsi la détermination de la structure des protéines normales et anormales est indispensable à une meilleure compréhension de ces maladies (RICHARD MARLENE 2001).

2-3-1-Structure primaire :

Les formes PrP^c et PrP^{sc} possèdent la même séquence de 254 acides aminés y compris un peptide signal de 22 acides aminés hydrolysé lors de la biosynthèse ceci est chez l'homme ; chez le bovin on a la même séquence primaire pour la PrP^c et la PrP^{sc} mais celle-ci est de 256 acides aminés. De plus on n'a pu identifier de modifications chimiques entre ces deux formes. Par contre différentes "souches" de prions ont pu être identifiées correspondant à différentes espèces ou à un polymorphisme du gène au sein d'une même espèce (RICHARD MARLENE 2001). Ainsi à ce jour plus de 23 séquences différentes ont pu être identifiées chez différentes espèces pour la PrP^c (M.BILLETER et al July 1997). Le polymorphisme des gènes de la PrP^c a aussi été attentivement étudié pour l'espèce humaine (S.PRUSINER 1998, S.PRUSINER 1996). Mais on ne sait pas si ces mutations existant chez les individus sains prédisposent à l'infection par le prion. On a par ailleurs étudié la séquence de la PrP^c chez les individus atteints d'encéphalopathies héréditaires. On peut citer en particulier la mutation E200K (substitution du glutamate par la lysine en position 200) présente chez la plupart des personnes atteintes par de maladie de Creutzfeldt Jakob héréditaire. L'étude de la structure de ces protéines mutées peut permettre de mieux comprendre le changement de conformation de la PrP (RICHARD MARLENE 2001).

2-3-2-Structure secondaire de la PrP^c et de la PrP^{sc} :

A-Modélisations numériques :

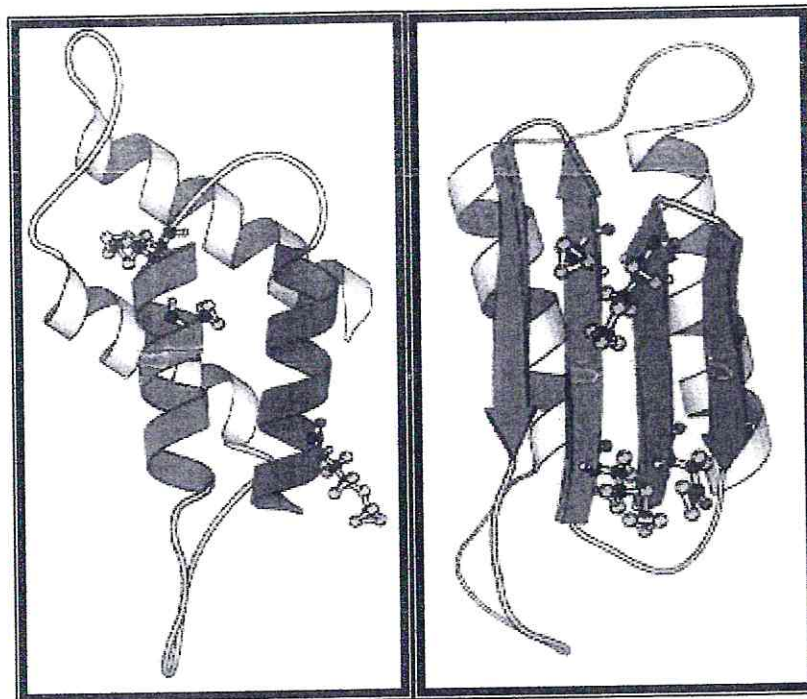
Connaissant la séquence d'acides aminés de la PrP, on tenta tout d'abord de prévoir la structure secondaire de la PrP^c et de la PrP^{sc} à l'aide de modèles numériques. Cependant en fonction du choix du modèle, on obtenait soit une forte préférence pour les hélices alpha

(31% hélices alpha contre 0% feuillets bêta) pour les modèles adaptés aux protéines riches en hélices alpha soit une préférences pour les feuillets bêta (0% hélices alpha 24% feuillets bêta) pour les modèles adaptées aux protéines riches en feuillets bêta (KEH-MING et al 1993). Ceci semblait indiquer que différentes conformations de la protéines pouvait être stables. Ces études permirent finalement de prévoir que la PrP^c devait comporter 4 hélices alpha. Deux d'entre elles s'avèreront en fait être des boucles et des feuillets bêta. Les deux autres sont effectivement des hélices.

B-Spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire :

On étudia tout d'abord des peptides modèles correspondant aux séquences 109-122, 178-191, 202-218 de la PrP (S.Prusiner1996). Ces peptides ont une conformation de boucles ou d'hélices alpha au sein de la protéine, mais lorsqu'on les dissou dans l'eau, ils polymérisent et forment des fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles étaient composées à plus de 70% de feuillet bêta. Ainsi la différence d'énergie conformationnelle entre une structure en feuillets bêta et en hélices alpha est faible pour la PrP.

La structure de la protéine PrP^c et de la PrP^{sc} entière a ensuite été étudiée par FTIR (fast transform infrared spectroscopy) (Keh-Ming et al1993). Les pourcentages d'hélices alpha et de feuillets bêta furent déterminées: la PrP^c comporte 42% d'hélices alpha et 3% de feuillets bêta alors que la PrP^{sc} a 30% d'hélices alpha et 43% de feuillets bêta. Des études par dichroïsme circulaire furent effectuées pour la PrP^c pour confirmer ce résultat (36 % d'hélices alpha). Elles ne purent être réalisées pour la PrP^{sc} en raison de son insolubilité.



FigureN°1: (à gauche) Modèle proposé pour la PrPc (à droite) Modèle proposé pour la PrPsc (www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/discours/2000/dprion.)

Ces études permirent de confirmer que la PrP^c et la PrP^{sc} diffèrent totalement par leur structure secondaire alors qu'elles possèdent la même séquence. Les nombreux feuillets bêta de la PrP^{sc} favorise la formation de plaques amyloïdes à l'intérieur des cellules.

2-3-3- Structure tertiaire de la PrP^c :

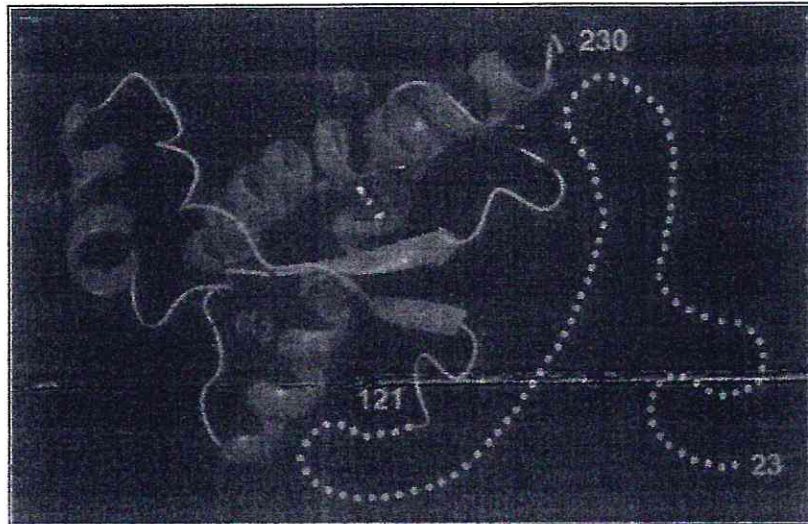


Figure N°2: Structure tertiaire de la PrPc humaine (hPrPc) . Les hélices alpha1(144-154), alpha2 (173-194), alpha3 (200-228) sont représentées en orange, les feuillets beta (beta1 (128-131) , beta2 (161-164)) en cyan. Les segments du domaine globulaire n'ayant pas de structure secondaire régulière sont en jaune et la queue flexible NH2 (23-121) en est symbolisé par des points.

(ist.inserm.fr/basismedsci/2002/ms_1_2002/sommaire/62_02.pdf -).

La PrP^c comprend un domaine globulaire (125-228) et une queue flexible aux terminaisons N (28-124) et C (229-230). Le domaine globulaire comprend trois hélices alpha mais aussi deux feuillets bêta qui n'avaient pu être déterminés par les études IR. La découverte de feuillets bêta dans la PrP^c a renouvelé notre conception de la structure de la PrP^c. Il est en effet tentant de voir dans ces feuillets bêta un site pouvant initier le changement de conformation. Mais ceci n'a pu être démontré jusqu'ici

(www.infoscience.fr/dossier/prion/prion5.html).

2-4-Localisation du prion :

De nombreuses études ont été effectuées afin de développer, à partir de la protéine normale purifiée, des réactifs et des anticorps pour des études fondamentales sur les propriétés de cette protéine, et pouvant être utilisés pour le diagnostic de la maladie.

Les difficultés majeures pour la purification sont essentiellement dues à la rareté du prion (5 mg/g de cerveau de mouton sain) et au fait qu'il soit exprimé dans les membranes des cellules. La mise au point d'un protocole de purification a permis d'obtenir une fraction de

prion purifiée à 80 %. Malheureusement, étant donné la rareté de la protéine et le rendement final de sa purification (8%), seulement 50 mg de la forme normale du prion peuvent être obtenus à partir d'un cerveau de mouton.

Afin de trouver d'autres sources éventuelles à partir desquelles le prion pouvait être purifié, les chercheurs ont étudié sa distribution qualitative et quantitative dans plusieurs organes de moutons sains. Le cerveau s'est avéré l'organe le plus riche, bien que le prion soit aussi présent dans plusieurs autres organes, notamment le poumon, le cœur et le muscle.

Toutefois, les études ont révélé que la signature biochimique de la protéine prion semble être caractéristique de chaque organe. Ces multiples isoformes ne sont pas encore pleinement caractérisées sur le plan biochimique (**RICHARD MARLENE 2001**).

3-Rôle de la PrP^c :

L'agent pathogène responsable des maladies à prion est composé essentiellement voire exclusivement par la protéine PrP^{sc}, forme anormale de la PrP^c fortement exprimée dans les cellules neuronales. Ces deux isoformes ont la même séquence d'acides aminés et ne diffèrent que par leur structure. Le rôle de la PrP^c dans la cellule est peu connu, ainsi que celui de la PrP^{sc} dans les différentes maladies. De plus, l'absence de PrP^c n'est pas mortelle puisque des souris transgéniques n'exprimant pas le gène de la PrP^c survivent très bien: son rôle n'est donc pas indispensable.

a) La PrP^c: une protéine de membrane :

La PrP^c est une protéine ubiquitaire ancrée sur la membrane externe de la membrane plasmique par un groupement phosphatidylinositol (GPI). Cela permet d'envisager un rôle dans l'adhérence cellulaire ou dans la liaison avec un ligand extracellulaire. D'autre part, elle est exprimée dès les deux premières semaines du développement embryonnaire ce qui suggère un rôle dans celui-ci (**S.MOUILLET-RICHARD et al Mars2001**).

b) La PrP^c fixe le Cuivre :

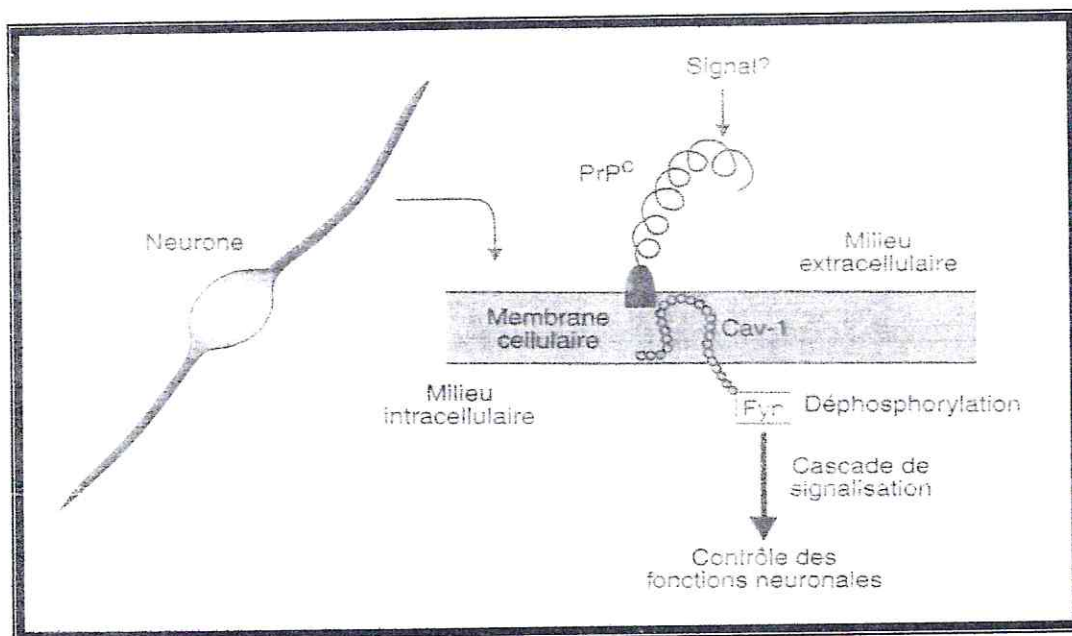
Il a été montré que la protéine forme un complexe avec le cuivre par sa séquence octapeptidique répétée (huit peptides répétées plusieurs fois dans la séquence de la protéine), induisant un changement conformationnel. De plus, l'infection par l'agent pathogène entraîne une altération des mécanismes moléculaires favorisant la résistance cellulaire aux "espèces réactives d'oxygène" (**MILHAVET et al. Décembre 2000**). Cela suggère que la PrP^c joue un rôle dans l'activité de la superoxyde dismutase dépendante du cuivre et du zinc (Cu-Zn SOD) et/ou dans l'état oxydatif de la cellule à travers la régulation du transport du cuivre.

Mais le rôle de la PrP^c dans le métabolisme du cuivre reste très controversé : en effet, des tests réalisés sur trois types de souris transgéniques exprimant respectivement 0, 1 et 10 fois le gène codant pour la PrP^c révèlent que la quantité de cuivre ionique dans leurs cellules est la même chez les trois types de souris (**D.WAGONNER j.Bio.CHEM 2000**). La PrP^c n'est

donc pas la principale responsable de l'entrée de Cu^{2+} extracellulaire dans les neurones, ni de l'approvisionnement en cuivre de la SOD dans le cerveau. Le cuivre étant fourni à la SOD par des cuproprotéines chaperonnes spécifiques, la PrP^c pourrait être active en amont de ces protéines (RICHARD MARLENE 2001).

c) La PrP^c dans le rôle de récepteur/transducteur :

Des études menées sur certaines cellules souches particulières de neurones ont tentées de montrer le rôle de la protéine en tant que récepteur (S.MOUILLET-RICHARD et al Mars 2001). Un signal a été mimé par des anticorps spécifiques de la PrP^c qui, en formant un pontage, induisent une déphosphorylation d'une protéine kinase, la Fyn. Cette modification s'accompagne d'une augmentation de son activité. Le signal apporté sur la membrane externe a donc été transduit à travers la membrane plasmique. Pour cela, il faut imaginer la présence d'intermédiaires intramembranaires: la cavéoline a été identifiée comme partenaire de la PrP^c.



FigureN°3: Couplage de la PrP^c à une voie de transduction dans les cellules neuronales (S.Mouillet-Richard Mars2001).

Ce rôle a été mis en évidence sur des cellules spécifiques, il reste encore à le vérifier *in vivo*. De plus, il reste à identifier le signal transduit à travers la membrane plasmique grâce à la PrP^c, ainsi que la (les) cible(s) en aval de la Fyn. La découverte de ces éléments permettra sûrement de mieux comprendre le rôle de la protéine normale dans les cellules.

Conclusion:

Les rôles de la PrP^c chez les êtres vivants sont encore mal connus, et de nouveaux éléments sont apportés par la recherche en permanence. Ainsi si on a pu montrer que la PrP^c est une protéine de membrane, sa fonction est loin d'être pleinement comprise et de nombreuses questions demeurent en suspens. Est elle liée à des processus d'adhérence cellulaire? Intervient-elle dans le contrôle des fonctions neuronales? Quel est son rôle exact dans le contrôle du stress oxydatif? La compréhension du rôle de la PrP^c est un enjeu capital car il permettrait de mieux comprendre le caractère pathogène de la PrP^{Sc}, et les mécanismes conduisant à l'apoptose cellulaire

(www.infoscience.fr/dossier/prion/prion5.html).

4-Rôle de la PrP^c :

Il est évident que les mécanismes des encéphalopathies spongiformes sont complexes. Le fait que des souris transgéniques n'exprimant pas le gène de la PrP^c soient viables et résistantes, et ne présentent que des altérations sans conséquences de la transmission synaptique, suggère que l'effet toxique ne provient pas d'une perte de la fonction de la PrP^c (A.PICOT et al 1998).

a)Formation de plaques amyloïdes :

L'accumulation de PrP^{Sc} dans les neurones entraîne une toxicité directe selon un mécanisme inconnu.

En effet, la mort cellulaire par injection de PrP^{Sc} a été constatée *in vitro*. D'autre part, des études similaires ont été menées avec le PrP106-126, un fragment de prion ayant des propriétés très proches de la PrP^{Sc} (feuillet-bêta, résistance partielle aux protéinases...). L'inoculation de PrP106-126 a induit l'apoptose cellulaire (mort cellulaire) sur des cellules de rétine de souris (M.ETTAICHE et al) *in vivo*. Par-contre, la mort cellulaire *in vivo* par la PrP^{Sc} n'a pas encore été observée jusqu'à présent (RICHARD MARLENE 2001).

b)Stress oxydatif :

La présence de PrP^{Sc} dans les cellules gliales pourrait déclencher une agression oxydante avec formation de superoxyde et d'oxyde d'azote qui forment l'anion péroxynitrite entraînant l'apoptose cellulaire. Ceci serait en accord avec le possible rôle de la PrP^c par rapport à la superoxyde dismutase (SOD) dont l'un des rôles est la régulation de la concentration en superoxyde.

c)Parallèle avec la maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer est due à l'accumulation dans les neurones d'une protéine bêta amyloïde sous forme d'agrégats: elle ressemble ainsi aux maladies à prions. A-bêta [1-40], un fragment de la protéine d'Alzheimer ainsi que le PrP106-126 augmentent la quantité de Ca⁺⁺ libre dans le cytosol de certains neurones (M.KAWAHARA et al 2000). D'autre part, l'augmentation de cholestérol soluble dans la membrane plasmique permet la baisse de la

fluidité de la membrane. Or, on observe que l'ajout de cholestérol soluble inhibe l'augmentation de la concentration de Ca^{++} induite par l'A-bêta [1-40].

Ces résultats suggèrent que dans la maladie d'Alzheimer et dans les maladies à prions, la mort cellulaire pourrait être la conséquence d'entrée de Ca^{++} dans la cellule par des canaux ouverts par la protéine anormale.

Conclusion:

Si de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer la neurotoxicité de la PrP^c, aucun à ce jour n'a pu être réellement démontré. Pourtant l'étude de cette question est fondamentale puisqu'elle apparaît comme un pré requis nécessaire pour rechercher des agents thérapeutiques capables d'inhiber les effets neurodégénératifs de la maladie. De plus, la parenté des maladies à prion avec d'autres pathologies (maladie d'Alzheimer entre autres) suggère que ces recherches pourraient aboutir à la compréhension de mécanismes intervenant dans d'autres pathologies (www.infoscience.fr/dossier/prion/prion5.html).

5-Passage de la PrP^c à la PrP^{sc} :

Les maladies à prion semblent être dues à une protéine pathogène, la PrP^{sc}. Les études structurales ont montré que la PrP^{sc} est strictement identique en séquence à une protéine ubiquitaire normalement exprimée, la PrP^c. Par contre leurs structures secondaires et tertiaires sont totalement différentes. Ainsi chez les mammifères, la PrP^c, protéine normale, se replie majoritairement sous forme d'hélices alpha alors que la PrP^{sc}, protéine pathogène, se replie avec un plus grand nombre de feuillets bêta. De plus, il semble que la PrP^{sc} puisse induire le changement de conformation de la PrP^c en PrP^{sc}. Cependant, le mécanisme de ce changement de conformation demeure encore largement inconnu puisque la structure tertiaire de la PrP^{sc} n'a pas été encore déterminée

(<http://www.ens-lyon.fr/DSM/Magistère/Projets-biblio2001/ebourles/index/hmt>.)

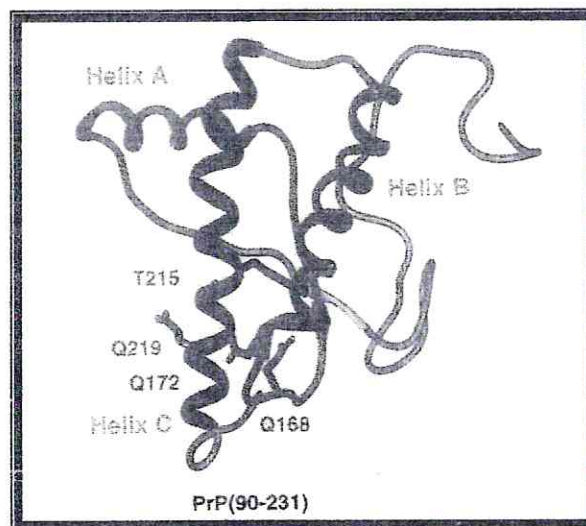
a) Interactions entre la PrP^c et la PrP^{sc} :

La formation d'un complexe entre la PrP^c et une ou plusieurs molécules de PrP^{sc} pourrait abaisser l'énergie de l'état de transition lors du repliement et favoriser le changement de conformation de la PrP^c en PrP^{sc}. Ainsi l'équilibre PrP^c/PrP^{sc} existe sans doute aussi chez les individus sains. Mais la concentration en PrP^{sc} est suffisamment faible et la vitesse suffisamment lente pour que la quantité de PrP^{sc} demeure insignifiante. Cependant pour des souris transgéniques où le gène de la PrP^{sc} est surexprimé (entraînant l'augmentation de la concentration en PrP^{sc}), on observe la formation de PrP^{sc} et le développement des maladies à prions. Ceci permet sans doute de mieux comprendre les cas sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. En effet, cette réaction PrP^c > PrP^{sc} est auto catalytique et donc, au delà d'un certain seuil de concentration en PrP^{sc}, on observe un déplacement irréversible de la réaction vers la forme PrP^{sc}. Ainsi l'injection de faibles

quantités de PrP^{Sc} serait suffisante pour franchir ce seuil critique et entraîner le changement de conformation de l'ensemble des PrP^C. (M.LAURENT 1996).

b) Expériences des peptides modèles :

Il est intéressant de connaître les zones de la PrP^C susceptibles d'interagir avec la PrP^{Sc}. Pour cela, des fragments de PrP ont été synthétisés (S.PRUSINER 1996). On observe que le peptide 109-122 (en boucle torsadée dans la protéine et adoptant dans l'eau une structure en feuillet- β) entraîne la conversion en feuillets β de deux autres fragments dans l'eau (fragment 104-122 et 129-141). Ceci montre que certains fragments de la PrP^{Sc} peuvent induire le changement de conformation de fragments de PrP^C. De plus, par génie génétique, on peut provoquer des délétions sur certaines portions du gène et ainsi supprimer sélectivement certaines structures secondaires de la PrP^C (S.Prusiner1998). On peut ainsi mettre en évidence les régions indispensables à la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc}. En effet, si les PrP^C mutées affectent la conversion de la PrP^{Sc}, on peut penser que les parties délétées sont nécessaires au changement de conformation. Le fragment 90-231 ci-dessous garde son rôle pathogène malgré les délétions: **c'est un miniprion.**



FigureN°4: Mini Prion

(<http://www.ens-lyon.fr/DSM/Magistère/Projets-biblio2001/ebourles/index/hmt.>)

Chapitre II:

Eléments utilisés pour le diagnostic des ESST

CHAPITRE 2 : Les éléments utilisés pour le diagnostic des maladies à prion

1-Les critères cliniques :

Cliniquement, les maladies à prion, d'origine humaine ou animale, sont marquées par une longue période d'incubation de plusieurs années durant laquelle aucun symptôme d'ordre clinique ou biochimique n'est visible. On dit de la période d'incubation qu'elle est silencieuse. Puis, les symptômes neurologiques et/ou psychiques s'installent, généralement de façon insidieuse. Des données expérimentales chez la souris montrent qu'ils font suite à l'apparition des lésions neuropathologiques. Aucun élément clinique ne fait supposer un syndrome infectieux. La maladie évolue de manière subaiguë et conduit inéluctablement vers la mort en quelques mois (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

2-Les critères paracliniques :

2-1- L'électroencéphalogramme (EEG) :

Un tracé évocateur, presque caractéristique de la MCJ sporadique (MCJs) montre des ondes régulières, bi- ou tri-phasiques, généralisées et lentes. L'absence de ce tracé évocateur ne doit pas écarter le diagnostic. Il peut n'être présent que pendant quelques jours ou quelques semaines le plus souvent en début d'évolution. L'examen doit donc être répété.

Souvent, l'EEG montre des modifications pathologiques moins évocatrices comme, par exemple, un ralentissement global des ondes. L'apport de l'EEG dans le diagnostic est très différent selon les formes étiologiques (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

2-2- L'imagerie :

Les examens d'imagerie sont pratiqués pour le diagnostic différentiel lorsque aucun aspect spécifique ou évocateur n'est rencontré. Ces examens ne permettent donc pas de poser un diagnostic définitif.

Au début de la maladie, le scanner cérébral est généralement normal. Il peut cependant montrer d'autres anomalies telles que des séquelles d'accident vasculaire cérébral, de traumatisme crânien. Au cours de l'évolution, il permet de remarquer la plupart du temps une atrophie du cortex hémisphérique. Cette atrophie peut être minime voire absente.

La valeur de l'imagerie à résonance magnétique (IRM) cérébrale est fonction des formes étiologiques et des techniques utilisées (Séquences normales, de perfusion et diffusion, FLAIR...). C'est un examen de plus en plus pratiqué en raison de sa bonne sensibilité par rapport au scanner (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

3-Les critères génétiques :

Les critères génétiques dans les ESST sont de deux ordres : les mutations, à l'origine des formes génétiques des maladies à prion, et la prédisposition génétique qui traduit la susceptibilité vis-à-vis de ces maladies (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

3-1-Les mutations présentes sur le gène PRNP :

De nombreuses mutations du gène PRNP ont été décrites. Il peut s'agir de mutations

ponctuelles, d'insertions ou encore de délétions. Les maladies humaines à prion d'origine génétique sont la MCJ familiale (MCJf), le syndrome de GSS et l'IFF. Elles sont habituellement transmises selon un mode autosomique dominant (RICHARD MARLENE ; 2001).

3-2-Les prédispositions :

Chez l'homme le codon 129 a deux variantes alléliques, l'une codant pour la méthionine (M), l'autre codant pour la valine (V). Ainsi, la population est composée d'individus homozygotes MM ou VV et d'individus hétérozygotes MV. Dans la population caucasienne, 8,3% de la population est VV, 43% est MM et 48,7% est MV au codon 129 (ZIMMERMAN *et AL.* 1999). Les études menées sur le polymorphisme du codon 129 (MV) du gène PRNP ont montré qu'il affectait les caractéristiques phénotypiques des ESST. D'une part, le polymorphisme du codon 129 semble affecter les caractéristiques cliniques des ESST, d'autre part, il semble associé à une sensibilité à l'infection puisque l'homozygotie MM ou VV augmente le risque de développer une ESST. En effet, dans les MCJs, on observe une majorité de cas MM au dépens des MV et tous les MCJv diagnostiqués jusqu'à présent sont MM au codon 129. On retrouve l'influence de ce polymorphisme sur les MCJi puisque les premiers cas apparus étaient homozygotes au codon 129. Les cas de MCJi, associés à l'hétérozygotie MV, sont apparus plus tard. Ce polymorphisme semble également accélérer l'évolution de la maladie : sujets plus jeunes, incubation plus courte, durée plus brève (BEAUVAIS ET BILLETTE DE VILLEMEUR 1996).

Chez l'ovine ; un polymorphisme des codons 136 (codon pour l'alanine (A) ou la valine (V)), 154 (codon pour l'arginine (R) ou l'histidine (H)) et 171 (codon pour l'arginine (R), la glutamine (Q) ou l'histidine (H)) est associé à la sensibilité des ovins et influence la longueur de la période d'incubation.

Cinq combinaisons sont retrouvées chez l'espèce ovine : ARQ, ARR, ARH, AHQ, et VRQ. L'allèle « V 136-R 154-Q 171 » codifié (VRQ) confère une grande sensibilité à la maladie. A l'opposé l'allèle « A 136-R 154-R171 » codifié (ARR) confère une résistance.

Noter aussi que l'influence génétique varie en fonction de la souche de l'agent infectieux. ARR et AHQ confèrent une plus grande résistance.

ARQ et ARH sont des allèles intermédiaires.

VRQ conférant une plus grande sensibilité.

(BEAUVAIS ET BILLETTE DE VILLEMEUR 1996).

4-Les critères neuropathologiques :

4-1-La spongiose :

La spongiose est la lésion la plus fréquente des infections à ATNC, mais elle peut être absente ou sa distribution peut être très hétérogène. Elle est observée dans le neuropile et consiste en une vacuolisation des prolongements cellulaires toujours limitée par une

membrane. Chez l'animal, les vacuolisations sont souvent observées au niveau du corps cellulaire des neurones. Elle est à différencier des états spongieux qui peuvent être observés dans les processus entraînant la mort des neurones profonds, comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Pick (HAUW *et AL.* 1995). Son interprétation est souvent délicate car on la distingue difficilement de l'œdème (gonflement du tissu cérébral dû à l'augmentation de sa teneur en eau) ou des artéfacts pré-analytiques (délais post-mortem, préparation des coupes).

4-2-La gliose astrocytaire :

A l'inverse des neurones, les cellules gliales ont conservé leur capacité de division, du moins dans certaines circonstances. En effet, dans les maladies à prion, on observe très fréquemment une prolifération et/ou une hypertrophie astrocytaire. Celle-ci est présente très précocement pour combler les espaces laissés vides par la perte neuronale. Elle peut également affecter des zones dépourvues de perte neuronale évidente et s'étendre à la substance blanche (RICHARD MARLENE ; 2001).

4-3-La perte neuronale :

La perte neuronale affecte surtout les couches profondes du cortex cérébral, les noyaux gris de la base et le thalamus, mais elle est difficile à apprécier car elle est d'intensité variable en fonction de la région et de la forme clinique de la maladie. Elle a lieu, en partie au moins, par apoptose (CHRETIEN *et AL.* 1999) et elle est d'autant plus marquée que la phase d'incubation de la maladie est longue. Outre la disparition de certains neurones, l'observation microscopique montre des neurones souvent atrophiés, des aspects de chromatolyse avec ballonnisation des neurones (HAUW *et AL.* 1995).

4-4-L'amylose :

L'amylose est l'une des lésions neuropathologiques de certaines maladies à prion dont certaines formes de MCJ et le syndrome de GSS. Dans ces pathologies, la fibrille amyloïde est formée de façon très prédominante de résidus de la protéine prion.

L'un des effets de la formation de la fibrille amyloïde est que la solubilité et la sensibilité aux protéases des polypeptides qui la composent sont diminuées. En effet, la résistance relative de la digestion à la PK augmente avec la quantité de feuilletts β -plissés (AUCOUTURIER *et AL.* 1999).

En microscopie photonique, plusieurs types de plaques sont identifiables. Les plaques de type Kuru comportent un cœur dense entouré d'un halo étroit de fibrilles radiales, sans anomalie majeure du tissu nerveux adjacent (HAUW *et AL.* 1995). Elles ont été décrites initialement dans le Kuru et sont observées dans la MCJv et dans certains variants de la MCJs. Les plaques multicentriques comportent de nombreux foyers denses de dépôts amyloïdes ou un large cœur dense amyloïde entouré par de petits foyers (MOHR *et AL.* 1999). Les limites des plaques peuvent être floues ou nettes, mais sans disposition radiale.

Elles ne semblent pas non plus être accompagnées d'anomalie du tissu nerveux adjacent. Elles sont caractéristiques du syndrome de GSS.

Il est important de distinguer ces plaques amyloïdes des autres plaques amyloïdes observées dans le tissu cérébral qui ne sont pas caractéristiques des ESST. Exemple celle de la maladie d'Alzheimer. Ces plaques, de composition différente, sont facilement identifiées par immunohistochimie spécifique (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

5-Les critères biochimiques : Les marqueurs de lyse neuronale :

Différents marqueurs biologiques sont proposés : la protéine S100, la protéine Tau, l'énolase neurone spécifique (ENS) et les protéines 14.3.3. Il semble que l'augmentation de ces marqueurs dans le LCR soit la conséquence des lésions observées dans la MCJ, à savoir, une lyse neuronale et une activation astrocytaire (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

5-1-La protéine S100 :

C'est une protéine acide liant le calcium. Elle est présente au niveau des cellules gliales. En raison de sa faible spécificité et de son coût, ce dosage n'est pas pratiqué en routine. La faible spécificité de ce marqueur dans le LCR peut être expliquée par le fait que la gliose astrocytaire, retrouvée de façon constante dans le ESST, est une caractéristique pathologique également présente dans un large spectre de maladies neurologiques (**BEAUDRY et AL.1999**).

Un dosage de la protéine S100b dans le sérum a également été proposé, mais n'est pas non plus spécifique (**OTTO et AL. 1998**).

5-2-La protéine Tau :

Est le principal constituant des dégénérescences neurofibrillaires des neurones au cours de la maladie d'Alzheimer. Cette protéine est dosée par une technique ELISA reconnaissant les formes non phosphorylées ou normalement phosphorylées de la protéine Tau. Otto et collaborateurs ont dosé la protéine Tau dans le LCR de trois groupes d'individus, des patients atteints de la MCJ, des patients déments non MCJ avec notamment des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Pick, de démence progressive... et d'un groupe d'individus contrôle non déments. Ils ont montré qu'il existe des différences significatives pour le taux de protéine Tau dans le LCR entre ces trois groupes. La sensibilité de ce dosage pour le diagnostic de MCJ est de 100%, la spécificité est de 94,7% (**OTTO et AL. 1997**). Ce test semble donc être un test prometteur pour différencier les MCJ des autres maladies caractérisées par une démence. Il n'est pas utilisé en routine du fait de son coût.

5-3-L'ENS :

Est une iso-enzyme considérée comme spécifique des neurones et des cellules neuroendocrines. Son augmentation dans le LCR, très probablement due à une destruction neuronale importante, est quantifiée par une technique ELISA. Pour une valeur seuil de 25 ng/ml, la sensibilité du test, pour les cas définitifs et probables, est de 89,8% (**BEAUDRY et**

AL. 1999). La spécificité est de 91,5%. Des faux positifs sont rencontrés dans deux cas de maladie d'Alzheimer, dans un cas de leucodystrophie et dans un cas de sclérose en plaques (**BEAUDRY et AL. 1999**). De fortes quantités d'ENS ont été également rapportées au cours d'hypoxie et d'accidents vasculaires cérébraux, mais l'ENS diminuait après la lésion initiale en quelques jours alors que la quantité d'ENS dans les cas de MCJ restait constante au cours de la maladie (**KROPP et AL. 1999**).

Le dosage répété de l'ENS dans le LCR permettrait ainsi de différencier les maladies à prion des autres troubles associés à une perte aiguë de neurones dans une courte période.

5-4-Les protéines 14.3.3 :

Sont actuellement le meilleur marqueur présent dans le LCR des patients atteints de la MCJ. Dans un cadre clinique approprié, l'augmentation des protéines 14.3.3 dans le LCR est utilisée en routine, pour le diagnostic de la MCJ. Les premiers travaux qui ont conduit à l'identification de ces protéines sont ceux de Harrington qui ont mis en évidence dans le LCR de patients atteints de la MCJ, quatre protéines nommées 127, 128, 130 et 131 par électrophorèse deux dimensions. Ces protéines étaient absentes dans 91% des LCR de patients souffrant d'autres maladies neurologiques, notamment du Kuru et de la maladie d'Alzheimer (**HARRINGTON et AL. 1986**). Il faut attendre 1996 pour que Hsich identifie les protéines 130 et 131 comme étant les protéines 14.3.3 et que soit développée une technique semi-quantitative simple et sensible pour la détection de ces protéines. Il s'agit d'une technique de Western blot (WB) : une électrophorèse SDS-PAGE, transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation par un anticorps anti-14.3.3 b en chimiluminescence. Cette technique s'avère plus sensible que l'électrophorèse deux dimensions (**HSICH et AL. 1996 ; ZERR et AL. 1998**).

Dans l'étude de Hsich, le WB est sensible à 96% et spécifique à 88% sur 257 LCR analysés pour le diagnostic d'orientation de la MCJs chez l'homme. Cependant, ces résultats ne tiennent pas compte des faux positifs obtenus pour les attaques cérébrales, les ischémies, les encéphalites virales et les hémorragies cérébrales. En continuité avec les travaux de Hsich, de nombreuses études ont été publiées confirmant la sensibilité et la spécificité de ce test dans un contexte clinique évocateur (**ZERR et AL. 1996 ; ZERR et AL. 1998 ; BEAUDRY et AL. 1999 ; ZERR et AL. 2000 ; LEMSTRA et AL. 2000**).

Récemment, un test immunométrique quantitatif a été adapté pour la détection des protéines 14.3.3 dans le LCR (**KENNEY et AL. 2000**).

Chapitre III:

Transmission des ESST et

maladies causées par le Prion

CHAPITRE 3 : Transmission des ESST et maladies causées par le prion.

1-Transmission des ESST :

-Les ESST ne sont pas des maladies CONTAGIEUSES ; une maladie CONTAGIEUSE se transmet d'individu à individu de même espèce ou d'espèce différente par contact direct ou indirect (sécrétions, excréments...).

-Les ESST sont des maladies TRANSMISSIBLES.

1-1-Transmission horizontale par voie Alimentaire (principale voie de transmission) :

C'est à dire que les organes infectés d'un animal malade d'une ESST sont absorbés par un autre animal :

-Farines de viandes ou graisses animales contaminées par des cadavres ou des organes d'animaux morts d'ESST.

-Placenta des brebis malades de tremblante ingérés par d'autres brebis .

-Cannibalisme dans le cas du Kuru où les femmes de la tribu étaient beaucoup plus atteintes que les hommes car le rituel mortuaire cannibale leur destinait les tissus à risque comme le cerveau alors que les hommes consommaient les parties "nobles" (muscles).

1-2-Transmission verticale (de la mère à l'embryon) :

En février 2001 une étude du Professeur John Wilesmith en Grande Bretagne, publiée dans le Veterinary Record, affirme que cette transmission n'existe pas.

L'étude a duré 12 ans, utilisant des embryons prélevés sur des Vaches Malades d'ESB (et du sperme de HUIT taureaux malade sur 13), embryons transférés sur des animaux INDEMNES en provenance de Nouvelle Zélande. Aucun des 266 bovins nés de près de 600 embryons implantés n'a développé la maladie après 7 ans d'observation, et les examens cérébraux après abattage ont tous été négatifs. AUCUNE des Souris transgéniques auxquelles on avait injecté du liquide utérin ou des embryons par voie intracrânienne n'a présenté de signe d'ESST.

1-3-Transmission verticale (de la mère au veau) :

Une étude anglaise (incomplète et discutée) plus ancienne montrait que le veau dont la mère développe la maladie l'année de sa naissance, a 10% de "chance" de plus de développer l'ESB En France aucun cas de transmission de la Vache au veau n'a été constaté.

1-4-Transmission iatrogène (par la médecine ou la chirurgie) :

-Par administration d'hormone de croissance extraite de cerveau humain avant que cette hormone ne soit synthétique.

-Par greffe de cornée ou de dure-mère.

-Par les instruments de neurochirurgie insuffisamment désinfectés.

-Une étude Anglaise (non encore achevée) a permis de transmettre une ESST de mouton infecté à mouton sain par transfusion sanguine.

1-5-Transmission expérimentale :

- Par injection intracrânienne à divers animaux de laboratoire (Voie la plus efficace).
- D'autres voies sont utilisées (Intra - péritonéale, Intraveineuse, ...).

1-6-Transmission par le milieu extérieur :

- L'injection à des animaux de laboratoire de broyats d'acariens de foin récolté sur des parcelles de pâture de moutons atteints de tremblante, ont provoqué la maladie.
- Une réinfection de moutons sains a été constatée en ISLANDE alors qu'ils pâturaient sur des parcelles sur lesquelles aucun mouton n'avait pâturé depuis plus de 5 ans.

1-7La barrière d'espèce :

1-7-1-Le cas de l'agent des ESST :

- L'agent des ESST est incapable de provoquer la maladie chez un hôte sensible n'exprimant pas le gène de la PrP (protéine prion normale).
- La PrP^{res} (ou PrP^{sc} pour "scrapie"), responsable des lésions entraînant la maladie, ne peut pas s'accumuler au sein d'un organisme dont le gène exprimant la PrP normale est soit absent soit trop différent.
- On connaît depuis longtemps des lignées génétiques de moutons dont la résistance à la tremblante est plus importante.
- Dans la maladie de Creutzfeldt - Jakob chez l'homme, les individus présentent des durées d'incubation différentes selon le code du gène responsable de la synthèse de PrP.
- De nombreuses expériences ont démontré que la dose infectante et la voie d'inoculation devaient jouer également un rôle important.

1-7-2-Le cas de l'agent de l'ESB dans les conditions naturelles :

- L'agent de l'ESB a infecté d'autres bovidés (Parcs zoologiques notamment).
- L'agent de l'ESB a infecté des félidés (Parcs zoologiques et Chats domestiques).
- L'agent de l'ESB a infecté des singes (Parcs zoologiques et voie expérimentale).
- L'agent de l'ESB a infecté l'homme (Variant de la MCJ).

(www.sante.gouv.fr/hmt/pointsur/vache/2esst).

A-Les maladies humaines à prion :

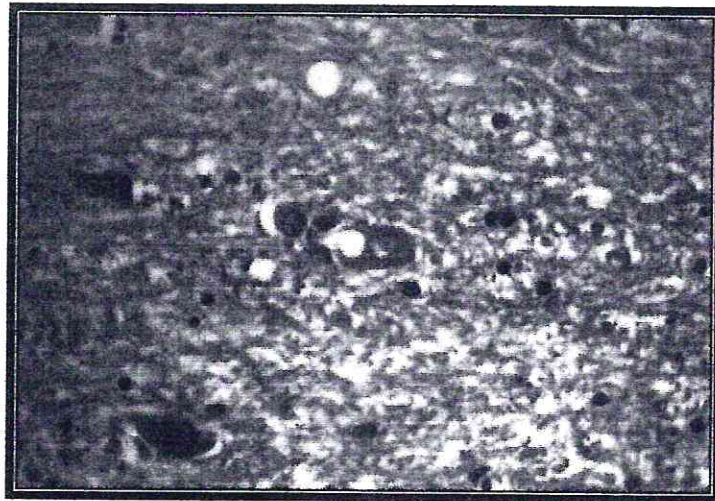
Les maladies humaines à prion ont été classées suivant leurs caractéristiques cliniques et neuropathologiques en quatre maladies : la MCJ, le SGSS, l'IFF et le Kuru.

Les suspicions de MCJ sont à déclaration obligatoire (**RICHARD MARLENE ; 2001**).

A-1-La maladie de Creutzfeldt-Jakob :

La plus commune des ESST est la MCJ, avec une incidence annuelle d'environ 1,4 cas par million d'habitants. La MCJ touche les deux sexes. Son apparition est le plus souvent sporadique, mais il existe également des formes génétiques dites familiales, liées à une mutation au niveau du gène PRNP, et héritées selon un mode de transmission autosomique dominant. Enfin, les formes acquises de la MCJ sont essentiellement liées à l'utilisation de

lots contaminés d'hormone de croissance naturelle et de dure-mère. Il faut ajouter à ces formes acquises, le nouveau variant de la MCJ liée à l'ESB (RICHARD MARLENE.2001).



FigureN°5: Coupe histologique dans le cortex d'un cerveau humain atteint de la maladie de Creutzfeldt Jakob
(Photographie aimablement prêtée par "University of Iowa's Virtual Hospital" (USA)).

A-1-1-La MCJ sporadique :

A-1-1-1- Les données cliniques, neuropathologiques :

La majorité des patients développant une MCJs a un âge compris entre 50 et 70 ans, mais des cas ont été rapportés chez des sujets plus jeunes ou plus âgés.

La phase d'entrée dans la maladie, ainsi que les premiers symptômes sont très variables d'un cas à l'autre. De façon schématique, les premiers symptômes sont soit des modifications comportementales ou psychiatriques, soit des troubles neurologiques, soit des symptômes peu évocateurs. Le mode d'entrée est souvent progressif (de quelques semaines à quelques mois), et rarement rapide ou soudain (de quelques heures à quelques jours).

Il faut attendre la phase d'état pour que soient réunis les symptômes classiques de la MCJ. Les signes cliniques les plus couramment rencontrés sont, par ordre de fréquence, une détérioration mentale plus ou moins sévère, des mouvements anormaux (myoclonies), un syndrome cérébelleux, des signes pyramidaux, extrapyramidaux et des signes visuels ou oculomoteurs.

La phase terminale conduit, en quelques mois, au décès dans un état grabataire et de dépendance totale.

Au plan histologique, les lésions sont identiques à celles décrites au cours des autres ESST c'est-à-dire " la triade " spongieuse, gliose et perte neuronale. Cependant, les caractéristiques

neuropathologiques sont variables d'un individu à l'autre (**RICHARD MARLENE.2001**).

A-1-1-2-Le diagnostic paraclinique :

La détection des protéines 14.3.3 dans le LCR est un outil de bonne sensibilité (97%) et de bonne spécificité (87%) dans le diagnostic d'orientation pour la MCJs (Lemstra *et al.* 2000). Dans le cadre de la MCJs, de nombreux travaux portant sur la sensibilité et la spécificité de ce test ont été publiés (**HSICH *et AL.* 1996 ; ZERR *et AL.* 1996 ; 1998 et 2000 ; BEAUDRY *et AL.*1999 ; LEMSTRA *et AL.* 2000**).

Les suspicions de MCJs sont classées en cas possibles, probables ou certains selon les critères de l'OMS (www.invs.sante.fr).

A-1-2-La MCJ familiale :

Les formes familiales de la MCJ représentent plus de 15% des cas (**PEOC'H et LAPLANCHE 1999**). Dans cette forme de MCJ, la PrP est pathologique du fait d'une anomalie génétique (mutations, insertions) et non pas du fait d'une modification post-traductionnelle.

Au plan clinique, ces anomalies génétiques sont accompagnées de modifications phénotypiques telles qu'un début à un âge plus précoce et une durée d'évolution plus longue. (**BRANDEL 1999**).

La détection des protéines 14.3.3 dans le LCR s'avère utile dans le cadre des MCJf. En effet, dans une étude conduite par Rosenmann, les protéines 14.3.3 ont été détectées dans 15 LCR sur 16 de MCJf associées à la mutation E200K et dans un LCR de sujet MCJf D178N) (**ROSENMANN *et AL.* 1997**). Plus récemment, ces protéines ont été détectées dans 100% des cas associés aux mutations E200K et V210I (**ZERR *et AL.* 2000**).

A-1-3-La MCJ iatrogène :

Les cas de MCJi décrits se sont développés suite à différentes procédures : les greffes de cornée, l'implantation intracérébrale d'électrodes contaminées, injection d'hormone de croissance naturelle contaminée (**BILLETTE DE VILLEMEUR 1995 ; BILLETTE DE VILLEMEUR *et AL.*1996**) et les greffes de dure-mère. Ces infections sont le résultat d'une extraordinaire résistance de l'agent infectieux aux techniques conventionnelles d'inactivation et de stérilisation.

Le phénotype des MCJi semble assez constant, touchant l'adulte jeune, mais semble cependant influencé par la voie de la contamination : périphérique dans le cas des hormones de croissance et centrale dans le cas des autres contaminations.

A-1-4-La MCJ nouveau variant :

La nouvelle variante est la forme la plus médiatisée de la MCJ mais cependant la moins courante. Au 08 juin 2001, le Royaume-Uni a recensé 101 cas probables ou certains de MCJv, la France 3 cas et l'Irlande 1 cas.

La MCJv fut identifiée pour la première fois en 1996 comme étant potentiellement une

nouvelle ESST dont la cause était probablement une contamination à l'homme de l'ESB (RICHARD MARLENE. 2001).

A-1-4-1-Les données cliniques :

Le phénotype clinique de la MCJv diffère de la MCJs par une longue évolution, en moyenne de 14 mois, un jeune âge de 29 ans en moyenne et des troubles sensitifs ou psychiatriques précoces (ZEIDLER *et AL.* 1997 ; WILL *et AL.* 2000). Les premiers signes neurologiques évocateurs sont une ataxie cérébelleuse souvent associée à des signes pyramidaux, à des mouvements involontaires incluant myoclonies, chorée et dystonie (ZEIDLER *et AL.* 1997 ; WILL *et AL.* 2000). Le stade terminal de la maladie est semblable à celui de la MCJs avec une détérioration cognitive progressive, une incontinence et une dépendance de plus en plus grande (ZEIDLER *et AL.* 1997 ; WILL *et AL.* 2000).

A-1-4-2-Les données neuropathologiques :

Les caractéristiques neuropathologiques sont clairement celles d'une ESST avec des modifications spongiformes largement distribuées et proéminentes au niveau du striatum. La perte neuronale est variable, mais cependant plus prononcée dans le cortex occipital et le cervelet où l'activation astrocytaire est très présente. La plus frappante des caractéristiques histologiques de la MCJv est la présence dans de nombreuses aires du cerveau, de larges plaques amyloïdes distribuées dans l'ensemble du cortex cérébral et cérébelleux. Elles sont également présentes en petit nombre dans les ganglions de la base, le thalamus, l'hypothalamus et les noyaux du " brain stem " (IRONSIDE 1997 ; IRONSIDE 1998). Dans la plupart des cas, ces plaques sont entourées par une couronne de vacuoles de spongiose.

A-1-4-3-Le diagnostic paraclinique :

L'EEG est anormal dans la plupart des cas, mais ne montre pas d'activité pseudo-périodique typique de la MCJs (COLLINGE 1996 ; ZEIDLER *et AL.* 1997).

L'IRM montre un fort signal bilatéral au niveau du pulvinar dans 77% des cas (WILL *et AL.* 2000).

Les paramètres du LCR sont habituellement normaux. La détection des protéines 14.3.3 est positive dans seulement 57% des cas (WILL *et AL.* 2000).

A-1-4-4-La biopsie d'amygdale :

La biopsie d'amygdale a été évoquée comme étant un examen extrêmement prometteur pour le diagnostic de la MCJv puisque la PrPres a été détectée, dans ce tissu, par IHC et par WB. Cependant, le nombre, encore insuffisant, de résultats portant sur cet examen ne permet pas de fixer sa sensibilité et sa spécificité (WILL *et AL.* 2000).

A-2-Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker :

Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker a été décrit en 1936. Il s'agit d'une maladie à prion héréditaire transmise selon un mode autosomique dominant. Cette maladie serait due à une mutation faux-sens au niveau du codon 102 (P102L) du gène PRNP.

Cependant d'autres mutations ponctuelles (6 faux-sens et une non-sens) ont été associées au syndrome de GSS (**GHETTI 1996**). Le début de la maladie se déclare entre 35 et 50 ans par une ataxie spinocérébelleuse progressive, se poursuit par un état dépressif puis une démence. La durée de la maladie est d'environ 5 ans.

La neuropathologie du syndrome de GSS se traduit par l'existence d'une spongiose extensive avec perte neuronale et gliose astrocytaire, par des lésions de la substance blanche des voies cérébelleuses longues et par la présence de plaques amyloïdes évoquant tantôt des plaques de Kuru, tantôt des plaques multicentriques. Certains variants du syndrome de GSS présentent des dégénérescences neurofibrillaires (**TRANCHANT et AL. 1997**). Dans certaines familles, les anomalies neuropathologiques ont une distribution plus restreinte et se limitent au télencéphale et au diencéphale.

Les protéines 14.3.3 ont été détectées dans 2 cas sur 5 de GSS (**ZERR et AL. 2000**).

Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker a été classé dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles en 1981 quand sa transmissibilité a été montrée. C'est une des plus rares maladies neurodégénératives avec une incidence annuelle de 2 à 5 cas pour 100 millions.

A-3-L'Insomnie Familiale Fatale :

La nature infectieuse de l'IFF n'a été démontrée que récemment (**TATEISHI et AL. 1995**).

L'IFF est une maladie à prion héréditaire transmise selon un mode autosomique dominant, caractérisée par des insomnies persistantes. L'IFF est caractérisée par la mutation du codon 178 du gène PRNP associé à une méthionine au codon 129.

L'IFF est rapportée pour la première fois en 1985 par Médori et collaborateurs. L'âge de début de la maladie se situe entre 40 et 60 ans et se déclare soit par des troubles du sommeil, insomnies, agitations nocturnes, rêves, soit par des troubles moteurs, ataxie, dysarthrie ou encore par des troubles de la mémoire. En quelques semaines, l'insomnie devient complète, les troubles cognitifs s'aggravent, les signes moteurs et les perturbations autonomes et endocrines apparaissent. La durée de la maladie est d'environ une année au terme de laquelle le décès survient.

Les lésions neuropathologiques sont essentiellement localisées au niveau du thalamus. La spongiose est souvent absente ou focalisée. La perte neuronale et la gliose sont importantes dans les noyaux ventraux antérieurs et dorsomédians et beaucoup plus discrètes dans les noyaux centromédians et du pulvinar et absentes pour le reste. Dans le cortex cérébral, on note une astrocytose. Dans le cervelet, la perte neuronale et la gliose sont modérées alors que l'olive inférieure est très atrophique. Le reste du cerveau est normal.

Les protéines 14.3.3 sont toujours négatives dans le LCR (**ZERR et AL. 2000**).

A-4-Le Kuru :

Le Kuru est une maladie similaire à la MCJ qui s'est développée en Nouvelle-Guinée par les rituels cannibales.

Cette maladie a été découverte en 1955 par Zigas et Gajdusek, elle est maintenant pratiquement éteinte. Cette affection ne touchait que le peuple Fore des hauts plateaux de la Nouvelle-Guinée. Elle se manifestait cliniquement par une ataxie cérébelleuse et un " tremblement " qui évoluait vers une impotence motrice absolue. La démence n'était pas une caractéristique essentielle de l'affection, mais pouvait apparaître au stade terminal. Le décès survenait moins d'un an après le début de la maladie et la mort était attribuée à une infection intercurrente ou à une malnutrition. Les modifications morphologiques du SNC étaient qualitativement semblables à celles de la MCJ. En revanche, la topographie des lésions était différente, l'atteinte du striatum était prédominante. des plaques amyloïdes dites de Kuru étaient observées dans 60% des cas (RICHARD MARLENE.2001).

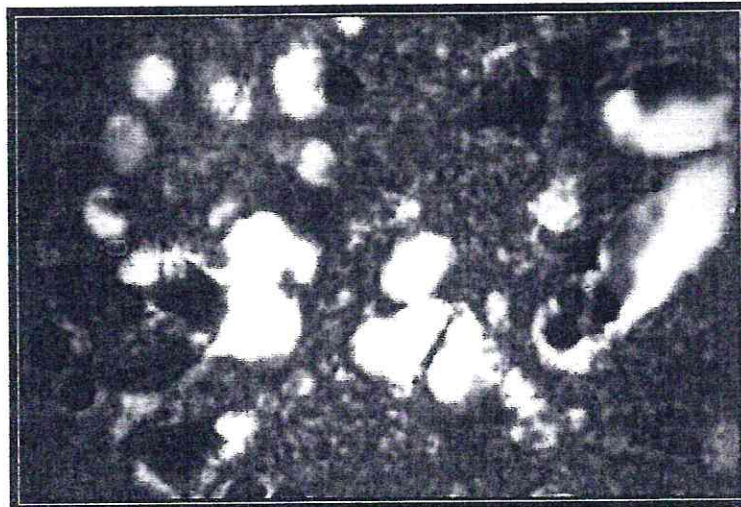


Figure N°6 : Coupe histologique d'un cerveau humain atteint par le Kuru.
Photographie aimablement prêtée par "University of Iowa's Virtual Hospital" (USA)

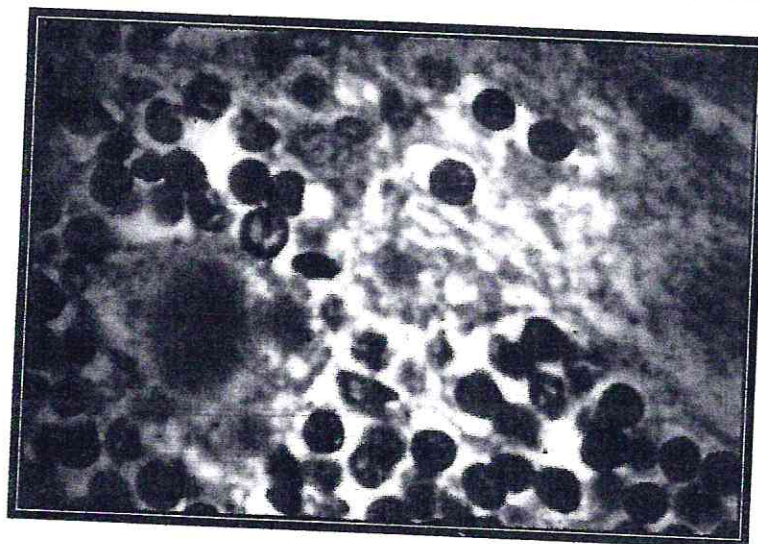


Figure N°7 : Coupe histologique d'un cerveau humain atteint par le Kuru, on y distingue les plaques amyloïdes dans les espaces intercellulaires.

Photographie aimablement prêtée par "University of Iowa's Virtual Hospital" (USA)

B-Les maladies animales à prion :

B-1-L'encéphalopathie spongiforme bovine :

B-1-1-Présentation :

L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), (appelée communément " maladie de la vache folle "), a été identifiée pour la première fois en Grande-Bretagne en 1985 et déclarée en 1986.

Cette maladie appartient au groupe des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) connues chez d'autres espèces animales (chat, mouton, wapiti, vison...).

Ce sont des maladies dégénératives du système nerveux central et sont dues à des agents infectieux appelés " agents transmissibles non conventionnels (ATNC) " ou " **prions pathogènes** ". Elles se manifestent par l'apparition de cavités dans les cellules nerveuses cérébrales (visibles au microscope) faisant ressembler le cerveau à une éponge (d'où le terme de " spongiforme ").

L'ESB se caractérise par l'apparition de symptômes nerveux sur des animaux adultes qui conduisent progressivement (entre un et six mois) et inéluctablement vers la mort.

(www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.)



Figure N°8 : Vache atteinte d'encéphalopathie spongiforme bovine
(www.phil.cdc.gov)

B-1-2-Origine de l'épidémie :

La maladie existe à l'état naturel à des fréquences très faibles. Mais, au début des années 1980, on commença à administrer des compléments alimentaires aux bovins de plus de six mois pour qu'ils grandissent plus vite et donnent plus de lait. Ces compléments étaient des farines de protéines animales, fabriquées à partir de carcasses de moutons ou de vaches. L'ESB fut transmise à un nombre considérable de bovins par l'intermédiaire de telles farines mal traitées, c'est-à-dire insuffisamment chauffées (130°C au minimum pour éviter les contaminations). Ce diagnostic a été confirmé par le comité scientifique des vétérinaires de la commission européenne et par l'organisme de contrôle mondiale, la fédération internationale des épizooties (FIE).

De plus, des études ont montré que l'ESB peut être transmise par la vache à son veau, sans que l'on puisse dire si cette transmission a lieu lors de la gestation ou si les prions sont présents dans le lait maternel. Cette maladie, transmissible à l'homme produit une forme atypique de la MCJ. Depuis les débuts de l'épidémie en 1985, plus de 160000 cas de vaches folles ont été recensés, principalement en Grande-Bretagne, mais aussi en Irlande, en Suisse, en France, aux Pays-Bas, en Allemagne et ailleurs... .

(www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.)

Cependant deux hypothèses ont été envisagées :

a-La première hypothèse serait que l'ESB ne préexistait pas :

L'épidémie britannique serait due à l'incorporation de cadavres de moutons atteints de tremblante (ou **scrapie** en anglais) dans les farines consommées par des bovins. L'agent infectieux de la tremblante se serait adapté à l'espèce bovine pour développer une maladie spécifique.

Cette hypothèse explique pourquoi la maladie ovine est souvent évoquée avec l'ESB.

La tremblante est une maladie du même groupe et est transmise par un agent similaire. Elle est connue depuis environ 200 ans, sans qu'un lien avec une maladie humaine similaire n'ait pu être reconnu.

Cette hypothèse est également basée sur l'importance du ratio ovins/bovins en Grande-Bretagne (environ 2/1) et de l'importante prévalence de la tremblante dans ce pays.

(www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.)

b-La seconde hypothèse serait que l'ESB est une maladie préexistante :

Dans ce cas, la maladie aurait existé bien avant l'épidémie britannique à l'état sporadique (c'est-à-dire sous la forme de cas isolés comme dans le cas de la maladie humaine dont la fréquence moyenne est de 1 cas pour 1 million d'habitants) du fait d'une mutation spontanée de la protéine appelée " prion " vers une forme anormale dite " pathogène ".

L'utilisation de cadavres d'animaux atteints d'ESB dans la fabrication de farines recyclées pour l'alimentation des bovins ainsi que des changements dans les méthodes de fabrication des farines auraient donc eu un effet amplificateur considérable d'une maladie préalablement non identifiée.

Cette hypothèse se voit renforcée par des analyses plus fines de la nature du prion ESB, aujourd'hui bien différencié de celui de la tremblante.

La confirmation d'une telle hypothèse remettrait en cause le statut de tous les pays se déclarant " indemnes " d'ESB.

En effet, si la maladie existe à un état suffisamment sporadique pour rester longtemps inapparente, il est fort probable que bien des pays se trouvent affectés sans s'en rendre compte

(www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.)

B-1-3-Symptomatologie :

La durée d'incubation n'est pas connue avec précision mais semble être toujours longue, de l'ordre de 5 ans.

Les symptômes caractéristiques de la maladie sont les modifications du comportement et des troubles locomoteurs. Mais le diagnostic ne peut être établi qu'après la mort de l'animal.

CHAPITRE III: Transmission des ESST et maladies causées par le prion

Les animaux touchés commencent par devenir nerveux, anxieux, peureux voire agressifs. Ils ont tendance à s'isoler du troupeau, ils peuvent sortir la langue pour se lécher le museau.

Les bovins ont une démarche hésitante et vacillante, accompagnée de tremblements. L'état général des animaux se détériore. La mort survient au bout de six à huit semaines, après l'apparition des symptômes.

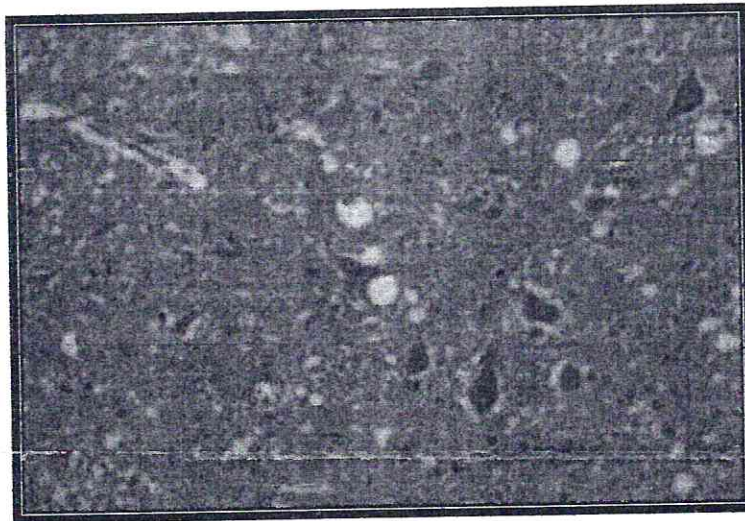
B-1-4-Le diagnostic :

Les diagnostics permettant d'établir avec certitude la présence du prion pathogène responsable de l'ESB sont pratiqués après la mort ou l'euthanasie de l'animal et reposent :

*soit sur un examen histopathologique permettant de mettre en évidence des lésions spongiformes de l'encéphale caractéristiques

*soit sur un test de Western Blot réalisé sur un fragment du tronc cérébral et présentant un résultat positif.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de diagnostic de certitude sur des animaux vivants en incubation. (www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.).



FigureN°9 : Coupe histologique dans une moelle de vache atteinte d'encéphalopathie spongiforme bovine

(Photographie aimablement prêtée par : National Institute of Animal Health (Japan))

(Photographed by Dr. M. KUBO NIAH.)

***Tissus infectants :**

Les encéphalopathies (encéphalo + pathie = cerveau + maladie) spongiformes transmissibles sont comme leur nom l'indique, des maladies atteignant le système nerveux central.

Les organes, qu'ils soient consommés ou non, ont été répartis en 4 catégories (de I à IV)

d'infectiosité décroissante :

*catégorie I : système nerveux central et tout ce qui s'y relie (yeux, méninges).

*catégorie II : ganglions lymphatiques, rate, amygdales, intestin, placenta, rein.

*catégorie III : glandes surrénales, thymus, moelle osseuse, poumons, pancréas, muqueuse nasale, liquide céphalo-rachidien.

*catégorie IV : les muscles sont considérés comme sains car ne présentant pas de titre infectieux détectable.

(La Recherche - N°332 de juin 2000).

B-1-5-L'assainissement des élevages infectés :

En France tous bovin suspect de BSE, c'est-à-dire présente des signes nerveux, anxiété, agressive... associés ou non à des trouble locomoteur et persistant plus de 15 jours, doit être signalé au vétérinaire sanitaire qui alerte la DSV. Dès la déclaration de suspicion, un arrêté de mise sous surveillance du cheptel est prise.

Si le diagnostic de BSE est confirmé par le laboratoire, l'élevage est séquestré. Tous les bovins de l'exploration sont marqués d'un trou à l'oreille droite.

Pour assainir son troupeau, l'éleveur dispose de deux possibilités :

*un abattage total subventionné. Dans ce cas, la viande des animaux, excepté celle des maladies, peut être livrée à la consommation sous réserve d'une préparation particulière.

*Un assainissement progressif par la réforme des animaux marqués qui peuvent demeurer sur l'exploitation pendant toute la vie.

L'abattage total est préférable, car il est difficile d'introduire des animaux pendant l'assainissement progressif **(La Recherche - N°332 de juin 2000).**

B-2-La tremblante du mouton:

La tremblante est une maladie transmissible, rencontrées chez le Mouton et la Chèvre, caractérisée cliniquement, après une longue période d'incubation, par l'apparition de trouble nerveux sensitifs sans hyperthermie, et vers une issue toujours fatale. D'autres espèces peuvent présenter cette affection, maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, encéphalopathie transmissible du vison, encéphalopathie spongiforme bovine (dénommée par les médias "maladie des vaches folles»). D'autres cas d'encéphalopathie ont été signalés chez le chat, le Guépard, le Puma, l'Autruche.... **(Maladies des moutons p65).**

B-2-1-ORIGINE :

La tremblante est connue depuis fort longtemps (XVIII^e siècle) chez les ovins et les caprins en particulier en Europe.

Il ne semble pas qu'un seul pays dans le monde soit indemne de tremblante. Cependant, l'Australie et la Nouvelle-zélande font état d'une éradication.

Dans les élevages endémiquement atteints, l'incidence de la tremblante exprimée cliniquement chez le Mouton est de l'ordre de 5 à 10% de la production annuelle, 70% des cas apparaissent à un âge compris entre 2 et 4 ans.

La nature exacte de l'agent responsable n'est pas connue avec précision. Il s'agit d'un agent transmissible non conventionnel (ATNC) différent des virus ou des bactéries.

La composante essentielle de cet agent est une protéine PrP^{sc}, d'où la dénomination "prion" (small proteinaceous infectious particles). Cette protéine se distingue d'une protéine similaire (PrP^c), présente dans les tissus sains par sa résistance à la protéase K et par la formation de SAF (ou "scrapie associated fibrils") au microscope électronique.

Le prion est très différent des virus en raison de sa résistance particulière aux désinfectants chimiques et physiques usuels. Par exemple, il peut résister plus de 4 mois dans une solution formolée à 20% ou 1h à 90°C.

Il peut même résister à 160°C pendant 24 heures en chaleur sèche.

Le problème actuel est l'impossibilité d'expliquer le mécanisme à l'origine de la conservation de la protéine normale Pr P en prion ou PrP^{sc}, en particulier lors de la transmission de la maladie.

La transmission de la maladie pourrait être maternelle (de la mère à l'agneau in utero ou après la naissance) et/ou horizontale.

La transmission maternelle semble jouer un rôle important dans l'épidémie de la tremblante, car l'agent infectieux est retrouvé en grande quantité dans les cotylédons de la brebis infectée. La brebis transmet également la susceptibilité génétique (cette transmission de la sensibilité peut être également liée aux caractères génétiques du bélier). En revanche, le lait

ou le colostrum ne semblent pas infectants.

Une transmission horizontale semble également possible "par contact" ou par l'intermédiaire d'une pâture contaminée (l'agent transmissible peut rester infectant pendant au moins 3 ans dans le sol).

Enfin, la tremblante a pu être transmise accidentellement en Grande-Bretagne par l'intermédiaire d'un vaccin formolé contre le louping-ill.

On peut penser que l'infection naturelle s'effectue par la voie orale avec une localisation primaire de l'agent infectieux dans les tissus lymphatiques de la région pharyngée puis dans l'intestin grêle distal et dans le colon proximal, avec une dissémination ultérieure vers la rate et les tissus lymphoïdes viscéraux. La dissémination ultérieure de cet ATNC dans les tissus nerveux provoquera l'apparition des symptômes (**MANUEL PRATIQUE ; MALADIES DES MOUTONS P 65**).

B-2-2-Symptômes:

Les symptômes apparaîtront après une période d'incubation remarquablement longue, de plusieurs mois (au minimum 10 mois) à plusieurs années (en général 2 à 3 ans). Dans les élevages très contaminés, on peut remarquer un raccourcissement progressif de la période d'incubation. On distingue deux formes cliniques de la tremblante : la forme prurigineuse et la forme nerveuse (paralytique).



Figure N°10 : Mouton atteint de tremblante ; lésions de grattage (B. Chamak, Pour la Science, 1999, vol 256).

B-2-2-1-La forme prurigineuse :

Le premier signe est l'apparition d'un prurit dorso-lombaire, qui s'étend ensuite aux autres parties du corps. Un comportement de grattage se développe ; la laine devient rêche et ébouriffée, puis est arrachée par plaques ; la surinfection des plaques dépilées est

fréquente. Ces symptômes expliquant la dénomination anglaise de la maladie (« to scrape » gratter). (**MANUEL PRATIQUE ; MALADIES DES MOUTONS P 65**).

B-2-2-2-La forme paralytique :

Débuté par une parésie de l'arrière train avec difficultés de la locomotion, et perte de la coordination.

Ces symptômes sont associés dès le début de la maladie, à des troubles du comportement (attitude craintive, fuites...) et surtout à une hyperesthésie se manifestant à la moindre excitation par des tremblements localisés d'abord aux oreilles puis s'étendant à la tête, à l'encolure et au membres. Ces symptômes sont à l'origine de la dénomination française de la maladie (« tremblante »). Bien que l'appétit soit conservé, l'état général est altéré, l'animal maigrit. Les signes nerveux s'intensifient et les tremblements deviennent permanents. L'animal reste en décubitus devient cachectique et meurt après passage à un état comateux entrecoupé de convulsions. La maladie aboutit systématiquement à la mort en un à deux mois en moyenne, après évolution graduelle des symptômes (**MANUEL PRATIQUE ; MALADIES DES MOUTONS P 65**).

B-2-3-Lésions :

Les lésions macroscopiques sont celles de grattage, par contre en microscopie on a la triade lésionnelle (« spongiose, gliose astrocytaire, et une dépopulation neuronale »). (**MANUEL PRATIQUE ; MALADIES DES MOUTONS P 65**).

B-2-4-Diagnostic de la maladie :

Le diagnostic clinique repose sur les données épidémiologiques (troupeau à tremblante) et sur l'examen clinique des animaux adultes.

Actuellement seul un examen histologique permet de confirmer une suspicion.

L'emploi du microscope électronique permet d'observer les structures fibrillaires dans le système nerveux central (**MANUEL PRATIQUE ; MALADIES DES MOUTONS P 65**).

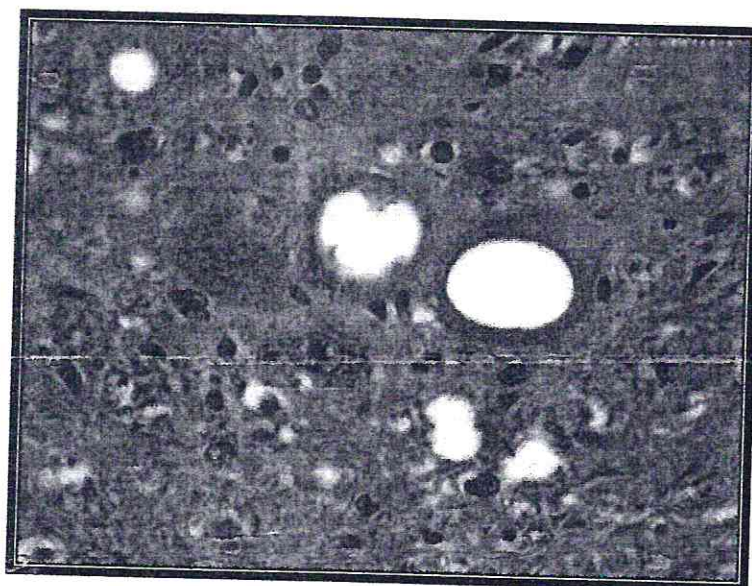
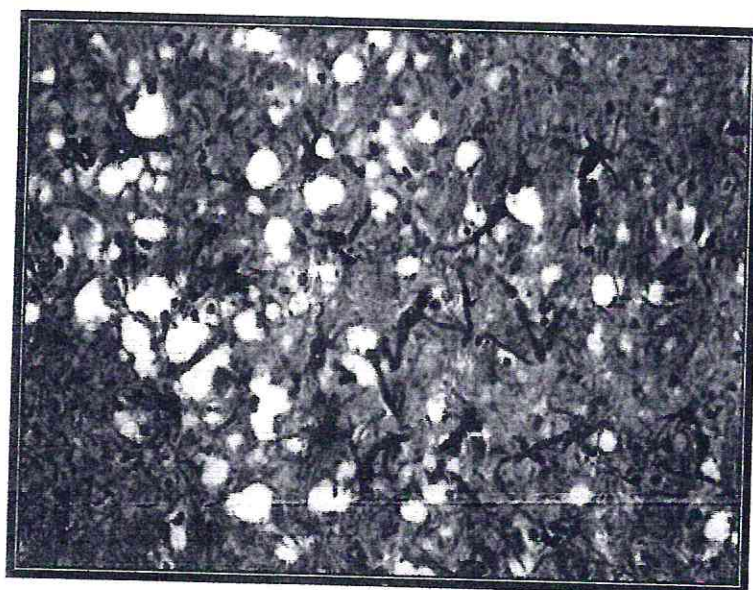


Figure N° 11: Coupes histologiques dans la substance grise d'un cerveau de mouton. On observe nettement sur la photographie de bas une grande vacuole dans chacun des deux neurones. Cette vacuole pousse sur les bords de la cellule le noyau et les autres organites cytoplasmiques.

(Photographies aimablement prêtées par Dr. R. Higgins, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis (USA)).

Conclusion

Conclusion

Les maladies à prion semblent prendre de plus en plus d'ampleur du fait de l'impossibilité de poser un diagnostic précoce, du fait de l'ignorance des propriétés exactes de l'agent pathogène pour pouvoir l'inactiver, et finalement du fait de l'absence de traitement.

Et donc il s'avère très important de se méfier du danger que représentent ces pathologies et cette particule intelligente ; le prion.

Ainsi vu la longueur de la période d'incubation il est irrationnel de se prononcer et dire qu'on n'a plus affaire à ce fléau.

Recommendation

RECOMMANDATIONS.

Suit à l'incertitude persistante, des précautions élémentaires doivent être prises :

- Stérilisation renforcée des instruments chirurgicaux pour tenir compte de la résistance exceptionnelle de l'ATNC,
- Utilisation de neurohormones "propres" issues du génie génétique,
- Alimentation sécurisée par l'interdiction à la distribution des organes à risques des animaux malades, par l'interdiction des farines animales dans l'alimentation du bétail quel qu'il soit, en raison des possibilités de franchissement de la barrière interspécifique.

Pour cela il faut tracer deux plans à savoir :

Plan sanitaire :

Pays indemnes :

- Surveillance ciblée pour déceler les symptômes nerveux.
- Mesures de protection relatives à l'importation des ruminants sur pied et de leurs produits.
- Décisions réglementaires concernant l'importation d'embryons.

Pays où des cas sont apparus chez les bovins :

- Abattage avec indemnisation, pour obtenir confirmation des cas.
- Contrôles visant à surveiller le recyclage des protéines issues de mammifères.
- Efficacité du système d'identification et de traçabilité des bovins.

-Le personnel de laboratoire amené à manipuler des tissus provenant d'animaux susceptibles d'être atteints d'ESB doit porter des vêtements de protection adaptés et respecter scrupuleusement un code de bonnes pratiques pour éviter toute exposition à l'agent pathogène, hautement résistant aux traitements physiques et à de nombreux traitements chimiques. L'apparition récente d'une nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob indique que l'agent pathogène pourrait être infectieux chez l'homme. La maladie n'étant pas contagieuse, les opérations de laboratoire doivent principalement éviter les expositions iatrogènes, oculaires ou bucco-nasales accidentelles.

Références bibliographiques

BIBLIOGRAPHIE

- **AUCOUTURIER P., KASCSAK RJ., FRANGIONE B., WISNIEWKI T. (1999).**Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters*. **274**: 33-36.
- **BEAUDRY P., COHEN P., BRANDEL JP., DELASNERIE-LAUPRETRE N., RICHARD S., LAUNAY JM., LAPLANCHE JL. (1999).**14.3.3 protein, neuron-specific enolase, and S100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease.*Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. **10**: 40-46.
- **BEAUVAIS P., BILLETTE DE VILLMEUR T.**Médecine.Science Flammarion(1996).
- **BILLETTE DE VILLEMEUR T. (1995).** Forme juvénile de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, aspects cliniques et neuropathologiques. *Path. Biol.* **43**(2) : 91-96.
- **BILLETTE DE VILLEMEUR T., DESLYS JP., PRADEL A., SOUBRIE C., ALPEROVITCH A., TARDIEU M., CHAUSSAIN JL., HAUW JJ., DORMONT D., RUBERT M., AGID Y. (1996).** Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France. *Neurology*. **47**: 690-695.
- **BILLETER M., RICK R., WIDER G., HORNEMANN S., GLOCKSHUBER R., WÜTHRICH K., Proc.Natl.Acad.Sci.USA July(1998).Vol 94,pp7281-7285**
- **BRANDEL JP.(1999).**Clinical aspects of human spongiform encephalopathies, with the exception of iatrogenic forms. *Biomed and Biopharmacother.* **53**: 14-18.
- **CHAMAK B. Pour la Pour la Science, 1999, vol 256.**
- **CHRETIEN F., DORANDEU A., ADLE-BIASSETTE., EREAU T., WINGERTSMANN L., BRION F., GRAY F. (1999).** Un processus de mort cellulaire programmée intervient dans la perte neuronale des maladies à prions. *Clin. Exp. Path.* **47**(3-4) : 181-191.
- **COLLINGE J., WHITTINGTON MA., SIDLE KC., SMITH CJ., PALMER MS., CLARKE AR., JEFFERYS JGR. (1994).**Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**: 295-297.
- **COLLINGE J. (1996).**New Diagnostic tests for prion diseases. *The New England Journal of Medicine*. **335**: 963-965.
- **COLLINGE J., HILL FH., SIDLE KC., IRONSIDE JW. (1997).**Typing prion isoforms. *Nature*. **386**: 232-233.
- **CONKLIN DS., GALAKTIONOV K., BEACH D. (1995).**14.3.3 proteins associate with Cdc25 phosphatases. *PNAS* **92**: 7892-7896.

- **DESLYS JP. (1999).** Prévention du risqué d'encéphalopathies spongiformes subaiguë transmissible. *La revue du Practicien.* **49** : 966-970.
- **ETTAICHE M., PICHOT R.,** J.Bio.Chem, vol 275, NO 47, p36487-36490
- **GHETTI B., PICCARDO P., FRANGIONE B., BUGIANI O., GIACCONE G., YOUNG K., PRELLI F., FARLOW MR., DLOUHY SR., TAGLIAVINI F. (1996).** Prion protein amyloidosis. *Brain Pathol.* **6**; 127-145.
- **HARRIGTON MG., MERRIL CR., ASHER DM., GADJUSEK DC. (1986).** Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *The New England Journal of Medicine.* **315**(5): 279-283.
- **HAUW JJ., NACCACHE PY., SEILHAN D., CAMILLERI S., MOKHTARI K., DUYCKAERTS C. (1995).** Neuropathologie des agents infectieux non conventionnels ou prions. *Path. Biol.* **43**(1): 43-52.
- **HAUW JJ., SAZDOVITCH V., LAPLANCHE JL., PEOC'H K., KOPP N., KEMENY J., PRIVAT N., DELASNERIE-LAUPRETRE N., BRANDEL JP., DESLYS JP., DORMONT D., ALPEROVITCH A. (2000).** Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* **54**: 1641-1646.
- **HSICH G., KENNEY K., GIBBS CJ., LEE KL., HARRIGTON MG. (1996).** The 14.3.3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *The New England Journal of Medicine.* **335**: 924-930.
- <http://www.ens-lyon.fr/DSM/Magistère/Projets-biblio2001/ebourles/index/hmt>.
- **IRONSIDE JW. (1996).** Review: Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Pathol.* **6**: 379-388.
- **IRONSIDE JW. (1997).** The new variant forme of Creutzfeldt-Jakob disease: a novel prion protein amyloid disorder. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **4**: 66-69.
- **KAWAHARA M., KURODA Y.** J.Bio.Chem(2000), vol 275, NO 19, p14077-14083.
- **KEH-MING PAN., BALDWIN M., PRUSINER S.** Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993). Vol 90, 10962-10966.
- **KREBS., GHANI., DONNELLY,** *Nature* (2000) **408**, 767, 583-4, 787-8.
- **KROPP S., ZERR I., SCHULZ-SCHAEFFER WJ., RIEDEMANN C., BODEMER M., LASKE C., KRETZSCHMAR HA., POSER S. (1999).** Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters.* **261**: 124-126.
- **LA RECHERCHE - N°332 de juin 2000 - Vache folle : transmission expérimentale (p. 46).**
- **LAURENT M/**Médecine/science (1996), 12, 774-85.
- **LEMSTRA AW., VAN MEEGEN MT., VREYLING JP., MEIJERINK PHS., JANSEN GH., BULK S., BAAS F., VAN GOOL WA. (2000).** 14.3.3 resting in diagnosing

Creutzfeldt-Jakob disease. A prospective study in 112 patients. *Neurology*. **5**: 514-516.

- **Manuel pratique; Maladies des moutons, p65, 69.**
- **MILHAVET., H.E.M., MAC MAHON.**Proc.Natl.Acad.Sci.USA, (Décembre 2000).Vol **97 NO 25, p13937-13942.**
- **MOHR M., TRANCHANT C., STEINMETZ G., FLOQUET J., GRIGNON Y., WARTER JM. (1999).**Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the french-alsatian A117V variant. *Clin. Exp. Path.* **47(3-4): 161-175.**
- **MOUILLET-RICHARD.,KELLERMANN O.**Médecine/Science (Mars 2001).Vol **17,p402-405.**
- **National Institute of Animal Health (Japan); Dr. M. KUBO NIAH.**
- **OTTO M., WILTFANG J., TUMANI H., ZERR I., LANTSCH M., KORNUBER J., WEBER T., KRETZSCHMAR H. A., POSER I. (1997).**Elevated levels of Tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience Letters*. **225**: 210-212.
- **OTTO M., WILTFANG J., SCHUTZ E., ZERR I., OTTO A., PFAHLBERG A., GEFELLER O., UHR M., GIESE A., WEBER T., KRETZSCHMAR HA., POSER S. (1998).**Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ*. **316** : 577-582.
- **PEOC'H K., LAPLANCHE JL.(1999).** Génétique des encéphalopathies spongiformes subaiguës humaines. *La revue du Practicien*. **49** : 954-958.
- **PICOT A.,GNERY J.**L'actualité chimique(1998),p 5-18.
- **PRUSINER S.**Prion in virology(1996).Lippincott-Raven Publishers pp2901-2950.
- **PRUSINER SB. (1982).** Novel proteinaceous infectious particle cause scrapie. *Science***216** : 136-144.
- **PRUSINER S.**Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1998).Vol 95,p13363-13383.
- **PUOTI G., GIACCONEG., ROSSI G., CANCIANI B., BUGIANI O., TAGLIAVINI F. (1999).**Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: co-occurrence of different types of PrPsc in the same brain. *Neurology* **53**: 2173-2176.
- **RICHARD MARLENE;** Mémoire ; localisation des protéines 14, 3,3 dans la maladie de Creutzfeldt Jakob (Septembre 2001).
- **RICHARD M., BIACABE AG., PERRET-LIAUDET A., McCARDLE L., IRONSIDE JW., KOPP N. (1999).**Protection of personnel and environment against Creutzfeldt-Jakob disease in pathology laboratories. *Clin. Exp. Path.* **47(3-4): 192-200.**
- **ROSENMAN H., MEINER Z., KAHANA E., HALIMI M., LENETSKY E., ABRAMSKY O., GABIZON R. (1997).**Detection of 14.3.3 protein in the CSF of genetic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. **49**:593-595.

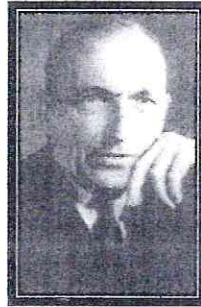
- TATEISHI J., BROWN P., KITAMOTO T., HOQUE ZN., ROOS R., WOLLMANN R., CERVENOKOVA L., GADJUSEK DC. (1995). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376: 434-435.
- TRANCHANT C., SERGEANT N., WTTEZ A., MOHR M., WARTER JM., DELACOURTE A. (1997). Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 63: 240-46.
- University of Iowa's Virtual Hospital" (USA)).
- WAGGONER D.J. *Bio.Chem*(2000). Vol 275. NO11, p7455-7458.
- WILL RG., ZEIDLER M., STEWART GE., MACLEOD MA., IRONSIDE JW., COUSENS SN., MACKENZIE J., ESTIBEIRO K., GREEN AJE., KNIGHT RSG. (2000). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-jakob disease. *Ann. Neurol.* 47: 575-582.
- ZEIDLER M., STEWART GE., BARRACLOUGH CR., BATEMAN DE., BATES D., BURN DJ., COLCHESTER AC., DURWARD W., FLETCHER NA., HAWKINS SA., MACKENZIE JM., WILL RG. (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *The Lancet.* 350: 903-907.
- ZERR I., BODEMER M., OTTO M., POSER S., WINDL O., KRETZSCHMAR H. A., GEFELLER O. (1996). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *The Lancet.* 348: 846-849.
- ZERR I., BODEMER., GEFELLER O., OTTO M., POSER S., WILTFANG J., WINDL O., KRETZSCHMAR H. A., WEBER T. (1998a). Detection of 14.3.3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 43: 32-40.
- ZERR I., POCCHIARI M., COLLINS S., BRANDEL JP., DE PEDRO CUESTA J., KNIGHT RSG., BERNHEIMER H., CARDONE F., DELASNERIE-LAUPRÊTRE N., CUADRADO CORRALES N., LADOGANA A., BODEMER M., FLETCHER A., AWAN T., RUIZ BREMON A., BUDKA H., LAPLANCHE JL., WILL RG., POSER S. (2000). Analysis of EEG and CSF 14.3.3 proteins as aids to diagnosis of reutzfeldy-Jakob disease. *Neurology.* 55: 811-815.
- ZIMMERMAN K., TURECEK PL., SCHWARZ HP. (1999). Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol.* 97: 355-358.
- www.Agri.agri.ifrance.com/esb.htm ifrance.
- www.anapath.necker.fr/TecACP%20%C4/TecACP/metanapat/metanapat.
- www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/discours/2000/dprion.
- (www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)
- www.infoscience.fr/dossier/prion/prion5.html.
- ist.inserm.fr/basismedsci/2002/ms_1_2002/sommaire/62_02.pdf -

- www.invs.sante.fr
- www.oie.int/fr/info/fr-info.htm
- www.oie.int/fr/OIE/fr_oie.htm
- www.phil.cdc.gov
- www.sante.gouv.fr/hmt/pointsur/vache/2esst

Annexes

ANNEXE 1

ANNEXE1



H.G.Creutzfeldt



A.M.Jakob

Photos N°1 :Creutzfeldt et Jakob :description clinique et neuropathologique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.



Photos N°2 : D. Carleton Gajdusek :maladies lentes à virus (Prix Nobel 1976).



Photos N°3 : John Collinge : très grandes similitudes biochimiques entre le prion de l'ESB et celui du nouveau variant de CJD (Nature383, 685-90) (1996).



Photos N°4: Stanley Prusiner:hypothèse de l'agent transmissible non conventionnel(1981).

ANNEXE 2

Technique d'immunohistochimie :

1-Objectif :

Détection enzymatique d'un peptide à l'aide d'un anticorps dirigé contre ce peptide.

2-Principe de la Technique :

Le peptide ou la protéine a détectée va être reconnue par un anticorps spécifique. Cet anticorps est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline). La révélation se fait alors à l'aide d'un substrat de l'enzyme (ex :diaminobenzidine ou amino-ethyl carbazol pour la peroxydase, système NBT-BCIP pour la phosphatase alcaline). Au laboratoire l'immunohistochimie est employée soit sur tissu fixé monté sur lame soit sur coupes flottantes.

(www.anapath.necker.fr/TecACP%20%C4/TecACP/metanapat/metanapat.)

3-Avantages :

- Technique simple d'utilisation et ne nécessitant pas d'équipement lourd, si ce n'est un microtome ou un vibratome pour faire les coupes de tissu
- Résolution au niveau cellulaire
- Contrôle de la révélation en temps réel
- Possibilité d'effectuer des marquages multiples (en utilisant différents substrats de l'enzyme et en recourant à des révélations séquentielles ou bien en utilisant des anticorps secondaires couplés l'un à la peroxydase l'autre à la phosphatase alcaline)

(www.anapath.necker.fr/TecACP%20%C4/TecACP/metanapat/metanapat.)

4-Inconvénients :

- L'obtention de bons résultats est subordonné à l'utilisation d'un bon anticorps primaire (i.e. spécifique). Par ailleurs un même anticorps pourra convenir en coupes flottantes mais être inefficace sur coupes montées
- L'utilisation d'anticorps dirigés contre des neurotransmetteurs peut conduire à un marquage fibrillaire plutôt que des corps cellulaires. La quantification des cellules peut alors s'avérer difficile. Dans ce cas de figure une injection préalable d'un inhibiteur du transport axonal tel que la colchine peut résoudre le problème. Alternativement, s'il s'agit de détecter les cellules exprimant la substance en question le problème peut être résolu en s'attachant à la détection non de la protéine mais de son ARNm par HIS froide.

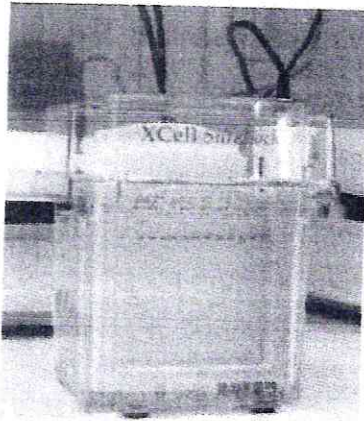
(www.anapath.necker.fr/TecACP%20%C4/TecACP/metanapat/metanapat.)

5-Matériel :

-Anticorps primaires, secondaires et substrats enzymatiques.

(www.anapath.necker.fr/TecACP%20%C4/TecACP/metanapat/metanapat.)

Les différentes étapes du buvardage de WESTERN BLOT :



Une cuve d'électrophorèse. Les puits de dépôt des échantillons sont colorés en vert, en haut du gel. Un courant électrique est appliqué pour faire migrer les protéines vers le bas.

Préparation des échantillons

Typiquement, les échantillons sont prélevés d'un tissu ou d'une culture cellulaire. Ils sont rapidement refroidis, voire réfrigérés (en dessous de 0°C). Ils sont homogénéisés par sonication (utilisation d'ultra-sons pour rompre les membranes), contrainte mécanique ou simplement lysés par utilisation de tampons à hautes concentrations en sels. Il en résulte un homogénat de tous les compartiments cellulaires, pouvant être utilisé tel quel ou être soumis à plusieurs étapes de centrifugations différentielles afin d'isoler les fractions cytosoliques, nucléaire et membranaires. L'échantillon est ensuite traité de façon à recueillir un taux constant de protéines à partir de chaque échantillon différent. Cela implique un dosage des protéines par la méthode du Biuret ou du bleu de Coomassie (Méthode de Bradford).

Les échantillons sont ensuite bouillis de 1 à 5 minutes dans une solution tampon (par exemple le tampon de Laemmli), contenant une substance tampon, généralement du tris, un colorant, un composant sulfhydryl (typiquement du beta-mercaptoéthanol ou du dithiothréitol ou plus simplement DTT), un détergent anionique lipophile (sodium dodécyl sulfate ou SDS) et du glycérol pour augmenter la tension de surface.

L'ébullition dénature les protéines en brisant les liaisons faibles intramoléculaires, ce qui a pour conséquence de les dérouler complètement. Le SDS leur procure alors un environnement riche en charges négatives afin de les solvater et prévenir la précipitation, et le composant sulfhydryl empêche la reformation de pont disulfure. Le glycérol augmente la densité de l'échantillon par rapport au tampon dans la partie supérieure du réservoir du gel,

facilitant la mise des échantillons qui descendront plus facilement au fond des compartiments du gel.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Électrophorèse sur gel

Les protéines de l'échantillon sont séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel, la composition desquels varie en fonction du laboratoire, du poids moléculaire des protéines d'intérêt, et des tampons disponibles. Les gels de polyacrylamide sont les plus fréquents. Les protéines ne traversant le gel que dans une dimension (du haut vers le bas), les échantillons sont chargés l'un à côté de l'autre dans des "puits" formés dans le gel. Les protéines sont séparées par masse en "bandes" dans chaque "couloir" formé sous les puits. Un couloir est réservé à un "marqueur" ou "échelle standard", une mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis disponible dans le commerce.

Il est également possible d'employer un gel 2D qui, à partir d'un seul échantillon, permet de faire migrer les protéines dans deux dimensions. Les protéines sont alors séparées par leur point isoélectrique (c'est-à-dire le pH auquel leur charge nette est neutre) dans la première dimension, et selon leur poids dans la seconde.

La composition d'un tampon d'électrophorèse (*Running buffer*) pour western blot est d'1 volume de tampon TGS (Tris-glycine-SDS) concentré 10 fois dans 9 volumes d'eau distillée. (www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Transfert sur membrane

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF. La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique est appliqué aux grandes plaques sur l'un des deux côtés. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures. Tant les membranes de nitrocellulose que de PVDF sont "collantes", liant des protéines de manière non-spécifique (c'est-à-dire qu'elles lient toutes les protéines présentes dans l'échantillon de la même façon). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Bien que les membranes de nitrocellulose soient moins chères que celles en PVDF, elles sont moins solides et ne peuvent être employées plusieurs fois. À la différence de celles en

nitrocellulose, les membranes de PVDF doivent être imbibées de méthanol ou d'isopropanol à 100% avant leur utilisation.

La composition pour un litre d'un tampon de transfert type est de :

- 700 ml d'eau distillée
- 100 ml de tampon TG (Tris-glycine) concentré 10 fois
- 200 ml de méthanol
- 4 ml de SDS

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Blocage

La membrane ayant été choisie pour ses propriétés de liaison non-spécifique, comme tant la protéine-cible que les anticorps sont des protéines, des précautions doivent être prises pour minimiser les interactions entre membrane et anticorps. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution diluée de protéines - le plus souvent de l'albumine de sérum bovin ou ASB (BSA en anglais) ou du lait sans matières grasses (lait dilué à 5% - 5 g pour 100 ml) - en présence de détergent, typiquement du Tween® 20), pendant une heure à température ambiante.

Les protéines dans la solution diluée se lient à la membrane dans tous les sites non-occupés par la protéine-cible. De la sorte, lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne peuvent (idéalement) plus s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de la protéine-cible, ce qui réduit le "bruit de fond" dans le produit final du buvardage de western, donne des résultats plus clairs et élimine les faux positifs.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Détection

Au cours de la pénétration, la membrane est "déchirée" pour la protéine d'intérêt avec des anticorps, liés ensuite à une enzyme émettant un signal photométrique ou colorimétrique. Pour plusieurs raisons, ceci se produit classiquement en deux étapes, bien que des méthodes en une étape soient disponibles pour certaines applications.

Méthode en deux étapes

Anticorps primaire

Les anticorps sont générés par inoculation à l'animal (généralement un lapin ou une chèvre) ou exposition d'une culture de cellules immunitaires à la protéine d'intérêt dans son intégralité ou seulement sur l'une de ses fractions (épitope). Toutefois, les protéines ayant été dénaturées lors de l'électrophorèse sur gel, il faut utiliser des anticorps qui reconnaissent spécifiquement la protéine dénaturée, et non la protéine native.

La réponse immunitaire normale est dans ce cas exploitée afin de générer des anticorps qui sont récoltés et utilisés comme outils de détection possédant à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité, se liant directement à la protéine - d'où leur appellation d'anticorps "primaire". Quelques anticorps monoclonaux, beaucoup plus difficiles à réaliser et dont l'affinité est beaucoup plus élevée peuvent également être utilisés en buvardage de western .

Après le blocage, une solution diluée d'anticorps primaire (généralement comprise entre 0.5 et 5 micro grammes/ml) est incubée avec la membrane sous agitation modérée. La solution se compose typiquement d'un tampon salin proche du pH neutre (généralement, une faible quantité de chlorure de sodium), d'un petit pourcentage de détergent, et parfois de protéines (ASB ou lait 5%) diluées. La solution d'anticorps et la membrane peuvent être scellées dans un sachet en plastique et incubées ensemble pour une durée allant de 30 minutes à une nuit. Elle peut aussi être incubée à différentes températures, les températures plus élevées étant associées à plus de liaisons plus spécifiques.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

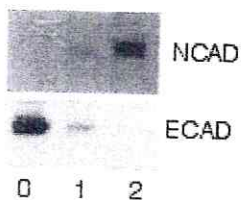
Anticorps secondaire

Après rinçage de la membrane afin d'enlever les anticorps primaires non liés, celle-ci est exposée à un autre anticorps, dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. Cet anticorps est connu comme anticorps "secondaire", et tend à être référé, du fait de ses propriétés de ciblage, comme "anti-souris", "anti-chèvre", "anti-lapin", etc. Les anticorps sont de source animale (mais généralement, d'espèces différentes), ou de cultures d'hybridomes d'origine animale ; un anticorps anti-souris se liera à pratiquement tout anticorps primaire d'origine murine, ce qui permet de réaliser des économies en laissant le laboratoire partager une seule source d'anticorps secondaire, et permet des résultats plus reproductibles. L'anticorps secondaire est généralement lié à la biotine ou à une enzyme qui permet l'identification visuelle de la protéine étudiée sur la membrane, comme une phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort. Cette étape confère un avantage, en ce

que plusieurs anticorps secondaires se lieront à un anticorps primaire, permettant d'améliorer le signal.

Le plus communément, un anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) est utilisé en conjonction avec un agent luminescent, et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. Un film photographique sensible est placé contre la membrane et, sous l'exposition de la lumière due à la réaction, crée une image des anticorps liés à la membrane. Plus souvent maintenant, une caméra à CCD est utilisée en place des films photographiques. Comme pour les procédures d'ELISPOT et ELISA, l'enzyme peut être fournie avec une molécule-substrat qui sera converti par l'enzyme pour émettre un produit de réaction coloré, visible sur la membrane.

Une troisième possibilité consiste à utiliser un marqueur radioactif plutôt qu'une enzyme couplée à l'anticorps secondaire, par exemple en marquant une protéine liant les anticorps, telle que la protéine A du *staphylocoque* avec un isotope radioactif de l'iode. Cependant, les autres méthodes étant plus sûres, plus rapides et moins chères, cette méthode est plus ou moins tombée en désuétude, mais demeure parfois utilisée dans certaines circonstances.



Un western blot utilisant un système de détection radioactive

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Méthode en une étape

Lorsque la technique est apparue, le processus de détection était réalisé en deux étapes, du fait de la relative facilité de production des anticorps primaires et secondaires en deux procédés distincts. Cela permet aux chercheurs et fournisseurs une certaine souplesse à l'emploi, et ajoute une étape d'amplification du signal au processus de détection. Toutefois, depuis l'arrivée d'analyses de protéines à haut rendement et à marge de détection plus basse, c'est-à-dire détectant des protéines à très faible concentration, il est devenu intéressant de développer des systèmes de sondage en une étape unique qui permettront un gain de temps et une économie de matière première. Ces systèmes nécessitent un anticorps de détection pouvant à la fois détecter la protéine d'intérêt et émettre un signal détectable,

lesquelles sont souvent disponibles pour des marqueurs de protéine connus. La sonde primaire est incubée avec la membrane à la manière de l'anticorps primaire dans le procédé en deux temps, et est ensuite prêt pour la détection directe après une série d'étapes de rinçage.

Analyse

Après rinçage des anticorps secondaires non-liés, le western blot est prêt pour la détection des sondes marquées et liées à la protéine d'intérêt. En pratique, tous les buvardages de western ne révèlent pas la protéine sur une bande donnée de la membrane, les gels n'étant pas complètement exempts de protéines après avoir éponnés. Une approximation sur la taille est réalisée en comparant les bandes marquées à celles des marqueurs de la gamme étalon chargé durant l'électrophorèse dans un puits à part. Le processus est répété pour une protéine de structure, comme l'actine ou la tubuline, dont la concentration ne devrait pas varier entre les échantillons (contrôle interne). La concentration de la protéine-cible est indexé à celui de la protéine servant de contrôle interne, afin de normaliser les expériences. Cette pratique permet la correction par rapport au taux de protéines totales sur la membrane, en cas d'erreur ou de transfert incomplet.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Détection colorimétrique

Cette méthode est tributaire, lors de l'incubation du buvardage de western, de la présence d'un substrat qui réagit au déclencheur présent sur l'anticorps secondaire (comme la peroxydase). Ceci convertit un colorant soluble en une forme insoluble, de couleur différente, qui précipite à côté de l'enzyme, teignant donc la membrane de nitrocellulose. Le développement du buvardage de western est alors arrêté par rinçage du colorant soluble. La concentration de protéine est évalué par densitométrie, évaluation de l'intensité de la bande ou par spectrophotométrie.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Détection par chimiluminescence

Cette méthode nécessite, lors de l'incubation du buvardage de western, la présence d'un substrat qui émet de la lumière après exposition au déclencheur présent sur l'anticorps

secondaire. La lumière émise sert à impressionner un film photographique, ou plus récemment, par des caméras CCD qui restituent une image numérique du buvardage de western. L'image est analysée par densitométrie, qui évalue le taux relatif de marquage de la protéine, et quantifie les résultats en terme de densité optique. Des logiciels permettent une analyse plus poussée des données, comme l'analyse du poids moléculaire si les standards appropriés sont utilisés. Cette méthode appelée "détection améliorée de la chimiluminescence" ("enhanced chemiluminescent" - ECL) est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse des western blots.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Détection par radioactivité

Le marquage radioactif ne nécessite pas de substrat enzymatique, mais permet l'utilisation de films utilisés en médecine pour l'imagerie à rayons X. Le film est directement placé sur le buvardage de western, qui se développe lors de son exposition au marqueur et crée des régions sombres, lesquelles correspondent aux bandes de la protéine d'intérêt (cf. illustration). L'importance des méthodes de détection par radioactivité est en déclin, du fait de son coût et de techniques plus sûres comme l'ECL.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Détection par fluorescence

La sonde couplée à l'anticorps est excitée par un rayon monochromatique et l'émission qui en résulte est alors détectée par un photosenseur, par exemple une caméra CCD équipée des filtres d'émission appropriés, qui restitue une image numérique du buvardage de western et permet une analyse plus fine telle que l'analyse du poids moléculaire ou quantitative du buvardage de western. La fluorescence est considérée comme d'un niveau à peu près équivalent à la chimiluminescence pour l'analyse des buvardages de western. Elle nécessite un outillage plus coûteux toutefois.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Différence entre fluorescence et chimiluminescence

Bien que de mécanisme photophysique similaire, chimiluminescence et fluorescence ne sont pas la même chose :

- la **fluorescence** fait référence à l'excitation d'une molécule depuis un état stable vers un état excité, et son retour à l'état basal par émission d'une radiation dans le spectre électromagnétique d'une longueur d'onde donnée, et spécifique de la molécule.
- la **chimiluminescence** fait référence à la situation dans laquelle une molécule est formée dans un état excité, en tant que produit d'une réaction chimique, et retombe vers un état basal avec émission d'une radiation dans le spectre électromagnétique d'une longueur d'onde donnée.

Sondage secondaire

L'une des plus grandes différences entre les membranes en nitrocellulose et celles en PVDF est liée à leur capacité de supporter l'"arrachage" (*stripping*) d'anticorps et la réutilisation des membranes pour des sondages par d'autres anticorps. Bien qu'il existe des protocoles bien établis pour la réutilisation des membranes de nitrocellulose, le PVDF, plus épais, permet de réaliser ces manœuvres en toute sécurité et facilité, et davantage d'utilisations ultérieures avant d'être, tel un palimpseste, recouvert de "bruits" parasites. Une autre différence importante est que le PVDF, contrairement à la nitrocellulose, doit être trempé dans de l'éthanol à 95% ou de l'isopropanol avant usage. Les membranes en PVDF tendent aussi à être plus épaisses et plus résistantes aux dommages physiques liés à leur utilisation normale.

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)

Applications médicales en diagnostic

- Les tests VIH de confirmation emploient la méthode du buvardage de western afin de détecter un anticorps anti-HIV dans un échantillon de sérum. Des protéines de cellules que l'on sait infectées par le VIH sont séparées et transférées sur membrane comme décrit ci-dessus. Le sérum à tester est appliqué. L'étape d'incubation dans l'anticorps primaire ; les anticorps libres sont éliminés par rinçage de la membrane, et un anticorps dirigé contre les protéines humaines secondaires associé à une enzyme ou un chromophore est ajouté. Les bandes marquées indiquent ensuite les protéines contre lesquelles le sérum du patient contient des anticorps.
- Le buvardage de western est également utilisé pour le test de confirmation de l'ESB (dite 'maladie de la vache folle').
- Certaines formes de détection de la maladie de Lyme utilisent le buvardage de western

(www.futura-sciences.com/indexator/mot_western_blot_principe.)