

Méthodes de diagnostic des « maladies à prions » chez l'homme et chez l'animal

Diagnostic tests for human and animal prion diseases

Par Karim Tarik ADJOU⁽¹⁾, Emmanuel COMOY⁽²⁾, Jean-Philippe DESLYS⁽²⁾, Jacques GRASSI⁽³⁾, Mohand Ouidir OUIDJA⁽¹⁾, Henri BRUGÈRE⁽⁴⁾ et Jeanne BRUGÈRE-PICOUX⁽¹⁾
(communication présentée le 23 juin 2005)

RÉSUMÉ

L'existence potentielle de bovins en phase de latence cliniquement silencieuse d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et d'individus en période d'incubation de la nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob représente constamment un grand risque pour la santé publique. Par conséquent, le développement de tests de dépistage des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) humaines et animales constitue toujours une priorité. Dans la première partie de cet article, sont décrites les principales méthodes d'orientation permettant d'aider au diagnostic d'une ESST le plus souvent clinique, comme l'imagerie médicale cérébrale, l'analyse de l'électroencéphalogramme (EEG) et l'examen du liquide céphalo-rachidien. Dans la deuxième partie, sont présentés les tests de confirmation *post mortem* du diagnostic des ESST, comme l'inoculation à l'animal de laboratoire, l'examen histologique et la recherche de la PrPres par des méthodes biochimiques. La troisième partie est consacrée aux tests dits « rapides » (Prionics, Bio-rad, Enfer), validés en 1999 par la Commission Européenne (CE), pour le diagnostic *post mortem* de l'ESB à l'abattoir chez les bovins. Utilisés à grande échelle en Europe, ils ont permis de préciser l'étendue réelle de l'épizootie et d'éliminer efficacement de la chaîne alimentaire les animaux présentant un risque pour l'homme. Depuis 2002, ils sont également utilisés pour le diagnostic *post mortem* des petits ruminants. De nouveaux tests ont été récemment évalués par la CE, mais il est trop tôt pour évaluer la place qu'ils tiendront sur le terrain.

Mots-clés : ESST, prions, diagnostic, tests rapides, ELISA, Western blot, immunohistochimie.

SUMMARY

The potential existence of clinically silent cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) among cattle, and of humans incubating the new variant Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD) is still a major public health concern. Therefore, the development of screening tests for transmissible subacute spongiform encephalopathies (TSSE) in man and animals remains a priority. In the first part of this paper, we review the main methods used to diagnose generally clinical TSSE, such as brain imaging, electroencephalogram (EEG) analysis, and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In the second part, we present the post-mortem tests used to confirm a TSSE diagnosis, such as inoculation to laboratory animals, histological examination, and identification of abnormal prion protein (PrPres) using biochemical methods. Finally, the third part presents so-called rapid tests (Prionics, Bio-rad, Enfer), validated by the European Commission (EC) for post-slaughter BSE diagnosis in cattle. Now used on a large scale in Europe, these tests have helped assess the extent of the epizooty and eliminate from the food chain animals presenting a risk for human consumption. Since 2002, they have been used for the post-slaughter diagnosis of scrapie in small ruminants. New tests have recently been evaluated by the EC, but it is too soon to predict their role in the field.

Key words: TSEs, prions, diagnostic, rapid tests, ELISA, Western blot, immunohistochemistry (IHC).

(1) Unité de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. tel. + 33 1 43 96 71 24, fax. + 33 1 43 96 70 55 ; e-mail: adjou@vet-alfort.fr.

(2) CEA, GIDTIP, 18 route du Panorama, 92 265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

(3) CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, CEA/Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex, France.

(4) Unité de Physiologie et Thérapeutique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

• INTRODUCTION

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), encore appelées «maladies à prions», sont des maladies lentes dégénératives, strictement confinées au système nerveux central, qui affectent aussi bien l'homme que l'animal (tableau 1). Ces maladies, constamment mortelles, se caractérisent par un très long temps d'incubation cliniquement silencieux, pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années chez l'homme. A l'heure actuelle, il n'existe ni vaccin ni traitement pour ces désordres neurologiques. Les ESST sont causées par les agents transmissibles non conventionnels (ATNC) ou prions dont la nature demeure, à ce jour, contestée.

| Hôte | Maladie | Première observation |
|---|--|---------------------------|
| Mouton | Tremblante | vers 1730 |
| Chèvre | Tremblante | ? |
| Homme | Kuru Maladie de Creutzfeldt-Jakob Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker | vers 1900 1920 1926 |
| Vison | Encéphalopathie spongiforme du vison | 1947 |
| Wapiti et cerf mulet des Rocheuses | Maladie du dépérissement chronique | 1967 |
| Bovin | Encéphalopathie spongiforme bovine | 1985 |
| Nyala Gemsbok* Elan du Cap, oryx d'Arabie, grand koudou | Encéphalopathie spongiforme | 1986 1987 1989 |
| Chat | Encéphalopathie spongiforme féline | 1990 |
| Autruche* (??) | Encéphalopathie spongiforme | 1991 |
| Guépard*, puma* | Encéphalopathie spongiforme | 1992 |
| Mouflon | Encéphalopathie spongiforme | 1992 |
| Homme | Insomnie Fatale Familiale | 1992 |

* transmissibilité non démontrée

Tableau 1 : Les maladies à prions naturelles de l'homme et de l'animal, (adapté de WILESMITH et WELLS, 1991)

Chez l'homme, elles correspondent à la maladie de Creutzfeldt-Jakob, au kuru, au syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et à l'insomnie fatale familiale. Chez l'animal, la tremblante naturelle du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) sont les plus médiatiques.

Les signes cliniques des ESST, très complexes et variables selon les maladies et la génétique de l'hôte, sont caractérisés par une ataxie cérébelleuse (incoordination motrice et instabilité posturale), des tremblements, des myoclonies et, chez l'homme, une démence profonde. Sur le plan neuropathologique, les ESST induisent une triade

caractéristique constituée d'une spongiose, d'une perte neuronale et d'une gliose souvent associée à une hyperastrocytose. Des plaques amyloïdes sont également observées d'une manière inconstante.

La crise dite de la maladie de la «vache folle» a vraiment débuté en 1996, lorsque WILL et ses collaborateurs rapportèrent pour la première fois, dans la revue britannique *The Lancet*, 10 cas de patients atteints d'une nouvelle forme «variante» de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nvMCJ) (WILL, IRONSIDE et ZEIDLER, 1996). Depuis février 1994, 155 cas ont été recensés au Royaume-Uni, 13 cas en France, 2 cas en Irlande et 1 cas pour chacun des pays suivants : Italie, Canada, Japon, États-Unis, Pays-Bas, Hongrie et République Tchèque. Cette nouvelle forme se différencie de la MCJ classique par le jeune âge des patients, ses signes cliniques (début insidieux et évolution prolongée, importance des signes psychiatriques et cérébelleux), et son tableau histopathologique (présence de plaques amyloïdes caractéristiques, constituées d'un centre dense et éosinophile entouré de vacuoles, donnant un aspect «en fleur» à l'origine de la dénomination de «plaques florides») (WILL, IRONSIDE et ZEIDLER, 1996). L'immunomarquage du système nerveux central (SNC) a confirmé l'accumulation de la PrP pathologique, marqueur spécifique des ESST.

Dès le 20 mars 1996, le Ministère de la Santé britannique avait annoncé une possible relation entre la nvMCJ et l'ESB. L'épidémiologie de cette nouvelle zoonose est très mal connue, ainsi que le mode de contamination, la dose minimale infectante, le temps d'incubation de la maladie chez l'homme ou la possible transmission à d'autres espèces. Les premiers modèles épidémiologiques envisageaient la contamination de plusieurs dizaines de milliers de personnes qui pourraient déclarer la maladie au cours des prochaines décennies. Les nouvelles projections sont beaucoup moins pessimistes, avec seulement quelques centaines à quelques milliers de victimes. A ce risque de transmission primaire, vient s'ajouter un risque de transmission secondaire à l'intérieur de l'espèce humaine. Il apparaît de plus en plus évident que chez les personnes atteintes de la nvMCJ, contrairement à la forme sporadique de MCJ, l'agent infectieux est présent de façon importante dans les organes lymphoïdes périphériques, ce qui fait craindre une éventuelle transmission par voie sanguine. Cette peur est étayée par la démonstration de la transmission de l'ESB à des moutons après une transfusion sanguine (HUNTER *et al.*, 2002) et par l'observation, en décembre 2003, d'un premier cas de la nvMCJ chez un patient britannique, probablement lié à un don de sang contaminé, puis d'autres cas ont été également rapportés. Ainsi, l'existence potentielle d'individus en phase d'incubation de la nvMCJ représente un risque médical et chirurgical très important. Par conséquent, le développement et la mise en place de méthodes de diagnostic et de tests rapides de dépistage des ESST humaines et animales constituent toujours une grande priorité.

• LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DES MALADIES À PRIONS

Les tests *ante mortem* d'orientation du diagnostic chez l'homme

Chez l'homme, en dehors des critères cliniques qui permettent de suspecter la MCJ, d'autres moyens d'investigation sont utilisés pour confirmer ou infirmer la maladie. Les examens les plus importants sont l'électroencéphalogramme (EEG), l'imagerie médicale cérébrale, l'examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) et l'examen génétique dans les formes familiales.

L'électroencéphalogramme (EEG)

L'EEG est le seul examen qui, actuellement, permet de différencier les cas de MCJ « probables » des cas de MCJ « possibles », grâce à la mise en évidence d'anomalies électroencéphalographiques caractéristiques, il s'agit d'ondes triphasiques d'aspect pseudo-périodique, retrouvées au cours de la MCJ sporadique. Toutefois, ces anomalies sont observées seulement chez 70 % des patients atteints de MCJ sporadique et n'ont jamais été rapportées chez les patients atteints de la nvMCJ. Bien que ces anomalies puissent provenir d'autres maladies métaboliques, voire quelquefois de cas de maladie d'Alzheimer, l'EEG reste un moyen de diagnostic *ante mortem* facile, accessible et non invasif et joue aujourd'hui un rôle primordial dans le diagnostic de la forme sporadique de la MCJ.

L'imagerie médicale cérébrale

Le principal objectif de cette technique est d'écartier d'autres maladies du système nerveux central comme les maladies cérébro-vasculaires. Les résultats obtenus par la tomographie à positrons sont décevants, puisqu'ils sont souvent normaux chez les sujets atteints de MCJ présentant une démence sévère, une ataxie cérébelleuse et des myoclonies. Cependant, ces résultats normaux peuvent être utilisés pour suspecter la MCJ. Par ailleurs, l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) montre une atteinte sévère des ganglions de la base, qui semble relativement spécifique à la MCJ. Ce test s'avère actuellement un très bon moyen de diagnostic pour différencier la nvMCJ des autres ESST humaines.

La recherche de marqueurs spécifiques dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)

L'examen du LCR chez l'homme est réalisé dans le but de rechercher et d'analyser certaines protéines susceptibles de confirmer le diagnostic de la MCJ. Les protéines recherchées sont : la S100, l'énolase spécifique des neurones et la protéine 14.3.3. Il faut noter que ces différentes protéines sont des protéines normales du cerveau, qui sont libérées de manière importante dans le LCR, en particulier au cours de la MCJ sporadique.

- L'énolase spécifique des neurones existe en grande quantité dans le LCR d'individus atteints de MCJ, mais elle est également retrouvée dans d'autres maladies, comme les tumeurs cérébrales, l'infarctus et les traumatismes cérébraux. Une étude allemande a montré que des valeurs de l'ordre de

35 ng/ml indiquent la présence de la maladie avec une sensibilité de 80 % et une spécificité de 92 % (ZERR, HELMOLD et WEBER, 1995; ZERR *et al.*, 1996).

- La S100 est une protéine de liaison du calcium, constituée d'un hétérodimère contenant 2 sous-unités isomériques alpha et bêta. L'isomère bêta (S100b) est présent dans les cellules gliales du système nerveux central. OTTO *et al.* (1997, 1998) et CEPEK *et al.* (2005) ont décrit une augmentation de la protéine S100 dans le LCR de patients atteints de MCJ et, en fonction du taux de cette protéine retrouvé dans le LCR, ils sont même capables de faire un diagnostic différentiel avec d'autres maladies nerveuses (CEPEK *et al.*, 2005). Ce marqueur a été retrouvé aussi dans le LCR de hamsters infectés expérimentalement par l'agent 263K de la tremblante (BEEKES *et al.*, 1999). Il existe une forte homologie entre les S100 humaine et bovine, mais ces tests sont souvent trop tardifs pour être préconisés de manière courante pour une recherche de l'ESB.

- La protéine 14.3.3.: cette protéine, impliquée dans la transduction des signaux, est également augmentée dans le LCR de patients atteints de la forme familiale de MCJ. Néanmoins, l'interprétation des résultats demeure difficile car la spécificité de ce marqueur reste controversée. Ainsi, l'élévation considérable du taux de cette protéine n'est pas spécifique des ESST car elle est retrouvée lors de lésions cérébrales étendues.

- L'apoprotéine (ApoE) est produite par les astrocytes du système nerveux central et semble jouer un rôle dans la mobilisation et la redistribution des lipides, lors des processus de croissance et de réparation tissulaire. Elle existe sous trois formes codées par des allèles spécifiques (E2, E3, E4) du gène de l'ApoE. L'ApoE a été parfois retrouvée dans les dépôts de PrP. En 1994, AMOUYEL *et al.* ont suggéré que l'allèle E4 était un facteur de risque pour la MCJ et l'allèle E2 modifierait le cours clinique de la maladie. Toutefois, cette observation n'est pas universellement reconnue (ZERR, HELMOLD et WEBER, 1995). Ainsi, un article rapporte des niveaux élevés d'ApoE dans le LCR de bovins atteints d'ESB et suggère que cette observation pourrait être utilisée pour le développement d'un test de diagnostic pour l'ESB (HOCHSTRASSER *et al.*, 1997).

Les méthodes de confirmation du diagnostic *post mortem*

L'inoculation à l'animal de laboratoire

La seule mise en évidence possible de l'infectiosité d'un tissu est l'inoculation par voie intra-cérébrale à l'animal de laboratoire. Les principaux modèles utilisés sont le modèle murin et le modèle cricétidien (Hamster). Dans la mesure où le temps d'incubation est proportionnel à la charge infectieuse, ils permettent de la « quantifier », en rapportant le temps moyen d'incubation aux temps moyens d'incubation d'animaux inoculés avec des dilutions sériées d'un échantillon infectieux connu et quantifié.

Cette technique est cependant peu utilisée, car elle présente de nombreux inconvénients : elle est très longue (les

durées d'incubation sont de plusieurs mois), très coûteuse et n'est pas fiable à 100 %. En effet, une souche d'ATNC, en raison du phénomène de barrière d'espèces, peut ne pas induire de maladie dans le modèle expérimental choisi dès le premier passage. La mise à disposition de souris transgéniques, exprimant la même PrP que celle de l'espèce donneuse, permet aujourd'hui de raccourcir ces délais mais, dans tous les cas, ces tests durent au moins trois à six mois.

Le diagnostic histologique et immunohistochimique

La confirmation *post mortem* d'une suspicion d'ESST se fait par un examen anatomo-pathologique du système nerveux central, sur des coupes cérébrales prélevées en pratiquant une section en avant de la protubérance annulaire. Dans le cas de l'ESB, les noyaux bulbaires sont examinés en première intention car ils sont le siège préférentiel de la spongiose. Les signes caractéristiques sont la vacuolisation neuronale (spongiose) (figure 1A), la perte neuronale, l'astrogliose réactionnelle (figure 1C) et parfois, la présence de plaques amyloïdes (figure 1D). Néanmoins, cette technique ne peut s'appliquer qu'à des organes ayant été prélevés et traités correctement : des vacuoles peuvent, par exemple, être observées lors d'une mauvaise inclusion de l'organe. Également, d'une façon générale, cette technique n'est pas fiable à 100 % : chez l'homme, certains cas de maladie d'Alzheimer peuvent être confondus sur la seule base de l'examen neuropathologique. Ainsi, il est recommandé d'associer à cette méthode de confirmation un immunomarquage de la PrPres, grâce à l'utilisation de techniques immunohistochimiques sur des coupes de cerveaux (figure 1B).

L'immunohistologie permet également de détecter la PrPres dans les amygdales de 98 % des moutons atteints de tremblante (VAN KEULEN *et al.*, 1996) et ce, de façon précoce, jusqu'à un an et demi avant l'apparition des premiers signes cliniques. Il a été aussi montré récemment que cette technique autorise une détection très précoce de la tremblante du mouton, quand elle est appliquée à d'autres tissus lymphoïdes périphériques (plaques de Peyer et ganglions lymphatiques mésentériques) (ANDREOLETTI *et al.*, 2000).

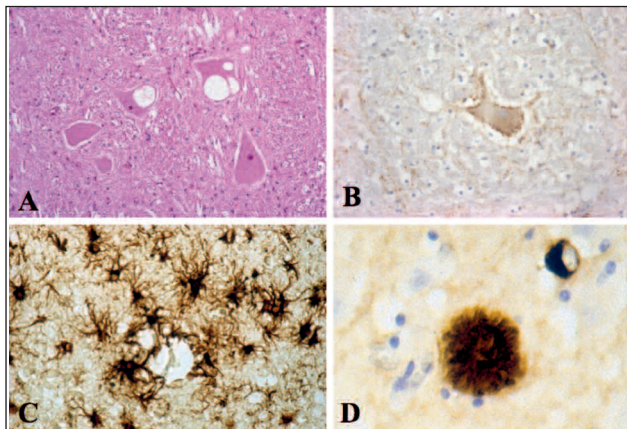


Figure 1 : Coupes histologiques d'un cerveau de mouton atteint de tremblante naturelle. A Lésions de spongiose avec présence de vacuoles intraneuronales (coloration Hémalum-éosine). B Immunomarquage de la PrPres (Anticorps 8G8). C Réaction astrocytaire importante mise en évidence par un anticorps anti-GFAP (protéine gliofibrillaire acide). D Plaque amyloïde contenant de la PrPres (Anticorps 8G8).

Toutefois, en dépit de ces données séduisantes, l'établissement d'une méthode de diagnostic de la tremblante par biopsie reste difficile à envisager en médecine vétérinaire.

En revanche, cette technique est exploitée lors d'une suspicion de nvMCJ pour poser un diagnostic fiable du vivant du patient. En effet, l'équipe de J. Ironside a détecté la PrPres, par immunohistochimie, dans l'appendice d'un patient (HILTON *et al.*, 1998), suggérant ainsi qu'il serait possible d'effectuer chez l'homme un dépistage *ante mortem* des «maladies à prions», par immunohistochimie sur des appendices ou sur des amygdales. Depuis, d'autres cas ont été confirmés au Royaume-Uni par cette méthode.

Mise en évidence des SAF (Scrapie Associated Fibrils)

Les SAF sont associés à l'infectiosité des tissus lors des ESST. Elles peuvent donc être utilisées comme marqueur de ces maladies pour l'établissement du diagnostic. Ces SAF sont observables en microscopie électronique (figure 2) (MERZ, 1981). Chez le mouton, des études montrent que la présence de SAF dans le cerveau est corrélée aux éléments diagnostiques histologiques mais la quantité détectée n'est pas proportionnelle aux lésions de vacuolisation observées. Une étude similaire, menée sur des cerveaux de bovins atteints d'ESB, montre que la quantité de fibrilles retrouvées dans certaines zones de l'encéphale est corrélée aux lésions de vacuolisation. Néanmoins, cette méthode de diagnostic, longtemps utilisée au Royaume-Uni, est aujourd'hui abandonnée, en raison de la remise en cause de sa sensibilité et sa spécificité.

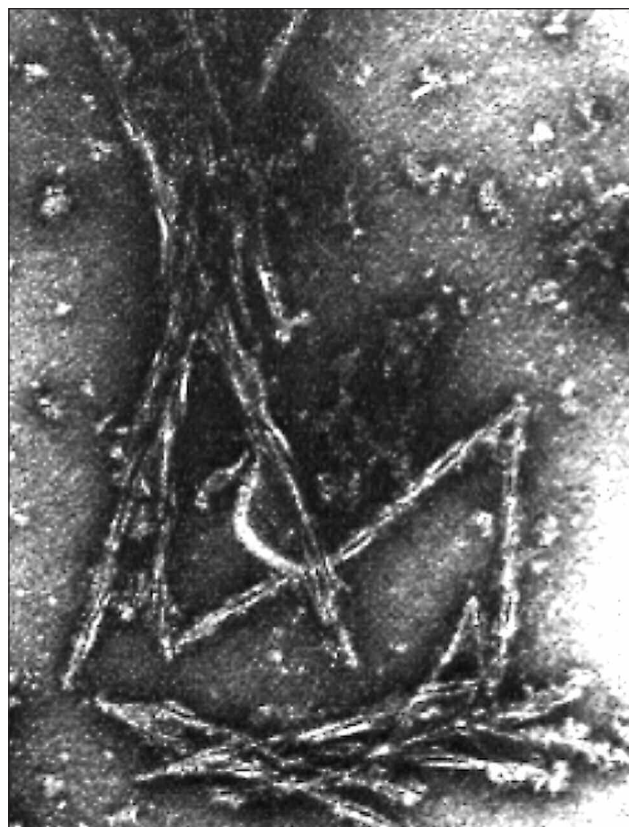


Figure 2 : Mise en évidence, en microscopie électronique, de structures fibrillaires caractéristiques des ESST, appelées les SAF (pour Scrapie associated fibrils) (MERZ *et al.*, 1981).

La recherche de la PrPres par la technique du Western blot

La mise en évidence de la forme anormale de la protéine du prion, la PrPres, seul marqueur spécifique des ESST, constitue un outil de choix pour le diagnostic de confirmation. Néanmoins, la détection de la PrPres pose différents problèmes. Tout d'abord, la PrPc (cellulaire ou normale) et la PrPres présentent la même structure primaire en acides aminés et ne diffèrent que par leurs structures secondaire et tertiaire (BOLTON, McKINLEY et PRUSINER, 1982).

Dans la mesure où il n'existe pas à l'heure actuelle, d'anticorps identifiant chaque conformation, il n'est pas possible de différencier directement ces deux formes à l'aide d'anticorps spécifiques : une préparation des échantillons est indispensable pour séparer PrPc et PrPres, du fait de la résistance de la PrPres aux protéases. D'autre part, la PrPc est une protéine constitutive de l'hôte (protéine du soi) et elle est hautement conservée entre les espèces : la production d'anticorps anti-PrP est donc très difficile. Cependant, grâce à de nouveaux outils de biotechnologie, il a été possible récemment de produire des anticorps spécifiques de la PrP, soit en immunisant des souris avec des peptides synthétiques, soit en immunisant des souris déficientes en PrP avec de la PrPc.

La PrPres présente deux caractéristiques majeures : à l'inverse de la PrPc, elle est hydrophobe et insoluble dans les détergents et elle est partiellement résistante à la digestion par les protéases. L'utilisation de ces deux propriétés majeures permet de purifier la PrPres sous forme de « SAF » (*Scrapie Associated Fibrils*) (MERZ *et al.*, 1981) et de digérer la PrPc. L'addition d'un traitement dénaturant permet alors d'augmenter l'immunoréactivité de la PrPres.

Dans un second temps, la PrPres est alors mise en évidence par technique immunoenzymatique, par exemple par Western Blot. Cette technique permet de détecter la PrPres dans des extraits de tissus cérébraux de nombreuses espèces atteintes d'ESST, et de confirmer des diagnostics histopathologiques, à partir de biopsies de cerveaux de patients atteints de MCJ. De nombreux laboratoires ont cherché à améliorer ces protocoles de purification et d'immunodétection de la PrPres, permettant ainsi une détection réalisable en 24 heures.

Cette technique de mise en évidence de la PrPres a été adaptée aux organes périphériques (rate, ganglions lymphatiques) dès 1992 dans la tremblante naturelle du mouton, avec une sensibilité de 87% (RACE *et al.*, 1992).

Elle présente l'avantage de confirmer qualitativement la spécificité de la détection, par estimation directe du poids moléculaire des protéines mises en évidence. En effet, la PrPres est reconnaissable en western blot par les trois bandes détectées, correspondant aux trois formes de la PrPres bi-glycosylée, mono-glycosylée et non glycosylée (figure 3). Chez l'homme, différents profils de PrPres ont été identifiés (COLLINGE *et al.*, 1996), selon les positions de migration des trois bandes et leurs intensités relatives. Ainsi, la PrPres, dans le cas de la nvMCJ, présente un profil électrophorétique différent de la PrPres dans les cas de MCJ sporadiques (COLLINGE *et al.*, 1996).

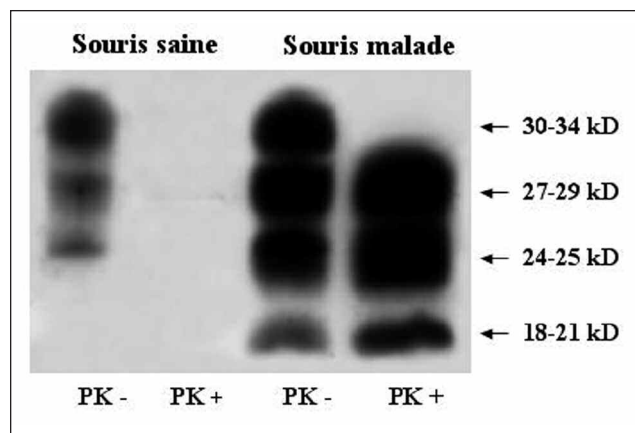


Figure 3 : Résistance de la PrPres à la digestion par la protéinase K (PK) et représentation des différents degrés de glycosylation. Des cerveaux de souris saines et de souris infectées par une souche stabilisée de tremblante (C506M3), au stade terminal, ont été prélevés. La PrP a été purifiée à partir des homogénats de cerveau en présence ou non de la protéinase K (PK+ ou PK-). La détection de la PrP (PrPc et PrPres) a été réalisée par la technique du Western blot avec un anticorps polyclonal de lapin anti-PrP. La PrPc est détruite par le traitement (piste 2) à la différence de la protéine pathologique (piste4).

Par ailleurs, ce typage électrophorétique a récemment permis d'identifier de nouvelles formes de tremblante chez les petits ruminants, appelées « tremblantes atypiques ». En effet, cette PrPres a des particularités biochimiques différentes de celle des cas de tremblantes classiques, puisqu'elle présente un profil électrophorétique de cinq bandes, bien distinct de celui du profil des trois bandes rencontré habituellement. De plus, cette PrPsc (scrapie) offre une résistance réduite à la digestion par la PK, par rapport à celle de la PrPsc des formes de tremblante classique. Cette technique, connue depuis plus de 20 ans, demeure la méthode de confirmation la plus utilisée par les laboratoires.

Le Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET Blot)

Une autre technique de détection de la PrP anormale, intermédiaire entre le Western Blot et l'immunohistochimie, a été suggérée (SCHULZ-SCHAEFFER *et al.*, 2001). Il s'agit d'une nouvelle méthode de détection de la PrPres sur des coupes de tissus inclus en paraffine, transférées sur membranes de nitrocellulose. Succinctement, une fois le tissu fixé, les membranes sont déparaffinées, puis réhydratées. Une digestion poussée par les protéases (protéinase K) est ensuite réalisée ; seule, la PrPres persiste sur la membrane de nitrocellulose car elle n'est que partiellement digérée par l'enzyme. La mise en évidence de la PrP pathologique est réalisée à l'aide d'un anticorps anti-PrP. Cette méthode associerait la sensibilité et spécificité de l'immunohistochimie et du Western Blot.

Les tests rapides

Aucune des méthodes que nous venons de décrire n'est réellement adaptée à un criblage à haut débit et ne peut se prêter à une automatisation. Elles sont maintenant utilisées essentiellement comme méthodes de confirmation, notamment le Western blot et l'immunohistochimie. À la suite de la première crise de la « vache folle », s'est développée une nouvelle génération de tests diagnostiques, dits « rapides »,

qui sont fondés sur la détection immunologique de la PrPres, le seul marqueur spécifique des « maladies à prions ».

Les tests rapides utilisés actuellement

En mai 1998, la Direction Générale XXIV (DG XXIV) de la Communauté Européenne, chargée de la sécurité du consommateur, a lancé un appel d'offre visant à évaluer les tests de dépistage de l'ESB disponibles alors sur le marché. Selon la DG XXIV, une dizaine de laboratoires ont répondu à cet appel d'offre. Suite à l'étude de ces dossiers, la DG XXIV a retenu 4 tests pour validation (MOYNAGH et SCHIMMEL, 1999) :

- le test A, développé par la société anglaise E.G. & G. Wallac, est basé sur une procédure immunométrique non compétitive DELFIA, comprenant deux anticorps monoclonaux anti-PrP;
- le test B, développé par la société suisse Prionics, est basé sur la détection du fragment de PrPres résistant à la dégradation par les protéases, au moyen d'un immunoblot faisant appel à un anticorps monoclonal anti-PrP;
- le test C est développé par Enfer Ltd, société irlandaise; il est basé sur un test ELISA de chimioluminescence, avec un anticorps polyclonal anti-PrP;
- le test D est développé en France par le Commissariat à l'Energie Atomique (test CEA). Il est basé sur un test de type ELISA.

L'étude de validation proprement dite des différents tests a eu lieu au cours du mois de mai 1999. La DG XXIV a fourni à chacun des participants 1 600 échantillons, à tester en aveugle, en moins de 4 semaines. Ces échantillons se répartissaient d'une part, en 1 400 prélèvements de tronc cérébral d'environ 1 gramme et d'autre part, en 200 homogénats de cerveau à 80 % (poids/volume) dans une solution de sucrose à 5 %. Chacun des participants a reçu les mêmes échantillons.

Au terme de la première étape de l'étude de validation, la DG XXIV a rendu les résultats publics le 8 juillet 1999 (tableau 2). Parmi les 1000 échantillons négatifs (provenant de bovins sains de Nouvelle Zélande), le test CEA a détecté 1000 échantillons négatifs et sur les 300 échantillons provenant de bovins cliniquement infectés par l'ESB, le test a détecté 300 échantillons positifs. Ainsi, pour

| | Positifs | Négatifs | Totaux |
|--------------------|----------|----------|--------|
| Résultats positifs | 300 | 0 | 300 |
| Résultats négatifs | 0 | 1000 | 1000 |
| Totaux | 300 | 1000 | 1300 |

| | % observés | % statistiques (Test de Poisson unilatéral) |
|-------------|------------|--|
| Sensibilité | 100 % | 99,0 % |
| Spécificité | 100 % | 99,7 % |

Tableau 2 : Sensibilité et spécificité du test CEA au cours de la première partie de l'étude de validation de la DG XXIV, (d'après COMOY, 2000).

les prélèvements soumis à l'étude de validation menée par la DG XXIV, le test CEA présente une sensibilité de 100 % (aucun faux négatif) et une spécificité de 100 % (aucun faux positif), ainsi qu'une valeur prédictive positive de 100 % et une valeur prédictive négative de 100 %.

En ce qui concerne les autres tests, évalués lors de cette étude, les tests B (Prionics) et C (Enfer) ont également présenté sur ces 1 400 premiers échantillons, 100 % de spécificité et 100 % de sensibilité. Le test A (E.G. & G. Wallac Ltd) a présenté, quant à lui, une sensibilité de 69,8 % et une spécificité de 89,8 % évaluées à partir de 399 échantillons, ce test ne pouvant pas, selon les organisateurs de la DGXXIV, traiter tous les échantillons de l'étude de validation dans le temps imparti.

La seconde partie de l'étude portait sur des homogénats de tissu cérébral, correspondant à des dilutions successives d'un homogénat de cerveau positif dans un homogénat de cerveaux sains. Dans la mesure où la première partie de l'étude de validation correspondait soit à des prélèvements sains, soit à des prélèvements de bovins atteints cliniquement d'ESB, cette étude ne fournit aucun renseignement sur la capacité des tests évalués à détecter des animaux en période d'incubation, et n'ayant pas encore développés de signes cliniques. Malheureusement, des prélèvements de bovins en cours d'incubation de l'ESB n'étaient pas disponibles au moment de l'étude de validation. Néanmoins, au cours de l'incubation, l'accumulation de PrPres s'effectue progressivement dans le système nerveux central des animaux infectés et ce, bien avant l'apparition des premiers signes cliniques. Ainsi, il était important de connaître la limite de détection des différents tests évalués. Cette approche ne permet, en aucune manière, d'estimer la durée de la période pendant laquelle ces tests pourraient détecter les animaux prépatents, avant l'apparition des premiers signes cliniques, puisque la cinétique d'accumulation de PrPres dans le système nerveux central des bovins n'est pas encore connue.

Les 200 homogénats étaient constitués d'un homogénat pur de cerveau positif (analysés en sextuplicats) et de 9 dilutions de ce même homogénat positif dans un homogénat négatif, la première dilution étant au 1/10, les dilutions suivantes étant des dilutions successives de 0,5 log en 0,5 log. Chacune des dilutions a été analysée 20 fois.

Le test du CEA a détecté positifs 100% des échantillons purs, dilués au 1/10, 1/31,6 et 1/100. Dix huit échantillons sur 20 (90%) de la dilution au 1/316 ont été détectés comme positifs, ainsi que 1 échantillon de la dilution au 1/1000.

Le tableau 3 présente les résultats obtenus avec les autres tests évalués. Ainsi, le test CEA (Test D) présente une détection de la PrPres 10 fois plus sensible que le test C (Enfer), environ 30 fois plus sensible que le test B (Prionics) et près de 300 fois plus sensibles que le test A (Wallac Ltd).

Les résultats, publiés par la Commission Européenne, ont montré que le test développé par le CEA était aussi sensible que le dosage biologique (inoculation à un animal de laboratoire) qui constituait la norme en la matière (détection d'en-

viron 0,1 DL50 dans 25 mg de cerveau tout en fournissant une réponse en moins de 24 heures). C'était la première fois qu'un test biochimique se révélait aussi sensible que l'inoculation directe des échantillons par voie intracérébrale à un animal de laboratoire.

L'utilisation des tests rapides dans le cadre d'études épidémiologiques et de tests systématiques à l'abattoir

En 2000, la deuxième crise de la « vache folle », provoquée par la hausse du nombre de cas d'ESB recensés en dehors du Royaume-Uni, a conduit à la mise en place des tests systématiques chez les bovins de plus de 30 mois (limite descendue depuis, à 24 mois). Cette nouvelle politique constitue une alternative à celle adoptée en Grande-Bretagne, depuis 1996, qui consiste à interdire à la consommation humaine les animaux de plus de 30 mois. Ainsi, près de 8,5 millions de tests ont été réalisés en 2001 en Europe. En tout, ce sont plus de 1000 animaux infectés qui ont été identifiés en Europe en 2001, dont 279 étaient destinés à la consommation humaine. Ces mesures ont été reconduites en 2002 et ont fourni des résultats similaires (10,3 millions de tests, 1393 animaux positifs dont 287 destinés à la consommation humaine).

En dehors du gain de sécurité qu'elles ont apporté, ces analyses à grande échelle ont permis d'identifier la présence de l'ESB dans de nombreux pays européens. Elles ont aussi montré que de nombreux pays qui n'avaient enregistré aucun cas jusqu'en 2000 (Allemagne, Espagne, Italie par exemple), présentent une incidence équivalente ou plus élevée que celle de la France qui enregistre des cas depuis 1991.

De plus, depuis 2002, une surveillance active des ESST chez les ovins et les caprins a été mise en place en Europe, avec l'obligation pour les Etats membres de la CEE, de soumettre aux tests un nombre important d'animaux abattus normalement ou issus des populations à risque. En France, par exemple, près de 79 000 petits ruminants ont été examinés en 2002, dont 30 000 animaux en provenance des équarrissages. Cette étude a permis de détecter 160 animaux infectés dont 31 étaient destinés à la consommation humaine. Actuellement, les tests utilisés en France sont les tests Prionics Check et Bio-rad.

De nouveaux tests rapides en développement

Cinq nouveaux tests ont été évalués en 2001 sur des petites séries d'échantillons (200 bovins dont 152 sains et 48 atteints d'ESB), par la Commission Européenne. L'un des tests évalués est une version améliorée du test Wallac présenté par la société Perkin Elmer life Science (Royaume Uni). Les quatre autres nouveaux tests ont été développés respectivement par deux sociétés, ID-Lelystad (Pays-Bas) et Prionics Check LIA (Suisse), et deux laboratoires universitaires, de l'Université de Californie (UCSF (*University of California, San Francisco, USA*)) et de l'Imperial College (Université de Londres, Royaume Uni).

- Le test développé par ID-Lelystad est basé sur le principe du Dot-Blot. Il est réalisé en six heures (DESLYS et GRASSI, 2005).
- Dans le test de Perkin Elmer life Science, la distinction PrPc/PrPres repose sur les propriétés de solubilité de la PrPres. Le test est réalisé en dix-sept heures.
- Le nouveau test présenté par la société Prionics est de type ELISA. Après traitement de l'homogénat cérébral par la PK, la PrPres est mesurée directement à l'aide d'un dosage sandwich utilisant deux anticorps monoclonaux. Le test peut être complètement automatisé et le résultat est obtenu en quatre heures.
- Le test développé par l'Université de San Francisco en Californie est une variante de celui publié en 1998 par l'équipe de S. Prusiner (SAFAR *et al.*, 1998). La détection de la PrPres est obtenue de façon différentielle, en comparant le signal obtenu après dénaturation à celui mesuré en l'absence de dénaturation. Le test dure moins de huit heures.
- Le test développé par l'Imperial College est un dosage sandwich impliquant un anticorps traceur marqué au ruthénium avec une détection par électroluminescence. Peu de détails techniques sont disponibles sur ce test.

Les résultats détaillés obtenus par les différents tests au cours de cette évaluation sont disponibles sur le site web : http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse42_en.pdf.

La Commission Européenne a considéré que les cinq tests avaient donné des résultats satisfaisants et a demandé à ce qu'ils

| Dilutions | Test A (Wallac) | Test B (Prionics) | Test C (Enfer) | Test D (CEA) |
|--|-----------------|-------------------|----------------|--------------|
| Pur (Titre 10 ^{3.1}) | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 |
| 10 ^{-1.0} (Titre 10 ^{2.1}) | 0/20 | 15/20 (+2*) | 20/20 | 20/20 |
| 10 ^{-1.5} (Titre 10 ^{1.6}) | | 0/20 | 20/20 | 20/20 |
| 10 ^{-2.0} (Titre 10 ^{1.1}) | | | 0/20 | 20/20 |
| 10 ^{-2.5} (Titre 10 ^{0.6}) | | | | 18/20 |
| 10 ^{-3.0} (Titre 10 ^{0.1}) | | | | 1/20 |
| 10 ^{-3.5} (Titre 10 ^{-0.4}) | | | | 0/20 |

* Pour deux échantillons de cette dilution, il n'a pas été possible de conclure au vu des résultats.

Tableau 3 : Evaluation de la limite de détection des différents tests par la DG XXIV : nombre d'homogénats détectés positifs pour chacune des dilutions étudiées, (D'après MOYNAGH et SCHIMMEL, 1999).

soient évalués sur des séries plus importantes d'échantillons de terrain, négatifs (10000) et positifs (200), avant de recevoir un agrément définitif. Aujourd'hui, seuls les tests ELISA de Prionics et celui de l'UCSF ont obtenu l'agrément de la Commission Européenne.

Les tests sur animaux vivants

Le développement de tests *ante mortem* (surtout le test sanguin) reste toujours difficile, malgré l'intérêt que leur portent de nombreux industriels depuis plusieurs années. La difficulté réside surtout dans la détection de la PrP anormale dans le sang de l'homme et des animaux, puisqu'elle est présente à des concentrations extrêmement faibles (1 à 10 unités infectieuses par millilitre). Néanmoins, un laboratoire vient d'annoncer que le premier test de dépistage sanguin des ESST, développé en utilisant une nouvelle approche (technologie des ligands et capture magnétique des particules), sera disponible d'ici deux ans.

Par ailleurs, des travaux récents ont démontré la présence, dans l'urine d'animaux atteints par une ESST, d'une forme de PrP s'apparentant à la PrPres, ce qui permet d'en-

visager un test *ante mortem* utilisable à grande échelle chez les bovins et les petits ruminants (SHAKED *et al.*, 2001). Néanmoins, à ce jour, cette technique n'a pas encore été appliquée à des séries significatives d'échantillons et n'a pas fait, sur le terrain, la démonstration de ses qualités réelles.

• CONCLUSION

Le diagnostic des « maladies à prions », du vivant des patients et des animaux, est limité et les différentes méthodes sont, en général, réservées à des investigations *post mortem*. Toutes ces techniques, classiques ou nouvelles, de recherche des marqueurs de l'infection, sont complémentaires. Dans la mesure où la nature exacte de l'agent infectieux n'est toujours pas élucidée, le diagnostic se limite principalement à la mise en évidence de la PrPres et aux lésions classiques associées aux ESST (spongieuse, gliose, perte neuronale).

Enfin, la mobilisation dans le monde de très nombreux chercheurs et laboratoires, sur la mise au point de tests applicables aux animaux vivants, permet d'espérer logiquement de grandes avancées dans un futur proche.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOUYEL P, VIDAL O, LAUNAY JM, LAPLANCHE JL (1994) The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. The French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Lancet*, **344**, 1315-1318.
- ANDREOLETTI O, BERTHON P, MARC D, SARRADIN P, GROSCLAUDE J, VAN KEULEN L, SCHELCHER F, ELSEN JM, LANTIER F (2000) Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, **81**, 3115-3126.
- BEEKES M, OTTO M, WILTFANG J, BAHN E, POSER S, BAIER M (1999) Late increase of serum S100 beta protein levels in hamsters after oral or intraperitoneal infection with scrapie. *J. Infect. Dis.*, **158**, 669-676.
- BOLTON DC, MCKINLEY MP, PRUSINER SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
- CEPEK L, STEINACKER P, MOLLENHAUER B, WIESE B, CIESIELCZYK B, BIBL M, WILTFANG J, ZERR I, SCHULZ-SCHAEFFER W, KRETZSCHMAR HA, POSER S, OTTO M (2005) Follow-up investigations of tau protein and S-100B levels in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr. Cogn. Disord.*, **19**(5-6), 376-382.
- COLLINGE J, SIDLE KCL, MEADS J, IRONSIDE J, HILL AF (1996) Molecular analyses of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature*, **383**, 685-690.
- COMOY EE (2000) *Contribution au développement d'un test de diagnostic post-mortem des bovins atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine.*, Thèse Méd. Vét., Alfort, 116 pages.
- DESLYS JP, GRASSI J (2005) Screening tests for animal TSE: present and future. *Pathol. Biol. (Paris)*. **53**(4), 221-228.
- HILTON DA, FATHERS E, EDWARDS P, IRONSIDE JW, ZAJICEK J (1998) Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **352**, 703-704.
- HOCHSTRASSER DF, FRITIGER S, WILKINS MR, HUGUES G, SANCHEZ JC (1997) Elevation of apolipoprotein E in the CSF of the cattle affected by BSE. *FEBS Letters*, **416**, 161-163.
- HUNTER N, FOSTER J, CHONG A, McCUTCHEON S, PARNHAM D, EATON S, MACKENZIE C, HOUSTON F (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.*, **83**, 2897-2905.
- MERZ PA, SOMERVILLE RA, WISNIEWSKI HM, IQBAL K (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathologica*, **54**, 63-74.
- MOYNAHG J, SCHIMMEL H (1999) Tests for BSE evaluated. *Nature*, **400**, 105.
- OTTO M, STEIN H, SZUDRA A, ZERR I, BODEMER M, GEFELLER O, POSER S, KRETZSCHMAR HA, MADER M, WEBER T (1997) S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol.*, **244**, 566-570.
- OTTO M, WILTFANG J, SCHUTZ E, ZERR I, OTTO A, PFAHLBERG A, GEFELLER O, UHR M, GIESE A, KRETZSCHMAR HA, POSER S (1998) Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *British Medical Journal*, **316**, 577-582.
- RACE R, ERNST D, JENNY A, TAYLOR W, SUTTON D, CAUGHEY B (1992) Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 883-889.
- 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**(34), 31479-31482.
- SAFAR J, WILLE H, ITRI V, GROTH D, SEREBAN H, TORCHIA M, COHEN FE, PRUSINER SB (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.*, **4**, 1157-1165.

- SCHULZ-SCHAEFFER WJ, FATZER R, VANDEVELDE M, KRETZSCHMAR HA (2001) Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch. Virol. Suppl.*, **61**, 173-180.
- VAN KEULEN LJ, SCHREUDER BE, MELOEN RH, MOOIJ-HARKES G, VROMANS ME, LANGEVELD JP (1996) Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1228-1231.
- WILL RG, IRONSIDE JW, ZEIDLER M (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-924.
- WILESMITH JW, WELL GA, (1991) Bovine spongiform encephalopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **172**, 21-38.
- ZERR I, BODEMER M, OTTO M, POSER S, WINDL O, KRETZSCHMAR HA, GEFELLER O, WEBER T (1996) Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet*, **348**, 846-849.
- ZERR I, BODEMER M, RÄCKER S, GROSCHE S, POSER S, KRETZSCHMAR HA, WEBER T (1995) Cerebrospinal fluid concentration of neuron specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **345**, 1609-1610.
- ZERR I, HELMHOLD M, WEBER T (1995) Apolipoprotein E in Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **345**, 68-69.

