

# Biologie des prions : de l'énigme moléculaire aux risques actuels

## *Biology of prions: from the molecular enigma to current risks*

Par Emmanuel E. COMOY<sup>(1)</sup>, Franck MOUTHON<sup>(2)</sup> et Jean-Philippe DESLYS<sup>(3)(4)</sup>  
(communication présentée le 23 juin 2005)

### RÉSUMÉ

Les prions constituent par bien des points une énigme biologique. Notamment, leur nature exacte en tant qu'agent infectieux n'est pas définie précisément. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) en Grande-Bretagne, et son corollaire chez l'Homme, la variante de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (v-MCJ), représentent des défis importants en termes de santé animale et humaine, compte tenu des risques de contaminations par voie alimentaire d'une part, et de contaminations secondaires inter-humaines d'autre part. La meilleure connaissance de la biologie de ces agents a permis des avancées pratiques importantes ces dernières années, notamment en termes de diagnostic, de décontamination et d'évaluation des risques, permettant ainsi une meilleure gestion de ces maladies.

**Mots-clés : prions, biologie, décontamination, évaluation du risque.**

### SUMMARY

*Prions are in many ways a real biological enigma, given that the exact nature of the pathogen is still unclear. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in Great-Britain, and its related disorder the variant form of Creutzfeldt-Jakob Disease (v-CJD) represent major challenges in terms of animal and human health, given the risks of food-borne contamination, and of secondary man-to-man contamination. Improved knowledge of the biology of these agents has led to major progress over the past few years, notably in the field of diagnosis, decontamination and risk analysis, thereby improving the management of these diseases.*

**Key words: prions, biology, decontamination, risk management.**

(1) DVM, PhD.

(2) MD.

(3) MD, PhD.

(4) Groupe d'Innovation Diagnostique et Thérapeutique sur les Infections à Prions, Commissariat à l'Energie Atomique, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses

Les prions, agents pathogènes responsables des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), sont considérés comme des agents transmissibles non conventionnels, puisque aucune structure classique de microorganisme (bactérie, virus) n'a pu, à ce jour, être associée à l'infection dans ces maladies. Cette communication se propose de faire le point sur les dernières données relatives à la biologie de ces agents pathogènes, et les applications qui en découlent pour la maîtrise de ces maladies.

### • LE PRION, PROTÉINE INFECTIEUSE ?

Alors qu'aucune modification des paramètres biologiques n'est observée dans les maladies à prions, seule une protéine, appelée protéine du prion (PrP) et présente chez tous les mammifères, s'accumule sous une forme pathologique (appelée PrPsc ou PrPres) dans le système nerveux central, chez tous les individus atteints d'ESST en fin d'incubation. Les expériences de fractionnement et de purification indiquent que la PrPres et l'infectiosité co-purifient, et les concentrations en PrPres sont proportionnelles au titre infectieux dans les modèles expérimentaux, ce qui a conduit S. Prusiner à proposer la notion de protéine infectieuse (PRUSINER, 1982).

La PrP, protéine de 253 acides aminés avec une ancre glypiée en région C-terminale (couplage à un glycoposphatidyl-inositol permettant l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire), est composée dans sa forme normale (PrPc ou PrP cellulaire) d'un corps globulaire contenant 3 hélices  $\alpha$  et 2 petites structures en feuillets  $\beta$  ainsi qu'une extrémité flexible en région N-terminale comportant notamment une séquence répétée d'octapeptides (appelée « octarepeats »). Cette protéine, dont la fonction biologique exacte reste encore à élucider, présente une modification post-traductionnelle de ses structures secondaires et tertiaires dans sa forme pathologique. En effet, la PrPres est quant à elle majoritairement composée de feuillets  $\beta$  (PAN *et al.*, 1993), conférant ainsi à la forme pathologique une structure tridimensionnelle davantage « compactée », à l'origine de ses propriétés physico-chimiques particulières. Notamment, tandis que la PrPc est sensible, la PrPres est résistante à la dégradation par les protéases (d'où la dénomination de PrPres pour « PrP résistante »). Également, et contrairement à sa forme normale, la PrPres est hydrophobe, insoluble dans les détergents et non détachable des membranes cellulaires par les phospholipases (LEHMANN et HARRIS, 1996). Son catabolisme étant allongé, la PrPres s'accumule alors au niveau du système nerveux en s'agrégeant de par son hydrophobicité. *In vitro*, la PrPres s'agrége également, sous la forme de fibrilles (appelées SAF pour Scrapie Associated Fibrils) visibles au microscope électronique.

La transconformation de la PrPc en PrPsc *in vivo* relève d'un mécanisme non encore élucidé, nécessitant très vraisemblablement la présence d'une molécule chaperonne (non encore identifiée à ce jour) compte tenu de la stabilité de la PrPc. En effet, il est nécessaire d'avoir recours à des conditions expérimentales particulières non physiologiques pour modifier *in vitro* la structure spatiale de la PrPc et ainsi obte-

nir une forme pathologique générée *de novo*, qui présente toutes les caractéristiques physico-chimiques de la PrPres, mais qui semblait dépourvue d'infectiosité dans la plupart des expériences. Hydrophobe, la PrPres peut s'agréger alors sous forme d'oligomères, et constituer ainsi des noyaux de nucléation conduisant à une polymérisation massive, observables au microscope sous la forme d'agrégats de PrP ou de plaques amyloïdes. L'accumulation de PrPres dans le cerveau induit alors une toxicité et une mort neuronale, selon des mécanismes qui restent encore à ce jour obscurs. Des expériences récentes suggèrent un faible rôle des agrégats de PrPsc dans la neurotoxicité (CHESEBRO *et al.*, 2005). En effet, des souris transgéniques exprimant une PrP tronquée, sans ancre glypiée, accumulent la forme pathologique de la PrP sous la forme de plaques amyloïdes, mais pas à la surface des cellules. Ces animaux développent des lésions cérébrales mais pas de signe clinique, suggérant que la toxicité neuronale observée serait davantage liée aux monomères ou petits oligomères de PrPres, ou à leurs produits de dégradation, présents à la surface des cellules.

Des travaux récents suggèrent qu'il est possible de générer *in vitro* des particules infectieuses. Ainsi, une technique récente d'amplification de la PrPres (Protein Misfolding Cyclic Amplification ou PMCA) permet d'obtenir de grandes quantités de PrPres par transconformation de PrPc apportée en excès, au cours de cycles successifs de transconformation - sonication (cette dernière étape permet de casser les agrégats nouvellement formés et de générer ainsi de nouveaux noyaux de nucléation pour les transconformations suivantes). Cette PrPres générée *de novo*, inoculée à l'animal de laboratoire, est capable d'induire une ESST (CASTILLA *et al.*, 2005). Également, une PrP synthétique tronquée dans sa partie N-terminale et agrégée *in vitro* sous la forme de fibrilles a été décrite comme induisant une ESST chez des souris transgéniques surexprimant le gène de la PrP (LEGNAME *et al.*, 2004). Ces travaux renforcent la théorie de la protéine infectieuse, même s'ils n'excluent pas définitivement l'existence d'un virus non encore identifié ou d'un fragment d'acide nucléique associé à la PrPres (notion de virino). Toutefois, il faut rappeler que des expériences antérieures de transmission primaire de l'agent de l'ESB à des souris avaient souligné la présence d'infection (transmission de la maladie) indépendamment de la présence de PrPres, la PrPres s'accumulant au cours de passages secondaires tandis que la période d'incubation raccourcissait, signe d'une adaptation de la souche de prion à son nouvel hôte (LASMEZAS *et al.*, 1997). Ces données suggéraient davantage que la PrPsc, dans sa forme résistante à la dégradation par les protéases, représentait plutôt un facteur de virulence.

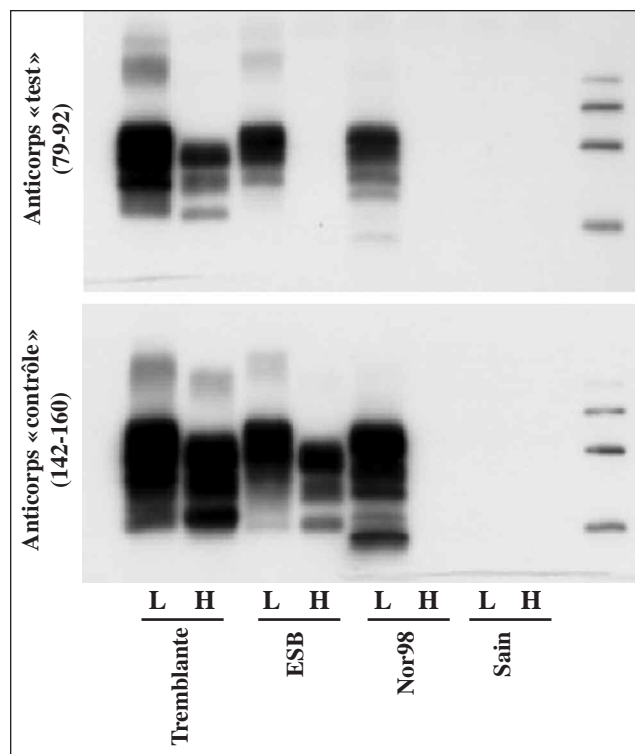
Ainsi, la nature exacte de l'agent étiologique des maladies à prions reste encore obscure, mais les techniques nouvellement développées de conversion *in vitro*, ainsi que de nouveaux modèles de souris transgéniques, permettent de mieux approcher l'étiologie et la pathogénie de ces maladies, ouvrant la voie à de nouvelles approches pour la thérapeutique des maladies à prion.

### • LA PrPRES, MARQUEUR BIOLOGIQUE SPÉCIFIQUE DES ESST

La PrP faisant partie des protéines du soi, l'accumulation de PrPres n'induit ni réponse inflammatoire, ni réponse immunitaire de l'organisme, compliquant ainsi le diagnostic des maladies à prions. La PrPres constitue donc à ce jour le seul marqueur biochimique spécifique de ces maladies. En absence d'anticorps conformationnel reconnaissant spécifiquement la PrP pathologique, sa détection est assurée en s'appuyant sur les différences physico-chimiques entre PrPc et PrPres (les rares anticorps conformationnels annoncés ne semblent pas faire preuve d'une efficacité permettant leur utilisation dans un test diagnostic). La plupart des techniques de diagnostic (biochimiques et immunohistochimiques entre autres) se basent sur la résistance de la PrPres à la dégradation par les protéases: après une protéolyse permettant l'élimination de la PrPc, la PrPres résiduelle est alors mise en évidence à l'aide d'anticorps anti-PrP. Dans certains cas, les capacités d'agrégation de la PrPres sous forme de fibrilles sont utilisées pour concentrer la PrPres, permettant ainsi d'accroître d'autant la sensibilité de détection. Les tests biochimiques rapides utilisés pour la recherche systématique de l'ESB à l'abattoir sont basés sur ces principes. Il faut souligner que l'utilisation de protéases induit le biais de ne détecter que les formes, certes majoritaires, résistantes à la protéolyse. De nouvelles techniques, basées sur les différences de structure tridimensionnelle entre PrPc et PrPsc, sont actuellement en cours d'évaluation.

La résistance de la PrPres à la protéolyse n'est en fait que partielle; en effet, l'extrémité N-terminale est classiquement clivée par protéolyse, conduisant à une forme tronquée appelée PrP27-30 (27 à 30 kDa, correspondant aux poids moléculaires des formes non, mono- ou di-glycosylées de la PrP 90-230). Cependant, dans des conditions particulières de protéolyse contrôlée, il est possible de conserver tout ou partie de cette région N-terminale, tandis que la PrPc est totalement dégradée. Cette persistance de la région N-terminale, notamment au niveau des « octarepeats », varie en fonction des souches de prion: ainsi, les « octarepeats » sont clivés dans certaines conditions expérimentales pour la PrPres associée à l'agent de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), tandis qu'ils persistent dans ces mêmes conditions pour la PrPres associée à l'agent de la tremblante. Sur la base de ces particularités de la PrPres en fonction des souches, il a été possible, alors que la distinction était impossible tant au niveau clinique que lésionnel, de pouvoir développer des tests rapides de diagnostic différentiel de l'ESB chez les petits ruminants (figure 1).

Ces tests ont permis récemment de mettre en évidence un cas très vraisemblable d'ESB naturelle chez la chèvre en France (figure 2), qui a été par la suite confirmée par l'inoculation à l'animal de laboratoire (ELOIT *et al.*, 2005). En effet, les petits ruminants, sensibles à l'agent de l'ESB lors d'inoculations expérimentales, ont été exposés à cette souche de prion sur le terrain car nourris avec les mêmes farines de viande que les bovins. Au regard du risque pour le consommateur que représenterait le passage de l'ESB aux petits ruminants (notamment les ovins), des études de caractérisation biochimique ont été entreprises, notamment en France, sur des prélèvements



**Figure 1 : Test de diagnostic différentiel de l'ESB chez les petits ruminants (test CEA).**

Dans des conditions contrôlées de protéolyse, de faibles concentrations de protéases (conditions L) permettent de conserver la région des octapeptides (détectée par l'anticorps « test ») dans les différentes souches de prion des petits ruminants. En revanche, l'utilisation de fortes concentrations de protéases (conditions H) induit la disparition de cet épitope pour l'agent de l'ESB, tandis qu'il persiste pour celui de la tremblante classique. En parallèle, la région centrale de la protéine (détectée par l'anticorps « contrôle ») n'est pas affectée pour ces deux traitements, à l'exception de la souche Nor98: la sensibilité de cette souche à la protéolyse se traduit par une dégradation de l'ensemble de la protéine, en présence de fortes concentrations de protéase.

d'ovins et caprins naturellement atteints d'ESST. Depuis cette découverte, il a été décidé, au niveau de l'Europe, de procéder systématiquement à la caractérisation des souches d'ESST chez les petits ruminants au moyen de ces tests de différenciation pour rechercher d'autres animaux contaminés par l'agent de l'ESB.

Parallèlement, l'utilisation de tests utilisant des conditions contrôlées de protéolyse a permis de mettre en évidence, chez le mouton, des souches de prions non détectées par des techniques utilisant des conditions de protéolyse plus drastiques. Ces souches de prion, qui n'avaient pas été observées auparavant, présentent une faible résistance à la protéolyse, notamment la souche Nor98 isolée pour la première fois en Norvège et apparemment retrouvée dans le reste de l'Europe (BENESTAD *et al.*, 2003). Des expériences d'inoculation de cette souche à l'animal de laboratoire ont démontré son caractère infectieux, remettant ainsi en cause l'utilisation, pour le diagnostic des ESST chez les petits ruminants, de techniques utilisant des conditions de protéolyse importantes.

L'utilisation des propriétés biochimiques particulières de la PrPres permet donc de développer des outils de diagnostic originaux, qui permettent de compenser les lacunes

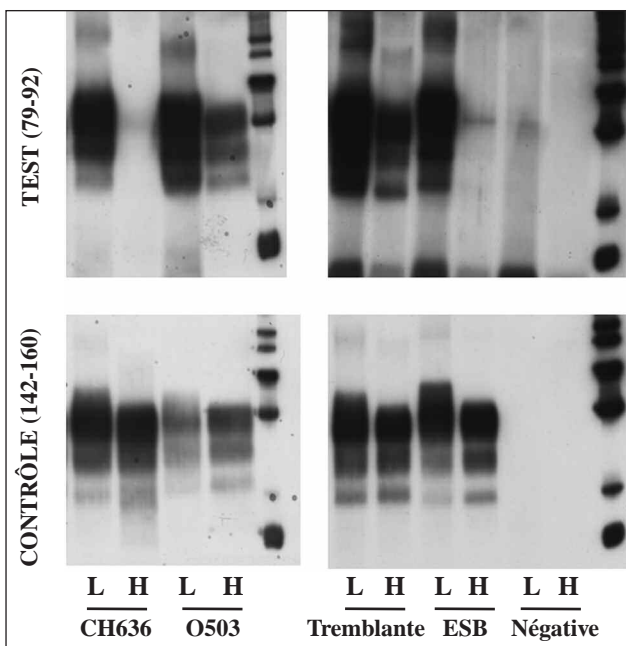


Figure 2 : Suspicion d'ESB chez une chèvre.

L'utilisation du test de diagnostic différentiel de l'ESB chez les petits ruminants permet, chez une chèvre atteinte d'ESST naturelle (CH636), de mettre en évidence le profil d'un agent de type ESB (disparition de l'épitope 79-92, détecté par l'anticorps « test », dans les conditions de protéolyse fortes (H), tandis que l'épitope central 142-160 n'est pas affecté). Un prélèvement de cerveau d'un mouton soumis au même test (O503) présente le profil de l'agent de la tremblante classique.

d'autres systèmes de diagnostic et mettre ainsi en évidence de nouvelles souches de prions d'une part, mais également la présence de l'agent de l'ESB chez les petits ruminants, ce qui constitue, en cas de large diffusion, un risque important pour le consommateur.

#### • LE FORMIDABLE SPECTRE DE RÉSISTANCE DES PRIONS

En parallèle de la résistance de la PrPres à la protéolyse, les prions présentent un spectre important de résistance aux agressions physiques et chimiques. En effet, la persistance des prions dans le milieu extérieur a été illustrée à de nombreuses occasions. Sur le terrain, les prés à tremblante ou les fermes maudites, comme il existe des champs à charbon, sont connus depuis longtemps, et cette persistance dans l'environnement de l'agent de la tremblante participe au maintien de cette maladie à un niveau enzootique : les animaux se contaminent, vraisemblablement par voie orale, à partir de matériel infectieux excrété, comme les annexes fœtales contaminées et expulsées durant la parturition. Cependant, d'autres sources de contamination sont vraisemblables, comme les fèces (Maignien *et al.*, 1999), voire les urines (Shaked *et al.*, 2001), même si la présence de PrPres dans ces dernières est controversée. Cette résistance dans l'environnement a été démontrée par P. Brown dans sa fameuse expérience dite « du pot de fleurs » : du matériel infectieux, mélangé à de la terre, a été exposé aux intempéries pendant plus de deux ans; au terme de cette exposition, la charge infectieuse initiale n'était réduite que d'un facteur 100 (Brown et Gajdusek, 1991).

Dans ces conditions de résistance, l'éventualité de la dissémination de l'agent de l'ESB dans l'environnement risquerait de conduire au maintien de l'ESB à un niveau enzootique. Cette dissémination pourrait avoir comme origine l'infection potentielle de mouton par l'agent de l'ESB (présence d'infectiosité dans les organes périphériques comme pour la tremblante) d'une part, et des contaminations accidentelles d'origine industrielle (stockage non conforme de farines contaminées, eaux de ruissellement au niveau des abattoirs ou des centres d'équarrissage...) d'autre part. Pour mémoire, l'observation récente en 2005 de trois cas d'ESB chez des animaux jeunes dans un même troupeau, en Grande-Bretagne, aurait pour origine une contamination de l'environnement à partir de résidus de farines de viande lors du nettoyage d'un ancien silo.

Cette persistance d'agent infectieux dans l'environnement est très vraisemblablement à l'origine de la formidable diffusion de la Maladie du Dépérissement Chronique (MDC ou Chronic Wasting Disease) qui affecte actuellement les ruminants sauvages des Montagnes Rocheuses sur le continent nord-américain. Cette maladie, qui affecte désormais plus de 10 % des daims sauvages (mule deer) abattus par les chercheurs dans les foyers d'origine (Colorado et Wyoming) et décime les élevages, s'est propagée dans de nombreux États ainsi qu'au Canada en quelques années.

Les prions présentent également un formidable spectre de résistance aux méthodes de décontamination classiquement utilisés vis-à-vis des agents pathogènes. Ainsi, les traitements thermiques en chaleur sèche ne permettent pas une inactivation totale du matériel infectieux. Seuls des traitements intensifs en chaleur humide (autoclavage à 134-138°C pendant 18 minutes sous 3 bars de pression) permettent d'inactiver ces agents sous certaines réserves. Par ailleurs, les méthodes chimiques classiques d'inactivation ne présentent qu'un effet partiel sur les prions : notamment le formol est sans effet d'inactivation, mais semble *a contrario* rendre les prions plus résistants, très vraisemblablement par un effet de tannage des protéines. Seuls des traitements chimiques drastiques, en combinaison ou non avec un traitement thermique, sont réputées efficaces selon l'OMS : l'utilisation pendant au moins une heure d'hydroxyde de sodium (soude) à 1M ou d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 2 % de chlore actif.

L'insuffisance des procédés d'élimination et ou d'inactivation utilisés vis-à-vis des prions est à l'origine de la plupart des contaminations industrielles et iatrogènes. Ainsi, la modification dans les années 70 des procédés britanniques de fabrication des farines de viande ne suffisait plus à inactiver suffisamment les prions, tandis que ces procédés continuaient à être efficaces vis-à-vis des autres pathogènes, ce qui a conduit à l'anazootie<sup>(5)</sup> d'ESB que l'on connaît. Par ailleurs, les procédés de purification de l'hormone de croissance extractive n'ont pas permis d'éliminer les prions présents dans des hypophyses contaminées, conduisant à près de 100 cas de contaminations iatrogènes en France dans les années 80. Enfin, des cas iatrogènes de Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) ont été recensés suite à l'utilisation d'instruments de

(5) Équivalent d'anémie pour les animaux. Se dit des maladies épidémiques non contagieuses chez l'homme (Sources : Dictionnaire de Médecine, Flammarion, Ed 1991).

neurochirurgie contaminés et ayant subi des processus de décontamination insuffisants. En effet, les prions, très hydrophobes, s'adsorbent aisément sur des surfaces. Cette contamination de surface des instruments médico-chirurgicaux a été modélisée au moyen de tiges métalliques (ZOBLEY *et al.*, 1999). Un simple contact de cinq minutes avec du matériel infectieux suffit pour que ces tiges soient infectieuses, et leur implantation temporaire pendant cinq minutes est suffisante pour être contaminante chez l'animal de laboratoire.

Tandis que l'infectiosité est principalement confinée au niveau du système nerveux central des patients atteints de MCJ sporadique, celle-ci est également retrouvée dans les tissus lymphoïdes (amygdales, appendices...) des patients atteints de vMCJ, due au passage de l'agent de l'ESB à l'Homme. Cette répartition plus large de l'infectiosité étend, par conséquent, les risques de transmission iatrogène au cours d'actes médicaux et chirurgicaux à d'autres domaines que la neurochirurgie, rendant ainsi urgent le besoin de nouvelles méthodes efficaces de décontamination. En effet, les procédés drastiques recommandés par l'OMS (autoclavage, soude, eau de javel) sont en pratique incompatibles avec les matériaux fragiles ainsi qu'avec l'électronique, et ils sont donc inutilisables sur des instruments médico-chirurgicaux comme les endoscopes. De même, l'utilisation de ces procédés sur des instruments de chirurgie, pourtant composés de matériaux censés être résistants, induit des corrosions et un vieillissement prématuré du matériel.

La modélisation de la contamination de surface par des prions au moyen de tiges contaminées a été utilisée pour évaluer de nouveaux produits et procédés de décontamination (FICHET *et al.*, 2004). Ce modèle a également permis de confirmer l'efficacité des traitements de référence de l'OMS sur une contamination surfacique ; en effet, ces derniers avaient jusqu'à présent uniquement été validés sur des suspensions infectieuses (tableau 1). Néanmoins, il faut préciser l'efficacité limitée de l'autoclavage réalisé sur des surfaces souillées sèches, ce qui souligne l'importance du nettoyage préalable à l'étape de stérilisation. Différents traitements compatibles avec les matériaux à décontaminer, principalement basés sur des phénomènes physico-chimiques dégradant les protéines, comme l'oxydation ou l'hydrolyse, ont prouvé leur efficacité importante vis-à-vis de ces contaminations de surface par les prions, proposant ainsi une alternative aux traitements drastiques de référence (tableau 1). Ainsi, l'utilisation de nettoyants alcalins ou enzymatiques, couplés à des traitements thermiques plus modérés que l'autoclavage à 134°C, ainsi que l'utilisation de certains dérivés phénoliques, permet d'obtenir une efficacité importante d'inactivation. De plus, il est à noter que le peroxyde d'hydrogène, sous sa forme vaporisée, induit une importante inactivation des prions au niveau d'une contamination de surface, proposant ainsi pour la première fois une technique de décontamination des prions par diffusion aérienne. Ces différents procédés de décontamination, une fois validés, présenteraient de nombreuses applications, aussi bien dans le domaine médical que dans l'industrie agro-alimentaire, pour limiter de nouvelles contaminations d'origine industrielle des animaux d'élevage : pour mémoire, les animaux Nés Après l'Interdiction des Farines de viandes

(ou NAIF), et atteints d'ESB, ont très vraisemblablement été contaminés, suite à des contaminations croisées dans des sites de fabrication d'aliments industriels.

Le spectre de résistance des prions aux agressions extérieures et aux procédés de décontamination supporte donc les risques de maintien des ESST animales (tremblante mais aussi l'ESB et la MDC) à un niveau enzootique d'une part, et les risques de transmission secondaire d'autre part. Le développement de nouvelles méthodes d'élimination et /ou d'inactivation des prions constitue donc un enjeu majeur pour la santé animale et humaine.

#### • PATHOGÉNIE DES MALADIES À PRIONS ET ÉVALUATION DES RISQUES POUR L'HOMME

La voie intracérébrale, quasiment inexistante dans les conditions naturelles mais très utilisée dans les conditions expérimentales, est le mode de contamination le plus efficace par les prions. Les prions s'accumulent dans le système nerveux central, induisant une mort neuronale et une vacuolisation du neuropile, ainsi qu'une astroglie réactionnelle.

Lors de contaminations par voie périphérique, les prions vont tout d'abord présenter une phase de réplication périphérique dans le système réticulo-endothélial, avant de contaminer le système nerveux central par voie nerveuse ascendante. Ainsi, les organes du système immunitaire, principalement les ganglions lymphatiques, les amygdales et la rate, constituent le site de cette réplication périphérique, alors qu'aucune réponse immunitaire ni inflammatoire n'est observée. Les prions s'accumulent au niveau des cellules folliculaires dendritiques, les lymphocytes remplissant en outre certainement un rôle passif de transport des agents pathogènes (AGUZZI, 2003).

Lors de contamination par voie orale, l'étude de modèles animaux expérimentaux a montré que les prions s'accumulaient en premier lieu dans les organes lymphoïdes associés au tube digestif (plaques de Peyer), avant de s'étendre aux autres organes lymphoïdes (MAIGNIEN *et al.*, 1999). Chez les petits ruminants atteints de tremblante naturelle, l'infectiosité, mise en évidence par inoculation à l'animal de laboratoire, est ainsi retrouvée dans l'iléon et le colon proximal très tôt (dès les premiers mois), ainsi que dans les autres organes lymphoïdes, pour atteindre un taux maximal environ 50 fois plus faibles que dans le cerveau.

En revanche, les bovins atteints d'ESB ne présentent pas d'infectiosité détectable dans ces mêmes organes lymphoïdes, suggérant un niveau d'infectiosité au moins 1000 fois inférieur à celui du système nerveux central. Seul l'iléon présente de faibles niveaux de contamination (proches du seuil de détection), lors de contamination expérimentale par voie orale avec des doses très importantes de matériel infectieux (100 g de cerveau infecté). Cependant, par principe de précaution, la liste des organes lymphoïdes qui présentent une infectiosité dans le cas de la tremblante du mouton est considérée chez les bovins comme Matériel à Risque Spécifié (MRS) pour la consommation humaine, et ces organes sont retirés de la chaîne alimentaire.

Traitements	Dilutions	% mortalité	Période d'incubation (jours)	Réduction de charge infectieuse (logs)
<b>Témoins</b>	10 <sup>-1</sup>	100 %	90 + 3	
	10 <sup>-2</sup>	100 %	98 + 7	
	10 <sup>-3</sup>	100 %	117 + 8	
	10 <sup>-4</sup>	100 %	124 + 13	
	10 <sup>-5</sup>	92 %	201 + 79	
	10 <sup>-6</sup>	22 %	327 + 74	
	10 <sup>-7</sup>	0 %	> 365	
	10 <sup>-8</sup>	0 %	> 365	
<b>Soude</b> (1M, 1 heure, 25°C)	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6
<b>Eau de Javel</b> (20.000 ppm, 1 heure, 25°C)	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6
<b>Autoclave</b> (sec, 134°C, 18 minutes) (immersion, 134°C, 18 minutes)	10 <sup>-1</sup>	60 %	197 ± 86	4 - 4,5
	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6
<b>Nettoyant enzymatique</b> (0,8 %, 5 minutes, 43°C)	10 <sup>-1</sup>	100 %	143 + 12	~ 3,5
<b>Nettoyant enzymatique + autoclave 121°C, 20 minutes</b>	10 <sup>-1</sup>	10 %	242	~ 5
<b>Nettoyant alcalin</b> (1,6 %, 15 minutes, 43°C)	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6
<b>Dérivé phénolique</b> (5 %, 30 minutes, 20°C)	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6
<b>Peroxyde d'hydrogène vaporisé (VHP)</b> (1,5 mg/l, 3 heures, 25°C)	10 <sup>-1</sup>	33 %	170 + 33	~ 4,5
<b>Nettoyant enzymatique + VHP</b>	10 <sup>-1</sup>	0 %	> 365	> 5,6

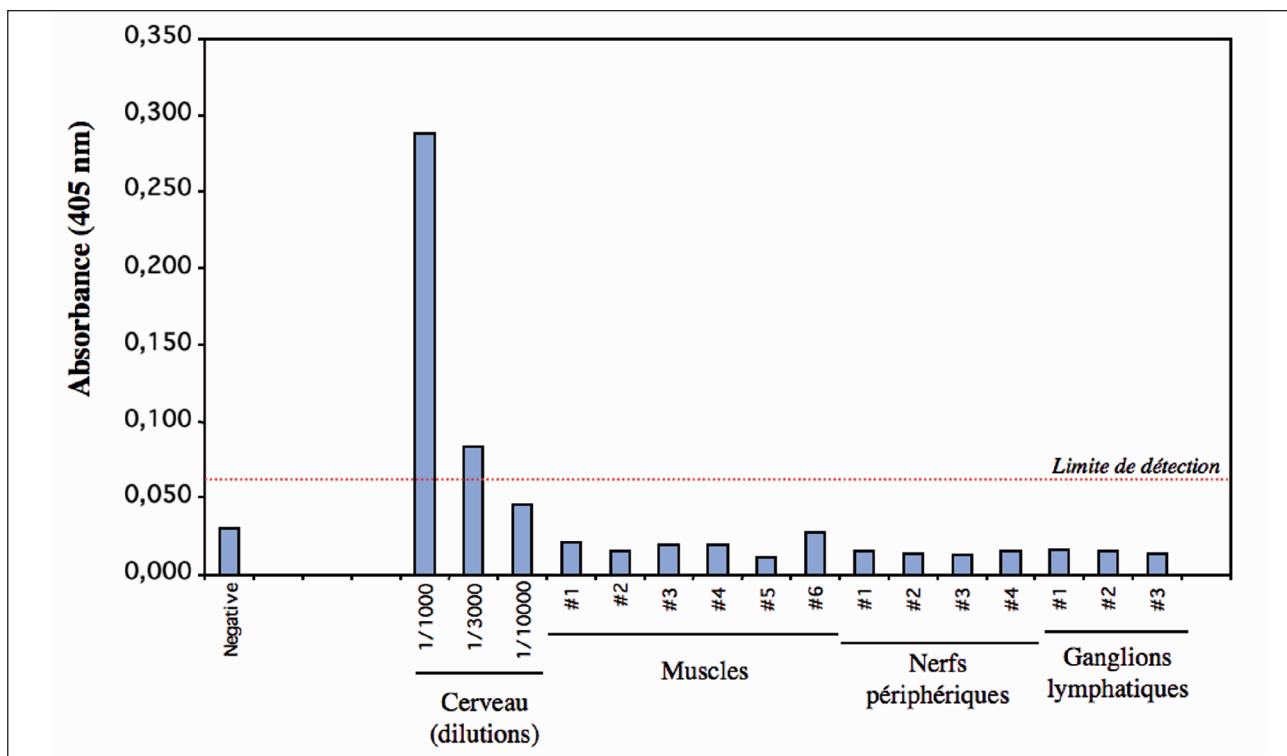
**Tableau I : Efficacité de certains traitements sur une contamination de surface par les prions (Fichet et al., 2004)**

Des tiges d'acier contaminées par la souche 263K, puis séchées, ont subi différents traitements de décontamination, puis ont été insérées dans les cerveaux de hamster. Le diagnostic final d'ESST repose sur la présence de signes cliniques et de PrPres dans le cerveau. Pour les témoins positifs, les tiges ont été contaminées par des dilutions croissantes du matériel infectieux.

Cette absence d'infectiosité détectable dans les organes périphériques des bovins atteints d'ESB ne semble pas liée à la souche de prion, puisque les moutons expérimentalement contaminés par l'agent de l'ESB par voie orale présentent la même répartition périphérique de l'infectiosité que les moutons atteints de tremblante. Ainsi, l'éventuelle contamination, par des farines de viande contaminées par l'agent de l'ESB, de petits ruminants dans des conditions naturelles représenterait un risque important pour la consommation humaine, au vu de la variété des organes contaminés.

La contamination expérimentale de primates par voie orale a permis de modéliser le risque alimentaire pour l'Homme (LASMEZAS *et al.*, 2005). L'ordre de grandeur de la DL50% chez le primate, dose infectieuse induisant 50% de mortalité, par voie orale est de 5 grammes de cerveau de bovin cliniquement atteint d'ESB, tandis qu'elle est d'environ 0,5 gramme chez le bovin (avec la notion que 1 milligramme peut être suffisant pour contaminer 1 bovin parmi 15). Cette quantité de 5 grammes pouvait aisément être consommée à

l'époque où le cerveau entrait dans la fabrication de certaines préparations culinaires. Avec le retrait des MRS, le seul risque résiduel d'exposition du consommateur à du matériel nerveux correspondait à la contamination accidentelle de la carcasse, notamment au moment de la fente de la colonne vertébrale. Cette souillure de la viande est difficile à maîtriser en pratique, des quantités de l'ordre de quelques grammes pouvant ne pas être décelées. Ainsi, un risque persistait pour le consommateur à partir de bovins contaminés et non diagnostiqués entrant dans la chaîne alimentaire. Depuis 2001, le dépistage systématique des bovins à l'abattoir permet le retrait des animaux contaminés de la chaîne alimentaire, augmentant ainsi la sécurité des consommateurs. En effet, le test actuel le plus sensible (test CEA/Bio-Rad) permet de toujours détecter comme positif un cerveau de bovin cliniquement atteint d'ESB dilué au 1/300 (DESLYS *et al.*, 2001) ; dans le cas d'un bovin très faiblement contaminé, et par conséquent non détecté même par ce test, la charge infectieuse nécessaire pour contaminer un homme, par rapport à la DL50% définie pré-



**Figure 3 : Recherche de PrPres dans les muscles et organes associés de bovin atteint d'ESB clinique.** La présence de PrPres a été recherchée dans différents échantillons de muscles, de nerfs et de ganglions associés, chez un bovin atteint d'ESB au stade clinique. En parallèle, différentes dilutions du cerveau ont été soumises au test CEA/Bio-Rad. Tandis que le cerveau est toujours positif à la dilution 1/1000, la PrPres n'a pas été mise en évidence dans aucun des organes périphériques.

cédemment, impliquerait de consommer plus de 1,5 kg de matière cérébrale, ce qui est impossible en pratique.

Les tests de détection étant de plus en plus sensibles, la PrPres a également été détectée dans les muscles. Tout d'abord, la PrPres ainsi qu'une infectiosité ont pu être mises en évidence dans les muscles de souris infectées par des souches de tremblante stabilisées dans cette espèce (BOSQUE *et al.*, 2002). Puis, la PrPres a également été détectée dans les muscles de moutons atteints de tremblante naturelle (ANDREOLETTI *et al.*, 2004). Au vu de ces dernières observations, la présence potentielle de PrPres liée à l'agent de l'ESB, et donc d'infectiosité, dans les muscles doit faire l'objet de recherches, compte tenu des implications en santé publique. Nos travaux sur des muscles de bovins atteints d'ESB n'ont pas permis de détecter de PrPres dans les muscles, ni dans les ganglions lymphatiques drainant ces muscles, ni dans les nerfs innervant ces muscles, tandis que la PrPres était toujours détectable dans le cerveau de ces bovins après dilution au 1/1000 (figure 3). Ainsi, si la PrPres est présente dans les muscles de bovins atteints d'ESB, sa concentration est au moins 1.000 fois inférieure à celle présente dans le cerveau, et ce facteur est certainement sous-évalué, dans la mesure où la PrPres n'a pas été détectée dans les ganglions et nerfs associés, alors que ces organes sont censés concentrer l'infectiosité à partir des zones qui leur sont associées. De plus, la contamination musculaire, si elle existe, semble se faire par voie centrifuge à partir du système nerveux central, ce qui signifie de faibles quantités, et de plus à une période de la maladie où le titre infectieux du cerveau est important, donc lorsque les bovins sont

détectés par dépistage systématique. Ainsi, l'exposition du consommateur à un risque lié aux muscles est normalement maîtrisée grâce à l'utilisation systématique des tests de dépistage sur des bovins de plus de trente mois.

Chez l'Homme, la répartition de l'infectiosité dans le cas de MCJ sporadique reste confinée au système nerveux central. En revanche, l'infectiosité est également retrouvée dans les organes périphériques des patients atteints de v-MCJ, notamment les amygdales, la rate et l'appendice (HILTON *et al.*, 1998). La modélisation de la contamination humaine par la contamination expérimentale de primates non humains a permis de montrer que la PrPres pouvait également être retrouvée tout le long du tractus digestif (HERZOG *et al.*, 2004). Cette répartition plus large de l'infectiosité étend d'autant les risques de contaminations iatrogènes par le biais des instruments médicaux et chirurgicaux.

La transfusion sanguine représente un autre risque émergent de contamination interhumaine. Ce risque lié à la transfusion, jusqu'à présent théorique, a été établi par les données observées chez le mouton. En effet, l'infectiosité avait été démontrée dans le sang de mouton expérimentalement infecté par l'agent de l'ESB et la transmission de la maladie possible par transfusion de 400 ml de sang non déleucocyté (HUNTER *et al.*, 2002). Désormais, le risque est devenu réel pour l'homme avec les 2 cas, considérés comme avérés, parmi les 15 receveurs transfusés à partir de donneurs britanniques ayant développé ultérieurement une vMCJ (LEWELIN *et al.*, 2004 ; PEDEN *et al.*, 2004). En France parmi les 5 derniers cas de vMCJ, 3 étaient des donneurs réguliers de sang.

Les différentes crises liées à l'ESB nous ont permis de mieux appréhender les risques liés à ces maladies, notamment par une meilleure connaissance de leur physiopathologie. La lutte contre les ESST ne pouvant être aujourd'hui que préventive, les mesures efficaces allient le retrait des sources d'infectiosité (pour rompre les cycles de contamination) aux tests de dépistage systématique. À ce jour, les risques majeurs liés à l'agent de l'ESB repose donc d'une part sur le passage potentiel de l'ESB aux petits ruminants (infectiosité dans les organes

périphériques), et d'autre part sur les risques de contamination iatrogène interhumaine, lors d'interventions médicales ou chirurgicales, mais surtout lors de la transfusion. Le modèle le plus pertinent pour l'étude de la transmission de l'agent de l'ESB à l'Homme demeure le primate, et la maîtrise de ce risque devra passer par la définition de nouveaux tests diagnostiques *ante mortem* d'une part, et la mise en place de procédés de décontamination et/ou d'élimination des prions d'autre part.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGUZZI A (2003) Prions and the immune system: a journey through gut, spleen and nerves. *Adv. Immunol.*, **81**, 123-171.
- ANDROLETTI O, SIMON S, LACROUX C, MOREL N, TABOURET G, CHABERT A, LUGAN S, CORBIERE F, FERRE P, FOUCRAS G, LAUDE H, EYCHENNE F, GRASSI J, SCHELCHER F (2004) PrPsc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nature Med.*, **10**, 591-593.
- BENESTAD SL, SARRADIN P, THU B, SCHONHEIT J, TRANULIS MA, BRATBERG B (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.*, **153**, 202-208.
- BOSQUE PJ, RYOU C, TELLING G, PERETZ D, LEGNAME G, DeARMOND SJ, PRUSINER SB (2002) Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3812-3817.
- BROWN P, GAJDUSEK C (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet*, **337**, 269-270.
- CASTILLA J, SAA P, HETZ C, SOTO C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, **121**, 195-206.
- CHESEBRO B, TRIFILO M, RACE R, MEADE-WHITE K, TENG C, LACASSE R, RAYMOND L, FAVARA C, BARON G, PRIOLA S, CAUGHEY B, MASLIAH E, OLDSTONE M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, **308**, 1435-1439.
- DESLYS JP, COMOY E, HAWKINS S, SIMON S, SCHIMMEL H, WELLS G, GRASSI J, MOYNAGH J (2001) Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, **409**, 476-478.
- ELOIT M, ADJOU K, COULPIER M, FONTAINE JJ, HAMEL R, LILIN T, MESSIAEN S, ANDROLETTI O, BARON T, BENCSIK A, BIACABE AG, BERINGUE V, LAUDE H, LEDUR A, VILOTTE JL, COMOY E, DESLYS JP, GRASSI J, SIMON S, LANTIER F, SARRADIN P (2005) BSE agent signatures in a goat. *Vet. Rec.*, **156**, 523-524.
- FICHET G, COMOY E, DUVAL C, ANTLOGA K, DEHEN C, CHARBONNIER A, McDONNELL G, BROWN P, LASMEZAS CI, DESLYS JP (2004) Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet*, **364**, 521-526.
- HERZOG C, SALES N, ETCHEGARAY N, CHARBONNIER A, FREIRE S, DORMONT D, DESLYS JP, LASMEZAS CI (2004) Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy in primates after intravenous or oral infection. *Lancet*, **363**, 422-428.
- HILTONDA, FATHERSE, EDWARDS P, IRONSIDE JW, ZAJICEK J (1998) Prion immunoreactivity in appendix before onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **352**, 703-704.
- HUNTER N, FOSTER J, CHONG A, McCUTCHEON S, PARNHAM D, EATON S, MCKENZIE C, HOUSTON F (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.*, **83**, 2897-2905.
- LASMEZAS CI, DESLYS JP, ROBAIN O, JAEGLY A, BERINGUE V, PEYRIN JM, FOURNIER JG, HAUW JJ, ROSSIER J, DORMONT D (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, **275**, 402-405.
- LASMEZAS CI, COMOY E, HAWKINS S, HERZOG C, MOUTHON F, KONOLD T, AUVRE F, CORREIA E, LES-COUTRA N, SALES N, WELLS G, BROWN P, DESLYS JP (2005) Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet*, **365**, 781-783.
- LEGNAME G, BASKAKOV IV, NGUYEN HOB, RIESNER D, COHEN FE, DeARMOND SJ, PRUSINER SB (2004) Synthetic Mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- LEHMANN S, HARRIS DA (1996) Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1633-1637.
- LLEWELIN C, HEWITT P, KNIGHT R, AMAR K, COUSENS S, MACKENZIE J, WILL R (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, **363**, 417-421.
- MAIGNIEN T, LASMEZAS CI, BERINGUE V, DORMONT D, DESLYS JP (1999) Pathogenesis of oral route infection of mice with scrapie and BSE. *J. Gen. Virol.*, **80**, 3035-3042.
- PAN KM, BALDWIN M, NGUYEN J, GASSET M, SERBAN A, GROTH D, MEHLHORN I, HUANG Z, FLETTERICK RJ, COHEN FE, PRUSINER SB (1993), Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966.
- PEDEN AH, HEAD MW, DIANE LR, JEANNE EB, JAMES WI (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, **364**, 527-529.
- PRUSINER SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
- SHAKED GM, SHAKED Y, KARIV-INBAL Z, HALIMI M, AVRAHAM I, GABIZON R (2001) A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31479-31482.
- ZOBEL E, FLECHSIG E, COZZIO A, ENARI M, WEISSMANN C (1999), Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol. Medicine*, **5**, 240-243.