



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

Présentée et soutenue par :

M. JEAN-YVES DOUET

le jeudi 9 avril 2015

Titre :

PERMEABILITE DES BARRIERES DE TRANSMISSION ET  
EVALUATION DU RISQUE IATROGENE ASSOCIE AUX AGENTS DES  
ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes - IHAP

Directeur(s) de Thèse :

M. OLIVIER ANDREOLETTI

MME CAROLINE LACROUX

Rapporteurs :

Mme SOPHIE MOUILLET-RICHARD, UNIVERSITE PARIS 5

M. RONALD MELKI, CNRS GIF SUR YVETTE

Membre(s) du jury :

Mme BETTINA COUDERC, INSTITUT CLAUDIUS REGAUD, Président

Mme STEPHANIE SIMON, CEA SACLAY, Membre

M. OLIVIER ANDREOLETTI, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. VINCENT BERINGUE, INRA JOUY EN JOSAS, Membre

# REMERCIEMENTS

**Aux membres du jury,**

**Le Professeur Bettina Couderc,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse

**Le Docteur Sophie Mouillet-Richard, le Docteur Ronald Melki**

Qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail

**Le Docteur Stéphanie Simon, le Docteur Vincent Béringue**

Qui ont accepté de participer à ce jury de thèse

**Au Docteur Olivier Andréoletti**

Pour son encadrement sans faille dans la réalisation de ce projet. Merci pour tout

**A Caroline Lacroux et Hervé Cassard**

Pour leur collaboration précieuse et leur bienveillance

**Aux membres de l'équipe EST**

Alvina, Cécile, Didier, Naima, Pierrette et Séverine. Pour votre accueil chaleureux et amical

**Aux personnels de l'animalerie**

Jean-Marc, Marion, Stéphanie. Merci pour votre aide et votre travail

# TABLE DES MATIERES

---

|  |    |
|--|----|
| TABLE DES MATIERES .....   | 1  |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS .....  | 5  |
| LISTE DES ABREVIATIONS .....   | 7  |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....  | 9  |
| 1. LES ENCEPHALOPHATIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES : DES MALADIES A PRIONS.....                         | 9  |
| 1.1. Présentation générale des encéphalopathies spongiformes transmissibles.....                         | 9  |
| 1.1.1. Caractéristiques des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles .....                           | 9  |
| 1.2. L'agent responsable des EST.....  | 12 |
| 1.2.1. Un agent résistant.....   | 12 |
| 1.2.2. Taille de l'agent.....  | 13 |
| 1.2.3. Un agent protéique ? .....  | 14 |
| 1.3. PrP <sup>C</sup> : la forme normale de la protéine Prion .....                                      | 15 |
| 1.3.1. Structure primaire et tridimensionnelle de la PrP <sup>C</sup> .....                              | 16 |
| 1.3.2. Biosynthèse, maturation et dégradation .....  | 17 |
| 1.3.3. Distribution tissulaire .....   | 19 |
| 1.3.4. Fonctions .....   | 19 |
| 1.4. PrP <sup>Sc</sup> : un conformère de la PrP <sup>C</sup> , constituant majeur de l'agent prion..... | 23 |
| 1.4.1. Etude structurale de la PrP <sup>Sc</sup> .....   | 23 |
| 1.4.2. Formes de PrP <sup>Sc</sup> sensibles à la PK .....   | 25 |
| 1.5. Nature de l'agent transmissible.....  | 26 |
| 1.5.1. La théorie du « virino » .....  | 26 |
| 1.5.2. Le prion : du concept à la démonstration .....  | 27 |
| 1.5.3. Modèles de réplication des Prions.....  | 30 |
| 2. SOUCHES, BARRIERES DE TRANSMISSION ET DIVERSITE BIOLOGIQUE DES AGENTS DES EST .....                   | 32 |
| 2.1. Notion de souche appliquée aux Prions.....  | 32 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.2.   | Identification de l'agent l'ESB : apport déterminant du typage sur souris conventionnelles ..... | 34 |
| 2.3.   | Limites opérationnelles du typage biologiques des souches.....                                   | 36 |
| 2.3.1. | Un isolat et plusieurs souches ?.....  | 36 |
| 2.3.1. | Evolution spontanée des souches de prion.....  | 37 |
| 2.4.   | Barrières de transmission et limites conceptuelles du typage souche.....                         | 37 |
| 2.4.1. | Absence de propagation / Infection asymptomatique chronique .....                                | 38 |
| 2.4.2. | Conservation des propriétés biologiques et phénotypiques .....                                   | 39 |
| 2.4.3. | Emergence d'un agent de phénotype différent.....   | 39 |
| 2.5.   | Déterminants des barrières de transmission.....  | 40 |
| 2.5.1. | Séquence de la protéine PrP des hôtes donneurs et receveurs .....                                | 40 |
| 2.5.2. | Nature de l'agent, souche de prion.....  | 42 |
| 2.6.   | Quel support pour l'information de souche ? .....  | 42 |
| 2.7.   | Vers un modèle cohérent expliquant les phénomènes de souches et de barrière d'espèce.....        | 44 |
| 2.8.   | Comment appréhender la diversité biologique des Prions ? .....                                   | 45 |
| 3.     | ORIGINE ET PATHOGENESE DES EST ANIMALES ET HUMAINES .....  | 48 |
| 3.1.   | La dualité maladie acquise / maladie spontanée .....   | 48 |
| 3.1.1. | Infection par les Prions.....  | 48 |
| 3.1.2. | Le concept d'EST spontanée.....  | 49 |
| 3.2.   | Schéma Pathogénique des EST acquises .....   | 53 |
| 3.2.1. | Tremblante Classique.....  | 53 |
| 3.2.2. | Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB).....  | 59 |
| 3.2.3. | Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob.....                                       | 60 |
| 3.3.   | Quel schéma pathogénique pour les formes spontanées d'EST .....                                  | 61 |
| 3.3.1. | Maladie de Creutzfeldt-Jakob .....   | 61 |
| 3.4.   | Conclusions.....   | 64 |
| 4.     | EVALUATION ET PREVENTION DES RISQUES DE TRANSMISSION IATROGENES DES EST .....                    | 66 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1. Approche de l'évaluation des risques de transmission iatrogène des EST chez l'Homme .....  | 67  |
| 4.1.1. Fréquence des maladies à Prions.....   | 67  |
| 4.1.2. Distribution de l'agent infectieux et Infectiosité relative des tissus.....  | 69  |
| 4.1.3. Pratiques médicales et populations exposées .....  | 73  |
| 4.2. Transmission iatrogène des formes sporadiques d'EST .....  | 74  |
| 4.2.1. Modes de contamination avérés ou suspectés .....   | 74  |
| 4.3. Transmission iatrogène du variant de la MCJ.....   | 77  |
| 4.4. Infectiosité sanguine et transmission par voie transfusionnelle.....   | 78  |
| 4.4.1. Infectiosité associée au sang et aux fractions sanguines .....   | 79  |
| 4.4.2. Transmission par voie transfusionnelle.....  | 82  |
| 4.4.3. Mesures de prévention des risques de transmission transfusionnels.....   | 84  |
| OBJECTIFS .....   | 86  |
| RESULTATS .....   | 88  |
| 1. PERTINENCE DES MODELES MURINS TRANSGENIQUES POUR L'EVALUATION DU RISQUE D'INFECTION ASSOCIE AUX ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES ..... | 88  |
| 2. RECHERCHE D'INFECTIOSITE DANS LE SANG DE PATIENTS ATTEINTS DE LA FORME VARIANTE ET SPORADIQUE DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB .....             | 92  |
| 3. EFFICACITE DE LA LEUCO-DEPLETION DANS LA PREVENTION DU RISQUE TRANSFUSIONNEL ASSOCIE AUX EST .....   | 100 |
| 4. TRANSMISSIBILITE DES EST PAR LES LEUCOCYTES ET SOUS POPULATIONS LEUCOCYTAIRES.....   | 106 |
| 5. DETECTION PRECLINIQUE DES PRIONS DANS LES LEUCOCYTES SANGUINS...   | 128 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....  | 137 |
| 1. DES OUTILS DE DETECTION ADAPTES AUX AGENTS DES EST HUMAINES .....  | 137 |
| 2. PRIONEMIE ET MCJ : QUELLE PERTINENCE ?.....  | 138 |
| 3. CONSEQUENCES ET INCERTITUDES SANITAIRES.....   | 139 |
| 4. VERS UNE GESTION RATIONNELLE DES RISQUES DE TRANSMISSION DES MCJ ?   |     |

|  |     |
|--|-----|
| 5. QUELLE ORIGINE POUR LA PRIONEMIE ?..... | 142 |
| CONCLUSION .....                           | 144 |

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

## FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Principales caractéristiques neuropathologiques des EST .....   | 11 |
| Figure 2: Scrapie Associated Fibrils (SAF) .....  | 15 |
| Figure 3: Structure de la PrP <sup>C</sup> .....  | 17 |
| Figure 4: Localisation et trafic cellulaires de la PrP <sup>C</sup> .....   | 18 |
| Figure 5: Détection biochimique de la PrP <sup>C</sup> et de la PrP <sup>res</sup> .....  | 24 |
| Figure 6: Modèles topologiques de la PrP <sup>Sc</sup> .....  | 25 |
| Figure 7: Schéma théorique du processus d'amplification de la PrP <sup>Sc</sup> par la PMCA .....   | 29 |
| Figure 8 : Modèles de conversion de la PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> .....  | 31 |
| Figure 9: Principe du typage biologique des Prions par inoculation sur souris .....   | 33 |
| Figure 10: Typage des souches d'agents responsables des EST .....   | 34 |
| Figure 11: illustration de la stabilité de l'agent de l'ESB .....   | 35 |
| Figure 12: Principe de l'expérience démontrant le rôle de la PrP dans la barrière d'espèce ...  | 41 |
| Figure 13: Mutations et polymorphismes du gène <i>PRNP</i> .....  | 50 |
| Figure 14: Voies potentielles de dissémination de l'agent de la tremblante via les plaques de Peyer après infection orale. ....               | 55 |
| Figure 15: Voies de neuro-invasion des agents responsables des EST .....  | 57 |
| Figure 16: Profil électrophorétique de PrP <sup>res</sup> extraites d'isolats de tremblante classique et atypique dans différents tissus..... | 63 |

## TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Effet du niveau d'expression de la PrP <sup>C</sup> murine sur la durée d'incubation de la souche RML ..... | 46 |
| Tableau 2: Distribution des polymorphismes au codon 129 en fonction des différentes formes de MCJ .....                | 51 |
| Tableau 3 : Cinétique d'apparition tissulaire de la PrP <sup>Sc</sup> lors de tremblante classique .....               | 58 |
| Tableau 4: Données OMS relatives à la distribution tissulaire de l'infectiosité dans les EST .                         | 70 |
| Tableau 5: Cas de MCJ associés à des greffes de cornées .....  | 76 |
| Tableau 6: récapitulatif des cas transfusionnels anglais.....  | 78 |

|  |    |
|--|----|
| Tableau 7: Synthèse des résultats portant sur les travaux historiques de détection d'infectiosité sanguine dans les maladies à prion ..... | 80 |
| Tableau 8: Travaux ultérieurs à l'année 2000 dans le domaine de l'infectiosité des maladies à prion .....                                  | 81 |



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

|                          |   |
|--------------------------|---|
| ATNC.....                | Agent transmissible non conventionnel                               |
| CGR.....                 | Concentrés de globules rouges                                       |
| CWD.....                 | <i>Chronic wasting disease</i> , maladie du dépérissement chronique |
| DC.....                  | Cellules dendritiques   |
| DL50.....                | Dose létale 50  |
| ESB.....                 | Encéphalopathie Spongiforme Bovine                                  |
| ESF.....                 | Encéphalopathie Spongiforme Féline                                  |
| EST.....                 | Encéphalopathie Spongiforme Transmissible                           |
| FDC.....                 | Cellules dendritiques folliculaires                                 |
| fMCJ.....                | maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale                              |
| GFAP.....                | <i>Glial Fibrillary acidic Protein</i>                              |
| GPI.....                 | Glycosyl-phosphatidyl-inositol                                      |
| GSS.....                 | Gerstmann-Sträussler-Scheinker                                      |
| IC.....                  | Intracérébrale  |
| IFF.....                 | Insomnie Fatale Familiale   |
| IP.....                  | Intrapéritonéale  |
| KO.....                  | <i>Knock out</i>  |
| MCJ.....                 | maladie de Creutzfeldt-Jakob  |
| MDS.....                 | Médicaments dérivés du sang   |
| OMS.....                 | Organisation mondiale de la Santé                                   |
| OR.....                  | <i>Octarepeat</i>   |
| ORF.....                 | Cadre ouvert de lecture   |
| PET Blot.....            | <i>Paraffin Embeded Tissue Blot</i>                                 |
| PK.....                  | Protéinase K  |
| PMCA.....                | <i>Protein misfolding cyclic amplification</i>                      |
| PrP.....                 | <i>Protease resistant protein</i>                                   |
| PrP <sup>C</sup> .....   | Forme cellulaire de la PrP  |
| PrP <sup>res</sup> ..... | Fraction résistante à la protéinase K de la PrP pathologique        |
| PrP <sup>Sc</sup> .....  | Forme pathologique de la PrP  |
| PSL.....                 | Produits sanguins labiles   |

|           |  |
|-----------|--|
| QuIC..... | <i>Quaking induced conversion</i>          |
| SAF.....  | <i>Scrapie associated fibril</i>           |
| sMCJ..... | Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique    |
| SNA.....  | Système nerveux autonome                   |
| SNC.....  | Système Nerveux Central                    |
| TME.....  | <i>Transmissible mink encephalopathy</i>   |
| vMCJ..... | variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob |
| WB.....   | <i>Western blot</i>                        |

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## 1. LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES : DES MALADIES A PRIONS

### 1.1. Présentation générale des encéphalopathies spongiformes transmissibles

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à Prions sont un groupe d'affections neurodégénératives fatales décrites chez l'homme et dans un large spectre de mammifères.

Chez l'homme, quatre formes distinctes ont été décrites sur la base de critères épidémiocliniques, neuropathologiques, biochimiques et génétiques : le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie fatale familiale (IFF) et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), complétée récemment par le nouveau variant de la MCJ (vMCJ)<sup>61</sup>.

Chez les animaux, les principales maladies sont la tremblante des petits ruminants, la maladie du dépérissement chronique des cervidés (*Chronic Wasting Disease*, CWD) en Amérique du Nord, l'encéphalopathie transmissible du vison (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME). L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), décrite dans le début des années 1980 a été particulièrement mise en lumière pour être à l'origine de l'apparition du vMCJ chez l'homme<sup>31, 75</sup>. L'épidémie d'ESB est également reliée à d'autres EST animales, dont l'Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF) touchant les chats domestiques ou les grands fauves en captivité<sup>162</sup>, ou encore l'Encéphalopathie Spongiforme des ruminants de zoo<sup>34</sup>.

#### 1.1.1. Caractéristiques des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles

Les EST ont en commun plusieurs caractéristiques cliniques, lésionnelles et physiopathologiques.

##### - *Tableau clinique*

La période d'incubation asymptomatique est longue par rapport à l'espérance de vie moyenne de l'espèce dont l'individu est atteint. Elle se chiffre en dizaine de mois chez les petits et grands ruminants et en années ou décennies chez l'homme. La phase clinique consécutive évolue sur un mode subaiguë à chronique, en quelques semaines ou plusieurs mois. Quoiqu'éminemment variable selon les espèces, les signes cliniques reflètent majoritairement une atteinte progressive du système nerveux central (SNC). Ces signes nerveux combinent

des troubles moteurs (ataxie cérébelleuse, myoclonies), sensitifs (prurit incoercible) et également cognitifs (démence progressive, accès d'humeur, troubles visuels). L'enchaînement des signes cliniques, la durée d'évolution et l'âge d'apparition varient en fonction des différentes formes de la maladie. Leur aggravation progressive aboutit à la mort de l'individu atteint.

- *Tableau lésionnel*

Il n'existe pas de lésions macroscopiques spécifiques des EST. Le tableau lésionnel reflète les troubles nerveux observés en fin d'évolution : amyotrophie liée aux déficits moteurs, myosite voire escarres de décubitus, perte de laine ou excoriations secondaires au prurit lors de tremblante ovine classique.

Dans tous les cas, les lésions microscopiques observables en histologie conventionnelle sont confinées au système nerveux central (SNC) et précèdent de peu les manifestations cliniques de la maladie. Seule l'histopathologie permet d'établir un diagnostic *post-mortem* définitif et de caractériser le type ou le sous-type d'EST en établissant un profil lésionnel basé sur la localisation et l'intensité des lésions. Elles consistent en une triade caractéristique associant une spongiose, une perte neuronale et une gliose réactionnelle.

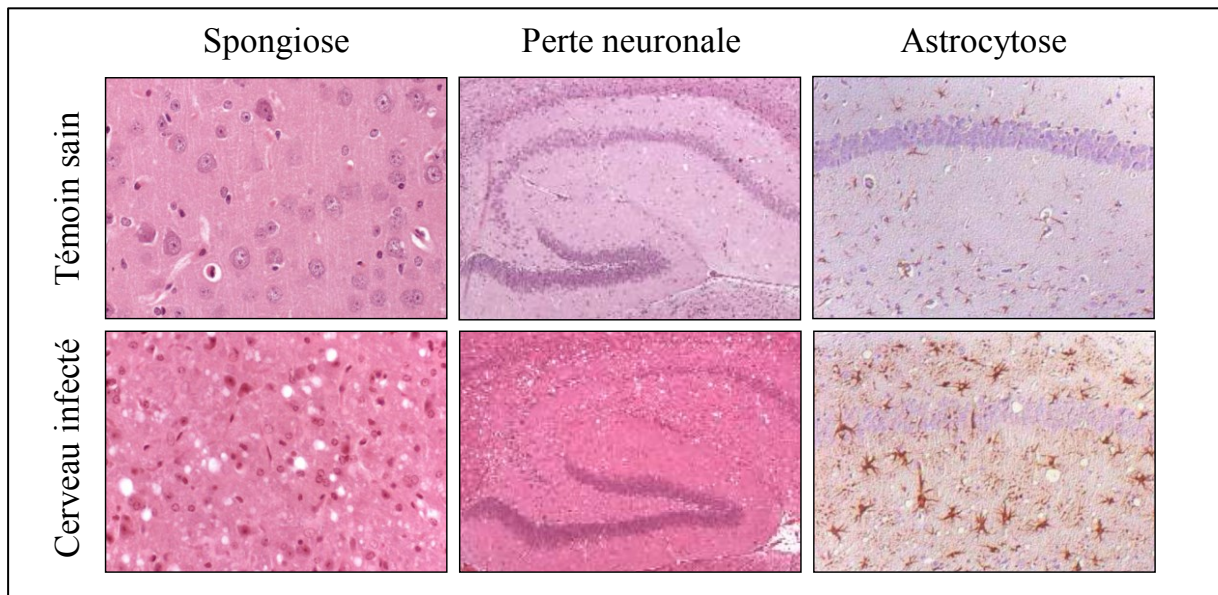
**La spongiose** est définie comme une vacuolisation neuronale périnukléaire et neuropilaire<sup>161</sup>. Les vacuoles peuvent être diffuses ou groupées et de formes rondes ou ovales.

**La perte neuronale** est variable suivant la région encéphalique examinée et dépend également de l'hôte, de l'agent d'EST. Contrairement à d'autres affections neurodégénératives comme la sclérose en plaque, aucun infiltrat lymphocytaire ou macrophagique n'est observé dans les EST<sup>76</sup> et la perte neuronale est attribuée à des phénomènes apoptotiques<sup>180</sup>.

**La gliose** se caractérise par une hyperplasie et une hypertrophie des cellules astrocytaires et microgliales, comme démontré par la surexpression de la protéine acide fibrillaire gliale (*Glial Fibrillary acidic Protein*, GFAP) et du récepteur au complément de type III (CD11b)<sup>179, 445</sup>. Cette gliose précède de manière très significative l'apparition des lésions vacuolaires.

Chez certains individus, des dépôts amorphes, biréfringents après coloration au rouge Congo sont parfois observés. **Ces dépôts amyloïdes** sont généralement d'extension légère et péri-vasculaires, mais prennent parfois l'aspect de plaques intra-parenchymateuses<sup>477</sup>. Une morphologie particulière de ces plaques est parfois associée à certains types de maladies. Par exemple, dans le GSS, une forme d'EST familiale chez l'homme, les plaques sont multicentriques<sup>325</sup>. Dans les cas de Kuru, les plaques comportent un cœur dense et une

périphérie composée de fibrilles épineuses radiaires<sup>271</sup>. Les plaques « florides » ont une morphologie comparable à celles rencontrées dans le Kuru. Elles sont de plus, bordées d'une couronne de lésions vacuolaires, leur conférant une forme évoquant une marguerite. Ces plaques florides sont notamment retrouvées chez les patients atteints du vMCJ<sup>316, 317</sup>.



**Figure 1: Principales caractéristiques neuropathologiques des EST**

Coupes histologiques d'encéphale colorées en Hémalum-Eosine. L'activation astrocytaire est matérialisée par l'immunomarquage de la GFAP.

- *Des maladies transmissibles*

La preuve du caractère transmissible des EST fut apportée par Jean Cuillé et Paul Louis Chelle, qui reproduisirent une tremblante clinique chez des ovins, 24 mois après l'injection intraoculaire d'un broyat de moelle épinière de moutons atteints<sup>116</sup>. Par la suite, ils mirent en évidence que d'autres voies d'inoculation permettaient une transmission de la maladie, notamment les voie intracérébrale, épidurale, et sous cutanée<sup>117</sup>. Enfin, en transmettant la maladie par inoculation d'un homogénat de cerveau ovin à une chèvre, ils réalisèrent la première transmission hétérospécifique<sup>118</sup>.

Dans les années 60, les analogies cliniques et lésionnelles entre la tremblante et le Kuru<sup>192</sup> aboutirent à l'hypothèse que cette maladie humaine pourrait également être dûe à un agent transmissible<sup>193</sup>. Les travaux menés par Daniel Carlton Gajdusek démontrèrent cette hypothèse, en transmettant la maladie à des chimpanzés, inoculés par voie intracérébrale avec des extraits de cerveaux de patients morts de Kuru<sup>166</sup>. Dès lors, ces affections furent classées dans un nouveau groupe de maladies neurodégénératives transmissibles, les EST, dont l'agent causal était inconnu.

Les échecs répétés d'isolement de l'agent transmissible, par les méthodes classiques bactériologiques et virologiques, ont historiquement poussé les expérimentateurs à utiliser les modèles de transmission à l'animal pour l'étude de ces agents. La transmission hétérospécifique de la tremblante du mouton à la souris<sup>98</sup>, au rat<sup>99</sup> et au hamster<sup>486</sup> constitua une étape importante dans l'étude des EST. L'utilisation d'espèces de laboratoires permit de s'affranchir partiellement des contraintes techniques, matérielles et financières liées à l'utilisation des « modèles grands animaux » (ruminants et primates). Ces modèles montrèrent toutefois rapidement leurs limites, puisque certains isolats d'EST, infectieux lors de transmission homospécifique, sont difficiles voire impossible à transmettre aux rongeurs<sup>252</sup>.

## **1.2.L'agent responsable des EST**

La nature exacte des agents infectieux responsables des EST n'est, à ce jour, pas complètement élucidée.

### **1.2.1. Un agent résistant**

La résistance exceptionnelle des agents des EST aux procédés classiques de décontamination, leur a valu la dénomination « d'agents transmissibles non conventionnels » (ATNC).

Les rayonnements ultra-violetts se sont révélés inefficaces pour inactiver les ATNC, y compris à des longueurs d'onde altérant les acides nucléiques (254nm)<sup>8, 274</sup>. De même, les micro-ondes, les rayons X et les ultrasons sont sans effet notable. Les rayonnements  $\gamma$  à 100 et 200 Kgy peuvent réduire les titres infectieux de tissus contaminés par l'agent de la tremblante, du Kuru ou de la MCJ<sup>178</sup>.

Les ATNC sont particulièrement résistants à la chaleur. L'effet des traitements thermiques dépend de la nature de l'isolat, mais également de l'état physique de l'échantillon soumis à la décontamination : nature, volume, état d'hydratation...<sup>255</sup>. L'autoclavage (chaleur humide) présente une efficacité variable suivant les paramètres de température, de pression et de durée appliqués. Un autoclavage à 136°C, sous deux bars de pression pendant 4 ou 9 minutes, permet de détruire l'infectiosité détectable contenue dans 50mg de cerveau de souris inoculée par une souche de tremblante murine<sup>255</sup>. Paradoxalement, des échantillons similaires soumis à 138°C, sous 2 bars de pression pendant 9 minutes sont restés infectieux<sup>424</sup>.

Comme pour les procédés physiques de décontamination, l'activité des produits chimiques est tributaire de la nature de l'agent étudié et les données obtenues pour un agent ne sont pas transposables à tous les autres. De manière générale, les ATNC sont peu sensibles à l'action des solvants organiques, des agents alkylants, des agents chaotropes ou des agents

oxydants<sup>138, 424</sup>. Toutefois, le sodium dodecyl sulfate (SDS), à la fois détergent et dénaturant réduit significativement le titre infectieux des homogénats de tissus contaminés<sup>255</sup>. L'efficacité est améliorée si le traitement est couplé à une ébullition<sup>422</sup> ou un autoclavage<sup>425</sup>. L'hypochlorite de sodium, en solution aqueuse, permet d'inactiver complètement certains isolats d'EST, à condition que la disponibilité en chlore libre et les temps de contact soient suffisants<sup>426</sup>. Une exposition d'une heure à la soude 1M à température ambiante permet de réduire fortement le titre infectieux ou d'inactiver de nombreux isolats d'EST. Toutefois, certains agents comme celui responsable de l'ESB (homogénat de cerveau de souris VM expérimentalement infectée par cet agent) demeurent infectieux après un tel traitement<sup>423, 426</sup>. Enfin, alors que ces agents semblent insensibles à l'action des nucléases<sup>369</sup>, des protéases, comme la protéinase K, permettent de diminuer de manière très significative les titres infectieux d'homogénats de tissus contaminés<sup>371</sup>.

### **1.2.2. Taille de l'agent**

Des expériences d'irradiation ont permis, dès les années 1960, d'estimer que la taille de l'agent transmissible responsable de la tremblante se situait autour de 7 nm<sup>10</sup> pour un poids moléculaire de 150 kDa<sup>9</sup>.

Ces estimations ont été ensuite affinées par des techniques de fractionnement biochimique et de sédimentation en gradient de sucrose, de filtrations sur membrane et chromatographie. Le diamètre des particules contenues dans les fractions infectieuses a été alors estimé à 25-30 nm<sup>410</sup>.

Plus récemment, l'utilisation d'approches basées sur le fractionnement par ultrasons et la filtration sur tamis moléculaires a permis de caractériser la taille des particules les plus infectieuses, d'un isolat de tremblante adaptée au hamster (263K). Dans ce modèle, les particules les plus infectieuses, correspondent à des formes d'environ 17 à 27 nm de diamètre pour une masse moléculaire de 300 à 600 kDa<sup>404</sup>. Il semble toutefois que la taille moyenne et minimale des particules infectieuses varie de manière significative en fonction de la nature de l'agent étudié<sup>432</sup>.

Il est toutefois important de rappeler ici que ces travaux reposent sur l'étude de fractions biochimiques traitées notamment par différents détergents. Ces traitements sont susceptibles d'altérer la structure des particules infectieuses (dont dépend la taille) telles qu'elles existent *in vivo* (cf. 1.4.2)

### 1.2.3. Un agent protéique ?

La résistance singulière des ATNC aux procédés physico-chimiques dégradant les acides nucléiques, leur petite taille, leur sensibilité à l'action des protéases a progressivement fait émerger l'hypothèse qu'ils étaient de nature protéique<sup>8</sup>.

Dès 1966, Griffith proposa, sur la base d'un modèle mathématique, que l'agent infectieux responsable de la tremblante était une petite protéine capable d'autoréplication<sup>189</sup>.

Au début des années 1980, Merz étudia en microscopie électronique, des échantillons de cerveaux de hamster, inoculés avec un isolat de tremblante adapté à cette espèce. Les tissus étaient préalablement digérés par la protéinase K (PK) en milieu détergent<sup>321</sup>. Ces travaux ont été menés chez les hamsters, mais également à partir de tissus issus d'élang atteints de CWD, ou encore de patients atteints de MCJ, de Kuru<sup>322</sup>. Ils mirent en évidence des agrégats fibrillaires de 20 nm de diamètre et 100 à 200 nm de long, droits ou parfois arrangés en hélice<sup>286</sup>. Ces agrégats, nommés *Scrapie associated fibrills* (SAF), sont systématiquement absents des préparations de tissus issus d'animaux sains<sup>320</sup> (Figure 2).

L'inoculation de préparation de SAF, purifiées à partir de cerveaux de hamster<sup>140</sup> et de souris<sup>370</sup> malades, à des animaux sains permet de reproduire la maladie.

La production d'anticorps spécifiques, dirigés contre les SAF, a ouvert un nouveau chapitre de l'histoire des EST. Elle a permis en particulier de démontrer que le constituant majeur des SAF était un polypeptide de 27-30 kDa<sup>51, 140, 315</sup>. Le séquençage de quelques acides aminés N-terminaux de ce polypeptide et la synthèse de sonde nucléiques révélèrent que ce polypeptide correspondait à une protéine de 33-35 kDa, détectable par western blot, à la fois chez les individus sains et les individus infectés. Cette protéine est codée par un gène de l'hôte et non un acide nucléique d'un micro-organisme (virus ; bactérie)<sup>339</sup>. Toutefois, alors que la protéine est sensible à la digestion par la protéinase K chez les individus sains, elle est partiellement résistante à ce traitement chez les individus infectés<sup>339</sup>.

Par la suite, une nomenclature spécifique destinée à rendre compte des caractéristiques et propriétés de cette protéine a été créée<sup>324</sup> :

-La protéine de 33-35 kDa est dénommée **PrP** pour *Protease Resistant Protein*

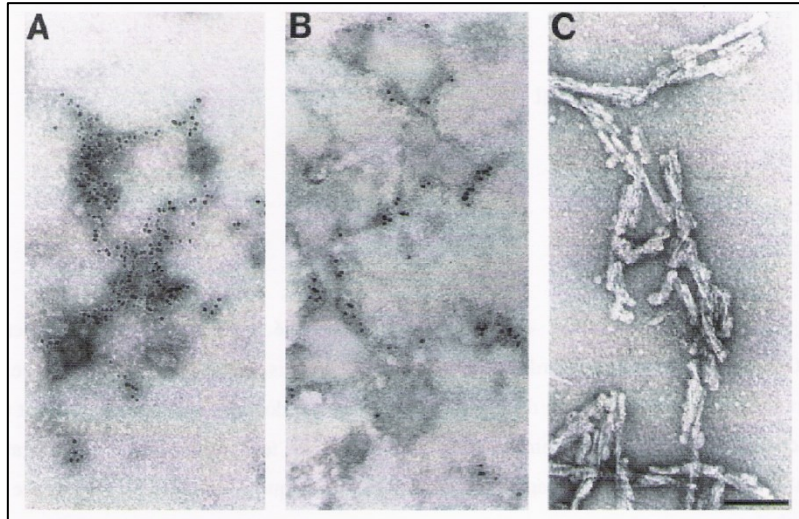
-Le gène codant la PrP est dénommé **PRNP**

-L'isoforme naturel, sensible à la PK est appelée **PrP cellulaire (PrP<sup>C</sup>)**



-L'isoforme anormale de la PrP retrouvée chez les individus atteints est appelée **PrP<sup>Sc</sup>** et la protéine de 27-30 kDa obtenue après digestion par la PK est appelée **PrP<sup>27-30</sup>** ou **PrP<sup>res</sup>**.

---



**Figure 2: Scapie Associated Fibrils (SAF)**

Microscopie électronique à transmission après immunodétection avec des anticorps couplés à des billes d'or et contre coloration négative. Barre = 100 nm d'après<sup>368</sup>

---

### 1.3. PrP<sup>C</sup> : la forme normale de la protéine Prion

La PrP est codée par le gène *PRNP* identifié chez tous les mammifères, et pour lesquels des séquences apparentées ont été identifiées chez les oiseaux<sup>203</sup>, certaines espèces de reptiles<sup>407</sup> et d'amphibiens<sup>420</sup>.

Le gène est situé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme, sur le chromosome 13 chez les ruminants domestiques et sur le chromosome 2 de la souris. Il est constitué de 2 introns et 3 exons chez la souris, le mouton, la vache et deux exons seulement chez l'homme et le hamster. La totalité du cadre ouvert de lecture (ORF) est localisée sur le dernier exon<sup>373</sup>, ce qui élimine la possibilité que la PrP<sup>C</sup> ou la PrP<sup>Sc</sup> soient le résultat d'épissages alternatifs. Chez les mammifères, sa séquence est hautement conservée, avec plus de 80% d'homologie entre espèces<sup>338</sup>. Le gène *PRNP*, est considéré comme un gène non soumis à des régulations transcriptionnelles dans un type cellulaire donné, notamment en raison de l'absence de boîte TATA dans la région du promoteur. Il présente toutefois dans sa structure, un certain nombre de zones de régulation transcriptionnelle. En effet, des sites de liaisons au facteur de transcription général Sp1 ont été identifiés, ainsi qu'un site AP1 (facteur de transcription des

familles Jun et Fos)<sup>389</sup> et AP2<sup>83</sup>. Chez les ovins, la détection de 2 types d'ARNm exprimés selon un ratio différent dans le SNC et la rate suggère une régulation tissu-spécifique de l'expression<sup>185</sup>. Enfin, la quantité d'ARNm codant la PrP<sup>C</sup> est similaire chez les individus sains et les malades<sup>100</sup>.

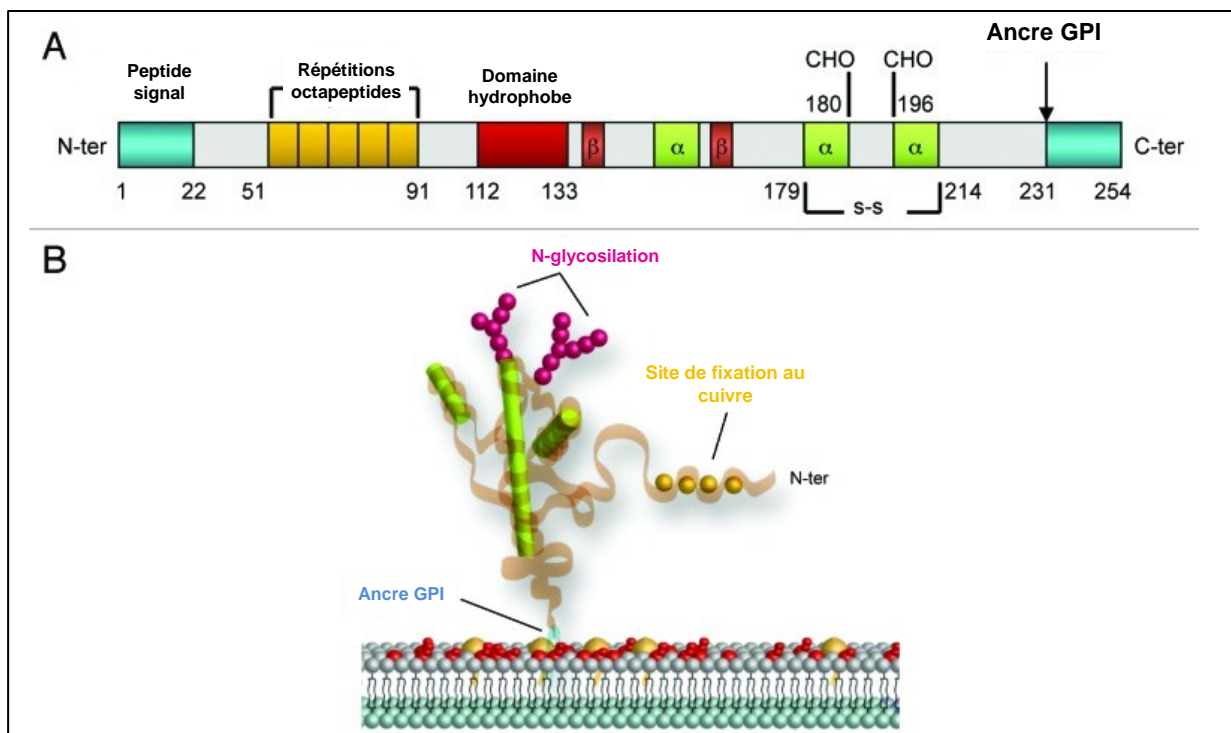
### 1.3.1. Structure primaire et tridimensionnelle de la PrP<sup>C</sup>

La PrP<sup>C</sup> est une sialoglycoprotéine d'environ 250 acides aminés (253 chez l'homme, 256 chez le mouton, 264 chez la vache, 254, chez la souris), de poids moléculaire de 33 à 35 kDa. Elle est composée de cinq domaines structuraux distincts, qui sont présentés sur la base de la PrP<sup>C</sup> murine (Figure 3A) :

- Un peptide signal N-terminal de 22 acides aminés qui permet la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE), qui est clivé pendant la maturation post-traductionnelle.
- Une extrémité N-terminale (23-94) contenant 4 à 6 répétitions d'une séquence consensus octapeptidique (PHQGGWGQ), qui présentent une capacité à fixer les ions Cu<sup>2+</sup> avec une forte affinité, ainsi que d'autres cations divalents tels que Zn<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup>, bien que l'affinité soit moindre<sup>326</sup>.
- Un domaine central (95-134) hydrophobe très conservé, qui contient une séquence d'arrêt de transfert qui intervient dans la translocation de la PrP<sup>C</sup> vers le réticulum endoplasmique<sup>480</sup>.
- La région 135-231, qui contient deux sites de N-glycosylation aux positions 180 et 196 et un pont disulfure reliant deux résidus cystéine<sup>49</sup>. Les deux sites de N-glycosylation ne sont pas obligatoirement occupés, d'où la présence simultanée de trois glycoformes<sup>199</sup>. Elles correspondent à la forme bi-glycosylée (33 à 35 kDa), mono-glycosylée (26 à 30 kDa) et non-glycosylée (27 kDa)<sup>277</sup> (Figure 5).
- Une séquence C-terminale hydrophobe qui est un peptide signal (232-254) clivé et remplacé par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), qui permet la fixation de la protéine à la membrane plasmique, dans des domaines membranaires riches en sphingolipides et cholestérol dénommés radeaux lipidiques ou *rafts*<sup>417</sup>.

La structure spatiale de la PrP<sup>C</sup> a été obtenue par l'étude de protéines recombinantes purifiées. Les études biochimiques et structurales (résonance magnétique nucléaire, spectroscopie infrarouge, dichroïsme circulaire) ont mis en évidence que la PrP<sup>C</sup> comporte deux régions distinctes : une région carboxy-terminale, globulaire et ancrée à la membrane plasmique et une région amino-terminale sans conformation définie du fait de sa flexibilité. Le cœur

globulaire de la protéine est organisé en trois hélices  $\alpha$  (H1 : 144-154 ; H2 : 175-193 ; H3 : 200-219), dont deux sont reliées par un pont disulfure, associées à 2 feuillets  $\beta$  antiparallèles (128-131 et 161-164). Cette structure tridimensionnelle, déterminée pour de la PrP recombinante est potentiellement altérée *in vivo* par les glycosylations (nature et complexité des chaînes de glycosidiques), la fixation d'ions cuivres sur les séquences octapeptidiques ou encore la dimérisation de la PrP par formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires (Figure 3B).



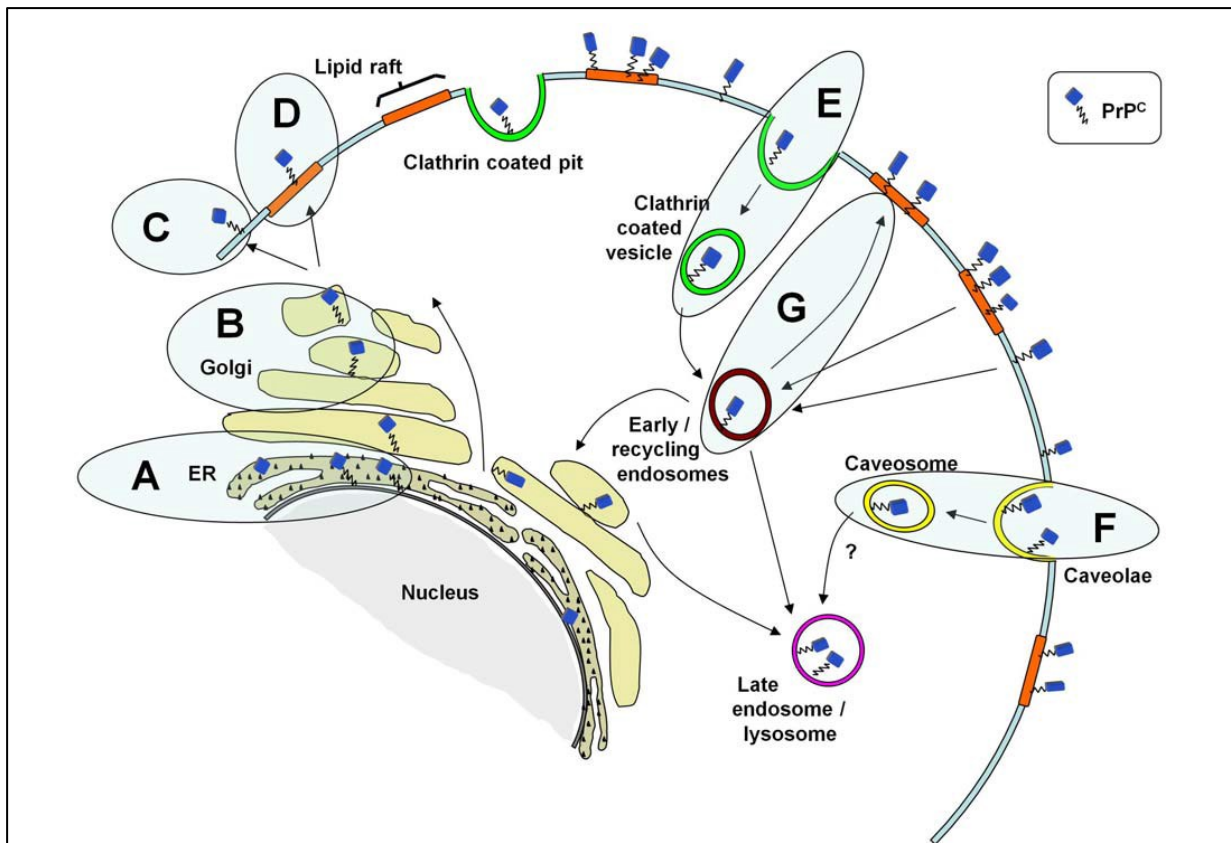
**Figure 3: Structure de la PrP<sup>c</sup>**  
(A) Structure primaire et secondaire, (B) structure tertiaire et topologie. D'après<sup>363</sup>

### 1.3.2. Biosynthèse, maturation et dégradation

La biosynthèse de la PrP<sup>c</sup> est similaire à celle des autres protéines transmembranaires ou sécrétées. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique puis transite via l'appareil de golgi vers la surface cellulaire. Au cours de ce processus, elle subit le clivage de sa partie N-terminale, l'ajout des deux chaînes oligosaccharidiques (N glycosylation), la formation d'un pont disulfure ainsi que l'attachement d'une ancre GPI<sup>202</sup>, avant d'être exportée à la membrane (Figure 4)

Néanmoins, l'ancrage GPI n'est pas le seul type de liaison possible de la PrP à la membrane<sup>97</sup>. Trois autres formes topologiques de la molécule ont été décrites. Deux de ces formes (<sup>C<sub>tm</sub></sup>PrP

et  $^{Ntm}PrP$ ) possèdent un domaine transmembranaire correspondant à la séquence hydrophobe conservée de la molécule et sont fixées au réticulum endoplasmique<sup>210</sup>. L'extrémité carboxy-terminale de la  $^{Ctm}PrP$  est orientée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Outre le domaine transmembranaire, la  $^{Ctm}PrP$  est fixée par une ancre GPI et présente la particularité de conserver son peptide signal amino-terminal<sup>418</sup>. La forme  $^{Ntm}PrP$  présente une orientation inversée par rapport à la  $^{Ctm}PrP$ . Elle n'est pas glycosylée, et demeure dépourvue d'ancre GPI. Initialement observée dans un système de traduction *in vitro*<sup>205</sup>, la  $^{Ctm}PrP$  a été détectée par la suite *in vivo* et en culture cellulaire<sup>210, 419</sup>. Le mécanisme aboutissant à ces formes est complexe et implique trois séquences clés: le peptide signal<sup>344</sup>, une séquence STE (*stop transfer effector*) qui stoppe la translocation de la protéine dans la lumière réticulaire, et la séquence hydrophobe (TMD, *trans membrane domain*) qui permet l'ancrage de la protéine sous une forme transmembranaire stable<sup>248</sup>.



**Figure 4: Localisation et trafic cellulaires de la PrP<sup>C</sup>**

(A) La PrP<sup>C</sup> est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Elle transite par le Golgi (B) avant d'être exportée à la membrane plasmique (C), insérée dans les rafts lipidiques (D). L'endocytose de la PrP<sup>C</sup> a lieu via une internalisation dans des puits de clathrine (E) ou par invagination au sein des cavéoles (F). La majorité de la PrP<sup>C</sup> est recyclée à la surface cellulaire (G), et un faible pourcentage est dégradé via la voie endo-lysosomiale. D'après<sup>283</sup>

La 3<sup>ème</sup> forme intracellulaire de la PrP est cytosolique (<sup>cy</sup>PrP). Cette topologie pourrait correspondre au recyclage de molécules de PrP mal repliée, pour permettre sa dégradation par le protéasome<sup>293</sup>. L'inhibition du protéasome provoque l'accumulation de <sup>cy</sup>PrP. Cependant, une partie de cette forme de PrP est porteuse du peptide signal, suggérant une voie alternative de transfert, indépendante du réticulum endoplasmique<sup>143</sup>.

Après avoir été adressée à la surface de la cellule, la PrP<sup>C</sup> subit des cycles de déplacements entre la membrane plasmique et le compartiment endosomal. Après l'internalisation via des mécanismes clathrine- et/ou cavéoline-dépendants<sup>201, 361</sup>, la majorité des molécules (90%) est recyclée à la surface cellulaire et réintègre la membrane plasmique<sup>401</sup>. Le faible pourcentage restant est dégradé par la voie lysosomiale à chaque cycle<sup>281</sup> (Figure 4).

### 1.3.3. Distribution tissulaire

La PrP<sup>C</sup> est une protéine ubiquitaire exprimée dans de nombreux tissus : appareil digestif, foie, cœur, muscles squelettiques, poumon, rate, nœuds lymphatiques, reins, ovaires, tissu mammaire, sang et majoritairement le cerveau<sup>288, 331</sup>.

Dans l'encéphale, la PrP<sup>C</sup> est exprimée fortement dans la substance grise, mais pas dans la substance blanche. Le niveau d'expression varie en fonction de la zone et des populations cellulaires considérées<sup>155</sup>. Ainsi, elle est fortement exprimée dans le cortex, le striatum et l'hippocampe et plus modérément dans le thalamus, le cervelet et le bulbe olfactif<sup>35</sup>. Dans le cortex cérébelleux, seule la couche cellulaire la plus externe présente une forte expression de PrP<sup>C21</sup>. Au plan cellulaire, elle est exprimée par les neurones et de façon plus modérée par les cellules gliales (cellules de Schwann, astrocytes et cellules microgliales)<sup>154</sup>. Des disparités ont également été mises en évidence en fonction du type de neurone, avec une forte expression dans les neurones GABAergiques comparativement aux neurones cholinergiques et dopaminergiques<sup>155</sup>.

Globalement, le taux d'expression de la PrP<sup>C</sup> dans le SNC augmente progressivement dès le 7<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire, pour atteindre un plateau vers 2 semaines après la naissance. A l'âge adulte, celui-ci varie peu, même au cours du développement d'une EST<sup>100</sup>.

### 1.3.4. Fonctions

Malgré de très nombreux travaux, les fonctions de la PrP<sup>C</sup> ne sont pas encore complètement connues. Actuellement, plusieurs rôles lui sont attribués : (i) une fonction cytoprotectrice en lien avec une activité anti-apoptotique ou anti-oxydante, (ii) un rôle dans le métabolisme du cuivre ou encore, (iii) de par sa nature (protéine membranaire ancrée GPI), un rôle dans

l'adhésion ou la signalisation cellulaire, ainsi que dans l'intégrité des synapses et dans la croissance neuritique<sup>468</sup>.

- *Phénotype des animaux dénués de PrP<sup>C</sup>*

La détermination de la fonction de la PrP<sup>C</sup> a été initialement envisagée par l'étude de différents modèles murins invalidés pour le gène *Prnp*.

Lorsque les modifications génomiques sont limitées au cadre ouvert de lecture (ORF) du gène *Prnp*, les lignées créées sont tout à fait viables et ne présentent pas de modifications phénotypiques notables<sup>78, 303</sup>. Des études comportementales ont cependant rapporté des troubles du rythme circadien<sup>434</sup>, du sommeil<sup>433</sup> et de l'apprentissage spatial<sup>114</sup>. Aucun trouble neuropathologique n'est observé, hormis une démyélinisation partielle des nerfs périphériques chez certains animaux âgés<sup>334</sup>.

En revanche, d'autres lignées, chez lesquelles l'ORF ainsi que les séquences flanquantes du gène *Prnp* sont délétées<sup>330</sup>, développent spontanément une ataxie cérébelleuse associée à une perte massive des cellules de Purkinje. Cette modification apparaît tardivement et peut être abolie en restaurant l'expression de PrP<sup>C479</sup>. L'explication de cette discordance phénotypique entre les lignées est venue de la découverte d'un gène homologue *Prnd* situé 16kb en aval de *Prnp*. *Prnd* code une protéine nommée Doppel (Dpl) qui est exprimée en très faible quantité dans le SNC des souris conventionnelles et des souris *Knock-out* (KO), sans altération phénotypique. Chez les souris atteintes d'ataxie, la délétion plus large place le gène *Prnd* sous le contrôle d'une région promoteur de *Prnp*, à l'origine d'une surexpression ectopique de Dpl dans l'encéphale. Les troubles nerveux seraient alors vraisemblablement dus à l'expression de Dpl en l'absence de PrP<sup>C</sup>, plutôt qu'à l'absence de PrP<sup>C</sup> elle-même. Plus récemment, aucune modification phénotypique n'a été détectée chez des bovins invalidés pour le gène *PRNP*<sup>382</sup>, ni chez des chèvres naturellement dépourvues de PrP suite à une mutation non-sens<sup>37</sup>.

L'ensemble de ces données contraste avec celles obtenues chez le poisson zèbre, chez qui l'extinction du gène *Prp-1* induit une létalité embryonnaire précoce, dès le stade de la gastrulation<sup>197</sup>.

- *Fonction cytoprotectrice et métabolisme du cuivre*

De nombreux résultats *in vitro* et *in vivo* confèrent à la PrP<sup>C</sup> un rôle neuro-protecteur, en particulier contre le stress oxydatif et, de manière plus générale, contre les stress internes et environnementaux pro-apoptotiques<sup>385</sup>.

L'impact bénéfique sur le stress oxydatif, serait notamment lié à la participation de cette protéine au métabolisme du cuivre. La PrP<sup>C</sup> possède en effet des régions capables de fixer ce cation avec une affinité réduite à des pH faibles ; elle pourrait être impliquée dans le transport du cuivre depuis la membrane plasmique vers des vésicules endosomales acides<sup>465</sup>. L'utilisation de protéines tronquées a permis de montrer que ce phénomène était dépendant des régions octapeptides<sup>358</sup>. Une chélation du cuivre par la PrP<sup>C</sup> entraîne par ailleurs une stimulation de l'endocytose de cette dernière ; suggérant qu'elle se comporte comme un récepteur cuprique, régulant les concentrations intra- et extracellulaires<sup>354</sup>. *In vitro*, la corrélation entre fixation du cuivre et niveau d'expression de la PrP<sup>C</sup> est en faveur de cette hypothèse<sup>378</sup>. Des lignées cellulaires issues de phéochromocytome de rat, qui expriment également des quantités élevées de PrP<sup>C</sup>, sont particulièrement résistantes à la toxicité induite par le cuivre et au stress oxydant<sup>58</sup>. A l'inverse, des cultures de cellules nerveuses issues de souris *Prnp*<sup>0/0</sup> ont une sensibilité accrue à l'action oxydante des ions Cu<sup>2+</sup> ou du peroxyde d'hydrogène. Cette propriété semble liée à une réduction de l'activité superoxyde dismutase (SOD)<sup>58</sup>, glutathion réductase et catalase<sup>469</sup>. Une activité SOD-like propre de la PrP<sup>C</sup> a été démontrée dans certains modèles<sup>59</sup>, mais ce résultat n'a pu être reproduit dans tous les systèmes cellulaires étudiés<sup>243</sup>. Ces données suggèrent que la PrP<sup>C</sup> pourrait participer à l'échelle cellulaire, à la régulation des stress oxydants, soit en stimulant l'activité d'enzymes anti-oxydantes, soit en jouant elle-même ce rôle.

- *Neuroprotection et signal de survie*

Les neurones dérivés des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> ont été originellement décrits comme plus sensibles à une apoptose induite par une privation en sérum, que des neurones issus de souris de génotype sauvage<sup>264</sup>. La restauration de l'expression de la PrP<sup>C</sup> chez des animaux *Prnp*<sup>0/0</sup> permet d'abolir ce phénomène<sup>335</sup>.

*In vitro* (culture de neurones fœtaux), la PrP<sup>C</sup> semble agir sur l'activité pro-apoptotique de Bax, une molécule de la famille de Bcl-2 (*Bcell lymphoma-2*), qui joue un rôle important dans la régulation des populations des neurones du SNC<sup>443, 481</sup>. Quand les neurones sont micro-injectés avec un plasmide codant Bax, 90% des cellules entrent en apoptose ; ce taux baisse à 10%, lorsque Bax et PrP sont co-injectés<sup>55</sup>. Cet effet anti-apoptotique de la PrP est spécifique de Bax, puisque que le même procédé est sans effet notable sur d'autres voies d'induction de l'apoptose, comme celles induites par la staurosporine ou la thapsigargine<sup>386</sup>.

L'effet anti-apoptotique de la PrP a été décrit dans les cellules MCF-7, dérivées d'adénocarcinome humain. Ces cellules ont la particularité d'entrer massivement en apoptose en réponse à un traitement par le TNF- $\alpha$ . L'analyse d'un clone de cellules résistantes à

l'action du TNF- $\alpha$ , a révélé une expression de PrP<sup>C</sup> à des niveaux 17 fois supérieurs à ceux observés dans les cellules sensibles<sup>132</sup>. La surexpression de PrP<sup>C</sup> dans les autres clones de MCF-7, permet également de rendre les cellules résistantes à l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ .

#### - *Signalisation cellulaire*

Comme d'autres protéines ancrées par un GPI, la PrP<sup>C</sup> est localisée dans des *rafts lipidiques* membranaires. Ces structures sont particulièrement impliquées dans la transduction des signaux des cellules neuronales<sup>283</sup>. La PrP<sup>C</sup> étant extracellulaire, elle doit, pour induire un signal intracellulaire, interagir avec des protéines transmembranaires.

Le ligand ou les ligands physiologiques de la PrP<sup>C</sup> n'ont, à ce jour, pas été formellement identifiés. Toutefois, la capacité de la PrP<sup>C</sup> à induire un signal intracellulaire a été démontrée par l'utilisation d'anticorps anti-PrP. Un tel traitement induit l'activation de Fyn, une enzyme de la famille des Src kinases. Cette voie de signalisation implique un complexe PrP<sup>C</sup>-cavéoline-Fyn<sup>332</sup> et conduit au recrutement de deux cibles intracellulaires : la NADPH oxydase, une enzyme de synthèse de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), et les kinases ERK1/2, des MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinases impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires<sup>395</sup>.

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les oligomères solubles de peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> générés par le clivage de la protéine APP (*amyloid precursor protein*) semble être un intervenant majeur de la toxicité neuronale<sup>182</sup>. Des travaux récents ont permis de mettre en évidence que la PrP<sup>C</sup> membranaire serait un récepteur majeur de A $\beta$ <sub>1-42</sub> dans l'induction de cette neurotoxicité<sup>275, 276</sup>. (voir<sup>224</sup> pour revue)

#### - *Rôle dans la transmission synaptique*

Dans les neurones, la PrP<sup>C</sup> est détectée en position membranaire axonale et notamment en région pré-synaptique<sup>21, 215, 333</sup>. Différents résultats suggèrent un rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la régulation de l'activité synaptique. L'adjonction de PrP recombinante à des cultures primaires de neurones hippocampaux conduit à l'augmentation du nombre de liaisons synaptiques<sup>246</sup>. Dans l'hippocampe de la souris, une corrélation a été établie entre l'expression de la PrP<sup>C</sup> et la transmission glutamatergique<sup>85</sup>. Couplés à la réduction des potentiels de post-hyperpolarisation observés dans des cultures neuronales de l'hippocampe des souris *Prnp*<sup>-/-106</sup>,<sup>302</sup>, ces résultats suggèrent un rôle de la PrP<sup>C</sup> dans la modulation de la transmission synaptique.



## - *Système immunitaire*

Les organes lymphoïdes représentent après le système nerveux, les tissus où l'expression de la PrP<sup>C</sup> est la plus abondante.

La PrP<sup>C</sup> est exprimée par les cellules souches hématopoïétiques chez la souris et son expression pourrait définir une sous-population particulière de cellules possédant un potentiel de reconstitution à long terme. En effet, une série de transplantations successives de moelle osseuse issue de souris *Prnp*<sup>-/-</sup> chez des receveurs conventionnels irradiés létalement s'est traduite par l'altération des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques<sup>484</sup>. Chez l'homme, les cellules souches hématopoïétiques CD34+ expriment également la PrP<sup>C</sup>. Au cours de la différenciation, l'expression de la PrP<sup>C</sup> est maintenue dans les monocytes et les lymphocytes, alors qu'elle semble réprimée au cours de la différenciation des lignées granulocytaires<sup>141</sup>.

L'étude de souris transgéniques sur-exprimant la PrP<sup>C</sup> murine a mis en lumière un rôle potentiel de la PrP<sup>C</sup> sur la différenciation des lymphocytes T. En effet, le thymus de ces souris est atrophié comparativement aux témoins et le nombre de lymphocytes T exprimant un récepteur de type  $\alpha\beta$  est diminué, avec en corollaire une augmentation des lymphocytes T $\gamma\delta$ . Une supplémentation en cuivre de ces animaux permet de corriger partiellement ce phénomène, suggérant que la surexpression de la PrP<sup>C</sup>, via une chélation du cuivre, est responsable de cette altération de la différenciation lymphocytaire<sup>244</sup>.

### **1.4.PrP<sup>Sc</sup> : un conformère de la PrP<sup>C</sup>, constituant majeur de l'agent prion**

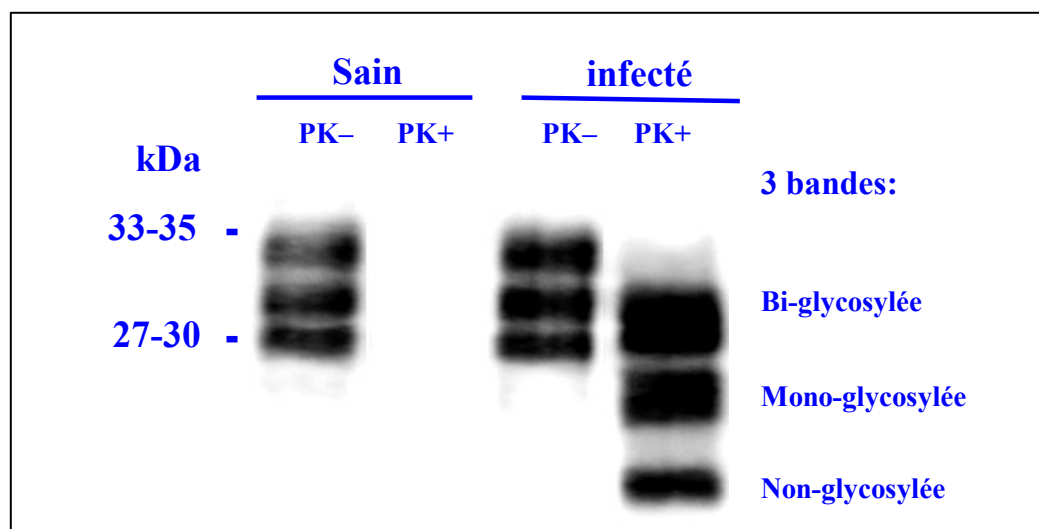
#### **1.4.1. Etude structurale de la PrP<sup>Sc</sup>**

La PrP<sup>Sc</sup> est l'isoforme pathologique de la PrP<sup>C</sup> et elle est retrouvée exclusivement chez les individus atteints d'EST (cf 1.2.3). Elle dérive de la PrP<sup>C</sup> par un processus de transconformation post-traductionnelle<sup>52</sup>. Sa séquence primaire en acides aminés est identique à celle de la PrP<sup>C</sup> et aucune modification covalente ne permet de la distinguer de celle-ci<sup>416</sup>.

En revanche, de nombreuses données expérimentales indiquent que les structures secondaires, tertiaires (et probablement quaternaires) des deux formes de protéines diffèrent. Des mesures par dichroïsme circulaire et en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont indiqué que la PrP<sup>Sc</sup> est riche en feuillets  $\beta$  (43% pour 30% d'hélices  $\alpha$ ) alors que la PrP<sup>C</sup> est composée majoritairement d'hélices  $\alpha$  (42% pour seulement 3% de feuillets  $\beta$ )<sup>347</sup>. Cette abondance des feuillets  $\beta$  expliquerait la résistance de la PrP<sup>Sc</sup> à la digestion par la Protéinase

K ou à d'autres protéases, qui n'auraient accès qu'aux acides aminés situés en portion N-terminale. La quantité de feuilletts  $\beta$  du core protéique (27-30 kDa) obtenu après protéolyse ( $\text{PrP}^{27-30}$  ou  $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) est comparable à celui mesurable dans la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  non digérée<sup>347</sup>.

La digestion ménagée par la Protéinase K en conditions détergentes est couramment utilisée pour distinguer la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et détecter de manière spécifique l'isoforme anormale de cette protéine par Western-blot ou immunohistochimie (Figure 5).



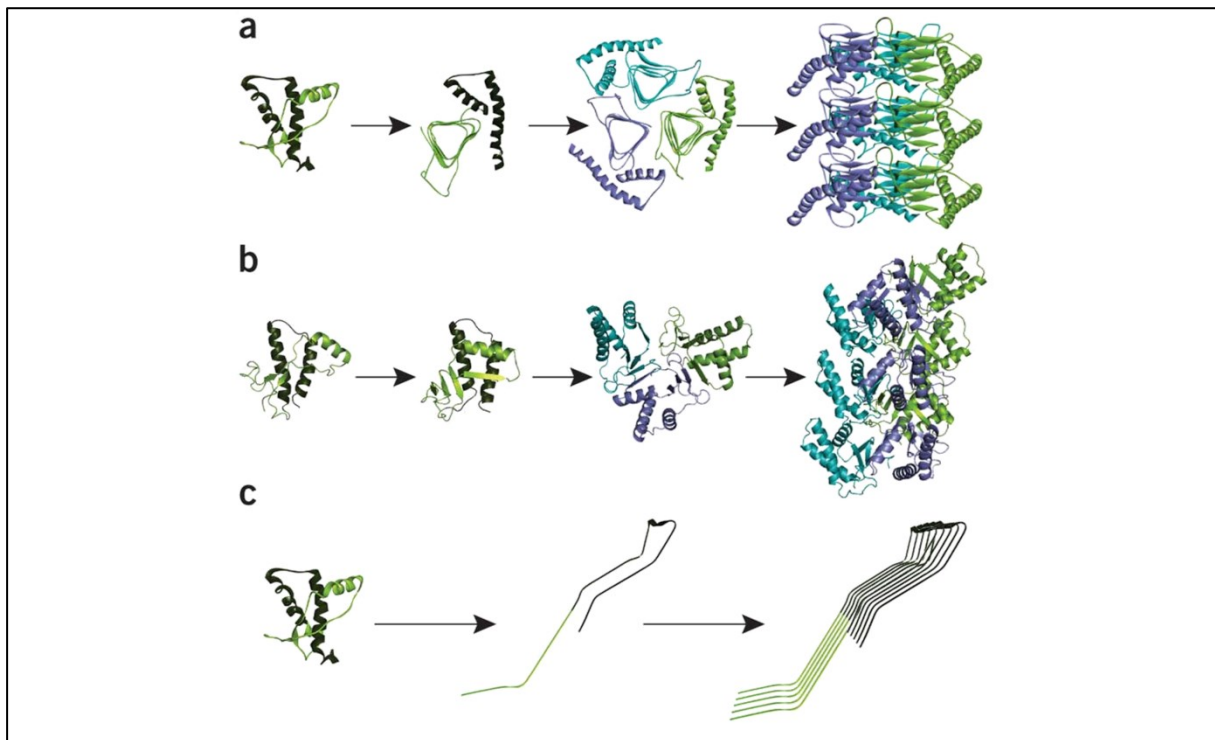
**Figure 5: Détection biochimique de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et de la  $\text{PrP}^{\text{res}}$**

Profil électrophorétique de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  et de la  $\text{PrP}^{\text{res}}$  issues de cerveau sain et contaminé, après digestion par la protéinase K

La  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  présente également une insolubilité partielle dans les détergents non ioniques et une propension à s'agréger. Ainsi, il est possible de la précipiter par sédimentation, après centrifugation haute vitesse d'un lysat de cellules ou d'un homogénat de tissu, traité par la PK en milieu détergent<sup>95</sup>.

Cependant, la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  n'a jamais pu être isolée sous sa forme native (*in vivo*). L'état d'agrégation, l'insolubilité et le degré insuffisant de pureté des préparations obtenues interdisent pour l'instant une étude structurale cristallographique haute définition (NMR) de la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  de pleine séquence. Les données relatives à la structure de la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  actuellement disponibles proviennent de travaux *in silico* ou sont issues d'approches indirectes, comme l'utilisation de protéines recombinantes « fibrillées » *in vitro*. Si ces travaux ont permis de proposer des modèles de structure tertiaire et quaternaire, leurs conclusions divergent sur de nombreux points et il reste difficile de combiner l'ensemble des données dans un modèle cohérent.

Trois modèles structuraux d'assemblage des molécules PrP<sup>Sc</sup> sont actuellement proposés (Figure 6). Le premier décrit une structure en hélice  $\beta$  sénestre. L'unité symétrique de base est constituée d'un trimère de PrP<sup>Sc</sup><sup>187</sup>. Le second, dit en  $\beta$ -spirale, considère un assemblage en une spirale formée par trois feuilletts  $\beta$  parallèles/antiparallèles et un feuillet isolé. Des protofibrilles constituées de trimères de PrP<sup>Sc</sup> associés au niveau des brins  $\beta$ , s'empileraient en spirale<sup>125</sup>. Enfin dans le troisième modèle, la PrP<sup>Sc</sup> serait ordonnée sous la forme d'un empilement axial de feuilletts  $\beta$  parallèles, la fibre ainsi générée pouvant s'accroître indéfiniment<sup>103</sup>.



**Figure 6: Modèles topologiques de la PrP<sup>Sc</sup>**  
 (a) Modèle en hélices  $\beta$ . (b) Modèle en  $\beta$ -spirale. (c) Modèle en empilement parallèle. D'après<sup>133</sup>

L'incapacité à purifier la PrP<sup>Sc</sup> à partir de tissus infectés a, par ailleurs, amené certains auteurs à considérer la participation d'autres composants que la PrP à ces assemblages structuraux. Indépendamment de l'ancrage GPI, plusieurs études ont montré une possible association de la PrP<sup>C</sup> avec des lipides<sup>22, 453</sup>. Dans les SAF, la PrP<sup>res</sup> peut également être associée à des sphingolipides<sup>167, 257</sup>.

#### 1.4.2. Formes de PrP<sup>Sc</sup> sensibles à la PK

La PrP<sup>Sc</sup> et la PrP<sup>res</sup> (ou PrP<sup>27-30</sup>) ont longtemps été considérées comme une seule et même entité<sup>367</sup>. Mais, à partir de 1998, des formes de PrP<sup>Sc</sup> sensibles à la protéolyse (senPrP<sup>Sc</sup>) ont été mises en évidence, notamment par la technique de CDI (*conformational dependent immunoassay*). Le principe de ce test est d'augmenter spécifiquement l'immunoréactivité de la PrP<sup>Sc</sup>, par une dénaturation en milieu chaotrope. Ce traitement démasque des épitopes cryptiques de la PrP<sup>Sc</sup>.<sup>390</sup> Dans les homogénats de tissu, l'augmentation d'immunoréactivité de la PrP<sup>Sc</sup> en CDI est beaucoup plus forte avant digestion par la PK qu'après. Une partie de la PrP<sup>Sc</sup> serait ainsi éliminée par la protéolyse<sup>391</sup>.

D'autres techniques, substituant la thermolysine à la PK (autre protéase qui dégrade également très efficacement la PrP<sup>C</sup>) ont permis de confirmer l'importance quantitative de la senPrP<sup>Sc</sup> dans plusieurs modèles expérimentaux ou d'infection naturelle<sup>105, 115, 345</sup>. Par la suite, des études par ultracentrifugation différentielle ou par chromatographie d'exclusion de taille ont montré que les agrégats de senPrP<sup>Sc</sup> étaient de taille réduite, suggérant un rôle de la structure quaternaire dans la résistance aux protéases<sup>440</sup>. Toutefois, le caractère infectieux de cette population senPrP<sup>Sc</sup> n'est pas définitivement tranché. En effet, la perte d'infectiosité consécutive à un traitement par la PK ou la thermolysine est identique. Or, la thermolysine préserve une large part de la PrP<sup>Sc</sup> contrairement à la PK. Il semblerait donc que la fraction senPrP<sup>Sc</sup> résistant à la thermolysine soit peu infectieuse<sup>115</sup>. A l'opposé, dans une autre étude, la digestion par la PK d'inoculum infectieux, issus de différents agents propagés sur hamster, n'a eu que peu d'effet sur le temps d'incubation<sup>119</sup>. Il a été proposé que l'utilisation de fractions insolubles plutôt que des homogénats complets ait entraîné l'élimination des fractions solubles infectieuses. En partant de cette hypothèse, le potentiel infectieux associé aux différents états d'agrégation de la PrP<sup>Sc</sup> a été évalué. Cette étude a confirmé que le profil de sédimentation correspondant aux particules les plus infectieuses, n'est pas toujours superposable à celui du pic de sédimentation contenant la majorité de PrP<sup>res</sup>. Il semble que ce phénomène varie en fonction de l'agent étudié<sup>432</sup>.

## **1.5. Nature de l'agent transmissible**

Différentes hypothèses historiques concernant la nature des agents responsables des EST ont été émises. Elles vont du sarcocyste (petit parasite unicellulaire du porc et du mouton), au virus en passant par des lipides membranaires et des polysaccharides<sup>396</sup>. L'hypothèse d'une origine virale comme agent causal des EST a longtemps prévalu.

### **1.5.1. La théorie du « virino »**

L'implication d'un lentivirus de petite taille, puis d'un acide nucléique entouré de protéines et de lipides de l'hôte (dénommé virino) a longtemps été considéré comme la cause la plus probable des EST<sup>139</sup>.

L'hypothèse du « virino » permettait d'apporter une explication à l'absence de réaction immunitaire spécifique chez les hôtes infectés : le génome de l'agent infectieux étant protégé par des protéines de l'hôte. Elle permettait également d'expliquer le rôle central à la PrP au sein des SAF<sup>71, 137</sup>.

L'identification d'acides nucléiques étant essentielle à la démonstration de cette théorie, de nombreux travaux visant à démontrer leur présence ont été entrepris. Des images de SAF, hébergeant une structure monobrin sensible aux nucléases, ont été obtenues<sup>320</sup>. Toutefois, les SAF ne sont observées qu'à partir de préparations traitées aux détergents, et cet aspect morphologique est possiblement plus un artéfact de préparation qu'un caractère propre. Il est toutefois apparu qu'une quantité non négligeable d'acides nucléiques était présente dans les préparations de SAF infectieuses et différentes études ont démontré l'affinité de la PrP<sup>res</sup> pour les acides nucléiques endogènes<sup>7</sup> ou synthétiques<sup>458</sup> (ARN).

Des expériences de sédimentation en gradients de sucrose, à partir de broyat de tissu contaminé, indiquent que l'infectiosité est associée à une fraction dont la densité (120 S) est compatible avec celle de particules virales<sup>308, 411</sup>. A partir de cette fraction il a été montré que l'infectiosité co-purifiait avec des complexes protéine-acides nucléiques<sup>409</sup>. Toutefois, les acides nucléiques présents dans la fraction infectieuse semblent pouvoir être digérés (<80bp) sans réelle altération du titre infectieux<sup>247, 323, 383</sup>.

En dehors de l'existence ou non d'acides nucléiques viraux, il semble qu'un mécanisme caractéristique des infections virales, l'interférence, puisse être mis en évidence dans les EST expérimentales. Chez des souris inoculées avec une souche de MCJ (lente) puis ensuite avec une souche de GSS (rapide), la durée d'incubation est identique à celle observée chez les souris inoculées uniquement avec la souche lente, avec un allongement significatif par rapport aux souris inoculées uniquement avec la souche rapide<sup>307</sup>. Outre la période d'incubation, le phénomène d'interférence a été mis en évidence dans l'apparition des signes cliniques, caractéristiques de la souche lente.

### **1.5.2. Le prion : du concept à la démonstration**

Sur la base des travaux de Pattison et de l'hypothèse formulée par Griffith à la fin des années 60, Stanley Prusiner énonça au début des années 80 le concept de prion (*Proteinaceous infectious particle*), postulant que l'isoforme anormale de la PrP est le constituant principal,

voire unique de l'agent infectieux<sup>367</sup>. Dans le postulat initial, la conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> est un processus auto-catalytique dont l'ensemble des intervenants est de nature exclusivement protéique<sup>368</sup>.

La découverte, dans les années qui ont suivi, des SAF, de la PrP et du gène *PRNP* est venue conforter cette hypothèse. Un argument de poids en faveur du concept Prion fut la démonstration de la résistance à la maladie et de l'incapacité à propager l'agent infectieux des souris invalidées pour le gène *Prnp*<sup>392, 459</sup>. Dans ces souris, la réintroduction du gène restaurait la sensibilité à la maladie<sup>77</sup>.

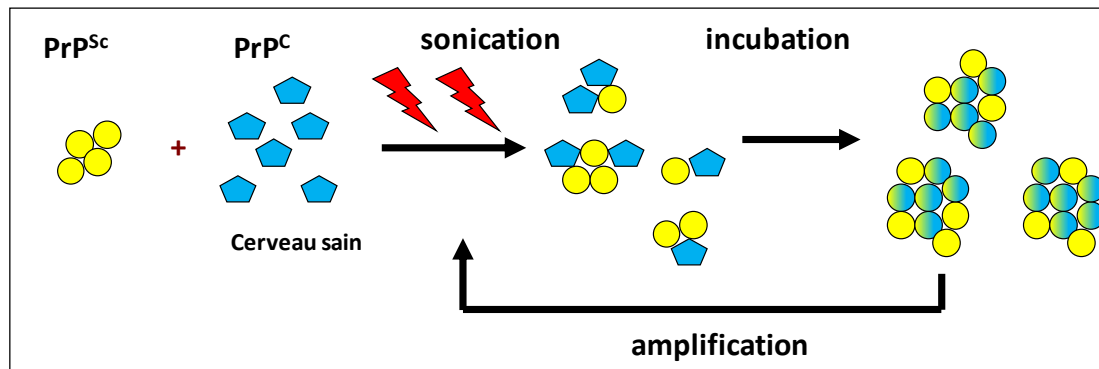
Toutefois, si ces travaux ont démontré que l'expression de la PrP<sup>C</sup> est nécessaire à l'infection, ils n'apportent pas la preuve définitive que la PrP<sup>Sc</sup> soit le principal (sinon, le seul) composant de la particule infectieuse. La démonstration de ce principe central du concept Prion aura nécessité près d'une vingtaine d'années.

La démonstration finale du concept Prion provient de la capacité à transmettre une EST authentique (*i.e* transmissible en passages consécutifs par bioessai) par inoculation d'une protéine PrP recombinante d'origine bactérienne trans-conformée *in vitro*, à des animaux conventionnels (non transgéniques)<sup>300</sup>.

C'est toutefois les méthodes de propagation *in vitro* des agents des EST qui ont permis de mieux comprendre les acteurs impliqués dans le processus de réplication des Prions.

La démonstration de la capacité des agents des EST à se propager *in vitro* provient d'expériences où un homogénat de cerveau infectieux est mélangé à un homogénat de cerveau négatif. Après incubation, une très faible quantité de PrP<sup>Sc</sup> néoformée, issue de la trans-conformation de la PrP<sup>C</sup> présente dans le substrat est détectable dans le mélange réactionnel<sup>48</sup>. Une telle conversion est cependant trop peu efficace pour permettre l'étude des mécanismes de conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup><sup>54</sup>.

A partir de 2001, une nouvelle technique appelée PMCA pour *Protein Misfolding Cyclic Amplification* est apparue. Elle permet de reproduire *in vitro* le processus de conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> avec une très grande efficacité<sup>388</sup>. Elle consiste en la mise en contact d'un noyau de PrP<sup>Sc</sup> avec un substrat contenant de la PrP<sup>C</sup>. Ce substrat est généralement composé d'un homogénat de cerveau en milieu détergent. Le mélange réactionnel est soumis à une succession de phases de sonication et d'incubation au cours desquelles des molécules de PrP<sup>C</sup> contenues dans le substrat vont être converties en PrP<sup>Sc</sup><sup>92</sup> (Figure 7).



**Figure 7: Schéma théorique du processus d'amplification de la PrP<sup>Sc</sup> par la PMCA**

Ce processus permet de propager indéfiniment un prion dans un substrat contenant une PrP<sup>C</sup> convertible. Il nécessite l'utilisation de niveaux extrêmement faible de PrP<sup>Sc</sup> pour initier la réaction d'amplification. La PrP<sup>Sc</sup> générée est infectieuse et les caractères phénotypiques de l'agent propagé sont identiques à celui ayant servi à ensemercer la réaction<sup>91</sup>.

Le principe théorique de la PMCA repose sur une fragmentation des agrégats de PrP<sup>Sc</sup> polymérisés par la sonication. Cette fragmentation permettrait de générer des noyaux infectieux, capables de convertir des molécules de PrP<sup>C</sup> présentes dans le substrat. Toutefois, les mécanismes réellement impliqués dans cette propagation *in vitro* des Prions restent inconnus.

La PMCA a été utilisée pour identifier la nature des composés biochimiques nécessaires à la propagation des Prions à l'aide de substrats semi-synthétiques (composés biochimiques purifiés à partir de tissus) ou synthétiques<sup>172</sup>. Ces travaux ont démontré qu'en plus de la PrP (extractive ou recombinante), la présence de molécules poly-anioniques (ARN messager ou ARN poly-A synthétique) ainsi que de phospholipides étaient les éléments cruciaux à l'amplification des Prions par PMCA<sup>121, 336, 454</sup>

La destruction des ARN présents dans le mélange réactionnel après amplification *in vitro* n'affecte en rien les niveaux d'infectiosité des Prions ainsi propagés. Cela indique que les ARNs ne participent pas directement à la structure de la particule infectieuse<sup>364</sup>.

Une adaptation progressive, au fil des cycles d'amplification *in vitro* d'un prion, permet de propager des formes biochimiquement anormales de PrP (PK résistante et insoluble dans les détergents) en présence de la seule PrP recombinante (en l'absence de tout autre cofacteur). Toutefois, l'infectiosité associée à ces formes de PrP est nulle ou très faible<sup>123</sup>. Ces résultats impliquent que la présence de phospholipides au cours du processus de répllication est au

minimum nécessaire au maintien du caractère infectieux des Prions et qu'une participation de cet élément à la structure même du Prion ne peut être exclue.

### 1.5.3. Modèles de répllication des Prions

La génération *de novo* d'un prion à partir de PrP recombinante et de composés synthétiques place la conversion et le changement de conformation de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> au centre de la répllication des agents des EST<sup>454</sup>. Si les bases moléculaires du mécanisme de conversion ne sont pas complètement élucidées, plusieurs modèles ont été proposés.

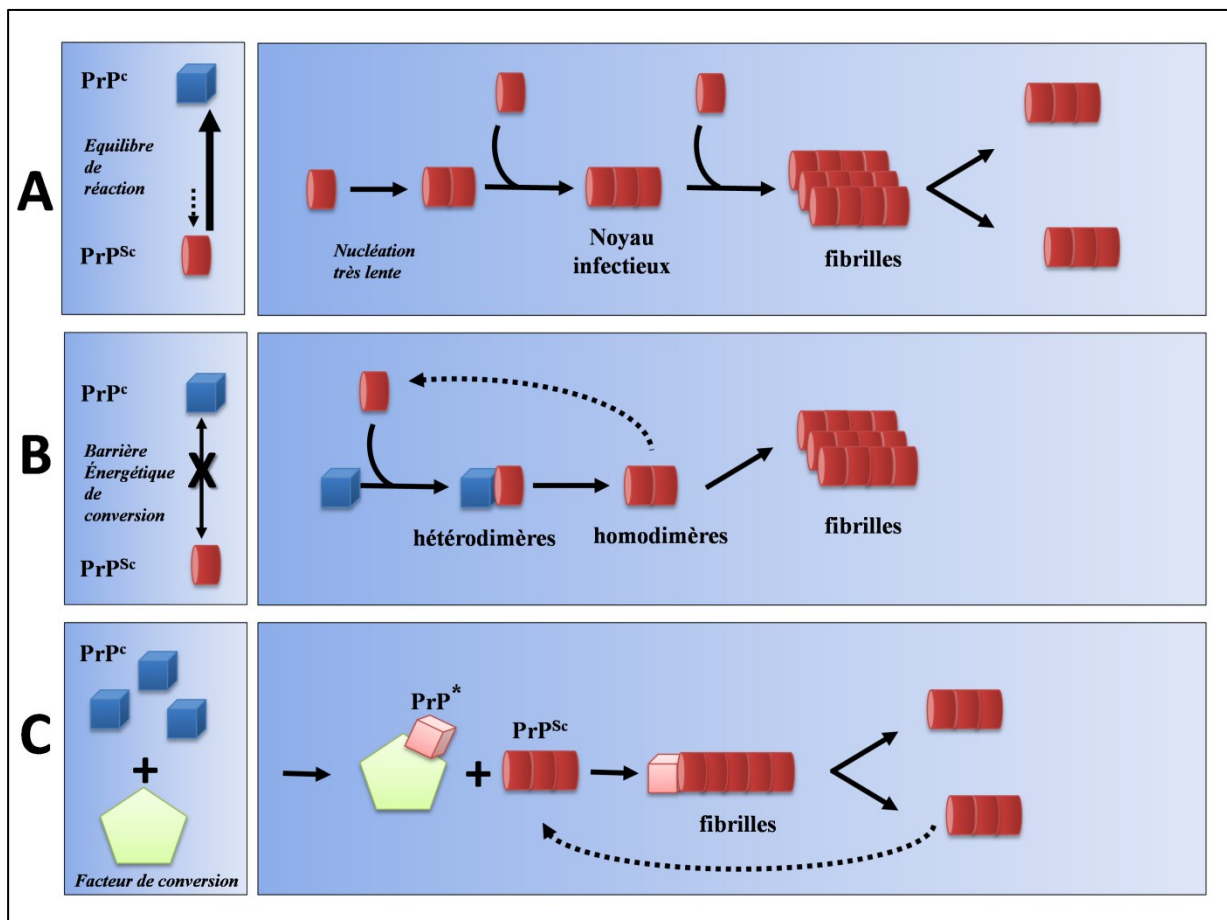
Dans le modèle dit de nucléation-polymérisation (*seeded-nucleation*), la PrP<sup>Sc</sup> monomérique existe à l'état d'équilibre avec la PrP<sup>C</sup><sup>238, 258</sup> (Figure 8A). Cet équilibre est largement en faveur de la PrP<sup>C</sup> d'un point de vue thermodynamique. La PrP<sup>Sc</sup> monomérique représenterait une isoforme mineure et transitoire et ne serait stabilisée qu'en cas de formation d'agrégats ordonnés. Les oligomères stabilisés agiraient comme des noyaux, permettant de recruter la PrP<sup>Sc</sup> monomérique au sein des polymères. Ce processus est plus rapide que l'étape de formation du noyau initial de PrP<sup>Sc</sup>. Dans cette théorie, la PrP<sup>Sc</sup>, sous sa forme monomérique, ne serait pas infectieuse et l'agent infectieux consisterait en un agrégat d'ordre supérieur des molécules de PrP<sup>Sc</sup><sup>404</sup>.

Dans le modèle auto-catalytique (*template-directed refolding*), la PrP<sup>Sc</sup> contient les instructions de repliement nécessaires au changement de conformation de la PrP<sup>C</sup> suite à l'interaction des deux isoformes (Figure 8B). Le processus de conversion implique d'abord la formation d'une unité hétérodimérique PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup> qui initierait le changement conformationnel de la PrP<sup>C</sup>, et qui générerait une unité homodimérique de PrP<sup>Sc</sup>. Cette dernière interagirait ensuite avec d'autres dimères de PrP<sup>Sc</sup>, avec pour conséquence la formation d'agrégats de plus en plus massifs. Dans ce modèle, l'unité infectieuse est le monomère de PrP<sup>Sc</sup>, et la formation de plus grands agrégats n'est pas nécessaire à la répllication des Prions. Des données récentes sont en désaccord avec ce modèle : elles suggèrent que les particules au potentiel infectieux le plus élevé seraient des structures agrégées composées de 14 à 28 unités de PrP<sup>Sc</sup>, alors que les petits oligomères seraient non infectieux<sup>404</sup>.

Enfin plus récemment, un modèle de répllication, nommé modèle de nucléation assistée a été proposé<sup>2</sup> (Figure 8C). Il ferait intervenir la formation d'un état structural intermédiaire (PrP\*), différent de la PrP<sup>Sc</sup>, capable de promouvoir le changement de conformations de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>.



Malgré tout l'intérêt qu'ils présentent, ces modèles demeurent purement théoriques et les interactions moléculaires impliquées dans la réplication *in vivo* des Prions restent à découvrir.



**Figure 8 : Modèles de conversion de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>**

(A) **Modèle de nucléation-polymérisation** : la PrP<sup>C</sup> et la PrP<sup>Sc</sup> sont dans un état d'équilibre thermodynamique réversible très en faveur de la PrP<sup>C</sup>. La PrP<sup>Sc</sup> monomérique ne peut être recrutée et agrégée en amyloïdes que si un noyau de nucléation hautement ordonnée a été préalablement formée. Au sein du noyau, la PrP<sup>Sc</sup> est stabilisée. La fragmentation de la PrP<sup>Sc</sup> augmente le nombre de noyau et entraîne la réplication de l'agent infectieux. (B) **Modèle autocatalytique** : l'interaction entre une PrP<sup>Sc</sup> exogène et la PrP<sup>C</sup> endogène provoque le changement de conformation de cette dernière et sa conversion en PrP<sup>Sc</sup>. L'existence d'une barrière énergétique très importante entre ces deux isoformes empêcherait la conversion spontanée de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. (C) **Modèle de nucléation assistée** : La PrP<sup>Sc</sup> n'existe pas sous forme monomérique et requiert 2 réarrangements structuraux successifs pour former les oligomères infectieux de PrP<sup>Sc</sup>. La PrP<sup>C</sup> passe par un état intermédiaire PrP\* après interaction avec un facteur de conversion endogène. D'après<sup>6</sup>.

## 2. SOUCHES, BARRIERES DE TRANSMISSION ET DIVERSITE BIOLOGIQUE DES AGENTS DES EST

En 1961, Pattison et Millson rapportèrent que des chèvres inoculées avec un même pool d'homogénats de cerveaux de moutons atteints de tremblante (inoculum SSBP/1, *scrapie sheep brain protocol/1*) développaient deux formes distinctes de maladie. L'une de ces formes était caractérisée par de la somnolence (*drowsy*) alors que la seconde était dominée par un prurit intense (*scratchy*).

Ces caractéristiques cliniques distinctes étant transmissibles lors de passages itératifs homospécifiques (chèvre à chèvre) ; ils en déduisirent qu'ils étaient liés à la nature de l'agent infectieux<sup>351-353</sup>.

Ces éléments associés à d'autres observations, comme l'hétérogénéité de résistance de l'infectiosité aux traitements décontaminants, notamment la chaleur<sup>138</sup>, suggérèrent rapidement l'existence d'une diversité biologique des agents responsables des EST.

### 2.1. Notion de souche appliquée aux Prions

En l'absence de données relatives à la nature de l'agent infectieux, l'étude de la diversité biologique des agents des EST a été initialement abordée en utilisant leur transmissibilité.

La mise en évidence au début des années 1960 de la capacité des rongeurs « conventionnels » (hamster et souris) à propager une partie des isolats de tremblante par le NPU (Neuro-Pathogenesis Unit) à Edimbourg a ouvert la voie à près de quatre décennies de travaux visant à décrire, par des « bioessais » sur des lignées de souris conventionnelles, la diversité des agents responsables des EST chez les différentes espèces de mammifères.

L'approche repose sur l'inoculation (3 à 4 passages itératifs) par voie intracérébrale des isolats d'EST, à un panel de lignées de souris VM, C57Bl6, C57Bl6 x VM et RIII<sup>67, 68</sup>.

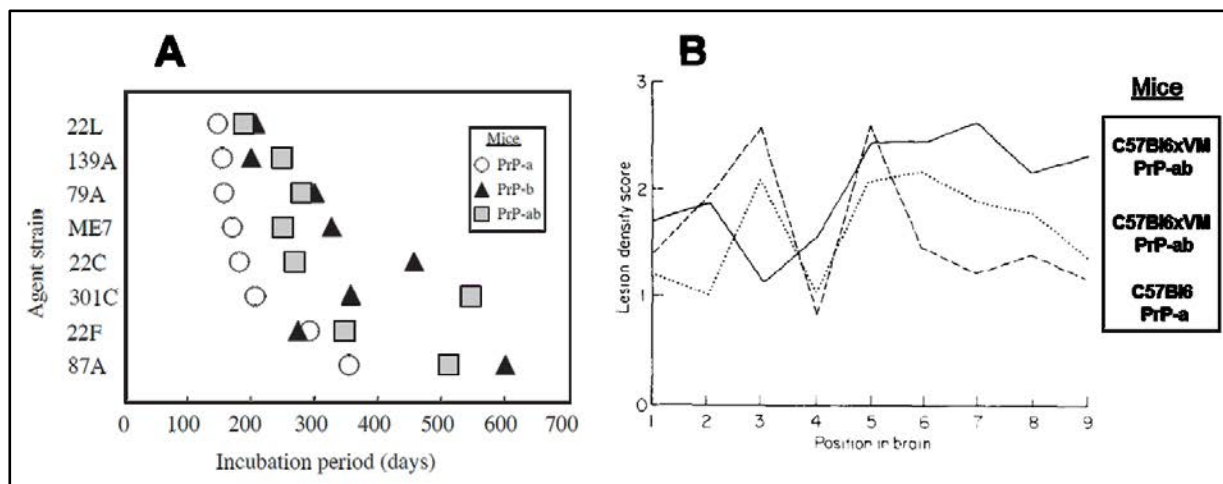
L'inoculation d'un isolat d'EST à des souris de même lignée, se traduit généralement en premier passage, par une phase asymptomatique longue et une efficacité de transmission limitée. Dans quasiment la moitié des cas, aucune transmission n'est observée.

Au cours des passages suivants, la durée d'incubation diminue progressivement et le taux d'attaque (nombre de souris malades/ nombre de souris inoculées) augmente pour atteindre 100%. Ces deux paramètres se stabilisent en général après 2 à 3 passages<sup>69</sup>. La stabilisation des durées d'incubation s'accompagne d'une uniformisation inter-individuelle de l'intensité et de la distribution des lésions vacuolaires dans 11 zones définies de l'encéphale, définissant un profil lésionnel<sup>160</sup>, chez les souris d'une même lignée inoculées par un même isolat<sup>161</sup>.

L'accumulation des données obtenues dans les différentes lignées de souris (passages d'isolats divers) a amené au constat que les durées d'incubation combinées au profil lésionnel, permettaient de distinguer de manière robuste et reproductible différents agents des ESTs.

De ces travaux, a émergé le concept qu'à un phénotype particulier (durée d'incubation et profil lésionnel) était associé un agent transmissible biologiquement stable, dénommé « souche ». En d'autres termes, la transmission de deux isolats d'EST à une lignée de souris conventionnelle, conduisant à un même tableau phénotypique, implique probablement la même souche. En revanche, lorsque la transmission de deux isolats d'EST conduit dans une lignée donnée à deux tableaux phénotypiques distincts, au moins deux souches différentes sont présentes dans ces isolats.

Le panel de lignées de souris congéniques utilisées pour le typage biologique présente la particularité, pour une même souche d'agent, d'aboutir à des durées d'incubation très différentes. Pour une même souche, les durées d'incubation peuvent varier de plusieurs centaines de jours d'une lignée à l'autre<sup>69</sup>. Avec la découverte de la protéine Prion, il est apparu que cette propriété était liée à un polymorphisme au codon 108 (L/F) de la PrP<sup>467</sup>. Les deux allèles *Prnp-a* et *Prnp-b*, sont exprimés respectivement chez les souris C57Bl6 et VM (Figure 9).

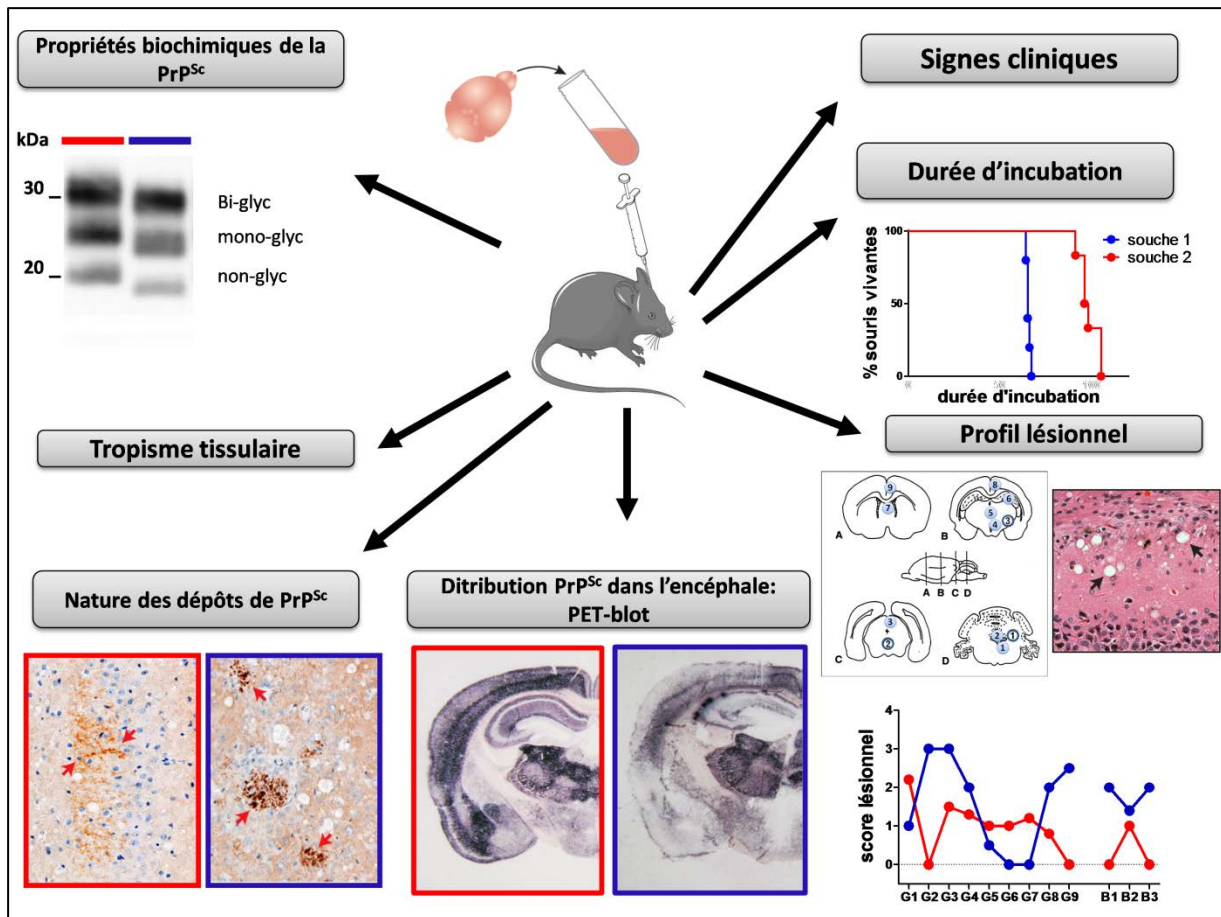


**Figure 9: Principe du typage biologique des Prions par inoculation sur souris**

(A) durée d'incubation de huit souches d'EST chez les souris de différents génotypes. (B) profils lésionnels de la souche ME7 après inoculation dans les mêmes lignées de souris. D'après<sup>69, 161</sup>

Ces deux paramètres biologiques demeurent les critères essentiels utilisés pour caractériser une souche de prion chez la souris, même si, suite au développement des connaissances sur la nature de l'agent transmissible, d'autres éléments ont été progressivement pris en compte

(Figure 10). Il s'agit notamment de la présence de plaques amyloïdes<sup>477</sup> ou de la distribution de la protéine Prion anormale dans l'encéphale, visualisée par histo blot, PET blot (*Paraffin-embedded tissue blot*)<sup>26, 284, 397</sup> ou par immunohistochimie<sup>11, 206</sup>.



**Figure 10: Typage des souches d'agents responsables des EST**

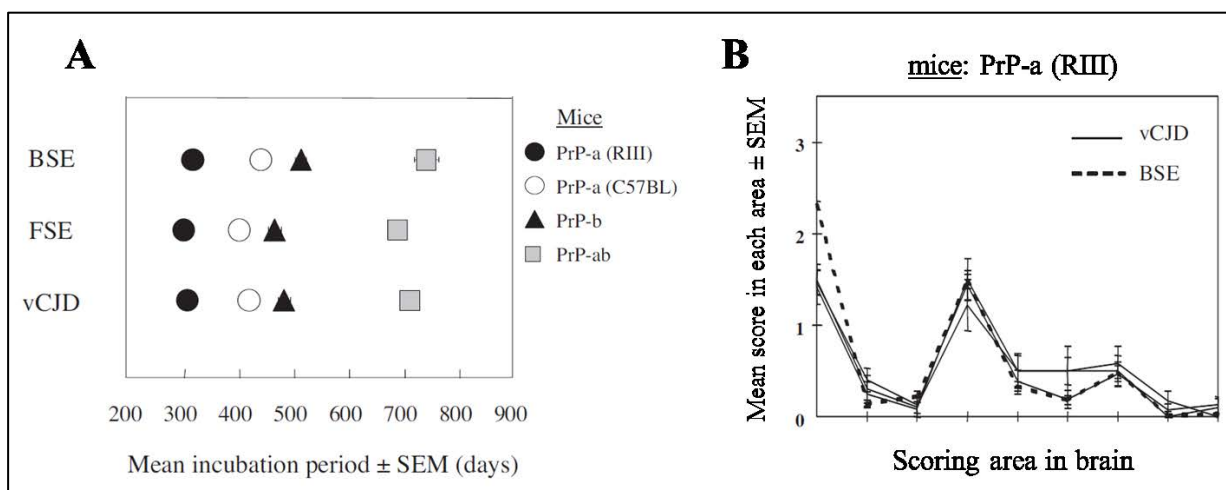
Ce typage biologique est théoriquement réalisable dans d'autres espèces de rongeurs, que la souris (Hamster, campagnol, etc.). Toutefois, l'absence de lignées congéniques avec des génotypes *Prnp* différents limite son intérêt. Des résultats probants ont cependant été obtenus avec le hamster<sup>45, 46</sup> ou le campagnol roussâtre<sup>337, 455</sup> dans la différenciation de certaines souches d'EST.

## 2.2. Identification de l'agent l'ESB : apport déterminant du typage sur souris conventionnelles

L'épidémie d'ESB qui s'est propagée dans les cheptels bovins en Europe à partir du milieu des années 80 a entraîné la création d'un réseau européen de surveillance. Au plan épidémiologique, l'émergence chez l'homme du vMCJ dans le pays où l'exposition

alimentaire à l'agent de l'ESB avait été la plus forte, suggéra une cause commune à ces deux affections, soulevant rapidement la nécessité d'outils permettant d'identifier l'implication de cet agent.

Cette hypothèse fut validée par des essais de transmission *in vivo*. L'inoculation d'un isolat d'ESB issu de bovin aux lignées de souris C57Bl6, RIII et Vm, conduit à une signature phénotypique spécifique de cette « souche »<sup>67, 75, 159</sup>. Les mêmes caractéristiques (durée d'incubation et de profil lésionnel) ont été obtenues à partir de tissus de patients atteints par le vMCJ, ou issus de Koudou, de chat, de porc, et de moutons inoculés ou naturellement contaminés par de l'ESB bovine. Ces résultats ont permis de confirmer que l'agent de l'ESB était responsable des cas d'EST observés chez ces différentes espèces<sup>70</sup>.



### Figure 11: illustration de la stabilité de l'agent de l'ESB

(A) durées d'incubation dans les différentes lignées de souris conventionnelles, pour un isolat d'ESB (BSE), d'encéphalopathie spongiforme féline (FSE) et de vMCJ (vCJD). (B) Comparaison des profils lésionnels obtenus chez des souris RIII inoculées avec 3 isolats de vMCJ (trait plein) et un isolat d'ESB (pointillés). D'après<sup>69</sup>.

Ce succès de la méthode classique de typage de souche est indéniable et a fait de cette approche, la référence pour la caractérisation des Prions pendant de longues années. Cependant, malgré tout l'intérêt qu'il présente, le typage biologique des agents des EST sur souris conventionnelles présente des limites opérationnelles et conceptuelles qui amènent à s'interroger sur sa capacité à rendre compte de manière pertinente de la diversité réelle de ces agents.

## **2.3.Limites opérationnelles du typage biologiques des souches**

### **2.3.1. Un isolat et plusieurs souches ?**

Chez les chèvres inoculées par les isolats « Drowsy » ou « Scratchy », les caractéristiques de la maladie sont stables, ce qui suggère qu'elles sont toutes deux atteintes par une souche unique et distincte de tremblante. Toutefois, lorsqu'un isolat Scratchy (identifié 79) et un isolat Drowsy (identifié 22) sont passés en série sur des souris VM et C57Bl6 jusqu'à stabilisation, les durées d'incubation et les profils lésionnels permettent de distinguer non pas deux mais quatre souches.

L'isolat 79 passé en série sur la souris C57Bl6 (79A) et inoculé ensuite aux souris Vm et C57Bl6 donne des résultats différents en termes de profil lésionnel et de durée d'incubation, par rapport au même isolat passé en série sur les souris VM (79V) puis inoculé aux C57Bl6 et VM. Un phénomène similaire est observé pour l'isolat 22 qui génèrera deux phénotypes distincts et stables, après avoir été passé sur les souris C57Bl6 ou VM, respectivement 22C et 22H. Dans tous les cas de figure (22A-22H-79A-79V), le profil lésionnel et la durée d'incubation sont stables tant que le fond génétique des lignées de souris, sur lesquelles l'agent est propagé, n'est pas modifié<sup>134</sup>.

Au regard de la définition originale, 22A-22H-79A-79V sont des souches distinctes. Or, la stabilité primaire des phénotypes observés sur les chèvres laissait supposer qu'il n'y avait que deux souches.

Pour expliquer ce phénomène, il est possible d'envisager en premier lieu que l'isolat initial ne contenait pas une, mais bien plusieurs souches. Lors de l'inoculation aux deux lignées de souris, la souche la mieux adaptée à ce nouvel hôte, c'est-à-dire celle qui présentait la durée d'incubation la plus courte, se serait imposée. Le phénotype obtenu serait alors celui de cette souche « rapide ». Cette hypothèse s'appuie sur le fait qu'à partir de divers isolats naturels (issus d'individus et de troupeaux différents), des couples de phénotypes identiques sont isolés de façon répétable après passages multiples sur souris C57Bl6 et VM<sup>73, 136</sup>.

L'autre hypothèse envisageable est l'adaptation d'un agent unique à l'hôte. L'agent serait spontanément capable de produire des variants (ou mutants), et c'est le variant le mieux adapté qui s'imposerait.

### **2.3.2. Clonage par dilution limite et co-infection**

Afin de s'affranchir de la présence possible de plusieurs souches dans un même inoculum, l'utilisation d'une approche de clonage en dilution limite, comme pratiquée en virologie, a été

suggérée. Celle-ci s'effectue par passages successifs en dilution limite d'infectiosité sur une lignée de souris. Toutefois, aucune garantie n'existe quant à l'efficacité de la technique<sup>136</sup>.

Un mélange stable de deux souches ME7 et 22C a pu être propagé une dizaine de fois par inoculation intracérébrale à une lignée de souris (C57Bl6); dans ces conditions c'est le phénotype de la souche ME7 qui s'impose. Toutefois la souche 22C peut ensuite être recouvrée, par inoculation intra-péritonéale de ce dixième passage en série. En effet, lors d'inoculation intrapéritonéale, la souche 22C est plus rapide que la souche ME7. Le phénotype retrouvé après les 10 passages est celui de la 22C. Toutefois, un clonage en dilution limite (inoculation intracérébrale) de l'isolat, permet d'éliminer, autant qu'il soit possible de le déterminer, la souche 22C<sup>72</sup>.

A partir d'un isolat composé potentiellement de plusieurs souches, le clonage biologique permet la mise en évidence de la souche la mieux adaptée, mais réduit donc également la capacité d'évaluer la diversité des souches.

### **2.3.1. Evolution spontanée des souches de prion**

A partir de souches clonées par dilution limite, des modifications du phénotype de la souche peuvent être observées. Ces modifications peuvent être spontanées ou correspondre à une modification de l'environnement hôte de la souche. Certaines souches clonées par dilution limite apparaissent instables. Par exemple, la souche 87A a été régulièrement obtenue à partir d'isolat de tremblante ovine naturelle<sup>135</sup> propagé sur souris C57Bl6. Elle demeure stable lorsqu'elle est inoculée à faible dose, par voie IC, sur cette lignée. Toutefois, lorsque l'inoculation est réalisée (toujours sur C57Bl6) à plus forte dose, il arrive que le phénotype de la souche évolue. Le phénotype de la nouvelle souche obtenue est invariablement le même et correspond à la souche ME7<sup>71</sup>.

## **2.4. Barrières de transmission et limites conceptuelles du typage souche**

Le typage de souche, tel que présenté, repose sur la transmission à des modèles rongeurs conventionnels, d'un isolat issu d'une espèce tierce ; c'est à dire à une transmission d'un prion entre individus appartenant à deux espèces différentes.

Or, il est rapidement apparu, alors même que le typage de souche se développait, que le passage hétérosécifique des agents des EST impliquait un phénomène extrêmement complexe, baptisé barrière de transmission, susceptible d'influer directement sur les caractères de souche. De surcroît, la transmission d'un agent des EST entre des espèces

différentes peut, selon les cas, aboutir à des résultats radicalement différents, en fonction de la combinaison hôte donneur /agent (souche)/ hôte receveur considérée.

#### **2.4.1. Absence de propagation / Infection asymptomatique chronique**

Un hôte peut s'avérer en apparence, totalement réfractaire à l'infection. L'absence de propagation d'isolats de tremblante classique issus d'ovins de génotypes ARQ/ARQ (codons 136,154, 171 du gène *PRNP*)<sup>73</sup> ou des agents responsables de la maladie du dépérissement chronique des cervidés (CWD)<sup>42</sup> à la souris conventionnelle en sont des exemples très représentatifs.

Cette absence de transmission aux souris conventionnelles apparaît d'emblée comme un écueil majeur à toute tentative de dresser un panorama exhaustif des Prions circulants chez les différentes espèces de mammifères.

Ces échecs de transmission ont abouti à considérer, que certains hôtes pourraient être totalement réfractaires aux infections à Prions. Ainsi, le phénomène de barrière de transmission pouvait constituer, en conditions naturelles d'exposition, une protection sinon absolue, en tout cas très efficace contre la propagation interspécifique de nombreux agents. L'absence de transmission de différents Prions (Tremblante, CJD) au lapin<sup>177</sup> illustre parfaitement cette situation. Toutefois, des expériences récentes ont permis de démontrer que le lapin était, à l'instar de nombreuses autres espèces, susceptible de propager l'agent de l'ESB<sup>101, 449</sup>.

Des observations récurrentes faisaient état de l'impossibilité de transmettre à la souris conventionnelle, la souche de tremblante 263K adaptée au hamster<sup>252</sup>. Des investigations plus poussées ont permis de mettre en évidence la présence chez les souris inoculées, de niveaux substantiels d'infectiosité en l'absence de signes cliniques, plusieurs mois après l'infection<sup>220, 377</sup>. Après la même durée d'incubation, aucune infectiosité n'était plus décelable chez des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> inoculées<sup>375</sup>. Ces informations suggèrent fortement la capacité de la souche 263K à se répliquer à bas bruit (dépendance de l'expression de la PrP<sup>C</sup>?) chez la souris sans entraîner le développement de troubles cliniques.

De la même manière, alors que la transmission d'isolats de MCJ aux souris conventionnelles n'aboutit que rarement à la propagation d'une maladie clinique (même après plusieurs passages en aveugle), la ré-inoculation des tissus issus de ces souris permet la propagation d'une MCJ chez le campagnol, modèle par ailleurs décrit comme très sensible à la MCJ<sup>337</sup>.



Enfin, des travaux plus récents ont permis de démontrer, chez des rongeurs, la capacité de différents agents d'EST à se propager et se répliquer dans les tissus lymphoïdes, sans développer ni signes cliniques, ni accumulation détectable de Prion dans leur système nerveux central<sup>41</sup>. Ces dernières observations interrogent directement le concept de barrière de transmission et la façon même dont elle est expérimentalement abordée depuis plusieurs décennies.

#### **2.4.2. Conservation des propriétés biologiques et phénotypiques**

Lors de la transmission entre individus de la même espèce, les propriétés phénotypiques des agents des EST sont généralement conservées. De la même manière, la transmission d'un prion d'une espèce A à une espèce B, puis son retour à l'espèce A, aboutit dans certains cas à la propagation d'un agent ayant des propriétés phénotypiques identiques à celle du Prion d'origine. C'est le cas notamment de certaines souches de tremblante murine, comme ME7 pour laquelle le passage sur le rat n'altère pas le phénotype observé chez la souris<sup>249</sup>. De même, l'agent responsable de l'ESB semble avoir une forte capacité à conserver ses propriétés phénotypiques originales dans un large panel de modèles animaux rapporteurs, après sa propagation à différents hôtes intermédiaires<sup>67, 75, 89, 148</sup>.

Ces observations pourraient laisser penser que la capacité d'une souche à conserver un phénotype stable lors de passage interspécifique est une propriété intrinsèque de l'agent. Pourtant, les expériences menées sur les souches de tremblante adaptées à la souris ont permis de démontrer qu'aucune règle simple ne semblait prévaloir. En effet, alors qu'après un passage intermédiaire chez le rat ou le hamster, la souche ME7 conserve ses propriétés phénotypiques originales chez la souris, la souche 139A demeure stable après passage au rat mais subit une modification radicale de son phénotype, après passage intermédiaire sur le hamster<sup>249, 254</sup>.

#### **2.4.3. Emergence d'un agent de phénotype différent.**

Ce phénomène, initialement dénommé « Mutation », en référence à l'évolution brutale des caractéristiques biologiques d'autres agents infectieux (virus, bactérie), a été très tôt rapporté pour les agents des EST<sup>71</sup>.

L'un des exemples le plus classiquement cité est celui d'un isolat de TME (Transmissible Mink Encephalopathy), une EST du vison<sup>45</sup>. Comme dans les travaux de Pattison chez la chèvre, le passage en série chez le hamster d'un isolat de TME provoque deux formes cliniques distinctes, caractérisées respectivement par de la somnolence (souche DY pour *drowsy*) ou de l'hyperexcitabilité (HY pour *hyperexcitability*). Outre les symptômes, ces deux

souches se distinguent par leurs durées d'incubations, respectivement 168 et 65 jours<sup>47</sup>. De manière assez spectaculaire, après 4 passages sur le hamster, l'agent DY reste transmissible au vison alors que l'agent HY ne semble plus capable de se propager dans cet hôte<sup>45</sup>. Ces données ne sont pas en faveur d'une préexistence du composé HY dans l'isolat d'origine, mais suggèrent que cet agent à émerger *de novo* à la faveur de la propagation interspécifique initiale.

D'autres éléments expérimentaux, toujours issus des modèles rongeurs de la maladie, viennent témoigner de la capacité des EST à évoluer phénotypiquement à la faveur de transmission interspécifique.

La souche de tremblante murine Chandler peut être expérimentalement propagée au hamster. Lors des quatre premiers passages sur ce modèle, une réduction progressive des durées d'incubation est observée, signature classique d'une adaptation à un nouvel hôte<sup>251</sup>. L'inoculation à des souris d'un homogénat de cerveau de hamster au 3ème passage permet d'obtenir, chez certains animaux, la propagation d'un agent dénommé 431K, différent de la souche Chandler, et hautement transmissible à la souris. Par contre, l'inoculation des homogénats issus de passages ultérieurs (souche 263K sur modèle hamster) ne permet plus de propagation d'une maladie clinique chez la souris<sup>252</sup>.

## **2.5. Déterminants des barrières de transmission**

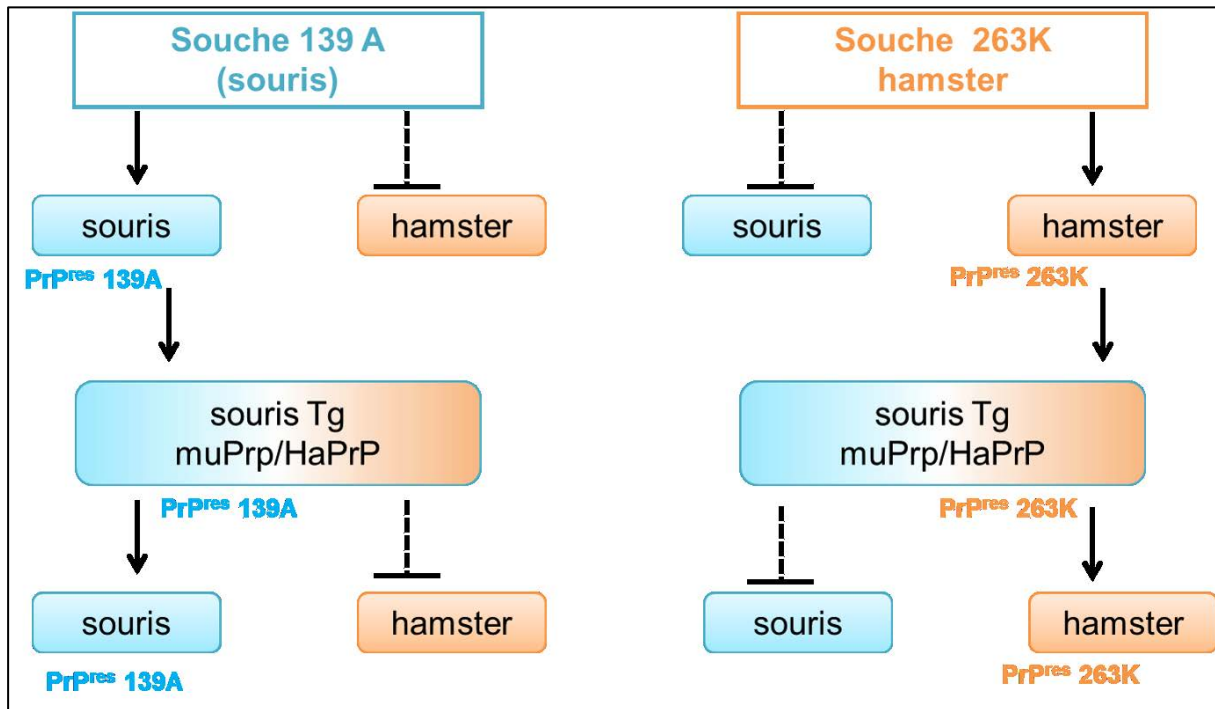
Bien que le phénomène de barrière de transmission soit largement documenté, il reste aujourd'hui encore impossible de prédire la capacité d'un agent à se propager d'une espèce à une autre et/ou le phénotype du Prion qui sera issu de cette propagation. Malgré ces limites, les principaux déterminants du phénomène de barrière de transmission semblent identifiés.

### **2.5.1. Séquence de la protéine PrP des hôtes donneurs et receveurs**

Historiquement, la preuve du rôle majeur de la séquence de la protéine PrP dans le phénomène de barrière d'espèce a été apportée par les premiers modèles d'animaux transgéniques pour le gène *PRNP*. En effet, alors que la souche 263K de hamster ne peut être propagé chez la souris conventionnelle<sup>252</sup>, ce prion se propage efficacement chez des souris exprimant la PrP<sup>C</sup> de hamster<sup>398</sup>. Ces expériences ont rapidement abouti au concept, que le phénomène de barrière de transmission résidait essentiellement dans les différences de séquence entre les PrP des hôtes donneurs et receveurs (Figure 12).

Cette découverte est à l'origine du développement, au cours des 20 dernières années, d'un grand nombre de modèles transgéniques essentiellement murins, exprimant les séquences PrP

de diverses espèces<sup>191</sup>. Ces animaux sont généralement créés sur un fond génétique *Prnp*<sup>0/0</sup>, pour éviter toute interférence de la PrP<sup>C</sup> murine endogène. Ces modèles, en abolissant la barrière d'espèce, ont permis de propager des Prions qui jusqu'alors n'avaient pu l'être<sup>42</sup>.



**Figure 12: Principe de l'expérience démontrant le rôle de la PrP dans la barrière d'espèce**  
D'après<sup>398</sup>

Ce concept de barrière de transmission modulée par la nature de la séquence PrP<sup>C</sup> apporte également un cadre conceptuel, permettant d'expliquer les différences de sensibilité aux infections par les Prions, observées chez certaines espèces de mammifères, comme par exemple l'ovin ou l'homme.

Chez les ovins, un polymorphisme majeur au codon 171 (Q/R) influence en effet de manière extrêmement significative, la sensibilité des animaux à l'infection par un large spectre d'agents des EST. Le niveau de résistance conféré par le variant R171<sup>33, 147</sup> est tel qu'une démarche de sélection à l'échelle des populations, a été entreprise en Europe, afin de contrôler et d'éradiquer certaines formes de la maladie (Tremblante classique).

Chez l'homme, le polymorphisme au codon 129 (Met/Val) influence également de manière extrêmement marquée, le risque de développer les formes sporadiques (maladie d'origine

présumée spontanée) et la sensibilité apparente, à l'infection par l'agent de l'ESB chez les individus exposés (vMCJ). Les individus homozygotes Methionine/Methionine présentent un risque accru par rapport aux homozygotes Val/Val et hétérozygotes Met/Val 129<sup>318, 476</sup>.

De manière similaire, l'introduction de polymorphismes ou de mutations ponctuelles dans le gène *Prnp* murin, se traduit par une altération spectaculaire de la capacité de propagation des Prions<sup>24, 366</sup>.

### 2.5.2. Nature de l'agent, souche de prion

Bien que la protéine PrP joue un rôle essentiel dans le phénomène de barrière de transmission, la nature de l'agent considéré est lui aussi un déterminant majeur.

A titre d'exemple, les isolats de sMCJ ne peuvent être transmis qu'avec difficulté aux souris conventionnelles (gène *Prnp* murin)<sup>75, 177, 219, 337</sup>. La transmission de tels isolats à des souris exprimant différents allèles du gène *PRNP* humain (modèle *Knock in*) est plus efficace mais demeure difficile (taux d'attaque inférieur à 100%)<sup>50</sup>, alors qu'ils se propagent avec une grande efficacité chez le campagnol<sup>337</sup>, un hôte exprimant pourtant une séquence *PRNP* hétérologue.

## 2.6. Quel support pour l'information de souche ?

Le concept Prion implique que la PrP<sup>Sc</sup> soit, sinon le seul composant, du moins le composant majeur de la particule infectieuse<sup>367</sup>. Dans ce paradigme, l'information de souche doit logiquement être supportée par ces mêmes entités infectieuses.

Les premiers éléments soutenant l'hypothèse selon laquelle la PrP<sup>Sc</sup> pourrait servir de support aux caractères de souches ont été apportés par l'étude de deux isolats de prion issus du vison et propagés sur hamsters. Les souches DY et HY (cf. 2.4.3) entraînent chez le hamster<sup>45</sup> l'accumulation de deux types de PrP<sup>Sc</sup> biochimiquement différentes par (i) leur solubilité dans le N-laurylsarcosyl, (ii) leur résistance à la PK et (iii) leur profil de migration en polyacrylamide<sup>47</sup>.

Des expériences de transconformation *in vitro* de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, par de la PrP<sup>Sc</sup> issue de hamsters infectés avec les souches HY et DY, aboutirent à la production d'une PrP<sup>Sc</sup> ayant les mêmes propriétés biochimiques que celle observée dans les souches d'origine<sup>44</sup>. Des expériences similaires ont permis de démontrer que la PrP<sup>Sc</sup> elle-même, est capable d'appliquer son propre profil de glycosylation à de la PrP<sup>C</sup><sup>222, 450</sup>. Plus récemment, les méthodes de propagation *in vitro* des Prions par PMCA, ont permis de démontrer qu'il était

possible de propager un Prion de manière infinie en conservant ses caractéristiques de souches et les propriétés spécifiques de la PrP<sup>Sc</sup> <sup>90, 91</sup> (cf 1.5.3).

Ces éléments démontrent l'existence d'une variabilité biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> et, pour une séquence PrP<sup>C</sup> hôte donnée, d'une corrélation entre le phénotype biochimique de la PrP<sup>Sc</sup> et les caractères de souche.

Des expériences menées sur des fractions de PrP<sup>res</sup> (obtenues après digestion ménagée à la PK) préparées à partir d'homogénat de cerveaux de hamsters infectés par une souche de tremblante, ont suggéré que la taille des particules les plus infectieuses était comprise entre 17 et 27 nm. Dans l'hypothèse où la particule infectieuse est composée uniquement de PrP<sup>Sc</sup>, cette taille équivaldrait à des oligomères de 14 à 28 molécules de PrP<sup>404</sup>. Des expériences ultérieures, menées en gradients de vitesse (ultracentrifugation) sur des fractions de PrP<sup>Sc</sup> (sans PK digestion) en conditions détergentes douces, ont confirmé le caractère infectieux de particules contenant de la PrP<sup>Sc</sup> et de taille compatible avec celles d'oligomères de PrP. Ces études ont par ailleurs démontré de manière probante, l'existence de profils de distribution de l'infectiosité dans les gradients différents, en fonction des souches. Ces données indiquent de manière définitive que des oligomères composés de 5 monomères ou moins de PrP sont capables de transmettre la maladie, tout en codant l'information de souche<sup>270, 432</sup>.

L'ensemble de ces travaux supporte donc l'hypothèse d'une particule infectieuse oligomérique de PrP<sup>Sc</sup>, dont l'agencement quaternaire coderait l'information de souche. Toutefois, compte tenu des limites liées aux méthodes d'extractions et de purification de la PrP<sup>Sc</sup>, il demeure impossible, à l'heure actuelle, de mettre en œuvre techniquement une étude structurale en haute résolution (résonance magnétique nucléaire) qui permettrait de confirmer l'existence de variants structuraux oligomériques. Pour les mêmes raisons, il est impossible de savoir si les particules infectieuses étudiées sont uniquement composées de molécules de PrP<sup>Sc</sup> ou si elles intègrent d'autres types moléculaires, qui pourraient jouer le rôle de cofacteur pour le déterminisme de la souche.

L'amélioration des techniques de propagation par PMCA, en utilisant des milieux synthétiques et semi-synthétiques a apporté des données intéressantes pour la résolution de cette question<sup>120-122</sup>.

En effet, des substrats composés uniquement de PrP recombinante d'origine bactérienne, de phospholipides (phosphatidylethanolamine), et d'ARN synthétiques (poly A) permettent une réplique *in vitro* efficace de l'infectiosité<sup>122</sup>. La présence de cofacteurs (Phospholipides et ARN ployA) dans le substrat de propagation est un élément essentiel au maintien de

l'information de souche. En effet, la propagation *in vitro* de trois souches de Prions différentes, dans un milieu contenant ces cofacteurs permet de maintenir des caractères de souches distincts pour les trois Prions. La même expérience, menée en l'absence d'ARN polyA, conduit à une convergence des caractères de souches des Prions infectieux propagés<sup>124</sup>. Il est toutefois essentiel de souligner que les caractères de souche (par transmission à la souris) des Prions de mammifères utilisés initialement, diffèrent d'avec ceux obtenus après leur propagation par PMCA en milieu synthétique<sup>124, 300, 301</sup>. Ces résultats impliquent que les phénomènes permettant le maintien des caractères de souches *in vivo* sont différents, ou en tout cas plus complexes que ceux modélisés dans ces expériences.

Enfin, La propagation par bioessai de trois souches de Prions chez des souris transgéniques exprimant des protéines PrP<sup>C</sup> murines dépourvues d'un ou des deux sites de N-glycosylation, a démontré, pour certains des agents testés, une altération irréversible des caractères de souches. Cette expérience tendrait à indiquer une participation de la glycosylation de la PrP<sup>C</sup> dans le maintien de l'information de souche. Toutefois, cette approche est intrinsèquement biaisée. La suppression des sites de N-glycosylation dans un tel modèle est obtenue par une altération de la séquence primaire de la protéine Prion<sup>439</sup> (cf.2.4).

## **2.7. Vers un modèle cohérent expliquant les phénomènes de souches et de barrière d'espèce**

Malgré de nombreux travaux conduits sur le sujet, les phénomènes moléculaires présidant au franchissement des barrières de transmission par un Prion restent largement inconnus<sup>259, 404</sup>.

Les connaissances acquises au cours des deux dernières décennies ont permis d'élaborer un modèle faisant un large consensus et permettant d'expliquer de manière cohérente, dans les limites du concept Prion, à la fois les phénomènes de barrières de transmission et la stabilité relative des propriétés de ces agents<sup>107</sup>.

Ce modèle proposé par Collinge et Clarke, postule que l'existence des souches de Prions et de la barrière de transmission résultent conjointement, de la capacité d'une isoforme donnée de la PrP<sup>C</sup>, à acquérir des états de conformations et/ou d'agrégations métastables différents. Chaque séquence PrP aurait un éventail de conformations PrP<sup>Sc</sup> thermodynamiquement stables ; la capacité d'un agent à se propager dépendrait de la propension des conformères PrP<sup>Sc</sup> présents dans l'isolat source, à entraîner le changement de conformation de la PrP<sup>C</sup> de l'espèce receveuse, en l'un de ces possibles conformères. L'altération ou la stabilité des caractéristiques des agents des EST (caractères de souche) reposeraient essentiellement sur la

stabilité ou l'instabilité des caractéristiques physico-chimiques des conformères de PrP<sup>Sc</sup>, générés au cours de la propagation de l'agent<sup>360</sup>.

La nature des conformères PrP<sup>Sc</sup> générés chez un hôte donné au cours du processus répliatif ne serait pas unique<sup>299, 381</sup>. Dans chaque isolat, une proportion mineure de variants PrP<sup>Sc</sup> plus ou moins stables serait générée. Cette plasticité dynamique de l'agent, dont le principe est calqué sur le concept de quasi-espèces virales<sup>145</sup>, permettrait d'expliquer qu'un Prion biologiquement cloné dans un modèle de culture cellulaire chroniquement infectée<sup>285</sup> ou dans un modèle animal<sup>66</sup> puisse voir ses propriétés biologiques évoluer, sous l'effet d'une pression de sélection environnementale.

## **2.8. Comment appréhender la diversité biologique des Prions ?**

Le filtre que constitue la barrière de transmission en matière de typage de souches sur souris conventionnelle implique que, malgré l'usage qui a été fait de cet outil, il est inexact de considérer qu'il puisse rendre fidèlement compte de la diversité biologique des Prions.

Au Royaume-Uni, l'application systématique de cet outil à des isolats de tremblante ovine a abouti à la description initiale de près d'une vingtaine de souches différentes<sup>134</sup>. Le réexamen des mêmes données, complété par de nouvelles transmissions a ensuite conduit les auteurs à réduire cette diversité à 4 souches<sup>70</sup>. La ré-inoculation à des ovins de ces quatre souches (ME7, 79A, 22A et 87V), clonées et stabilisées sur souris conventionnelles, a abouti à la propagation d'EST présentant des phénotypes différents. Toutefois, pour une même souche, le phénotype observé chez les ovins était susceptible de varier. Ces observations peuvent être interprétées comme une altération des propriétés des souches murines de Prions lors du franchissement en retour, de la barrière d'espèce mouton/souris. En tout état de cause, elles confirment qu'il est inexact de conclure qu'une souche clonée chez les rongeurs conventionnels correspond à un Prion unique chez l'ovine<sup>408</sup>.

La découverte que l'expression du gène *PRNP* de hamster chez la souris permettait d'abolir ou tout du moins de réduire de manière significative la barrière de transmission, qui limitait la propagation de la souche 263K à cet hôte, a totalement révolutionné l'approche expérimentale des barrières de transmission<sup>398</sup>. Cette découverte, combinée aux progrès technologiques en matière de transgénèse, a donné naissance à une longue liste de modèle de rongeurs exprimant des séquences PrP<sup>191</sup>. Ces souris transgéniques pour le gène *PRNP* d'une espèce donnée permettent la propagation de la plupart des isolats d'EST issus d'individus de cette espèce<sup>42</sup>.

400

Les premières études réalisées sur les modèles d'animaux transgéniques ont permis d'établir que les durées d'incubation de ces animaux étaient inversement proportionnelles avec les niveaux d'expression du gène<sup>5, 460</sup> (Tableau 1).

**Tableau 1: Effet du niveau d'expression de la PrP<sup>C</sup> murine sur la durée d'incubation de la souche RML**

| Lignée                      | Nombre de copies du gène <sup>a</sup> | Niveau d'expression de la PrP <sup>C</sup> <sup>b</sup> | Durée d'incubation (j) |
|-----------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|
| <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>  | 0                                     | 0   | NA                     |
| <i>Prnp</i> <sup>+/+</sup>  | 2                                     | 1   | 166±8                  |
| <i>Prnp</i> <sup>0/+</sup>  | 1                                     | 0.5   | 415±30                 |
| <i>tga19</i> <sup>+/+</sup> | 30                                    | 3-4   | 100±17                 |
| <i>tga20</i> <sup>+/+</sup> | 30                                    | 6-7   | 68±10                  |
| <i>tga20/tga20</i>          | 60                                    | 10  | 62±4                   |

a : normalisé par rapport à la souris conventionnelle ; déterminée par qPcr

b : normalisé par rapport à la souris conventionnelle ; déterminée par analyse quantitative sur Western-Blot d'après<sup>153</sup>

Il est ainsi clairement apparu que les modèles *knock-in* (remplacement de la séquence PrP endogène par le transgène) ne permettait pas de propager avec une grande efficacité les Prions pourtant issu d'hôte exprimant des séquences homologues au transgène étudié. Ce phénomène est communément attribué aux durées de vie relativement limitées des souris (2 ans environ) par rapport aux espèces (ovin, bovin, humain) dont les Prions étudiés proviennent<sup>50</sup>.

A partir de ces observations, l'idée que des souris transgéniques sur-exprimant le gène *PRNP* idoïne (sur fond *Prnp*<sup>0/0</sup>) pouvaient être utilisées pour appréhender la diversité biologique des Prions circulants dans l'espèce naturelle s'est peu à peu imposée<sup>399</sup>.

Les données générées à ce jour, en utilisant ces modèles transgéniques, ont permis des avancées notables en matière de description de la diversité des Prions. Ils ont, par exemple, permis de confirmer le fait que la tremblante atypique des ovins et des caprins, découverte sur la base d'observations biochimiques en 1998 en Norvège, puis dans la plupart des pays opérant une surveillance des EST des petits ruminants, était selon toute vraisemblance dû à une souche unique de Prion<sup>190, 278</sup>. Ils ont également permis de confirmer l'existence d'au moins trois souches naturelles de Prions chez les bovins (BSE classique, BSE H et BSE L)<sup>39, 81, 435</sup>.

Toutefois, malgré les travaux d'un nombre significatif de laboratoires dans ce domaine, il serait inexact de considérer que la description de la diversité biologique des Prions soit en passe d'être définitivement établie. En dépit de l'apport indéniable des modèles



transgéniques, des incertitudes demeurent quant à leur capacité à appréhender la diversité des souches de Prions.

Les difficultés rencontrées depuis près de 10 ans, pour brosser un tableau cohérent de la diversité des agents responsables de la tremblante classique chez les petits ruminants, malgré l'existence de nombreux modèles exprimant la PrP<sup>C</sup> ovine ou caprine en sont un exemple<sup>39, 42, 427, 429, 432</sup>. L'instabilité des phénotypes observés lors de transmission d'isolats ovins à des souris sur-exprimant différents variants du gène *PRNP* ovin<sup>428, 429</sup>, laisse présumer que ces nouveaux travaux rencontreront des difficultés opérationnelles comparables au typage de souche sur souris conventionnelles : mélange de souche, évolution spontanée des souches de Prions.

Enfin, bien que des données semblent indiquer que la surexpression du gène *PRNP* ne modifie en rien la sensibilité des animaux transgéniques par rapport à un hôte conventionnel<sup>82, 359</sup>, certains doutes subsistent quant à la pertinence conceptuelle de ces modèles. (cf publication 1)

### **3. ORIGINE ET PATHOGENESE DES EST ANIMALES ET HUMAINES**

Classiquement deux origines possibles sont décrites pour les maladies à Prion :

- une origine acquise, consécutive à l'exposition de l'hôte à une source infectieuse,
- une origine spontanée, considérée comme la conséquence d'un défaut aléatoire de repliement de la protéine PrP<sup>C</sup> dans l'organisme, qui aboutit à la production d'un noyau de réplication initiant le processus pathologique.

Alors que l'origine acquise des EST repose sur des éléments épidémiologiques et expérimentaux solides, les arguments soutenant l'existence d'une origine spontanée sont plus ténus.

Cette dualité a longtemps était considérée comme un déterminant majeur du schéma pathogénique général de l'affection. Celui-ci conditionne la nature des tissus et/ou les niveaux de Prion s'y accumulant.

#### **3.1.La dualité maladie acquise / maladie spontanée**

##### **3.1.1. Infection par les Prions**

Le concept de transmission interindividuelle naturelle des EST, similaire à celle observée dans des infections virales ou bactérienne (faiblement virulente) date de plusieurs siècles. Il a été essentiellement élaboré à partir d'observations réalisées sur des troupeaux atteints de tremblante ovine.

La tremblante est une maladie connue en Europe depuis plusieurs siècles. Elle fut décrite pour la première fois en Angleterre en 1732. A cette époque la tremblante ovine était considérée comme un danger pour l'économie Britannique : la laine -et donc le mouton - représentait le premier produit d'exportation de la grande Bretagne. En 1755, le parlement britannique statua sur « l'impact économique de l'augmentation d'une maladie fatale chez le mouton ». Il est notamment recommandé dans ce texte de ne pas introduire d'animaux issus de troupeaux atteints, dans des troupeaux sains afin de limiter la propagation de la maladie. Dans les années 1930, l'importation d'ovins (depuis l'Allemagne) en Islande est considérée comme le point de départ d'une épidémie de tremblante qui sévit encore à l'heure actuelle dans ce pays. De manière identique, l'introduction de la tremblante classique aux USA, au début des années 50, semble imputable à l'importation de moutons Anglais en incubation de la maladie (via le Canada)<sup>128</sup>.

Le caractère contagieux de la tremblante classique a été démontré expérimentalement au début des années 1960, par l'introduction d'animaux infectés dans des troupeaux sains<sup>349, 350</sup>. Dans les troupeaux affectés par la tremblante classique, jusqu'à 40% des individus peuvent être atteints<sup>287</sup>.

Il est communément admis, qu'en conditions naturelles d'exposition, la contamination par la tremblante se produit principalement durant la période périnatale<sup>13, 129, 267, 376, 437</sup>. Toutefois, la contamination d'animaux de génotype sensible, issus de troupeaux sains, après leur introduction à l'âge adulte dans des troupeaux affectés, a été rapportée. Cette contamination à l'âge adulte semble toutefois d'une faible efficacité<sup>229, 230 129</sup>.

La nature exacte des modes de transmission et de leur efficacité relative reste débattue<sup>129</sup>. En particulier, l'existence d'une contamination verticale (*in utero*) reste discutée<sup>156</sup>, même s'il est admis que cette voie ne représente sans doute pas le principal mode de transmission.

Le rôle du placenta et des annexes placentaires dans la contamination périnatale et la contamination environnementale est aujourd'hui largement documenté<sup>13, 437</sup>. Plus récemment, la présence de Prion dans le colostrum et le lait des brebis en incubation et leur efficacité à transmettre la maladie à des agneaux de génotype sensible ont été établies<sup>261, 267</sup>.

En Amérique du nord, une autre forme d'EST, la maladie du dépérissement chronique (CWD, *chronic wasting disease*) apparaît comme particulièrement contagieuse chez les espèces de cervidés sauvages<sup>402</sup>. La salive, les sécrétions nasales, l'urine semblent jouer un rôle important dans la transmission de la maladie<sup>131, 195, 196</sup>.

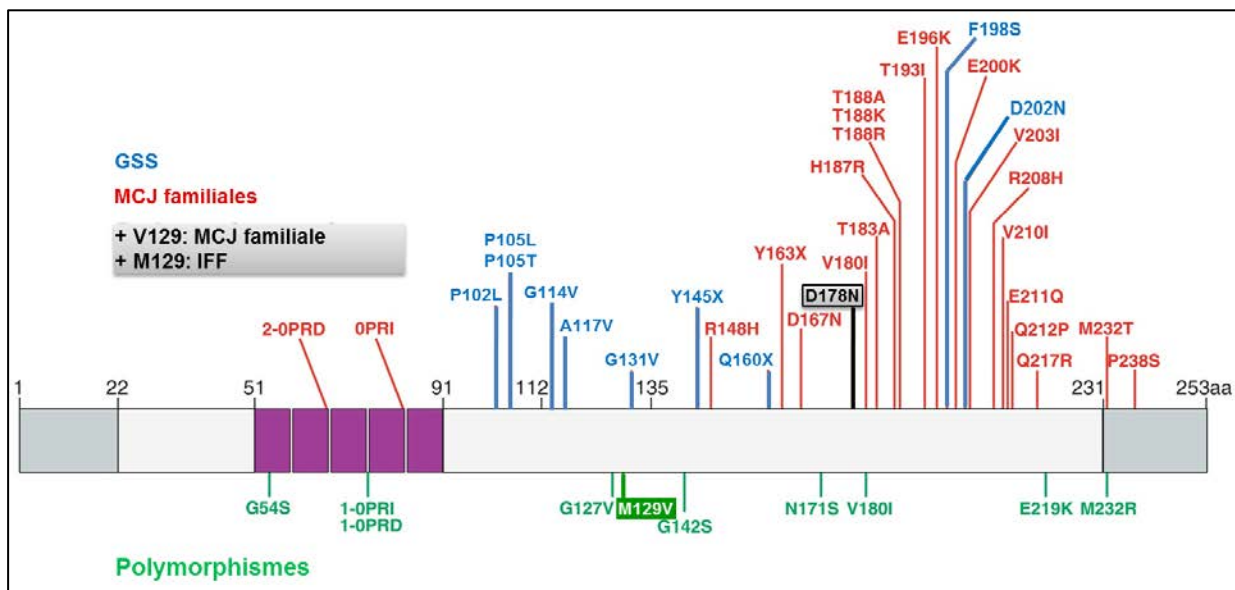
Parallèlement à ces contaminations interindividuelles directes, l'existence d'une contamination d'origine environnementale a longtemps été soupçonnée. Ce mode de transmission a été avancé comme explication à la contamination d'animaux sains, réintroduits sur des fermes après abattage total de troupeaux infectés, dans un nombre substantiel de cas<sup>173</sup>. Ce n'est toutefois que récemment que l'existence d'une contamination par les pâtures, sur lesquelles des animaux infectés avaient séjournés, a été démontrée<sup>130</sup> et que la forte rémanence des Prions dans certains type de sol a été découverte<sup>64, 102, 110, 171, 204, 241, 242, 292, 294, 372, 380, 384, 394, 470</sup>.

### **3.1.2. Le concept d'EST spontanée**

5 à 10 % des maladies humaines à Prion sont liées à des mutations du gène *PRNP*<sup>272</sup>. Ces affections héréditaires, peuvent revêtir différentes formes (cliniques et lésionnelles) ; elles concernent quelques dizaines de familles dans le monde.

Historiquement, la première forme familiale identifiée fut le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)<sup>174, 175</sup>. Ce syndrome est une affection autosomale dominante, associée à des lésions d'EST, dont il fut établi au début des années 90, qu'elle était liée à des mutations en position 102 ou 117 du gène *PRNP*.

Actuellement, une trentaine de mutations ont pu être corrélée à la survenue d'EST chez l'homme (Figure 13). Ces altérations sont des modifications de la séquence protéique par des mutations ponctuelles, essentiellement retrouvées en partie C terminale de la protéine<sup>290</sup>. Des répétitions ou des délétions dans la région des répétitions octapeptidiques ont également été décrites<sup>309</sup>. L'insomnie fatale familiale (IFF) est un variant clinique particulier des EST humaines. La maladie est liée à une mutation du résidu acide aspartique en asparagine au codon 178 (D178N)<sup>319</sup>, et à la présence d'une méthionine au codon 129 (génotype 129M 178N)<sup>200</sup>. La mutation au codon 178 lorsqu'elle est associée au variant V129 ne produit pas le phénotype IFF (génotype 129V 178N)<sup>362</sup>.



**Figure 13: Mutations et polymorphismes du gène *PRNP***

Les mutations associées aux formes familiales d'EST sont représentées en rouge. Les polymorphismes rencontrés couramment sont représentés en vert. OPRD : délétion de répétitions octapeptides/ OPRI : insertion de répétitions octapeptides (d'après<sup>290</sup>)

Avec environ 1 cas par an pour 1 million d'individus, la MCJ est la plus fréquente des EST chez l'homme<sup>310</sup>. Elle affecte principalement des individus âgés de 45 à 75 ans, la moyenne étant de 60 ans<sup>184</sup>. La durée d'évolution est souvent courte. Après l'apparition des signes cliniques, le décès survient en général dans un délai de 3 à 12 mois<sup>221</sup>.

La MCJ sporadique (sMCJ) représente 90% des cas d'EST humaine et survient chez des individus généralement âgés de plus de 50 à 60 ans. Un polymorphisme majeur au codon 129 (M ou V) est un facteur de risque important dans le développement de la maladie. La moitié de la population caucasienne (51 %) est hétérozygote (M/V) au codon 129, alors que les homozygotes V/V et M/M représentent respectivement 12 et 37 % de cette population. Les cas les plus fréquents apparaissent chez des individus homozygotes M/M (71 % des cas) au codon 129<sup>346</sup> (Tableau 2). Le phénotype clinique et moléculaire associé à la maladie est également affecté par ce polymorphisme<sup>127, 346</sup>

**Tableau 2: Distribution des polymorphismes au codon 129 en fonction des différentes formes de MCJ**

| Polymorphisme au codon 129 du gène <i>PRNP</i> (en %) | MM  | MV | VV |
|---|-----|----|----|
| <b>Population de Papouasie Nouvelle Guinée</b>        | 32  | 43 | 24 |
| <b>Kuru</b>   | 53  | 27 | 20 |
| <b><u>Royaume-Uni</u></b>                             |     |    |    |
| <b>Population générale</b>                            | 37  | 51 | 12 |
| <b>sMCJ</b>   | 66  | 17 | 18 |
| <b>vMCJ</b>   | 100 | 0  | 0  |
| <b><u>France</u></b>                                  |     |    |    |
| <b>Population générale</b>                            | 40  | 50 | 10 |
| <b>sMCJ</b>   | 64  | 19 | 17 |
| <b>vMCJ</b>   | 100 | 0  | 0  |

L'utilisation des modèles murins pour décrire les agents impliqués dans la survenue des cas de sMCJ ont permis de caractériser plusieurs souches<sup>50, 168</sup>. Cette diversité biologique combinée au polymorphisme Met/Val au codon 129 du gène *PRNP* pourrait expliquer la diversité clinico-pathologique des cas de sMCJ, ainsi que des propriétés biochimiques variables de la PrP<sup>Sc</sup> observées dans le cerveau des patients atteints<sup>57</sup>.

Aucun élément épidémiologique n'a permis, jusqu'à aujourd'hui, d'imputer cette maladie à l'exposition à un prion humain ou animal, ni à des facteurs environnementaux<sup>94, 310, 444</sup>. Le développement d'EST (avec une forte pénétrance) chez des individus porteurs de mutations du gène *PRNP*, comme les mutations E200K, P102L ou A117V, a rapidement amené à considérer l'hypothèse d'une origine spontanée de ces affections.

Dans cette hypothèse, les mutations favoriseraient une transconformation spontanée de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, selon une dynamique ne permettant pas d'éliminer de manière efficace les protéines mal conformées, via les voies classiques du catabolisme protéique. A terme, ces protéines joueraient le rôle de « nucléateur », entraînant une conversion autocatalytique de la

PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc104</sup>. Cette hypothèse permet de concilier le caractère héréditaire de ces formes d'EST et le concept Prion.

De la même manière, étant donnés (i) l'absence apparente de facteur de risque associé aux formes dites sporadiques de MCJ, (ii) la faible fréquence de ces cas et (iii) l'âge relativement avancé des patients au moment du diagnostic, il a également été avancé que l'occurrence de ces maladies pourrait être expliquée par un processus spontané ou endogène, consécutif à l'incapacité des systèmes du catabolisme protéique à dégrader des formes mal conformées de PrP.

L'hypothèse d'une origine spontanée, sans intervention d'un agent infectieux externe, survenant de manière aléatoire et favorisée par des mutations du gène *PRNP* est longtemps demeurée spéculative. De nombreuses tentatives pour générer des modèles animaux de maladie à Prion spontanée ont échoué. Par exemple, l'insertion dans le gène *Prnp* de la souris des mutations correspondant à la forme familiale P102L de la MCJ, s'il entraîne l'accumulation d'une forme légèrement résistante à la PK de PrP<sup>Sc</sup>, ne permet pas de générer un agent transmissible<sup>23, 25</sup>.

Ce n'est que récemment que des données expérimentales soutenant le concept d'une origine spontanée d'une maladie à prion ont été obtenues.

Les souris Tga20 sur-expriment environ 10 fois les niveaux physiologiques de PrP<sup>C</sup> murine. L'inoculation à des souris Tga20 d'un homogénat de cerveau, préparé à partir d'encéphale de Tga20 âgées non exposées à des Prions, entraîne dans une faible proportion de cas, la survenue d'une EST<sup>403</sup>. Toutefois, le niveau d'expression très élevé de PrP<sup>C</sup> chez ces souris, couplé à la description de troubles neurodégénératifs spontanés observés dans d'autres modèles sur-exprimant la PrP<sup>C466</sup>, soulèvent quelques doutes sur la pertinence réelle de ces données. L'absence de données quant à la transmissibilité d'une telle affection à des animaux exprimant des niveaux physiologiques de PrP<sup>C</sup> renforce ces réserves.

Dans un autre modèle, l'introduction dans le gène murin de la PrP (modèle *knock in*) d'une mutation ponctuelle(D177N) correspondant à celle associée chez l'homme à la FFI (D178N), provoque chez ces souris des troubles neurodégénératifs spontanés, transmissibles à des souris de génotype *Prnp* sauvage (non porteuses de la mutation), sans qu'il soit toutefois possible de mettre clairement en évidence une accumulation de PrP<sup>res</sup>, chez les souris porteuses de la mutation FFI<sup>237</sup>.

Plus récemment, il a été rapporté que la surexpression dans un modèle de souris transgéniques du variant I109 de la PrP du campagnol conduit à la survenue d'une maladie

neurodégénérative spontanée, caractérisée par l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> résistante à la PK et d'une spongiose du tissu cérébral. Cette forme est associée à des taux d'attaques de 100% et des durées d'incubation relativement brèves (<400 jours). L'inoculation d'homogénats de cerveaux issus de ces animaux, à des souris exprimant la séquence M109 de la PrP de campagnol ou la séquence sauvage de la PrP de souris, y compris à des niveaux physiologiques, permet la transmission de cette maladie. Ceci prouve le caractère authentique de la maladie à Prion spontanément apparue chez les animaux I109<sup>456</sup>.

Considérées dans leur ensemble, ces données constituent un faisceau convergent d'éléments qui supportent le concept de maladie à Prion spontanée. La preuve définitive qu'un tel phénomène est effectivement la seule origine de formes naturelles humaines ou animales des EST doit encore être apportée.

### **3.2.Schéma Pathogénique des EST acquises**

La tremblante classique des petits ruminants est considérée comme l'archétype des formes infectieuses d'EST. A ce titre, de nombreux travaux décrivent les étapes et les voies de dissémination des Prions dans l'organisme de petits ruminants naturellement ou expérimentalement contaminés par des agents responsables de cette forme d'EST.

Le schéma pathogénique décrit en tremblante classique se superpose de manière quasi parfaite à celui observé dans la maladie du dépérissement chronique des cervidés sauvages<sup>29, 170</sup>. Par contre, il semble, au premier regard, différer sensiblement de celui observé dans d'autres formes d'EST acquises comme l'ESB des bovins<sup>239</sup>.

#### **3.2.1. Tremblante Classique**

##### *- Contamination initiale et franchissement des barrières épithéliales*

Lors d'infection naturelle, il est établi que la voie majeure de contamination est digestive. La contamination s'opère généralement dans les premiers jours suivant la naissance des animaux<sup>12, 213</sup>.

Après exposition à l'agent, une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> est rapidement détectable dans les plaques de Peyer, formations lymphoïdes associées au tube digestif<sup>11, 12, 213</sup>. Dans ces structures, les cellules épithéliales membranaires, appelées cellules M (microfold) sont des sites clefs du micro-échantillonnage antigénique à partir de la lumière digestive<sup>262</sup>. Les cellules M sont connues comme porte d'entrée de nombreuses bactéries telles que *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ou encore *Vibrio cholerae*. Des travaux menés *in vitro* indiquent que la présence de cellules M différenciées, au sein d'un épithélium serait suffisante à un transport

transépithélial du prion<sup>28, 214</sup>. Elles internalisent donc des particules de la lumière intestinale par micro-pinocytose, puis les transfèrent aux cellules dendritiques. La déplétion *in vivo* de ces cellules par administration d'un ligand de RANK (Récepteur activateur de NF-kB, superfamille des récepteurs au TNF) bloque l'infection<sup>142</sup>.

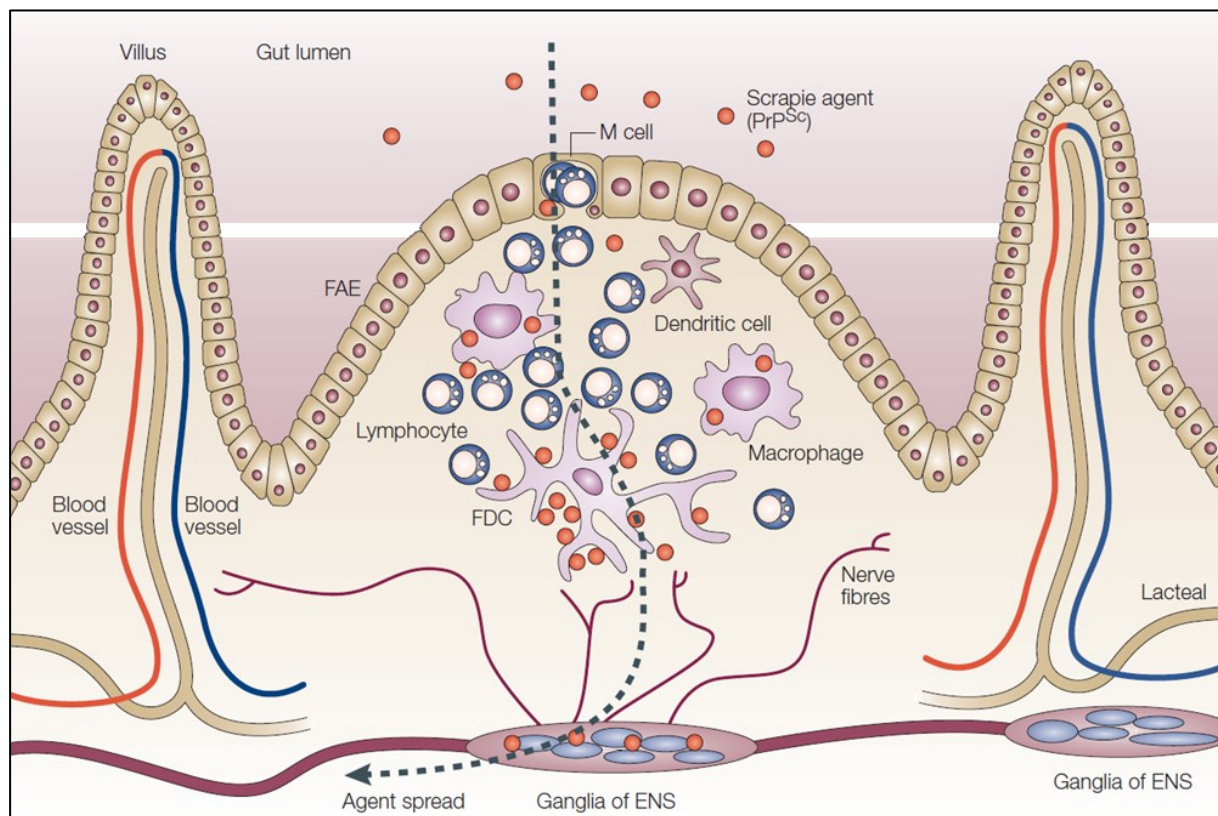
- *Dissémination de l'agent jusqu'aux sites de réplication périphériques*

Les cellules dendritiques (DC) sont issues d'un précurseur hématopoïétique de la moelle osseuse et incluent une grande variété de sous-populations : certaines résident dans les tissus (cellules de Langerhans), d'autres sont recrutées à partir des monocytes circulants. Elles expriment la PrP<sup>C</sup> à un niveau élevé, notamment dans leur état activé<sup>79</sup>. Véritables sentinelles de l'organisme, elles sont présentes dans la plupart des organes, en particulier la peau et les muqueuses où elles captent les agents étrangers ; elles migrent ensuite via les vaisseaux lymphatiques, vers les structures lymphoïdes secondaires. Elles y apprêtent et présentent les antigènes aux lymphocytes B et T, déclenchant ainsi les réponses immunitaires adaptatives.

Ces propriétés en font des candidats pertinents comme vecteur des Prions. Dans deux modèles de tremblante expérimentale murine (souches ME7 et 139A), la suppression temporaire et partielle des DC CD11c<sup>+</sup>, au moment de l'inoculation par voie orale, empêche l'accumulation des Prions dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif et la rate; ce qui se traduit par un allongement de la durée d'incubation<sup>111</sup>, voire une résistance à l'infection<sup>379</sup>. Cependant, d'autres résultats suggèrent que ce mécanisme n'est pas exclusif. Ainsi, l'inoculation sous-cutanée de souris, avec des cellules dendritiques vivantes infectées par les mêmes souches de tremblante (ME7 et 139A), ne raccourcit que de 10% environ la durée d'incubation par rapport à une inoculation avec les mêmes cellules tuées<sup>282</sup>. De plus, chez les souris portant la mutation *plt*, le déficit en chimiokines CCL19 et CCL21 (ligands de CCR7) qui bloque la migration des cellules dendritiques activées vers les tissus lymphoïdes, n'altère que très peu la propagation des Prions et de façon variable selon les voies d'inoculation<sup>282</sup> (Figure 14).

D'autres cellules, très présentes dans les tissus périphériques et d'un lignage apparenté, les macrophages, ont aussi de fortes capacités d'endocytose mais ne migrent pas depuis leur site de maturation. Des expériences de déplétion transitoire *in vivo* démontrent que, suite à une inoculation orale<sup>298</sup> ou intrapéritonéale<sup>40</sup>, l'agent s'accumule plus rapidement au sein des organes lymphoïdes. Au cours des infections à Prions, les macrophages pourraient donc plutôt participer à l'élimination de l'agent.





**Figure 14: Voies potentielles de dissémination de l'agent de la tremblante via les plaques de Peyer après infection orale.**

Peu après l'ingestion, la PrP<sup>Sc</sup> est détectée dans les cellules M des plaques de Peyer, à la surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC), dans les macrophages, puis dans les ganglions mésentériques (ENS). D'après <sup>87</sup>

- *Accumulation par les cellules dendritiques folliculaires*

Les cellules folliculaires dendritiques (FDC) se différencient à partir de précurseurs stromaux périvasculaires dans les centres germinatifs et expriment des niveaux élevés de PrP<sup>C263</sup>. Leur rôle est de présenter les antigènes aux cellules B qui se multiplient dans le centre germinatif et elles n'ont aucune capacité de migration en dehors du follicule. La forte expression de PrP<sup>C</sup> (et de PrP<sup>Sc</sup> d'ailleurs) dans les FDC suggère que ces cellules sont un site important de réplication des Prions. En effet, l'injection d'un récepteur soluble à la lymphotoxine-β se traduit par une ablation des FDC matures de la rate et ralentit significativement la neuroinvasion<sup>329</sup>, lors d'inoculation intrapéritonéale. Elle reste sans effet sur la pathogénèse en cas d'inoculation intracérébrale<sup>295</sup>. Ces sites de stockage progressif dans les premières semaines de l'infection semblent faciliter la neuro-invasion, sans doute en permettant aux Prions d'atteindre une concentration critique pour la neuro-invasion (Figure 14). En effet, pour des quantités de Prions 100 à 1 000 fois supérieures aux doses usuelles, l'étape de

réplication dans les organes lymphoïdes périphériques n'est pas requise pour envahir le cerveau, comme l'ont montré des expériences d'inoculation d'animaux immunodéficients dépourvus de FDC matures (souris SCID, *severe combined immunodeficient*, ou invalidées pour un des gènes RAG, *recombination activating gene*)<sup>365</sup>.

- *Atteinte du Système Nerveux Autonome (SNA) digestif*

La motilité digestive est assurée par la musculature lisse de la paroi du tube digestif. Ces muscles sont sous le contrôle d'un réseau dense de fibres nerveuses interconnectées et contrôlées par des neurones disséminés dans la paroi du tube digestif. Ces neurones sont organisés en plexus, eux-mêmes contrôlés par des centres de régulation neuronaux situés dans le système nerveux central (SNC) : les centres nerveux sympathiques et parasympathiques.

Les organes lymphoïdes sont largement innervés par des fibres de type sympathique<sup>152</sup>, et l'hypothèse d'une contamination de ces fibres au contact des organes lymphoïdes infectés a été proposée<sup>253</sup>. En outre, le réseau du SNA digestif comporte de très nombreuses fibres nerveuses non myélinisées, dont certaines innervent la zone superficielle des follicules lymphoïdes<sup>250</sup>. Dans cette zone, les FDC sont donc très proches des terminaisons axonales<sup>183</sup>. L'hypothèse est donc celle d'une contamination directe des fibres nerveuses à partir des FDC.

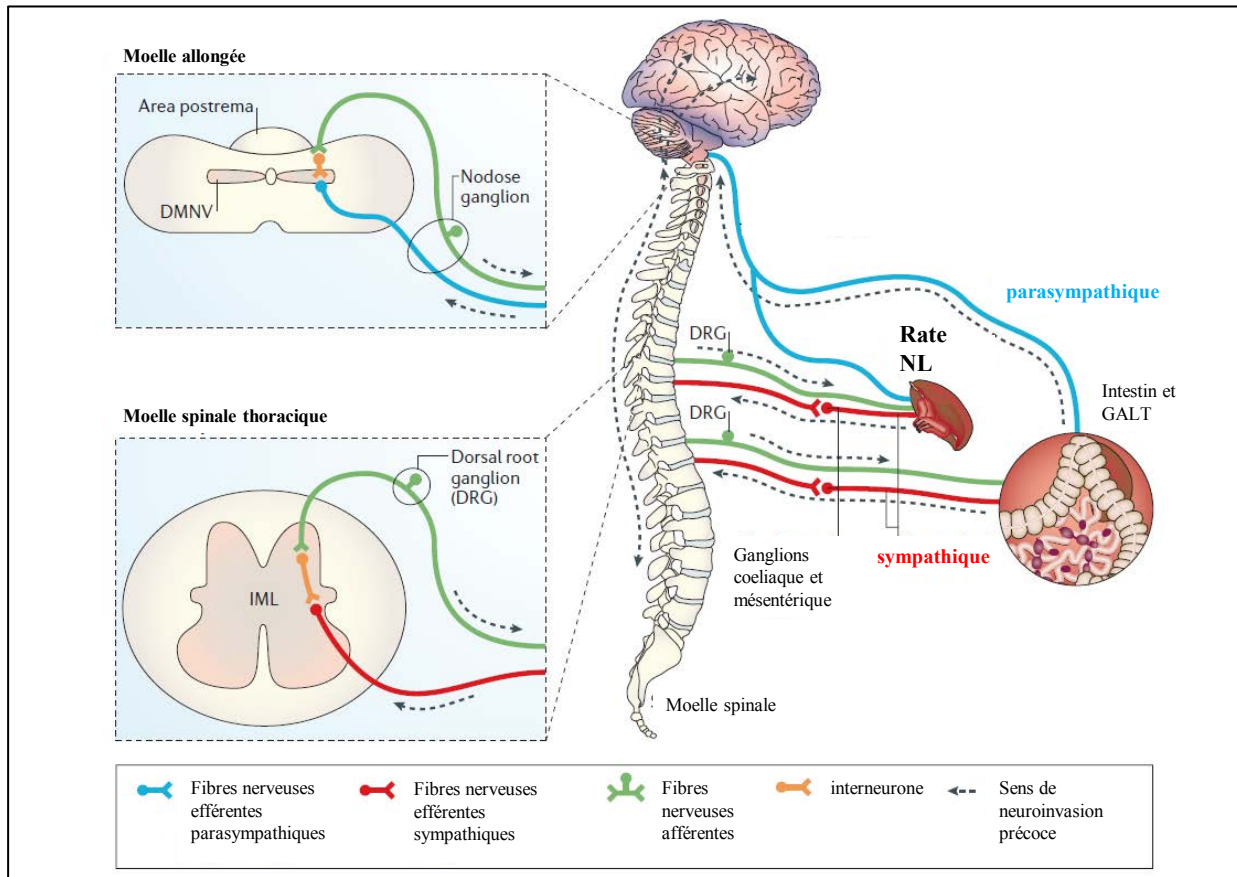
Cette théorie est soutenue par la présence précoce chez les ovins atteints de tremblante, de PrP<sup>Sc</sup> dans les neurones des plexus myentériques, situés immédiatement à proximité des plaques de Peyer<sup>12, 211</sup>.

La contamination du SNA ne semble pas s'opérer par un seul site, mais bien par l'ensemble des sites d'interface du tissu lymphoïde annexé au tube digestif et du SNA<sup>12</sup>. Par ailleurs, la présence de PrP<sup>Sc</sup> dans le SNA des différents segments du tube digestif (de l'œsophage au rectum), dans les phases tardives d'incubation, suggère une redistribution rapide de l'agent entre les différents groupes de neurones digestifs<sup>446</sup>.

- *Dissémination au Système Nerveux Central*

Après son entrée dans le SNA, la PrP<sup>Sc</sup> progresse vers le névraxe en suivant simultanément deux voies :

- Les fibres nerveuses sympathiques (nerfs splanchniques) qui innervent les organes digestifs et leurs formations lymphoïdes, comme le suggère l'atteinte précoce de la colonne intermedio-latérale de la moelle spinale<sup>12, 212, 447</sup>.
- Les fibres parasympathiques et notamment celles du nerf vague, comme en témoigne la présence précoce de PrP<sup>Sc</sup> dans le noyau dorsal du nerf vague<sup>387 19, 27, 30</sup>. (Figure 15)



### Figure 15: Voies de neuro-invasion des agents responsables des EST

L'analyse de la progression de l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> au sein du système nerveux de rongeurs inoculés expérimentalement, indique que les Prions diffusent depuis l'intestin jusqu'au système nerveux central (SNC) via deux voies neuroanatomiques distinctes. Dans chaque cas, la diffusion est rétrograde le long des voies efférentes (motrices). L'une des routes empruntées vers le SNC suit les fibres sympathiques du nerf splanchnique jusqu'à la colonne médullaire intermedio-latérale (IML) de la moelle spinale thoracique. Par la suite, l'agent diffuse jusqu'au cerveau dans le sens caudo-cranial le long de la moelle spinale. La neuroinvasion à partir de l'intestin peut également se dérouler le long des fibres parasympathiques vers le noyau dorsal du nerf vague (DMNV) au sein de la moelle allongée. GALT (*Gut-associated lymphoid tissues*). Modifié d'après<sup>296</sup>

#### - Dissémination centrifuge

Après avoir atteint le SNC, la protéine prion semble pouvoir disséminer par voie nerveuse dans l'organisme de manière centrifuge. Ainsi, de la PrP<sup>Sc</sup> a été détectée dans les muscles des rongeurs, souris et hamster<sup>53, 431</sup>. Sa présence a également été rapportée chez le mouton en incubation de tremblante, plusieurs mois avant l'apparition des signes cliniques. Toutefois, les quantités de PrP<sup>Sc</sup> détectables dans ce tissu demeurent 5000 fois inférieures à celles détectées dans l'encéphale ou les nœuds lymphatiques d'ovins en phase clinique. Dans ce modèle, l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup> semble confinée aux fuseaux neuromusculaires<sup>16</sup>.

- *Dynamique de dissémination dans l'organisme*

Pour la tremblante classique, l'essentiel des données disponibles provient d'études menées sur des cohortes d'animaux de génotype très sensibles (VRQ/VRQ), issus de deux troupeaux naturellement atteints (l'un français, l'autre néerlandais) avec une forte prévalence. Les résultats de ces différentes études sont comparables et concordent pour l'essentiel avec les données issues de troupeaux différents ou menées sur des animaux de génotype autre. (Tableau 3)

**Tableau 3 : Cinétique d'apparition tissulaire de la PrP<sup>Sc</sup> lors de tremblante classique**

| <b>Age d'apparition</b>          | <b>Tissu contenant de la PrP<sup>Sc</sup></b>          | <b>Références</b>        |
|----------------------------------|--|--------------------------|
| 21 jours                         | Formations lymphoïdes 2aires annexées à l'iléum        | <i>Andreoletti, 2002</i> |
| < 2mois                          | Formations lymphoïdes de l'intestin                    | <i>Andreoletti, 2000</i> |
|                                  | Nœuds lymphatiques mésentériques                       | <i>Van Keulen, 2000</i>  |
| Entre 2 et 6 mois                | Organes lymphoïdes secondaires<br>Plateau après 6 mois | <i>Andreoletti, 2000</i> |
| Entre 7 et 10 mois               | Système nerveux central<br>encéphale et moelle spinale | <i>Andreoletti, 2000</i> |
|                                  |  | <i>Jeffrey, 2001</i>     |
|                                  |  | <i>Van Keulen, 2002</i>  |
| 13 mois                          | Muscle squelettique                                    | <i>Andreoletti, 2004</i> |
| 12- 16mois<br>Première lactation | Mamelle, lait  | <i>Lacroux, 2008</i>     |
| ?? Précoce                       | sang   | <i>Hunter 2002</i>       |

- *Impact des interactions génotype / souche sur la cinétique de dissémination*

Les données générées dans les modèles d'inoculation orale ou d'infection naturelle par la tremblante classique fournissent un modèle cohérent de la dissémination des agents des EST dans l'organisme des ovins de génotype sensible. Toutefois, la cinétique de dissémination de l'agent est clairement dépendante à la fois de la souche considérée et du génotype de l'hôte.

Par exemple, dans une étude récente, les cinétiques de dissémination de la PrP<sup>Sc</sup> dans les tissus de deux groupes d'animaux (l'un VRQ/VRQ et l'autre ARQ/VRQ) exposés à la même pression naturelle d'infection ont été étudiées. Il ressort de cette expérience que la présence d'un allèle ARQ, ralentit sensiblement la dissémination de la PrP<sup>Sc</sup> dans l'organisme et aboutit à un allongement de l'ordre de 8 mois de la durée d'incubation chez les animaux ARQ/VRQ<sup>267</sup>. A l'inverse, lorsque des animaux VRQ/VRQ et ARQ/ARQ sont inoculés par voie orale avec de l'ESB d'origine bovine, la dissémination dans l'organisme de la PrP<sup>Sc</sup> est plus lente<sup>32</sup>. La durée d'incubation est cette fois-ci sensiblement plus longue chez les animaux VRQ/VRQ que chez les animaux ARQ/ARQ<sup>32, 157, 240, 448</sup>.

### 3.2.2. Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)

L'agent de l'ESB est à l'origine d'une épizootie de grande ampleur qui s'est propagée, depuis le Royaume Uni, dans la population bovine commerciale européenne à partir du début des années 1980<sup>464</sup>.

La consommation de farines de viande et d'os contaminées a été rapidement incriminée par les enquêtes épidémiologiques, pour expliquer l'origine et la diffusion de l'épizootie d'ESB<sup>471</sup>.

Tout comme pour la tremblante classique, la contamination s'effectue dans les premiers mois de la vie, par voie orale. Des inoculations expérimentales orales, utilisant différentes doses ont été menées au Royaume Uni, en Allemagne et au Canada<sup>18, 20, 461-463</sup>. Elles ont permis de reconstituer le schéma pathogénique probable de la maladie. Suite à l'exposition initiale, l'agent de l'ESB se réplique dans les plaques de Peyer iléales, ainsi que dans les formations lymphoïdes jéjunale et probablement duodénale et caecale<sup>225</sup>.

Contrairement à la tremblante des petits ruminants, les niveaux de PrP<sup>Sc</sup> s'accumulent dans les formations lymphoïdes intestinales demeurent limités et il n'y a pas de dissémination large de l'agent pathogène aux organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques, rate, amygdales, etc..). Toutefois, chez une minorité d'individus, de faibles niveaux de PrP<sup>Sc</sup> ont été détectés dans la membrane nictitante, les tonsilles linguales et plus récemment (grâce à des méthodes d'amplification des Prions *in vitro*) dans les nœuds lymphatiques mésentériques<sup>20</sup>.

La dissémination vers le SNC semble s'opérer à partir de l'intestin par le SNA. Dans la plupart des expériences, la présence de l'agent peut être démontrée, entre 15 et 20 mois post inoculation dans les ganglions nerveux autonomes péritonéaux<sup>226, 245</sup>. L'atteinte du SNC s'opère à partir de 26-28 mois chez les animaux exposés à des doses massives d'agent infectieux (100 g d'homogénat de cerveaux issus d'individus cliniquement atteints). Elle survient d'autant plus tardivement que la dose d'exposition est faible<sup>18</sup>.

Comme chez les petits ruminants infectés par les agents de la tremblante classique, l'atteinte du système nerveux central précède une phase de redistribution centrifuge via le système nerveux périphérique qui s'accompagne d'une accumulation d'agent infectieux dans les nerfs moteurs et, à faible niveau, dans le muscle squelettique<sup>82, 149, 341</sup>. Il est également probable que cette phase centrifuge puisse être responsable d'une accumulation secondaire de Prion dans les plexus nerveux intestinaux, notamment dans ses parties distales<sup>340, 415</sup>.

Il faut par ailleurs noter que l'inoculation orale d'ovins de génotypes sensibles (ARQ/ARQ) avec l'agent de l'ESB bovine est associée à un schéma pathogénique dont les phases sont

identiques (dissémination précoce et très large aux organes lymphoïdes) à celle observées en tremblante classique<sup>448</sup>. Chez les souris transgéniques exprimant la séquence bovine de la PrP, l'inoculation par voie périphérique de l'ESB bovine s'accompagne d'une accumulation de niveaux élevés de Prions dans la rate<sup>89</sup>.

Ces éléments impliquent l'existence, dans les formes acquises d'EST, d'une certaine variabilité du profil de distribution des Prions et des niveaux d'infectiosité s'accumulant dans les tissus. Cette variabilité est gouvernée, au-delà de la seule nature de la séquence PrP, par des mécanismes inconnus, définis par l'interaction entre l'agent infectieux et l'hôte.

### **3.2.3. Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeld Jakob**

Cette maladie est apparue en 1996 au Royaume-uni. A l'heure actuelle, environ 225 cas de vMCJ cliniques ont été recensés dans le monde, principalement au Royaume Uni et en France. Au plan clinique, elle diffère très significativement des autres formes d'EST décrites chez l'homme<sup>474</sup>. La maladie débute par des signes psychiatriques souvent marqués : dépression grave, hallucinations, agitation. Ils sont associés à des douleurs des membres et de la face. Les signes nerveux ne débutent qu'après quelques mois et la phase clinique est globalement plus longue (14 mois en moyenne) que celle de la sMCJ<sup>482</sup>. L'âge des personnes atteintes (30 ans en moyenne) contraste avec celui des patients atteints des autres formes décrites d'EST.

L'émergence du vMCJ est la conséquence d'une exposition alimentaire à l'agent de l'ESB. Dès 1997, des typages par bioessai sur souris conventionnelle ont permis de démontrer que l'ESB bovine et le vMCJ étaient causés par l'agent de l'ESB<sup>75, 108, 219, 273</sup>. (cf. 2.1.2)

Durant la première décennie de l'épidémie d'ESB, il a été estimé au Royaume Uni qu'environ un demi-million de bovins infectés soient entrés dans la chaîne alimentaire, sans qu'aucune mesure ne limite l'exposition des consommateurs (retrait des tissus les plus virulents).

Le schéma pathogénique du vMCJ chez l'homme n'a pas pu, pour des raisons évidentes (nombre de patients atteints, détection des patients au stade clinique, problème éthique), être étudié avec autant de précisions que celui des EST animales. Toutefois, l'étude *post mortem* de certains cas de vMCJ, associée à des expérimentations menées chez des primates (inoculations par voie centrale et périphérique) ont permis d'établir de larges similitudes en matière de distribution tissulaire de l'agent infectieux, entre les patients atteints de vMCJ et les ovins atteints de tremblante classique<sup>74, 194, 216, 218, 222, 233, 356, 473</sup>.

Il semble notamment que chez les patients atteints de vMCJ, il existe une dissémination primaire de l'agent infectieux aux organes lymphoïdes (Plaques de Peyer, rate, noeuds

lymphatiques, amygdales...) sans qu'il soit toutefois possible d'en préciser la dynamique exacte, notamment la précocité après contamination.

Sur la base de ces données, une étude de prévalence du vMCJ a été réalisée par détection immunohistochimique de la PrP<sup>Sc</sup> dans les pièces d'appendicectomie de patients anglais. L'exploitation de ces données indique une prévalence probable de 1 cas de vMCJ pour 2000 personnes dans les cohortes nées entre 1947 et 1985<sup>181</sup>.

### **3.3. Quel schéma pathogénique pour les formes spontanées d'EST**

Le concept de maladie à Prion spontanée repose sur l'hypothèse d'une propagation dans le SNC, d'un prion issu d'un défaut de repliement des molécules de PrP<sup>C</sup>. A partir de cet évènement, le prion va disséminer via les structures anatomiques capables d'assurer son transport et/ou sa réplication. Le SNC étant initialement atteint, la phase préclinique d'incubation de la maladie est supposée être significativement plus brève que celle observée dans les formes acquises de la maladie, comme cela est le cas lors d'inoculation intracérébrale comparativement à une inoculation orale. Ce phénomène implique dans les formes spontanées de maladie, une faible dissémination de l'agent aux organes périphériques.

Le concept des maladies à Prion spontanées/acquises, s'il paraît intellectuellement satisfaisant, souffre dans la réalité de certaines incohérences.

#### **3.3.1. Maladie de Creutzfeldt-Jakob**

La sMCJ est considérée comme l'archétype de la maladie à prion spontanée. Cette origine supposée de la maladie a été indirectement renforcée par le caractère apparemment limité de la distribution de l'agent infectieux dans l'organisme des individus atteints. En effet, l'agent infectieux a longtemps été considéré comme principalement, voire uniquement cantonné au système nerveux central et périphérique. Cette distribution limitée contraste avec celle observée chez les patients atteints de vMCJ, qui est une forme acquise d'EST chez l'homme<sup>4</sup>.

Bien qu'elle semble cohérente, l'origine spontanée des cas de sMCJ demeure théorique. En effet, aucun modèle *in vitro* ou *in vivo* (souris transgénique) n'a permis pour l'instant de générer, à partir d'une séquence humaine de PrP (Met ou Val 129), de propagation spontanée de Prion.

Par ailleurs, la transmission interindividuelle de la sMCJ est possible. A ce titre, l'exemple du Kuru est particulièrement intéressant. Le Kuru est une maladie décrite dans les années 1950 au sein des populations tribales des Fore du Sud en Papouasie-Nouvelle Guinée<sup>485</sup>. La maladie affectait principalement les femmes, les enfants et les jeunes adolescents

indépendamment du genre et seulement 2% d'hommes adultes. Dans les années 1950, des anthropologues ont émis l'hypothèse que la maladie du Kuru puisse être associée à la pratique de rites funéraires cannibales<sup>289</sup>. En effet, après un décès, chez les Foré du Sud la plupart des parties du corps du défunt étaient consommées: les femmes et leurs enfants mangeaient essentiellement le cerveau et certains viscères, alors que les hommes se réservaient les parties musculaires, symbole de courage et de force. En revanche chez les Foré du Nord, tribus issues de la même ethnie, mais ayant abandonné ces rites funéraires, la maladie était inconnue. Quelques années plus tard, plusieurs équipes confirmèrent la transmission intracérébrale de la maladie à différents modèles de primates humains<sup>166</sup> et non humains<sup>164, 165</sup>.

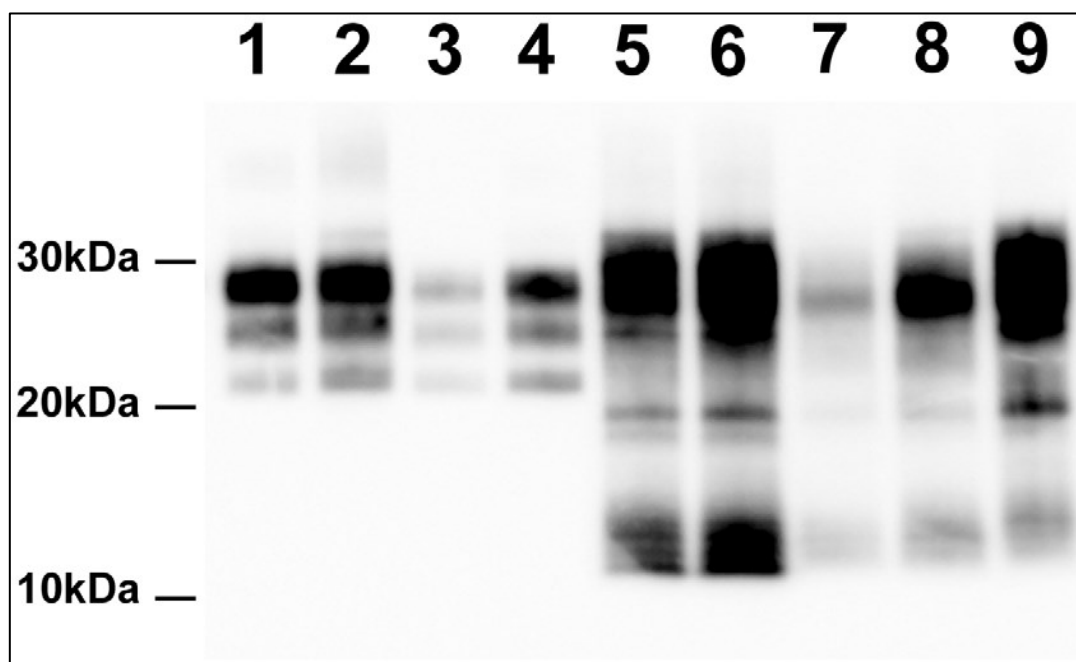
L'origine de la maladie n'est pas complètement éclaircie, mais les similarités de caractères de souches observées entre les cas de Kuru et de sMCJ suggèrent une contamination initiale à partir d'un ou plusieurs cas d'EST sporadique, dont l'agent aurait ensuite été propagé horizontalement via le cannibalisme<sup>452</sup>. De manière intéressante, la distribution de l'agent infectieux dans l'organisme des individus atteints de Kuru ne semble pas différer fondamentalement de celle observée dans les cas de sMCJ, ce qui va à l'encontre d'une dissémination différente entre formes acquise et formes supposées spontanées.

Enfin, très récemment, des éléments expérimentaux démontrent que la propagation de Prions animaux (différents isolats de tremblante classique) chez des souris transgéniques exprimant la PrP humaine aboutit à la propagation de Prions identiques à ceux responsables de cas de sMCJ<sup>88</sup>. Ces données impliquent que l'hypothèse d'une origine acquise (et non spontanée) des cas de MCJ a au moins autant de consistance que l'hypothèse de leur origine spontanée.

### **3.3.2. Tremblante atypique des petits ruminants**

Cette forme de tremblante a été identifiée en 1998, chez le mouton, en Norvège<sup>36</sup>. La souche, caractérisée par un profil biochimique inédit a ainsi été dénommée Nor98. La PrP<sup>res</sup>, détectée dans l'encéphale des animaux atteints, avait un profil électrophorétique à 5 bandes, qui contrastait avec le profil à 3 bandes décrit jusqu'alors dans les cas classiques de tremblante<sup>38</sup> (Figure 16). De plus, la résistance à la digestion par la PK de la PrP<sup>Sc</sup> était partielle est beaucoup plus réduite, en comparaison des cas de tremblante classique<sup>80</sup>.





**Figure 16: Profil électrophorétique de PrP<sup>res</sup> extraites d'isolats de tremblante classique et atypique dans différents tissus**

Lignes 1 à 4 : tremblante classique. Lignes 5 à 9 : tremblante atypique. D'après<sup>15</sup>

Les animaux atteints sont en moyenne plus âgés que dans la forme classique<sup>36</sup> et le tableau clinique différent ; le signe dominant est une ataxie sans prurit ou perte de pelage<sup>260</sup>.

A partir des années 2000, la surveillance active des EST des petits ruminants a permis d'identifier d'autres cas dans la plupart des pays d'Europe et dans d'autres pays comme le Canada et les USA<sup>36</sup>. Plus récemment, la tremblante atypique a été détectée en Australie et en Nouvelle Zélande<sup>256</sup>, deux pays considérés historiquement par l'OIE comme indemne de tremblante.

L'examen rétrospectif de banques de tissus a permis de mettre en évidence des cas de tremblante atypique, sur des échantillons d'ovins collectés dans les années 80<sup>457</sup>. L'analyse des données d'épidémiologie des EST animales a montré que la fréquence relative des cas de tremblante atypique détectés dans la population est demeurée stable en Europe entre 2002 et 2007<sup>314</sup>. Ces données suggèrent que la tremblante atypique pourrait circuler depuis plusieurs décennies, dans les populations de petits ruminants et que l'accroissement apparent de la fréquence des cas atypiques détectés résulte d'une identification plus performante de ces cas par le système de surveillance, plutôt que du développement d'une épidémie.

Alors que les formes dites classiques de tremblante des petits ruminants sont considérées comme l'archétype des EST acquises, la tremblante dite atypique est, dans les mêmes espèces, considérées comme un exemple d'EST spontanée.

Les schémas pathogénique et de distribution tissulaire de l'agent demeurent parcellaires. Cependant, la PrP<sup>Sc</sup> n'a pu être mise en évidence dans les tissus périphériques collectés à partir de cas naturels ou expérimentaux de tremblante atypique<sup>15, 36</sup>. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de l'agent, soit ici cantonnée au SNC, renforçant l'hypothèse que la tremblante atypique serait liée à un défaut endogène de repliement de la PrP<sup>C</sup>, sans intervention de facteur extérieur<sup>36</sup>. De plus, une étude de la prévalence de la tremblante atypique, dans les troupeaux où un cas avait déjà été identifié et dans une population générale témoin, n'a pas mis en évidence de différence significative<sup>151</sup>, suggérant que cette forme serait peu voir non contagieuse.

Pour autant, le caractère transmissible de la tremblante atypique a été clairement établi par voie intracérébrale, dans des souris transgéniques exprimant la PrP ovine, ainsi que chez le mouton<sup>151, 278, 405</sup>. Ces modèles ont également permis de mettre en évidence la présence d'infectiosité dans les tissus périphériques, à des taux plus faibles que pour la tremblante classique<sup>15</sup>. L'inoculation par voie orale à des ovins sains, permet la transmission de la maladie. Chez ces individus, la PrP<sup>res</sup> n'était détectable que dans le SNC, alors que l'infectiosité (bioessais sur souris transgénique ovine) a pu être détectée dans certains tissus périphériques<sup>406</sup>.

Ces données indiquent la possibilité d'une transmission inter-individuelle de cet agent comme origine de la maladie.

Par ailleurs, de manière originale, la distribution de l'agent infectieux dans les tissus des individus inoculés par voie orale est totalement superposable (y compris en terme de profils de distribution dans l'encéphale) à celle observée dans les cas naturels de la maladie<sup>15, 406</sup>. Cette observation contrarie le principe opposant le schéma pathogénique d'une maladie spontanée à celui d'une maladie acquise.

### **3.4. Conclusions**

Des éléments expérimentaux semblent indiquer clairement une origine spontanée possible de certaines maladies à Prions chez les mammifères. Pourtant, le cadre théorique qui a été élaboré afin d'attribuer une origine acquise ou spontanée à une forme donnée d'EST demeure incomplet.

Il apparaît, en particulier, que la dichotomie basée sur des schémas pathogéniques différents ignore certains éléments factuels.

Pourtant, ces phénomènes sont de première importance en matière de santé publique et de prévention des risques. En effet, l'élaboration des stratégies de prévention des risques de transmission des EST dépend directement de la distribution et des niveaux d'infectiosité s'accumulant dans les tissus des individus en incubation ou atteints d'EST.

#### 4. EVALUATION ET PREVENTION DES RISQUES DE TRANSMISSION IATROGENES DES EST

La médecine moderne a largement recours à des produits biologiques dérivés d'êtres humains ou d'animaux (médecine transfusionnelle, insuline, vaccins), ainsi qu'aux greffes de tissus ou d'organes. De nombreux exemples d'infections iatrogènes (HIV par exemple) illustrent les risques de transmission involontaire d'agent pathogène inhérents à ces pratiques. Malgré le développement des techniques d'ingénierie moléculaire (hormones de synthèse) et tissulaire (culture autologue de tissu pour les greffes de peau), l'utilisation de matériel prélevé sur des individus hétérologues demeure une ressource thérapeutique essentielle, notamment en médecine transfusionnelle.

Peu de temps après la démonstration du caractère transmissible des EST<sup>116, 117</sup>, l'existence d'un risque de transmission iatrogène de ce type de maladie a été objectivé. En 1946, William Gordon en utilisant un vaccin inactivé contre le *looping-ill* (arbovirose due à un *Flavivirus*), préparé avec des cultures virales propagées à partir de de cerveau ovine constata la transmission de cas de tremblante dans les troupeaux vaccinés<sup>186</sup>. Plus récemment, un autre épisode est apparu en Italie suite à l'utilisation de vaccins contre *Mycoplasma agalactiae*, agent responsable de mammite, d'arthrite et de kératite, chez des moutons et des chèvres<sup>84</sup>.

Chez l'homme, l'identification des premiers cas de transmission iatrogène remonte au milieu des années 70. Ces cas correspondent à des contaminations cérébrales directes par des instruments neurochirurgicaux<sup>475</sup>, des aiguilles stéréotaxiques<sup>43</sup> et des électrodes intracérébrales utilisées dans les électroencéphalogrammes corticaux<sup>62</sup>. Ces instruments avaient été probablement utilisés auparavant chez des patients en incubation ou atteints de MCJ, puis stérilisés par des méthodes classiques de décontamination, inefficaces sur les Prions. Plus de 2 ans après la dernière utilisation chez l'homme, un jeu d'électrodes intracérébrales incriminé dans un cas de transmission, fut soumis à un protocole de nettoyage et désinfection classique et réimplanté à un chimpanzé. L'animal développa une encéphalopathie spongiforme 18 mois plus tard<sup>176</sup>.

Les cas de transmission de MCJ (cf 4.1.2) combinés au caractère très atypique des EST (durée d'incubation, résistance de l'agent, difficulté à le détecter) ont conduit les autorités sanitaires de nombreux pays, ainsi que l'organisation mondiale de la santé (OMS), à évaluer les risques de transmission iatrogène de ce type de maladie et, le cas échéant, à prescrire ou recommander des pratiques visant à limiter ces risques.

## **4.1.Approche de l'évaluation des risques de transmission iatrogène des EST chez l'Homme**

Sans entrer dans une analyse élaborée des modèles utilisés pour évaluer les risques de transmission des agents des EST humaines (ou animales) associés à différentes pratiques médicales, ces approches reposent toutes sur la combinaison de trois éléments :

- La fréquence des maladies à prion humaines
- La distribution dans les tissus de l'agent et les titres infectieux en jeu
- La voie d'administration du processus thérapeutique évalué et la fréquence de l'acte (nombre d'individus exposés)

### **4.1.1. Fréquence des maladies à Prions**

Il n'existe à l'heure actuelle aucun test validé permettant une détection non invasive et sensible des individus en incubation de sMCJ ou de vMCJ.

Très récemment, plusieurs équipes ont développé des outils permettant d'identifier de manière efficace, à partir d'échantillons de sang, les patients en phase clinique de vMCJ<sup>236, 266</sup>. Toutefois, en l'absence d'échantillons prélevés sur des patients asymptomatiques en incubation de la maladie, il demeure difficile d'évaluer les performances finales de ces tests et de pouvoir recommander leur utilisation pour le screening des personnes faisant don de sang, de tissus ou d'organes

Pour la sMCJ, la situation est encore moins favorable. En effet, à l'heure actuelle, les seuls tests permettant d'établir un diagnostic de certitude sont basés sur la recherche de PrP<sup>res</sup> ou d'infectiosité dans le système nerveux central. De manière évidente, de tels tests ne permettent pas un screening *ante mortem* des populations. Ils pourraient toutefois être appliqués systématiquement avant tout prélèvement sur cadavre, dans le cadre du don d'organes.

En l'absence de test de qualification des donneurs, la prévention des risques de transmission iatrogène de MCJ ne peut reposer que sur la situation épidémiologique globale : fréquence des cas observés, cohorte des personnes à risque d'être atteintes...

Pour la sMCJ, la prévalence estimée de la maladie, dans les pays dont le niveau de médicalisation et l'espérance de vie de la population sont élevés, semble varier de 1 à 2 cas par million d'habitants et par an<sup>269</sup>. Ce chiffre en fait une maladie rare.

Toutefois, en l'absence de données sur la fréquence de personnes décédées, porteuses asymptomatiques de MCJ, il semble possible qu'un nombre plus conséquent de personnes pourraient être atteinte par cette maladie, sans développer de symptômes au cours de leur vie. Une explication possible serait que la durée de l'incubation excéderait ici l'espérance de vie<sup>109</sup>.

A ce jour, 225 cas cliniques de vMCJ ont été identifiés dans le monde. Bien que le nombre de nouveaux cas détectés soit en constante diminution depuis 2002 et que les modèles mathématiques les plus récents prévoient un nombre de cas inférieur à 3000 au cours des 50 prochaines années, de très nombreuses incertitudes entourent cette maladie et incitent à la plus grande prudence dans les prévisions de l'évolution future de cette épidémie. Ces réserves concernent notamment le nombre d'individus infectés et asymptomatiques dans la population exposée à l'agent de l'ESB, ainsi que la durée d'incubation. Une première étude rétrospective menée au Royaume-Uni et basée sur la détection de PrP<sup>Sc</sup> dans une banque d'échantillons d'amygdale et d'appendice, a révélé que la prévalence du vMCJ dans la population de ce pays pourrait atteindre 1 pour 4000<sup>169</sup>. Cette valeur apparaît bien plus élevée que celle suggérée par le nombre de cas de vMCJ effectifs, déclarés dans la population générale<sup>223</sup>. Elle a pourtant été confirmée par une nouvelle étude incluant l'analyse de plus de 30000 pièces d'appendicectomie. Cette deuxième étude a indiqué qu'au Royaume uni 1 individu pour 2000 personnes nées entre 1941 et 1985 serait porteur du vMCJ<sup>181</sup>. Cette valeur n'implique en rien que ces personnes vont développer au cours de leur existence une maladie clinique (voir supra). , chacun d'entre eux représente une source potentielle de transmission iatrogène de cette maladie.

En dehors du Royaume-Uni, pays pour lequel, compte tenu de l'ampleur de l'épidémie d'ESB, la population peut être considérée comme étant celle qui a subi l'exposition la plus massive à cet agent, il n'y a que peu d'élément permettant d'évaluer la fréquence potentielle des individus porteurs du vMCJ. En France, il est classiquement avancé que, compte tenu de l'ampleur de l'épidémie d'ESB et du nombre de cas cliniques observés jusqu'à présent, la fréquence des individus contaminés devrait être de l'ordre de 1/10 de celle estimée au Royaume-Uni. Pour les autres pays, qu'ils soient Européens ou non, il est très difficile d'évaluer la fréquence potentielle de la maladie<sup>280</sup>.

Le niveau de médicalisation des populations rend incertain dans beaucoup pays l'identification de cas de vMCJ. De même, l'importation de produits animaux depuis la grande Bretagne et donc l'exposition potentielle des consommateurs pendant la période de

l'épidémie apparaît comme difficilement traçable. L'existence endémique de l'ESB dans les populations bovines nationales est également difficile à évaluer. Enfin, dans plusieurs pays, le système de prise de décision sanitaire confronte, la réalité et les incertitudes relatives à la présence de personnes infectées par le vMCJ, aux enjeux économique-politiques. A titre d'exemple, le marché du plasma humain destiné à la fabrication de médicaments dérivés du sang (MDS) à partir de pays comme les Etats-Unis et la Chine se chiffre en dizaines de milliards d'euros. Ces deux pays nient tous deux le fait que leur population ait pu être exposée à l'ESB.

#### **4.1.2. Distribution de l'agent infectieux et Infectiosité relative des tissus**

La possibilité d'une transmission iatrogène de MCJ, à partir d'un individu en incubation ou atteint de la maladie, dépend de manière évidente, de la présence de l'agent pathogène et des niveaux d'infectiosité dans les tissus et les fluides biologiques d'intérêt.

Nous avons déjà évoqué l'impact, en tout cas théorique, d'une origine spontanée centrale (actuellement considérée comme l'origine des cas de sMCJ) ou infectieuse (vMCJ) sur la distribution et la dynamique supposées d'accumulation de l'agent dans l'organisme (cf 3.2 et 3.3). Il faut noter cependant qu'à l'heure actuelle, pour la sMCJ, aucun élément ne permet d'évaluer la durée de la phase d'incubation asymptomatique ou la précocité d'occurrence d'une distribution centrifuge de l'agent. De même pour le vMCJ, il n'y a que très peu d'éléments sur la précocité, au cours de la phase d'incubation, de l'accumulation de l'agent dans les tissus périphériques ou le système nerveux.

Les niveaux d'infectiosité présents dans les différents tissus et fluides biologiques des personnes en incubation de la maladie apparaissent comme un autre facteur déterminant de l'évaluation des risques de transmission iatrogène. Depuis la fin des années 90, l'OMS s'est efforcée au travers d'un document de synthèse de réunir l'ensemble des éléments relatifs à la présence et aux niveaux d'infectiosité dans les tissus de patients atteints de sMCJ et de vMCJ (Tableau 4)

**Tableau 4: Données OMS relatives à la distribution tissulaire de l'infectiosité dans les EST**

- **IA : tissus hautement infectieux** ; principalement les SNC qui atteint un niveau important d'infectiosité en phase terminale de la maladie, ainsi que d'autres tissus anatomiquement lié au SNC
- **IB : tissus de faible infectiosité** ; comprend les tissus périphériques qui ont été testés positifs pour l'infectiosité ou la PrP<sup>res</sup> dans au moins une forme d'EST
- **IC : tissus sans infectiosité détectable** : tissus examinés pour l'infectiosité ou la PrP<sup>res</sup> et négatifs

| Tissus                     | IA : Tissus hautement infectieux |                   |              |                   |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------|-------------------|
|                            | vMCJ                             |                   | sMCJ         |                   |
|                            | Infectiosité                     | PrP <sup>Sc</sup> | Infectiosité | PrP <sup>Sc</sup> |
| <b>Encéphale</b>           | +                                | +                 | +            | +                 |
| <b>Moelle spinale</b>      | +                                | +                 | +            | +                 |
| <b>Rétine</b>              | NT                               | +                 | +            | +                 |
| <b>Nerf optique</b>        | NT                               | +                 | NT           | +                 |
| <b>Ganglions spinaux</b>   | +                                | +                 | NT           | +                 |
| <b>Ganglion trigéminal</b> | +                                | +                 | NT           | +                 |
| <b>Hypophyse</b>           | NT                               | +                 | +            | +                 |
| <b>Dure-mère</b>           | NT                               | (+)               | +            | -                 |

Légende : + présence / - absence / **NT** non testé / ( ) données partielles ou préliminaires/ ? interprétation incertaine

Données issues du document OMS : « WHO Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies ». Mise à jour 2010

<http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf?ua=1>, consulté le 05/01/2015



| <b>IB : Tissus faiblement infectieux</b> |                     |                         |                     |                         |
|--|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
|  | <b>vMCJ</b>         |                         | <b>sMCJ</b>         |                         |
|  | <b>Infectiosité</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> | <b>Infectiosité</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> |
| <i>Système nerveux périphérique</i>      |                     |                         |                     |                         |
| <b>Nerfs périphériques</b>               | +                   | +                       | (-)                 | +                       |
| <b>Plexus entérique</b>                  | NT                  | +                       | NT                  | (-)                     |
| <i>Tissus lymphoïdes</i>                 |                     |                         |                     |                         |
| <b>Rate</b>                              | +                   | +                       | +                   | +                       |
| <b>Nœuds lymphatiques</b>                | +                   | +                       | +                   | -                       |
| <b>Amygdales</b>                         | +                   | +                       | NT                  | -                       |
| <b>Thymus</b>                            | NT                  | +                       | NT                  | -                       |
| <i>Tube digestif</i>                     |                     |                         |                     |                         |
| <b>Œsophage</b>                          | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Estomac</b>                           | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Duodenum</b>                          | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Jejunum</b>                           | NT                  | +                       | NT                  | -                       |
| <b>Iléon</b>                             | NT                  | +                       | NT                  | -                       |
| <b>Appendice</b>                         | (-)                 | +                       | NT                  | -                       |
| <b>Colon/Caecum</b>                      | NT                  | +                       | NT                  | -                       |
| <b>Rectum</b>                            | NT                  | +                       | NT                  | NT                      |
| <i>Tissu reproducteur</i>                |                     |                         |                     |                         |
| <b>Placenta</b>                          | NT                  | -                       | (+)                 | -                       |
| <b>Ovaire</b>                            | NT                  | -(+)                    | NT                  | -                       |
| <b>Uterus</b>                            | NT                  | -(+)                    | NT                  | -                       |
| <i>Autres</i>                            |                     |                         |                     |                         |
| <b>Tissu mammaire</b>                    | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Peau</b>                              | NT                  | -(+)                    | NT                  | -                       |
| <b>Tissus adipeux</b>                    | NT                  | -                       | (-)                 | -                       |
| <b>Cœur péricarde</b>                    | NT                  | -                       | -                   | -                       |
| <b>Poumons</b>                           | NT                  | -                       | +                   | -                       |
| <b>Foie</b>                              | NT                  | -(+)                    | +                   | -                       |
| <b>Rein</b>                              | NT                  | -(+)                    | +                   | -                       |
| <b>Glandes surrénales</b>                | NT                  | +                       | -                   | -                       |
| <b>Pancréas</b>                          | NT                  | -(+)                    | NT                  | -                       |
| <b>Moelle osseuse</b>                    | -                   | -                       | (-)                 | -                       |
| <b>Muscle</b>                            | NT                  | +                       | (-)                 | -                       |
| <b>Langue</b>                            | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Vaisseaux sanguins</b>                | NT                  | +                       | NT                  | +                       |
| <b>Muqueuse nasale</b>                   | NT                  | NT                      | NT                  | +                       |
| <b>Glande salivaire</b>                  | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Cornée</b>                            | NT                  | -                       | +                   | -                       |
| <i>Fluides</i>                           |                     |                         |                     |                         |
| <b>Liquide cébrospinal</b>               | -                   | -                       | +                   | -                       |
| <b>sang</b>                              | +                   | ?                       | -                   | ?                       |
| <b>Salive</b>                            | NT                  | -                       | -                   | NT                      |
| <b>Lait</b>                              | NT                  | NT                      | (-)                 | NT                      |
| <b>Urine</b>                             | NT                  | -                       | -                   | -                       |
| <b>Fèces</b>                             | NT                  | NT                      | -                   | NT                      |

| <b>IC : Tissus sans détection d'infectiosité ou de PrP<sup>Sc</sup></b> |                     |                         |                     |                         |
|---|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
|   | <b>vMCJ</b>         |                         | <b>sMCJ</b>         |                         |
|   | <b>Infectiosité</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> | <b>Infectiosité</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> |
| <b><i>Appareil reproducteur</i></b>                                     |                     |                         |                     |                         |
| <b>Testicule</b>  | NT                  | -                       | (-)                 | -                       |
| <b>Prostate, épидидyme, vésicule séminale</b>                           | NT                  | -                       | (-)                 | -                       |
| <b>Sperme</b>   | NT                  | -                       | (-)                 | -                       |
| <b>Fluides placentaire</b>  | NT                  | NT                      | (-)                 | (-)                     |
| <b>Foetus</b>   | NT                  | NT                      | NT                  | NT                      |
| <b>Embryons</b>   | NT                  | NT                      | NT                  | NT                      |
| <b><i>Appareil musculo-squeletique</i></b>                              |                     |                         |                     |                         |
| <b>Os</b>   | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Tendons</b>  | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b><i>Autres</i></b>  |                     |                         |                     |                         |
| <b>Tissu gingival</b>   | NT                  | -                       | -                   | -                       |
| <b>Pulpe dentaire</b>   | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Trachée</b>  | NT                  | -                       | NT                  | -                       |
| <b>Thyroïde</b>   | NT                  | -                       | (-)                 | -                       |
| <b><i>Fluides corporels, sécrétions</i></b>                             |                     |                         |                     |                         |
| <b>Colostrum</b>  | NT                  | NT                      | (-)                 | NT                      |
| <b>Sang de cordon</b>   | NT                  | NT                      | (-)                 | NT                      |
| <b>Salive</b>   | NT                  | NT                      | --                  | NT                      |
| <b>Larmes</b>   | NT                  | NT                      | -                   | NT                      |
| <b>Mucus nasal</b>  | NT                  | -                       | -                   | NT                      |
| <b>Bile</b>   | NT                  | NT                      | NT                  | NT                      |

Ce travail bibliographique très détaillé permet de constater la disparité des sources et des outils de détection des Prions, qui ont permis de réunir les données actuellement disponibles, pour l'évaluation des risques de transmission de la sMCJ et du vMCJ. Il montre également la fragilité de certaines données (nombre d'individus testés, dispositif expérimental peu performant, sensibilité des tests utilisés) pourtant essentielles à une évaluation pertinente des risques.

A titre d'exemple nous pouvons citer, pour la détection du vMCJ, l'utilisation de transmission sur souris conventionnelle (RIII) pour l'évaluation des titres infectieux, alors que ces modèles, du fait de la barrière d'espèce, apparaissent comme très faiblement sensibles. Pour la sMCJ, l'absence de propagation de la plupart des isolats sur modèles de rongeurs conventionnels a été compensée par le recours à des modèles primates. Ces derniers, compte tenu des contraintes évidentes inhérentes à leur utilisation, ne permettent pas une évaluation rigoureuse des titres infectieux.

Le développement des modèles de souris transgéniques pour le gène *PRNP* de différentes espèces permet (en théorie) de surmonter ces difficultés. Il faut toutefois constater, que malgré la diffusion aujourd'hui large de ces outils, aucune réévaluation systématique (ou évaluation) de la présence et des niveaux d'infectiosité dans les tissus des individus atteints de vMCJ et de sMCJ n'a été promue par les autorités sanitaires.

Au-delà de la crainte d'une remise en cause des éléments sur lesquels se sont construites jusqu'alors les politiques de prévention de la transmission iatrogène de ces maladies, il est également probable que des réticences existent, quant à l'utilisation des souris transgéniques sur-exprimant la PrP pour ce type d'étude. En effet, pour certains scientifiques, la sensibilité de détection de ces modèles pourrait dépasser celle des hôtes naturels et conduire à une perception non biologiquement pertinente de la distribution de l'agent infectieux dans les tissus des individus atteints de sMCJ et vMCJ.

#### **4.1.3. Pratiques médicales et populations exposées**

En terme de santé publique, le risque relatif de transmission iatrogène, que représente les MCJ est directement lié au public concerné et à la nature des actes médicaux pratiqués : voie d'exposition, répétition de l'acte. Les décisions doivent prendre en compte, d'une part le risque et les incertitudes, et d'autre part les bénéfices thérapeutiques pour les patients. Cet équilibre est essentiel à la compréhension du caractère plus ou moins drastique des mesures de prévention élaborées par les autorités sanitaires. Il serait toutefois très difficile de donner un arbre décisionnel générique gouvernant les prises de décisions dans ce domaine, tant les situations qu'il recouvre sont variables. A titre d'illustration, nous pouvons considérer trois exemples.

- *La greffe de tissu ou d'organes.*

Dans ce cas, le nombre de personnes potentiellement exposées est limité (un à quelques receveurs par greffon) et l'acte médical correspond à une urgence vitale pour des patients généralement atteints de maladies graves. Les conséquences en matière de santé publique de l'inclusion d'un donneur 'infecté' sont limitées.

- *Les produits labiles sanguins.*

Un donneur infecté peut faire durant sa phase d'incubation plusieurs dons. Les produits préparés à partir de ce don (Plasma frais, plaquettes, concentrés de globules rouges) seront

transfusés à un seul receveur, ce qui implique la possibilité de l'exposition de plusieurs individus.

- *Les médicaments dérivés du sang et des urines*

Dans ce cas, les dons de plusieurs centaines ou de plusieurs milliers d'individus seront mélangés avant la mise en œuvre d'une série de processus extractifs. Les lots de médicaments produits seront alors distribués à une large population (plusieurs centaines d'individus). Certaines populations comme les hémophiles, traités de manière permanente par ces médicaments sont particulièrement exposées, d'autant qu'un individu en incubation peut faire plusieurs dons.

Si l'utilisation de larges pools de produits biologiques bruts permet d'obtenir une dilution dans un large volume de l'infectiosité potentiellement apportée par un donneur infecté, il est difficile d'évaluer l'impact final de cette dilution sur l'efficacité de transmission de la maladie. A contrario, plus le nombre d'individus composant un pool est grand, plus le risque qu'il inclue un individu en incubation est important.

Compte tenu de la nécessité et de la fréquence d'utilisation des produits dérivés du sang en médecine, la possibilité d'une transmission d'une forme de MCJ par ces produits est sans doute celle qui a le plus d'implication en termes de santé publique.

## **4.2. Transmission iatrogène des formes sporadiques d'EST**

Les cas iatrogène de MCJ demeurent très rares; ils représentent environ 1% de l'ensemble des cas de MCJ rapportés jusqu'à aujourd'hui<sup>62</sup>.

### **4.2.1. Modes de contamination avérés ou suspectés**

- *Grefe de dure-mère*

Le recours à l'allogreffe de dure-mère fut longtemps une pratique répandue en neurochirurgie cérébrale et rachidienne. Aujourd'hui interdite en France, elle a été remplacée par l'utilisation de produits synthétiques.

Les premiers cas de MCJ liés à des allogreffes de dure-mère prélevées sur cadavre ont été rapportés en 1987<sup>430</sup>. En 2012, un total 228 cas a été identifié dans le monde, dont une majorité (142) au Japon<sup>62, 228</sup>. En France, les greffes de dure mère constituent à ce jour la seconde cause la plus fréquente de MCJ iatrogène (11 cas) derrière le traitement par hormone de croissance extractive. La durée d'incubation (délai entre la greffe et le déclenchement des

signes cliniques) est en moyenne de 7 ans. La majorité des patients atteints présentaient des symptômes et des lésions histologiques typiques de sMCJ. Toutefois, au Japon, environ un tiers avait une présentation clinique atypique et les signatures biochimiques PrP<sup>res</sup> chez différents patients pouvaient différer, suggérant l'implication de plusieurs souches de Prions. Le dernier cas recensé concerne un patient espagnol décédé en 2012 suite à une greffe réalisée en 1988<sup>113</sup>.

- *Hormone de croissance extractive*

Les traitements à base d'hormones extractives ont été initiés dans les années 1950. Plus de 30.000 enfants souffrant d'une insuffisance de synthèse de cette hormone ont reçu un traitement à base d'hormone extraite d'hypophyses prélevées sur cadavres (en France jusqu'en 1985), avant l'utilisation d'hormone de croissance synthétique. 226 cas ont été répertoriés dans le monde dont 119 en France entre 1991 à 2009<sup>56</sup>. La Grande Bretagne, le Japon et les Etats Unis représentent les autres foyers principaux de MCJ liée à l'hormone de croissance. Ces cas de transmission constituent la preuve, que l'infectiosité présente dans un matériel biologique peut persister dans le produit final malgré des étapes de purification biochimiques (chromatographie sur colonnes) et l'application de règles strictes en matière de contrôle qualité des produits finis.

- *Greffe de cornée*

Les affections cornéennes, sont à l'origine de 1.5 à 2.0 millions de nouveaux cas de cécité unilatérale chaque année dans le monde (données OMS). Le seul traitement envisageable est alors la greffe de cornée « de pleine épaisseur » ou kératoplastie transfixiante, qui est la plus ancienne greffe de tissus réalisée chez l'homme. Aux Etats-Unis, environ 30000 greffes sont réalisées chaque année et environ 4000 en France.

Actuellement, 5 cas de patients décédés de sMCJ chez des patients receveurs d'une greffe de cornée ont été décrits<sup>63</sup> (Tableau 5).

Parmi ces cas, le plus ancien remonte à 1974. Il est intéressant à double titre, puisqu'il représente une des premières suspicions historiques de transmission iatrogène de la MCJ et c'est le seul cas, pour lequel l'occurrence d'une sMCJ a été confirmée chez le donneur et chez le receveur de la cornée<sup>144</sup>. Les autres cas de sMCJ chez les receveurs demeurent spéculatifs et sont classés en transmission possible. En 1997, un donneur a été confirmé comme atteint des sMCJ peu après (3 et 4 mois) que ses deux cornées, ainsi que de la sclère aient été

transplantées. Un seul des deux greffons a été retiré, et aucun des patients n'a développé de signes évocateurs de MCJ iatrogène<sup>436</sup>.

**Tableau 5: Cas de MCJ associés à des greffes de cornées**

D'après<sup>297, 436</sup>

|  | Duffy <sup>144</sup> | Uchiyama <sup>441</sup> | Heckmann <sup>209</sup> | Rabinstein <sup>374</sup> |
|--|----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Date</b>                              | 1974                 | 1994                    | 1997                    | 2002                      |
| <b>Age patient</b>                       | 55                   | 63                      | 45                      | 56                        |
| <b>Délai depuis la chirurgie</b>         | 18 mois              | 15 mois                 | 30 ans                  | 2, 4 et 6 ans             |
| <b>Diagnostic définitif MCJ donneur</b>  | Oui                  | Non renseigné           | Oui                     | Non renseigné             |
| <b>Diagnostic définitif MCJ receveur</b> | Oui                  | Oui                     | Non                     | Oui                       |
| <b>Classification</b>                    | Cas confirmé         | Transmission possible   | Transmission probable   | Transmission possible     |

La cornée est classée comme tissu à bas risque (IB) par l'OMS, car en dépit d'évidence épidémiologique, la PrP<sup>Sc</sup> n'a pas pu être détectée dans d'autres tissus oculaires que la rétine et le nerf optique, qui sont classés à haut risque (IA)<sup>207, 208, 451</sup>.

Il n'existe, à l'heure actuelle, que très peu de données relatives à la présence d'infectiosité dans la cornée humaine. Des bioessais pratiqués sur souris conventionnelles ont bien mis en évidence des lésions spongiformes chez une souris sur six inoculées avec un homogénat de cornée d'un patient décédé de sMCJ<sup>421</sup>. Une transmission par injection intraoculaire d'homogénat de cornée issus de patients atteints de sMCJ a également été rapportées chez le cochon d'inde<sup>305</sup>. Toutefois, ces données ont toujours été considérées comme incomplètes voire équivoques par la communauté scientifique<sup>328</sup> et la transmission effective d'une EST par une greffe transfixiante de cornée reste à démontrer.

- *D'autres modalités de contamination ?*

La possibilité d'un risque de transmission de sMCJ par le sang ou les produits dérivés du sang et les urines a été envisagé dès le début des années 80<sup>483</sup>. Plusieurs études épidémiologiques visant à établir un risque accru de MCJ chez les patients transfusés ou chez les hémophiles ont été menées. Ces études n'ont pas révélé l'existence d'un risque augmenté de maladie dans ces populations.

Ces résultats peuvent sans doute être considérés comme rassurants, au sens où l'émergence d'un épisode majeur de cas secondaire de sMCJ liés à ses produits est peu probable.

Toutefois, il semble difficile compte tenu des limites de ces travaux de considérer qu'à l'échelle individuelle, le risque de contracter une sMCJ par le biais d'une transfusion ou d'un traitement par des MDS ou des urines est nul<sup>483</sup>.

En effet, ces études reposent sur des effectifs trop limités au regard de la fréquence des cas de sMCJ et des cohortes de personnes, dont la durée de vie est généralement écourtée. Compte tenu des durées potentielles d'incubation des formes acquises de sMCJ (cf 3.1.3, Kuru), l'existence de contaminations secondaires demeurant asymptomatiques durant l'espérance de vie des personnes traitées est envisageable<sup>3, 158</sup>.

Les études expérimentales visant à détecter la présence d'infectiosité dans le sang de patients atteints de sMCJ sont très peu nombreuses et leur résultats, le plus souvent, difficiles à interpréter<sup>126, 306</sup>.

Dans ce contexte, la génération de données expérimentales fiables permettant d'objectiver la présence éventuelle d'agent infectieux dans les urines et le sang apparait comme indispensable.

### **4.3. Transmission iatrogène du variant de la MCJ**

Les seuls cas iatrogènes de vMCJ identifiés à ce jour sont consécutifs à l'utilisation de produits sanguins.

En 2004, un patient anglais atteint de vMCJ ayant développé des signes cliniques 6.5 ans après avoir reçu une transfusion de concentrés de globules rouges issus d'un donneur décédé de vMCJ (3.5 ans après le don) a été identifié<sup>235</sup>. Dans ce même pays, trois autres cas probables de transmission par transfusion de concentrés de globules rouges non déleucocytés, ont été signalés.

Toujours au Royaume-Uni, 32 des 167 cas de vMCJ avaient donné leur sang au moins une fois. Une enquête épidémiologique a pu établir un lien entre 18 de ces donneurs et 66 transfusions<sup>217</sup> (Tableau 6). Deux des cas de vMCJ post transfusionnels sont associés au même donneur. Pour ces deux cas, la date du don précède de relativement peu l'apparition des signes cliniques chez le donneur (17 et 20 mois respectivement). Le délai de déclaration de la maladie chez les receveurs est également assez court (8 ans et 8,5 ans respectivement), en comparaison du délai d'incubation supposé plus élevé de la maladie lors d'une transmission primaire<sup>355, 478</sup>. Un autre cas («2ème cas dit transfusionnel») a été identifié par détection de la PrP<sup>Sc</sup> dans la rate et un nœud lymphatique cervical du sujet. Toutefois, il n'a été ni notifié, ni

comptabilisé dans les cas de vMCJ en Angleterre à son décès, car il ne présentait pas de signes cliniques évocateurs de vMCJ. Il s'agissait d'un patient Met/Val au codon 129 du gène *PRNP*<sup>357</sup>. Ce cas a pu être identifié car le patient faisait l'objet d'un suivi particulier; il appartenait à la cohorte des 66 receveurs de produits sanguins labiles, issus de 18 donneurs qui ont développé une vMCJ ultérieure au don<sup>217</sup>.

**Tableau 6: récapitulatif des cas transfusionnels anglais**

| Numéro du cas   | 1                  | 2                       | 3                  | 4                  |
|---|--------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Date de notification                                    | 2003               | 2004                    | 2006               | 2007               |
| PSL transfusé   | CGR                | CGR                     | CGR                | CGR                |
| Génotype  | Met-Met            | Met-Val                 | Met-Met            | Met-Met            |
| Signes cliniques développés par le receveur             | Evocateurs de vMCJ | Diagnostic post-mortem* | Evocateurs de vMCJ | Evocateurs de vMCJ |
| Délai entre don et maladie du donneur                   | 40 mois            | 18 mois                 | 20 mois            | 17 mois            |
| Délai entre transfusion et signes cliniques du receveur | 6,5 ans            | Décès 5 ans après       | 8 ans              | 8,5 ans            |

PSL : produits sanguins labiles. CGR non DL : concentrés de globules rouges, ici non déleucocytés

\* PrP<sup>res</sup> dans la rate et les NL cervicaux sans signes cliniques (pas de PrP<sup>res</sup> dans l'encéphale)

Un cas supplémentaire pourrait impliquer les médicaments dérivés du sang (Facteur VIII). En effet de la PrP<sup>Sc</sup> a été détectée dans la rate d'un patient anglais hémophile, de génotype hétérozygote (M/V), décédé d'une cause indépendante et n'ayant jamais manifesté de signes cliniques ou neuropathologiques évocateur du vMCJ. Ce patient avait reçu en 1996, plusieurs lots de facteur VIII incluant le plasma d'un donneur ayant développé une vMCJ quelques mois après le don<sup>356</sup>. Toutefois, ce patient présentait plusieurs facteurs de risques d'exposition au vMCJ, comme des transfusions répétées, plusieurs interventions chirurgicales, ou la consommation de viande bovine. Ces sources de contamination potentielles ne permettent pas d'établir le lien de causalité définitif entre l'utilisation des lots de Facteur VIII suspects et la maladie.

En France, 3 des 23 sujets atteints de vMCJ ont été donneurs de sang mais aucun cas de vMCJ d'origine transfusionnelle n'a été identifiée jusqu'à aujourd'hui<sup>279</sup>.

#### 4.4. Infectiosité sanguine et transmission par voie transfusionnelle

En l'absence de données relatives à la présence d'infectiosité dans le sang des patients atteints de sMCJ ou de vMCJ, les modèles animaux d'infection par les Prions ont constitué, au cours



de 25 dernières années, la principale source d'information utilisée pour modéliser les risques de transmission des maladies à prion par voie transfusionnelle et par les M.

#### 4.4.1. Infectiosité associée au sang et aux fractions sanguines

Les travaux de mise en évidence et de quantification d'infectiosité dans le sang d'individus atteints d'EST ont débuté dès les années 1960. Les résultats ont longtemps indiqué, qu'en dépit de faibles niveaux détectables dans la plupart des modèles expérimentaux rongeurs de la maladie, aucune infectiosité ne pouvait être identifiée dans le sang des animaux appartenant à des espèces naturellement atteints d'EST. L'essentiel de ces travaux reposait sur l'inoculation de fractions sanguines à des souris conventionnelles (Tableau 7). La sensibilité de cet outil, compte tenu du phénomène de barrière d'espèce, est insuffisante pour détecter de faibles niveaux d'infectiosité dans les tissus d'espèces hétérologues.

C'est ainsi que jusqu'au début des années 2000, la majorité des connaissances acquises dans ce domaine découlait des modèles expérimentaux rongeurs d'EST.

Les titres infectieux rapportés étaient compris entre 1 et 10  $DI_{50}/mL$  de sang en phase asymptomatique et pouvait atteindre 100  $DI_{50}/mL$  au cours de la phase clinique<sup>65, 96</sup>. Par ailleurs, 40% de l'infectiosité était associée au *Buffy coat*, le reste étant associé au plasma<sup>65, 188</sup>. Par contre, l'infectiosité associée au *Buffy coat* pouvait être nettement réduite par un lavage en PBS<sup>280</sup>. L'infectiosité endogène de cette fraction leuco-plaquettaire est quasi exclusivement liée aux cellules nucléées, les plaquettes ne contenant que des niveaux marginaux d'infectiosité, à la fois chez le hamster et la souris<sup>227</sup>.

Sans connaître la distribution des Prions dans le sang des autres espèces, les données issues de ces modèles furent utilisées pour évaluer le risque de transmission iatrogène du vMCJ. Une part importante de l'infectiosité étant présente dans le plasma de ses rongeurs, il a été proposé qu'une simple leuco-déplétion ne pourrait être efficace pour prévenir les cas de transmission d'EST par voie transfusionnelle<sup>438</sup>.

Sur un plan dynamique, dans les modèles rongeurs, la présence très précoce d'infectiosité dans le sang (prionémie) a été démontrée. Chez le cobaye inoculé par voie intracérébrale avec un agent dérivé d'un isolat de sMCJ (adapté préalablement au cobaye), la prionémie est présente tout au long de la phase d'incubation<sup>304</sup>. Chez le hamster inoculé par voie intrapéritonéale avec la souche 263K, elle peut être détectée dès la première semaine et persiste jusqu'à la mort des individus. Toutefois, l'intensité de cette prionémie semble diminuer fortement durant la fin de la phase d'incubation et la phase clinique de la maladie<sup>86, 93</sup>.

**Tableau 7: Synthèse des résultats portant sur les travaux historiques de détection d'infectiosité sanguine dans les maladies à prion**

Modifié d'après<sup>60</sup>

| Espèce  |               | Inoculum                 | Voie d'inoculation | Cas +/-total des donneurs | Références             |
|---|---------------|--------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------|
| Donneur   | Receveur      |                          |                    |                           |                        |
| <u>Tremblante (naturelle)</u>                   |               |                          |                    |                           |                        |
| Caprin  | Souris        | Culot cellulaire/sérum   | IC                 | 0/3                       | <i>Hadlow 1980</i>     |
| Ovin  | Souris        | Culot cellulaire/sérum   | IC                 | 0/18                      | <i>Hadlow 1982</i>     |
| <u>ESB (naturelle)</u>                          |               |                          |                    |                           |                        |
| Bovin   | Souris        | Culot cellulaire/sérum   | IC + IP            | 0/2                       | <i>Fraser 1994,</i>    |
|   |               | Buffy coat               | IC +IP             | 0/2                       |                        |
| <u>Tremblante (expérimentale)</u>               |               |                          |                    |                           |                        |
| Caprin  | Caprin        | Sang total               | IC                 | 0/14                      | <i>Pattison 1962</i>   |
| Ovin  | Souris        | Sérum                    | IC                 | 1/1                       | <i>Gibbs 1965</i>      |
| Souris  | Souris        | Sang total               | IC                 | 0/39                      | <i>Eklund 1967</i>     |
| Souris  | Souris        | Sérum                    | IC                 | 1/1 (pool)                | <i>Clarke 1967</i>     |
| Rat   | Rat           | Sérum                    | IC                 | 1/1 (pool)                | <i>Clarke 1967</i>     |
| Souris  | Souris        | Sang total               | IC                 | 3/13                      | <i>Dickinson 1969</i>  |
| Caprin  | Souris        | Culot cellulaire         | IC ou SC           | 0/20                      | <i>Hadlow 1974</i>     |
| Hamster   | Hamster       | Sang total               | IC                 | 0/9                       | <i>Diringer 1984</i>   |
| Hamster   | Hamster       | Extrait sanguin          | IC                 | 5/5 (pools)               | <i>Diringer 1984</i>   |
| Hamster   | Hamster       | Extrait sanguin          | IC                 | 10/11 (pools)             | <i>Casaccia 1989</i>   |
| <u>Encéphalopathie du vison (expérimentale)</u> |               |                          |                    |                           |                        |
| Vison   | Vison         | Sérum                    | IC                 | 0/1                       | <i>Marsh 1969</i>      |
| Vison   | Vison         | Sang total, ou fractions | IC                 | 0/8 (pools)               | <i>Marsh 1969</i>      |
| <u>MCJ (expérimentale)</u>                      |               |                          |                    |                           |                        |
| Cochon d'Inde                                   | Cochon d'Inde | Buffy coat               | IC, SC, IM, IP     | 10/28                     | <i>Manuelidis 1978</i> |
| <u>GSS (expérimental)</u>                       |               |                          |                    |                           |                        |
| Souris  | Souris        | Buffy coat               | IP                 | 4/7 (pools)               | <i>Kuroda 1983</i>     |
| Souris  | Souris        | Buffy coat/plasma        | IC                 | 5/5 (pools)               | <i>Brown 1999</i>      |
|   |               | Buffy coat/plasma        | IV                 | 2/2 (pools)               | <i>Brown 1999</i>      |
| <u>MCJ (naturelle)</u>                          |               |                          |                    |                           |                        |
| Homme   | Souris        | Sang total               | IC                 | 2/13                      | <i>Tateishi 1985</i>   |
| Homme   | Cochon d'Inde | Buffy coat               | IC                 | 1/9 (pools)               | <i>Manuelidis 1985</i> |
|   | Hamster       | Buffy coat               | IC                 | 2/5                       |                        |

**Tableau 8: Travaux ultérieurs à l'année 2000 dans le domaine de l'infectiosité des maladies à prion**

Modifié d'après<sup>60</sup>

| Espèce                                     |           |                  |                    |                           |                                     |
|--|-----------|------------------|--------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Donneur                                    | Receveur  | Inoculum         | Voie d'inoculation | Cas +/-total des donneurs | Références                          |
| <u>Tremblante (naturelle)</u>              |           |                  |                    |                           |                                     |
| Ovin                                       | Ovin      | Sang total       | IV                 | 4/10                      | Houston 2005                        |
|  |           | Buffy coat       | IV                 | 4/11                      |                                     |
| <u>Tremblante (expérimentale)</u>          |           |                  |                    |                           |                                     |
| Hamster                                    | Hamster   | Toutes fractions | IC                 | 1/1 (pool)                | <i>Rohwer 2000<br/>(non publié)</i> |
|  |           | Sang total       | IC                 | 31/124                    |                                     |
|  |           | Sang total       | IV                 | 3/108                     |                                     |
| <u>ESB (expérimentale)</u>                 |           |                  |                    |                           |                                     |
| Bovin                                      | Souris    | Buffy coat       | IC + IP            | 0/11 (pools)              | <i>Wells 2000</i>                   |
|  | Bovin     | Buffy coat       | IC                 | 0/4 (pools)               |                                     |
| Souris                                     | Souris    | Plasma           | IC                 | 4/48                      | <i>Taylor 2000</i>                  |
| Microcèbe                                  | Microcèbe | Buffy coat       | IC                 | 1/1                       | <i>Bons 2002</i>                    |
| Ovin                                       | Ovin      | Sang total       | IV                 | 5/11                      | <i>Houston 2005</i>                 |
|  |           | Buffy coat       | IV                 | 1/7                       |                                     |
| Singe                                      | Singe     | Buffy coat       |                    |                           | <i>Lasmezas 2005</i>                |
|  |           | Plasma           |                    |                           |                                     |
| <u>GSS (expérimental)</u>                  |           |                  |                    |                           |                                     |
| Chimpanzé                                  | Singe     | Leucocytes       | IC + IV            | 1/1                       | <i>Brown 2005<br/>(non publié)</i>  |
|  |           | Plasma           | IC + IV            | 0/1                       |                                     |
|  |           | Plaquettes       | IC + IV            | 0/1                       |                                     |
| <u>MCJ sporadique (expérimentale)</u>      |           |                  |                    |                           |                                     |
| Singe                                      | Singe     | Sang total       | IV                 | 0/4                       | <i>Brown 2005<br/>(non publié)</i>  |
| Chimpanzé                                  | Singe     | Leucocytes       | IC + IV            | 0/2                       |                                     |
|  |           | Plasma           | IC + IV            | 0/2                       |                                     |
|  |           | Plaquettes       | IC + IV            | 0/2                       |                                     |
| Homme                                      | Singe     | Buffy coat       | IC + IV            | 0/2 (pools)               |                                     |
|  |           | Plasma           | IC + IV            | 0/2 (pools)               |                                     |
| Homme                                      | Chimpanzé | Buffy coat       | IC                 | 0/3                       |                                     |
| <u>MCJ nouveau variant (expérimentale)</u> |           |                  |                    |                           |                                     |
| Souris                                     | Souris    | Buffy coat       | IC                 | 2/2 (pools)               | <i>Cervenakova<br/>2003</i>         |
|  |           |                  | IV                 | 2/2 (pools)               |                                     |
|  |           | Plasma           | IC                 | 2/2 (pools)               |                                     |
|  |           |                  | IV                 | 2/2 (pools)               |                                     |
| Singe                                      | Singe     | Sang total       | IV                 | 0/4                       | <i>Brown 2005<br/>(non publié)</i>  |
| Homme                                      | Singe     | Buffy coat       | IC + IV            | 0/3 (pool)                |                                     |
|  |           | Plasma           | IC + IV            | 0/3 (pool)                |                                     |

La mise à disposition de modèles de souris transgéniques pour le gène *PRNP* a permis ces dernières années, en supplantant les limites de la barrière de transmission, d'étudier la distribution de l'infectiosité dans les compartiments sanguins de modèles animaux atteints de formes naturelles d'EST (Tableau 8). Les travaux conduits sur des ovins et des cervidés infectés (naturellement ou expérimentalement) par la tremblante et la maladie du dépérissement chronique (CWD), ont permis de démontrer que dans ces deux espèces, si les titres infectieux présents dans le sang total sont du même ordre de grandeurs que ceux observés chez les rongeurs, la répartition de l'infectiosité dans les compartiments sanguins diffère sensiblement<sup>14, 265, 268, 311</sup>.

A titre d'exemple il apparaît que chez les ovins et les cervidés, contrairement au hamster et à la souris, la fraction plaquettaire est associée à une part significative de l'infectiosité<sup>96, 227</sup>. En corollaire à cette observation, il convient d'ajouter que chez l'homme, contrairement aux rongeurs, les plaquettes apparaissent comme l'un des éléments figurés sanguins exprimant les plus hauts niveaux de PrP<sup>C141</sup>. Par ailleurs, chez les ovins, les niveaux d'infectiosité associée aux cellules blanches ne sont pas modifiés par des lavages en PBS<sup>268</sup>.

L'existence de telles différences, soulève des doutes légitimes quant à la pertinence finale de l'utilisation des données issues de ces modèles animaux pour les évaluations relatives au risque de transmission associée aux produits sanguins dans l'espèce humaine.

Par-delà ces différences, la question de la validité finale des titres infectieux mesurés par bioessai (inoculation intracérébrale à des rongeurs) pour l'évaluation des risques peut être posée. En effet, la voie transfusionnelle se caractérise par l'administration intraveineuse d'un large volume de fluides biologiques et d'un grand nombre d'éléments figurés vivants. Ces caractéristiques propres à la transfusion diffèrent sensiblement de l'inoculation intracérébrale d'un faible volume d'homogénat cellulaire ou de fluide biologique.

#### **4.4.2. Transmission par voie transfusionnelle**

Le schéma pathogénique de distribution des Prions chez les ovins naturellement contaminés par la tremblante classique ou expérimentalement inoculés par voie orale est considéré comme relativement proche de celui réputé s'opérer chez l'homme contaminé par voie orale par l'agent de l'ESB (cf. 3.1.2). Le format des ovins permet de prélever et de transfuser des volumes sanguins comparables à ceux utilisés en médecine transfusionnelle.

Considérant que le modèle ovin était probablement pertinent pour l'évaluation du risque de transmission sanguine associée au vMCJ chez l'homme, des travaux visant à caractériser la

capacité du sang et des fractions sanguines à transmettre les EST par voie transfusionnelle ont été entrepris dans cette espèce<sup>234</sup>.

Début 2000, plusieurs équipes ont effectué des transfusions expérimentales de sang total, provenant de moutons en incubation (asymptomatique) de tremblante naturelle ou d'ESB expérimentale. Dans les deux cas, une partie des animaux transfusés développèrent une EST clinique<sup>231, 232</sup>. Ces expériences ont également démontré, que les globules rouges, le plasma, les plaquettes et le *buffy coat*, préparés en suivant des procédures comparables à celles appliquées en médecine transfusionnelle, pouvaient transmettre la maladie<sup>265, 312</sup>.

D'autres expériences menées chez des ovins infectés par deux souches de tremblante ovine ont démontré que la transfusion de 200 mL de sang total, prélevé en phase pré-clinique, permettait une transmission avec des taux d'attaque de 100%<sup>265, 268</sup>. Dans ces modèles, la prionémie est suffisante dès les premiers mois d'incubation pour permettre la transmission de la maladie par la transfusion.<sup>266, 268</sup>

Dans ces mêmes modèles, la virulence du sang total, du plasma ou des leucocytes a également été évaluée. Ces travaux ont indiqué que l'injection intraveineuse de 200 µl de sang total était suffisante transmettre la maladie. Cette forte efficacité de transmission contraste avec la mesure des titres infectieux du sang par injection IC à des souris transgéniques exprimant la séquence de la PrP<sup>C</sup> ovine (moins de 30 ID par mL de sang)<sup>14</sup>.

En outre, ces études ont également révélé des disparités dans l'efficacité de transmission de différentes fractions sanguines (plasma, leucocytes,...), alors que les titres estimés par inoculation sur rongeurs étaient similaires. Les leucocytes présentaient une efficacité équivalente au sang total alors que le niveau de transmission était moindre pour le plasma, suggérant que la capacité d'infection transfusionnelle ne dépend pas seulement de la « quantité » de Prions présents. Étonnamment, la fixation au formol des leucocytes n'altérait pas le titre infectieux en bioessai, alors qu'elle réduisait de manière drastique l'infection par transfusion au mouton<sup>14</sup>.

Ces données sont de nature à modifier très sensiblement l'évaluation des risques de transmission des EST humaines et des mesures de prévention de la transmission du vMCJ, par voie transfusionnelle qui repose exclusivement sur les titres infectieux mesurés par inoculation intracérébrale chez des rongeurs<sup>280</sup>.

#### 4.4.3. Mesures de prévention des risques de transmission transfusionnels

Les contaminations observées dans différents pays chez des patients ayant reçu de l'hormone de croissance extractive ont soulevé de nombreuses questions sur les risques de transmission iatrogène des MCJ.

A la fin des années 1990, de fortes incertitudes entouraient (i) la fréquence et la prévalence des cas de sMCJ et vMCJ, ainsi que (ii) les possibilités de transmission des maladies à Prions humaines par l'utilisation du sang et de ses dérivés.

Les craintes étaient d'autant plus forte qu'aucun test ne permettait (et ne permet encore) de qualifier le statut des donneurs de sang vis à vis de la MCJ

Dans ce contexte, les autorités sanitaires de nombreux pays industrialisés (dont la France) ont déployé progressivement un dispositif visant à limiter les risques potentiels de survenue de cas secondaires de sMCJ puis, après son identification, du vMCJ.

Ces mesures ont été développées alors même qu'aucun élément ne permettait de soupçonner la possibilité d'une transmission des MCJ par le sang et que les données nécessaires à une évaluation rationnelle de l'impact bénéfique de ces mesures étaient inconnues :

---

|           |  |
|-----------|--|
| 1992-1995 | Exclusion définitive de donneurs traités par l'hormone hypophysaire extractive.<br>Exclusion définitive de donneurs à antécédent familial de maladie neurodégénérative.<br>Rappel et destruction des PSL et des lots contenant le plasma d'un donneur ayant développé ultérieurement une MCJ sporadique, familiale ou iatrogène, ou ayant un antécédent familial de MCJ, ou ayant été traité par l'hormone de croissance extractive.<br>Exclusion définitive de donneurs ayant un antécédent d'intervention neurochirurgicale. |
| 1997      | Recherche des receveurs de PSL issus de dons de sujets ayant développé la maladie.   |
| 1998      | Exclusion définitive de donneurs ayant un antécédent de transfusion ou de greffe. Rappel et destruction des PSL et des lots issus d'un donneur ayant développé une vMCJ.<br>Déleucocytation des produits cellulaires.  |
| 2000      | Exclusion définitive des donneurs ayant séjourné au Royaume-Uni plus d'une année cumulée au cours de la période 1980–1996.   |
| 2001      | Déleucocytation des plasmas pour un taux résiduel inférieur à $1.10^6$ /unité  |
| 2003      | Taux leucocytaire résiduel ramené à $1.10^4$ /unité pour les plasmas homologues à usage thérapeutique et pour les produits issus de leur transformation.   |

---

D'après<sup>280</sup>

Au Royaume Uni, l'ampleur redoutée de l'épidémie de vMCJ puis les évaluations de la prévalence de l'infection par le vMCJ dans la population (1 personne positive pour 2000 dans

les cohortes d'âges nées entre 1941 et 1985) ont conduits les autorités sanitaires à prendre des mesures encore plus drastiques avec :

---

|      |   |
|------|---|
| 2002 | Importation du plasma frais congelé pour les receveurs nés à compter du 1er janvier 1996.   |
| 2004 | Exclusion définitive des donneurs ayant été transfusés après le 1er janvier 1980.   |
| 2005 | Importation du plasma frais congelé pour les receveurs âgés de moins de seize ans.<br>Exclusion définitive des donneurs ayant été transfusés à n'importe quelle date.<br>Exclusion définitive et information des donneurs dont les produits ont été transfusés à des receveurs ayant développé ultérieurement la maladie. |

---

D'après<sup>280</sup>

Sur un plan financier ainsi que sur le plan de l'approvisionnement en produits sanguins labiles (pour lesquels la pénurie est un problème chronique) les conséquences de ces mesures sont négatives. Le seul rappel des lots de MDS contenant un don issu d'un patient développant ultérieurement une sMCJ, s'élève à plusieurs millions d'euros par an. Le cout des mesures de leuco déplétion est lui aussi très conséquent.

En termes de bénéfice pour les patients et, plus globalement, pour le système collectif de santé, l'impact de ces mesures est impossible à mesurer.

Cette situation a conduit les industriels de la filière transfusionnelle et des médicaments dérivés du sang à alerter régulièrement les autorités sanitaires sur les coûts et l'inutilité éventuelle des mesures en place ou, au contraire, sur la nécessité de déployer de nouveaux dispositifs, qui permettraient une prévention efficace des risques de transmission des maladies à Prions. A ce titre, sur la base d'évaluations faisant état d'une inefficacité probable de la leuco-déplétion pour prévenir les risques de transmission du vMCJ par les PSL, plusieurs industriels ont développé des filtres censés permettre une capture efficace de Prions circulants dans le sang.<sup>188, 393, 413, 414</sup>

Après maintenant plus de 15 années d'application, il semble opportun d'examiner sur la base de données actualisées et pertinentes, l'efficacité et les bénéfices d'une mesure telle que la leuco-déplétion systématique.

## OBJECTIFS

---

La survenue de cas de vMCJ post-transfusionnels au Royaume-Uni ne laisse que peu de doute sur la présence d'infectiosité dans le sang de sujets en incubation d'une vMCJ. A l'inverse aucun élément épidémiologique ne permet à l'heure actuelle de suspecter une transmission effective de sMCJ par les produits sanguins ou les MDS.

Le risque de voir émerger un nombre important de cas secondaires de vMCJ consécutifs à l'utilisation thérapeutique de produits sanguins, combiné à l'absence de test de criblage validé pour la détection du vMCJ et ou du sMCJ, a amené les autorités sanitaires de nombreux pays à déployer des mesures de préventions systématiques souvent contraignantes et coûteuses.

Parmi ces mesures, l'application d'une déleucocytation systématique des concentrés de globules rouges (par l'ensemble des pays européens et le Canada) et, en France, des unités de plasma reste l'une des plus discutée. L'efficacité potentielle (et les limites éventuelles) de cette mesure reste pour nombre de pays trop incertaine pour en justifier l'utilisation.

Dans ce contexte, l'absence de données relatives à la présence (titre infectieux) et à la distribution dans les différents compartiments du « tissu sanguin » des patients atteints de vMCJ et sMCJ est problématique. En l'absence de ces données, il paraît difficile de déterminer si les résultats obtenus dans les modèles animaux, relatifs à la capacité de transmission d'une EST par voie transfusionnelle sont pertinents pour les maladies à Prions humaines.

Ce manque d'information s'explique principalement par la non existence, jusqu'à il y a peu, de modèles expérimentaux, permettant une détection sensible de l'infectiosité associée aux agents responsables des formes humaines d'EST. La mise à disposition de différentes lignées de souris transgéniques pour le gène *PRNP* humain est susceptible de résoudre ce problème. Toutefois, des doutes persistent quant à la pertinence biologique (sensibilité par rapport à un hôte naturel) de ces modèles expérimentaux.



Dans ce contexte, les objectifs de notre travail étaient :

- d'évaluer la sensibilité relative de modèles de souris transgéniques sur-exprimant la PrP d'une espèce hétérologue par rapport à un hôte naturel, afin de valider le concept de leur utilisation comme outil de mesure des titres infectieux ;
- de mesurer à l'aide de ce type de modèle, les niveaux d'infectiosité éventuellement présents dans des fractions sanguines issues de patients atteints de sMCJ et du vMCJ ;
- d'objectiver, dans un modèle animal, l'intérêt et les limites éventuelles de l'efficacité d'une leuco-déplétion standard, telle que pratiquée en médecine transfusionnelle, pour limiter les risques de transmission du vMCJ ;
- de discuter, à partir de données disponibles (produites par nous-mêmes et issues de la littérature), l'efficacité effective de la leuco-déplétion dans la prévention des risques de transmission des maladies à Prions par transfusion ;
- d'évaluer dans un modèle animal d'infection à prion, la capacité de différents outils, développés récemment, à détecter la présence de Prions dans le sang.

## RESULTATS

---

### 1. PERTINENCE DES MODELES MURINS TRANSGENIQUES POUR L'EVALUATION DU RISQUE D'INFECTION ASSOCIE AUX ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES

La majorité des évaluations relatives au risque de transmission des EST repose sur des bioessais dans des modèles rongeurs. Ces infections expérimentales permettent de caractériser le nature des Prions impliqués (souche) , mais surtout d'en mesurer le titre infectieux, qui est un paramètre déterminant de l'évaluation du risque<sup>191</sup>.

La propagation des Prions humains dans les modèles de souris conventionnelle est très difficile du fait d'une barrière de transmission particulièrement peu perméable. Cette caractéristique s'est longtemps avéré un problème majeur pour l'évaluation des titres infectieux dans les tissus et les fluides biologiques des patients atteints de MCJ.

Le développement et la diffusion des modèles de souris transgéniques, exprimant ou sur-exprimant le gène *PRNP* d'espèces hétérologues permet de s'affranchir de ces barrières de transmission.

Cependant, la sensibilité intrinsèque de ces modèles à l'infection, en comparaison aux hôtes naturels est une question qui fait toujours débat. Elle pose notamment le problème de la pertinence des mesure de titres infectieux dans le cadre de l'évaluation du risque de transmission dans l'hôte naturel<sup>1</sup>.

La première partie de notre travail a donc consisté évaluer la sensibilité relative d'un modèle de rongeur sur-exprimant fortement (6x) la séquence de la PrP ovine par rapport à l'hôte naturel (ovin) en titrant en point final un même isolat de tremblante classique dans les deux modèles.

Les résultats que nous avons ainsi obtenus démontrent sans ambiguïté que la surexpression de la PrP<sup>C</sup> ne modifie en rien les titres infectieux mesurés.

# PrP Expression Level and Sensitivity to Prion Infection

Jean-Yves Douet,<sup>a</sup> Caroline Lacroux,<sup>a</sup> Fabien Corbière,<sup>a</sup> Claire Litaise,<sup>a</sup> Hugh Simmons,<sup>b</sup> Séverine Lugan,<sup>a</sup> Pierrette Costes,<sup>a</sup> Hervé Cassard,<sup>a</sup> Jean-Louis Weisbecker,<sup>c</sup> François Schelcher,<sup>a</sup> Olivier Andreoletti<sup>a</sup>

INRA, UMR 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France<sup>a</sup>; AHVLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey, United Kingdom<sup>b</sup>; INRA Domaine de Langlade, Pomportuzat, France<sup>c</sup>

**Mice overexpressing the prion protein (PrP) sequence from various host species are widely used for measuring infectious titers in prion disease. However, the impact that the transgene expression level might have on the susceptibility to infection raises some concerns about the final biological relevance of these models. Here we report that endpoint titration of a sheep scrapie isolate in sheep and in mice overexpressing the ovine PrP results in similar estimates of the infectious titer.**

Bioassays play a pivotal role in transmissible spongiform encephalopathy (TSE) research. They are used to characterize the nature of the agent (strain typing) and/or to measure the infectious titer, which is a critical parameter for assessing the risk of disease transmission (1).

Historically, laboratory rodents have been used for titrating infectivity. However, the difficulties of transmitting certain TSE isolates, such as, for instance, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), in conventional rodents remained a major limitation to their use. This “transmission barrier” phenomenon is mainly attributed to the amino acid divergences in the prion protein (PrP) sequences between the donor and the recipient (2).

The apparent abrogation of the transmission barrier in transgenic hosts that express an homologous PrP sequence that results in transmission to that of the donor species has led to the development of a variety of transgenic mouse models expressing the sheep, bovine, porcine, and human PrP. An inverse correlation between the survival time and expression level of the transgene in the brain has been noticed in mice transgenic for mouse, hamster, sheep, and bovine PrP (1). Whether the transgene expression level has an impact on the final susceptibility of the model to infection remains a subject of debate, and the final pertinence of infectious titers as measured in mice overexpressing PrP to the risk of transmitting the disease in the natural host species is uncertain (3).

In this study, we first produced a large batch of stock inoculum, using the brain stems from 70 ARQ/VRQ sheep clinically affected with scrapie. All these animals were born and raised in a flock naturally affected by scrapie (Langlade flock) and belonged to the 2005/2006 birth cohort (4). A 1/10 dilution series of the inoculum (starting from a 4% [wt/vol] tissue homogenate) was prepared in negative sheep brain homogenate, and aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Groups of (i) tg338 mice that are homozygotes for the sheep PrP VRQ variant and knock down for the mouse PrP (PrP<sup>K<sup>o</sup></sup>) (5), (ii) tg338 mice cross bred with PrP<sup>K<sup>o</sup></sup> mice, and (iii) tg338 mice cross bred with tgShpXI (that are homozygotes for the sheep PrP ARQ variant and PrP<sup>K<sup>o</sup></sup>) were produced (1).

The expression levels in the brain of the tg338, tg338  $\times$  PrP<sup>K<sup>o</sup></sup>, and tg338  $\times$  tgShpXI mice, as estimated by Western blot analysis, were approximately 8-fold, 4-fold, and 8-fold higher than in the brain of ARQ/VRQ TSE-free sheep (Fig. 1).

Groups of six mice belonging to these three different mice lines were intracerebrally (IC) inoculated with the prepared dilution series. Similarly, groups of six ARQ/VRQ sheep were IC chal-

lenged using the same dilution series (Table 1). For each tested dilution, each of the mice and sheep received the same amount of brain material. Both mice and sheep were then monitored for clinical TSE occurrence. In clinically suspect animals, TSE transmission was confirmed by abnormal PrP (PrP<sup>Sc</sup>) detection in the animals' tissues using Western blot analysis (Sha31 anti-PrP monoclonal antibody; epitope YEDRYRE) (6).

On the basis of these results (Table 1), the infectious titer in sheep was estimated to be  $10^{7.1}$  50% infective doses (ID<sub>50</sub>) per gram (95% confidence interval [CI 95%],  $10^{6.69}$  to  $10^{7.51}$ ) by the Spearman-Kärber method (7). In both tg338 and tg338  $\times$  PrP<sup>K<sup>o</sup></sup> mice, the infectious titer was  $10^{7.26}$  ID<sub>50</sub> per gram (CI 95%,  $10^{6.88}$  to  $10^{7.65}$ ). In tg338  $\times$  tgShpXI mice, the inoculum displayed an infectious titer of  $10^{6.93}$  ID<sub>50</sub> per gram (CI 95%,  $10^{6.55}$  to  $10^{7.32}$ ). According to these results, the infectious titers measured in the different animal models were not statistically different.

The incubation periods observed in tg338 mice were significantly (Student's test;  $P < 0.05$ ) shorter than in tg338  $\times$  PrP<sup>K<sup>o</sup></sup> and tg338  $\times$  tgShpXI mice ( $10^{-3}$  dose; see Table 1). However, no statistical difference was observed between incubation periods in tg338  $\times$  PrP<sup>K<sup>o</sup></sup> and tg338  $\times$  tgShpXI mice. These results were unexpected, since the TSE incubation period is supposed to be shorter in hosts expressing a higher level of PrP<sup>C</sup>. The results suggest that the coexpression of ARQ and VRQ PrP<sup>C</sup> in the mice somehow interfered with the dynamics of the TSE agent propagation. Further experiments are ongoing to clarify the mechanism underlying this phenomenon.

In parallel to the IC endpoint titration experiment, newborn ARQ/VRQ lambs were orally challenged (natural suckling) with decreasing amounts of infectious material. Lambs ( $n = 50$ ) were separated from their mothers within the first 6 h following birth, and each received a single dose of inoculum corresponding to  $10^{2.7}$ ,  $10^{3.7}$ ,  $10^{4.7}$ , or  $10^{5.7}$  IC ID<sub>50</sub> in sheep (natural suckling). The experimental challenge was performed

Received 17 February 2014 Accepted 21 February 2014

Published ahead of print 26 February 2014

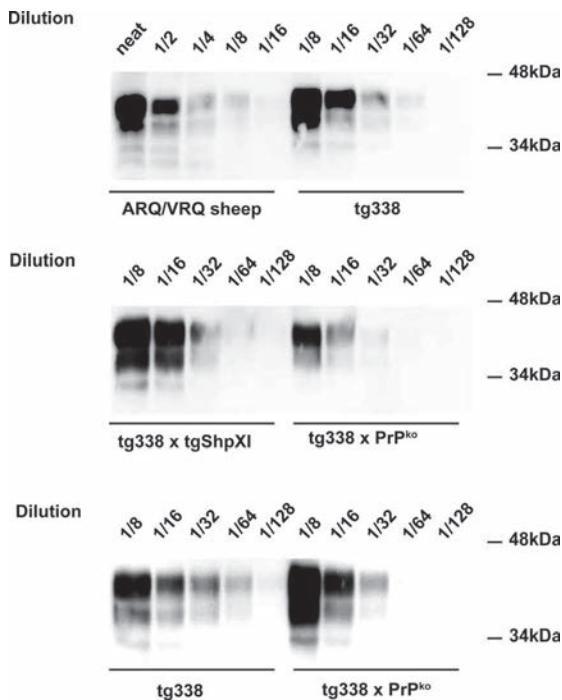
Editor: B. W. Caughey

Address correspondence to Olivier Andreoletti, o.andreoletti@envt.fr.

J.-Y. Douet and C. Lacroux contributed equally to this article.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.00369-14



**FIG 1** Cellular PrP expression level in the brain of ARQ/VRQ sheep and tg338, tg338 × PrP<sup>ko</sup>, and tg338 × tgShpXI mice. tg338 and tgShpXI mice express the ovine VRQ and ARQ variants of PrP, respectively. For each of the three mouse lines and a control sheep brain (cerebral cortex), a 10% brain homogenate was prepared. After denaturation in Laemmli's buffer, samples (either neat or diluted in Laemmli's buffer) were run on a 12% acrylamide gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. PrP<sup>C</sup> was then detected using 8G8 antibody (epitope, <sub>97</sub>SQWNKP<sub>102</sub>).

within the first 48 h of the life of the lamb. A group of animals was kept unchallenged (Table 2).

No disease transmission or PrP<sup>Sc</sup> accumulation was observed in lymphoid tissues (spleen, tonsil, mesenteric lymph node) or the central nervous system of the unchallenged control sheep. A 100% attack rate of disease was observed in sheep challenged with inocula containing  $10^{7.4}$  to  $10^{5.4}$  IC ID<sub>50</sub> units in sheep. In the animals

that were challenged with  $10^{4.4}$  IC ID<sub>50</sub> units in sheep, transmission was observed in 6 of the 9 animals. Clinical suspicions were confirmed by the presence of PrP<sup>Sc</sup> in the animals' tissues using Western blot analysis.

Together, these results indicate that in the investigated scrapie isolate, the infectious titers as measured by intracerebral endpoint titration in the different ovine PrP-expressing mice and in the ARQ/VRQ sheep were not statistically different. These findings are in agreement with data reported by Peretz et al. in hamster and transgenic mice overexpressing the hamster PrP and by Thackray et al. in conventional mice and transgenic mice overexpressing the mouse PrP (8, 9). They contradict the view that animal models that overexpress PrP have an intrinsic higher susceptibility to TSE agent infection than the natural host. They also strongly support the contention that the infectious titers measured by intracerebral endpoint titration in the transgenic mouse model and in the natural host are equally relevant for elaboration of TSE transmission risks.

Data reported in some mouse models (10) and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle (11) indicated that 1 ID<sub>50</sub> administered by the oral route is approximately equivalent to  $10^{5.5}$  to  $10^{5.6}$  IC ID<sub>50</sub> units. This range of values was the one we used to design our experiment. The results we obtained, using a sheep scrapie isolate and ARQ/VRQ sheep, indicated that 1 ID<sub>50</sub> oral unit in our paradigm is equivalent to less than  $10^{4.4}$  IC ID<sub>50</sub> units.

This discrepancy is a likely consequence of the complexity of the phenomena determining the capacity of TSE agents to transmit following peripheral exposure. Experimental evidence supports the view that both the nature of the TSE agent and the host species/genetic background have a direct impact on such transmission efficacy; whereas administration of 40,000 IC 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) units of 263K was shown to give 1 LD<sub>50</sub> by the intraperitoneal (IP) route in hamsters (12), in CW mice, 1 IP LD<sub>50</sub> of the 139A strain was equivalent on average to 430 IC LD<sub>50</sub> units (13).

In any case, the data we report indicate that the minimal oral infectious dose enabling the oral transmission of certain TSE agents might be significantly lower than it is usually considered to be.

**TABLE 1** Endpoint titration by the intracerebral route of a reference scrapie isolate in transgenic mice that express the ovine PrP and in ARQ/VRQ sheep<sup>a</sup>

| Dilution of the 4% (wt/vol) brain homogenate | Brain material per animal (g) | Transmission in <sup>b</sup> :                   |                                      |  |                                      |  |                                      |  |                                      |
|--|-------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|
|  |                               | tg338 mice                                       |                                      | tg338 × PrP <sup>ko</sup> mice                   |                                      | tg338 × tgShpXI mice                             |                                      | ARQ/VRQ sheep                                      |                                      |
|  |                               | No. of infection-positive mice/total no. of mice | Incubation period (days) (mean ± SD) | No. of infection-positive mice/total no. of mice | Incubation period (days) (mean ± SD) | No. of infection-positive mice/total no. of mice | Incubation period (days) (mean ± SD) | No. of infection-positive sheep/total no. of sheep | Incubation period (days) (mean ± SD) |
| $10^{-3}$                                    | $8 \times 10^{-7}$            | 6/6  | 94 ± 6                               | 6/6  | 103 ± 4                              | 6/6  | 111 ± 9                              | 6/6  | 212 ± 16                             |
| $10^{-4}$                                    | $8 \times 10^{-8}$            | 4/6  | 117 ± 12                             | 4/6  | 128 ± 12                             | 2/6  | 124, 154                             | 3/6  | 242, 263, 275                        |
| $10^{-5}$                                    | $8 \times 10^{-9}$            | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >650                                 |
| $10^{-6}$                                    | $8 \times 10^{-10}$           | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >650                                 |
| $10^{-7}$                                    | $8 \times 10^{-11}$           | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >250                                 | 0/6  | >650                                 |

<sup>a</sup> Successive 1/10 dilutions of a 4% tissue homogenate prepared using the brainstem from 70 ARQ/VRQ scrapie affected sheep (Langlade flock) were inoculated into groups of tg338 mice ( $n = 6$ ), tg338 × PrP<sup>ko</sup>, tg338 × tgShpXI and ARQ/VRQ sheep ( $n = 6$ ). In comparison with ARQ/VRQ sheep, (i) tg338 mice express about 8-fold, (ii) Tg338 × PrP<sup>ko</sup> mice express about 4-fold, and (iii) tg338 × tgShpXI mice express about 8-fold the ovine PrP<sup>C</sup> in their brain (see Fig. 1). Animals were euthanized when they showed clinical signs of infection or after 250 days postinoculation (mice) or 650 days postinoculation (sheep). Animals were considered infected when PrP<sup>Sc</sup> deposition was detected in the brain by Western blot analysis using the Sha31 monoclonal antibody which recognizes amino acids 145 to 152 (YEDRYRE) of the sheep PrP. Infectious titers were estimated by the Spearman-Kärber method (7), and they are reported as the number of ID<sub>50</sub> per gram of brain tissue.

<sup>b</sup> The most likely value and the lower and upper values of the 95% confidence intervals (in parentheses) of the infectious titers (ID<sub>50</sub> per gram of tissue) are as follows: for tg338 mice,  $10^{7.26}$  ( $10^{6.88}$  to  $10^{7.63}$ ); for tg338 × PrP<sup>ko</sup> mice,  $10^{7.25}$  ( $10^{6.88}$  to  $10^{7.65}$ ); for tg338 × tgShpXI mice,  $10^{6.93}$  ( $10^{6.55}$  to  $10^{7.32}$ ); and for ARQ/VRQ sheep,  $10^{7.1}$  ( $10^{6.69}$  to  $10^{7.51}$ ).

**TABLE 2** Oral inoculation of ARQ/VRQ lambs with decreasing amounts of a reference endpoint titrated (IC route in ARQ/VRQ sheep) scrapie isolate<sup>a</sup>

| Equivalent brain material amount per lamb | No. of ID <sub>50</sub> IC units in ARQ/VRQ sheep | Transmission in orally challenged ARQ/VRQ sheep |                                      |
|---|---|---|--------------------------------------|
|   |   | No. of affected sheep/total no. of sheep        | Incubation period (days) (mean ± SD) |
| 2 g                                       | 10 <sup>7.4</sup>                                 | 10/10   | 257 ± 18                             |
| 200 mg                                    | 10 <sup>6.4</sup>                                 | 10/10   | 279 ± 37                             |
| 20 mg                                     | 10 <sup>5.4</sup>                                 | 8/8 <sup>b</sup>                                | 305 ± 44                             |
| 2 mg                                      | 10 <sup>4.4</sup>                                 | 6/9 <sup>b</sup>                                | 545 ± 61                             |
| Noninoculated control                     |   | 0/10  | >1,200                               |

<sup>a</sup> Groups of 10 ARQ/VRQ lambs were orally challenged with decreasing amounts of a reference scrapie isolate. This isolate had previously been endpoint titrated by the intracerebral route in ARQ/VRQ (Table 1). Lambs were challenged within their first 48 h of life by natural suckling.

<sup>b</sup> Some of the challenged animals died from intercurrent disease within the first months of life. At death, to confirm the scrapie infection status, PrP<sup>Sc</sup> deposition in lymphoid tissues and central nervous system was assessed in each animal by Western blot analysis.

**REFERENCES**

1. Groschup MH, Buschmann A. 2008. Rodent models for prion diseases. *Vet. Res.* 39:32. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2008008>.
2. Béringue V, Vilotte JL, Laude H. 2008. Prion agent diversity and species barrier. *Vet. Res.* 39:47. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2008024>.
3. BIOHAZ EPoBH. 2011. Joint scientific opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans. *EFSA J.* 9:111. <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/1945.htm>.
4. Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andreoletti O, Eychenne F, Khang JV, Poivey JP, Lantier F, Laplanche JL. 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* 144:431–445. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050516>.

5. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL, Laude H. 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:16031–16036. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502296102>.
6. Féraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Créminon C, Vilette D, Lehmann S, Grassi J. 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication in infected cells. *J. Biol. Chem.* 280:11247–11258. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407006200>.
7. Markus RA, Frank J, Groshen S, Azen SP. 1995. An alternative approach to the optimal design of an LD50 bioassay. *Stat. Med.* 14:841–852. <http://dx.doi.org/10.1002/sim.4780140812>.
8. Thackray AM, Klein MA, Aguzzi A, Bujdosó R. 2002. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* 76:2510–2517. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.76.5.2510-2517.2002>.
9. Peretz D, Supattapone S, Giles K, Vergara J, Freyman Y, Lessard P, Safar JG, Glidden DV, McCulloch C, Nguyen HO, Scott M, Dearmond SJ, Prusiner SB. 2006. Inactivation of prions by acidic sodium dodecyl sulfate. *J. Virol.* 80:322–331. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.1.322-331.2006>.
10. Kimberlin RH, Walker CA. 1989. Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res.* 12:213–220. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702\(89\)90040-3](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702(89)90040-3).
11. Wells GA, Konold T, Arnold ME, Austin AR, Hawkins SA, Stack M, Simmons MM, Lee YH, Gavier-Widen D, Dawson M, Wilesmith JW. 2007. Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J. Gen. Virol.* 88:1363–1373. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82421-0>.
12. Kimberlin RH, Walker C. 1977. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J. Gen. Virol.* 34:295–304. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-34-2-295>.
13. Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA. 1983. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J. Gen. Virol.* 64(Pt 3):713–716. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-64-3-713>.

## **2. RECHERCHE D'INFECTIOSITE DANS LE SANG DE PATIENTS ATTEINTS DE LA FORME VARIANTE ET SPORADIQUE DE LA MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB**

En dépit des éléments épidémiologiques soutenant l'existence de cas transmission par voie transfusionnelle du vMCJ chez l'homme, les bioessais conduits sur souris conventionnelles n'ont pas permis d'établir la présence et la distribution de l'infectiosité dans le sang des patients atteints par cette maladie<sup>74</sup>. Pour les mêmes raisons, la présence éventuelle d'infectiosité dans le sang de patients en incubation ou atteints de sMCJ reste une question en suspens.

L'absence de données relatives à la distribution et au niveau d'infectiosité dans les différents compartiments sanguins apparaît par ailleurs problématique pour juger de la pertinence des paramètres (issues de modèles animaux de maladies à prion) utilisés pour l'évaluation des risques associés au sang et aux produits sanguins.

Dans la seconde partie de notre travail,

- Nous avons dans un premier temps identifié deux modèles animaux (souris transgéniques pour le gène *PRNP*) ayant une sensibilité potentiellement suffisante pour détecter la présence d'infectiosité dans les compartiments sanguins de patients atteints de la sMCJ et du vMCJ
- nous avons ensuite utilisé ces modèles pour estimer les titres infectieux présents dans les fractions sanguines (plasma, leucocytes et globules rouges) issues de patients atteints par ces deux formes de MCJ

Nos résultats confirment la présence de faibles niveaux d'infectiosité dans le sang de patients atteints par les deux formes de MCJ. Ils indiquent par ailleurs que chez les patients de vMCJ la distribution de l'infectiosité dans les compartiments sanguins diffère de celle observée chez les modèles rongeurs d'EST et se rapproche de celle observée dans les modèles ruminants (Ovin et cervidés) d'EST.

# Detection of Infectivity in Blood of Persons with Variant and Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease

Jean Yves Douet, Saima Zafar, Armand Perret-Liaudet, Caroline Lacroux, Séverine Lugan, Naima Aron, Herve Cassard, Claudia Ponto, Fabien Corbière, Juan Maria Torres, Inga Zerr, and Olivier Andreoletti

We report the presence of infectivity in erythrocytes, leukocytes, and plasma of 1 person with variant Creutzfeldt-Jakob disease and in the plasma of 2 in 4 persons whose tests were positive for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. The measured infectivity levels were comparable to those reported in various animals with transmissible spongiform encephalopathies.

**A**mong humans, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a low incidence disease ( $\approx 1$  case per million per year) that occurs as either a sporadic (sCJD) or a familial/genetic (fCJD) form. Whereas familial disease forms are linked to a mutation in the prion protein gene (*Prnp*), no clear epidemiologic risk factors have been identified for sporadic disease forms. sCJD is not a uniform disorder in terms of clinical and neuropathological phenotype. sCJD cases are classified as type 1 or 2 according to the polymorphism at codon 129 of the protease-resistant prion protein (PrP) sequence (methionine/valine) and to the electromobility of the proteinase K-resistant core of the abnormal PrP (PrP<sup>res</sup>) (1). Type 1 and type 2 isoforms in sCJD are believed to correspond to different transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents

Author affiliations: Institut National de la Recherche Agronomique/Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, France (J.Y. Douet, C. Lacroux, S. Lugan, N. Aron, H. Cassard, F. Corbière, O. Andréoletti); National Reference Center for Transmissible Spongiform Encephalopathy, Georg August University, Göttingen, Germany (S. Zafar, C. Ponto, I. Zerr); Hospices Civils de Lyon, France (A. Perret-Liaudet); BioRan, Bron, France (A. Perret-Liaudet); and Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid, Spain (J.M. Torres)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2001.130353>

Despite their relative rarity, several hundred iatrogenically transmitted CJD cases were identified during the past 60 years (2). Some data supporting the presence of infectivity in the blood of sCJD-affected patients were reported following the intracerebral inoculation of blood fractions from affected patients into rodents. These observations remain ambiguous because other studies did not confirm them (3,4).

In 1996, a new form of CJD, named variant CJD (vCJD), was identified in humans. Variant CJD was demonstrated to be caused by the agent that causes bovine spongiform encephalopathy in cattle (5). In the United Kingdom, 4 vCJD transmissions (3 clinical cases and 1 asymptomatic infection) were probably caused by the transfusion of non-leuco-depleted erythrocyte concentrates prepared from donors who later had positive test results for vCJD (6). More recently, a presumed additional case of vCJD infection was reported in the United Kingdom in a hemophilic patient who had received fractionated plasma products, including some units linked to a donor who had vCJD diagnosed (7). Despite the epidemiologic evidence of bloodborne transmission in vCJD, bioassays performed on conventional rodent models failed to demonstrate the presence of infectivity in the blood (8). The lack of TSE transmission in conventional rodent models could be a consequence of a low infectivity level in blood from vCJD- and sCJD-affected patients (as described in sheep and rodent TSE models) (9) or of the existence of the species barrier phenomenon that limits the transmission of human prions to these animal models. The development during the last decade of transgenic mice models expressing PrP from others species that abrogate the species barrier now offers the potential to detect low level of infectivity (10).

In this study, we used 2 transgenic mouse models that displayed a high sensitivity to the vCJD or sCJD TSE agents to estimate the infectious titer in certain blood fractions from vCJD- and sCJD-affected patients. According to legislation of the United Kingdom, Germany, and France, the experimental protocol, including the use of human samples, was approved by UK National CJD Research & Surveillance Unit tissue bank: REC reference number 2000/4/157-German TSE reference center: Ref Nr 11/11/93, PHRC ref 2004-D50-353 for patient from France.

## The Study

Previous studies reported a high sensitivity in transgenic mice overexpressing bovine PrP (tgBov) for the detection of the bovine spongiform encephalopathy agent. To demonstrate that tgBov also displays a high sensitivity to vCJD infection, we titrated to endpoint a vCJD isolate (10% brain homogenate) by intracerebral inoculation in this model (Tg110) (11). Considering the potential diversity

Table 1. Titration of sCJD and vCJD isolates in transgenic mice expressing the human or bovine prion protein\*†

| Dilution  | sCJD MM1 in tgHu   |                      | vCJD in tgBov  |                      |
|---|--|----------------------|--|----------------------|
|   | Positive transmission in mice                                | Incubation period, d | Positive transmission in mice                                | Incubation period, d |
| Not diluted   | 6/6  | 186 ± 10             | 6/6  | 249 ± 2              |
| 10 <sup>-1</sup>  | 6/6  | 213 ± 15             | 6/6  | 283 ± 15             |
| 10 <sup>-2</sup>  | 6/6  | 240 ± 13             | 6/6  | 316 ± 21             |
| 10 <sup>-3</sup>  | 6/6  | 263 ± 24             | 6/6  | 342 ± 10             |
| 10 <sup>-4</sup>  | 6/6  | 296 ± 26             | 6/6  | 453 ± 66             |
| 10 <sup>-5</sup>  | 6/6  | 323 ± 29             | 4/6  | 499 ± 17             |
| 10 <sup>-6</sup>  | 1/6  | 316                  | 1/6  | 502                  |
| 10 <sup>-7</sup>  | 0/6  | >650                 | 0/6  | >700                 |
| Infectious titer, ID <sub>50</sub> /g of brain (95% CI) | 10 <sup>6.67</sup> (10 <sup>6.33</sup> –10 <sup>6.97</sup> ) |                      | 10 <sup>6.33</sup> (10 <sup>5.84</sup> –10 <sup>6.82</sup> ) |                      |

\*sCJD, sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease; tgHu, human PrP gene; PrP, protease-resistant prion protein; vCJD, variant CJD; tgBov transgenic mice overexpressing bovine PrP, ID, infectious dose.

†Successive 1/10 dilutions of 10% brain homogenate (frontal cortex) from patients affected by vCJD and sCJD were injected intracerebrally to tgHu (n = 6) and tgBov (n = 6) mice, respectively. Those 2 patients were different from the 1 whose blood was tested in bioassay (Table 2). Mice were euthanized when they showed clinical signs of infection or after 650 days postinfection. Mice were considered infected when abnormal prion protein deposition was detected in the brain by western blot by using Sha31 monoclonal antibody, which recognizes amino acids 145–152 (YEDRYRE) of the sheep prion protein. Infectious titers were estimated by the Spearman-Kärber method (14).

of TSE agents that may cause sCJD, we decided to focus only on type 1 homozygous for methionine at codon 129 of the PRP gene (MM1) sCJD cases. An endpoint titration of a MM1 sCJD 10% brain homogenate was performed in a mouse model that express the methionine 129 variant of the human PrP gene (tgHu:Tg340) (12). This enabled confirmation of the capacity of the tgBov and tgHu models to detect the vCJD and sCJD MM1 agent, respectively, up to a 10<sup>-6</sup>

dilution of the reference brain homogenates (Table 1; 13). This value was within the range of the brain/blood relative infectivity reported in various TSE animal models (9,14).

In the next step of our experiment, blood fractions (erythrocytes, plasma, and leukocytes) from 1 vCJD-confirmed patient were injected intracerebrally in tgBov mice. Similarly, plasma samples from 4 sCJD MM1 patients were inoculated with tgHu (Table 2). The blood fraction

Table 2. Intracerebral inoculation of blood components collected from 1 vCJD and 4 sCJD cases (MM1) in transgenic mice expressing the bovine or human prion protein gene\*†

| Mouse model | Donor         | Specimen      | Inoculated mice | Positive mice | Incubation period, d | ID/mL (95%CI)‡ |    |
|-------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|----------------------|----------------|----|
| tgBov       | vCJD          | Leukocyte     | 24              | 3             | 476, 567, 576        | 2.23 (0–4.87)  |    |
|             |               | Plasma        | 24              | 1             | 453                  | 2.12 (0–6.52)  |    |
|             |               | Erythrocyte   | 24              | 1             | 433                  | 2.12 (0–6.52)  |    |
| tgHu        | sCJD case 1   | Plasma        | 14§             | 1             | 338                  | 3.70 (0–11.65) |    |
|             |               | Brain         | 6               | 6             | 216 ± 2              | NA             |    |
|             | sCJD case 2   | Plasma        | 24              | 0             | >700                 | 0 (0–6.24)     |    |
|             |               | brain         | 6               | 6             | 217 ± 5              | NA             |    |
|             | sCJD case 3   | Plasma        | 24              | 1             | 233                  | 2.12 (0–6.52)  |    |
|             |               | Brain         | 6               | 6             | 205 ± 5              | NA             |    |
|             | sCJD case 4   | Plasma        | 24              | 0             | >700                 | 0 (0–6.24)     |    |
|             |               | Brain         | 6               | 6             | 207 ± 3              | NA             |    |
|             | tgHu          | Control human | Plasma          | 12            | 0                    | >650           | NA |
|             | tgBov         | Control human | Plasma          | 12            | 0                    | >650           | NA |
|             | tgHu          | Control human | PBS             | 12            | 0                    | >700           | NA |
|             | tgBov         | Control human | PBS             | 12            | 0                    | >700           | NA |
| tgHu        | Control human | Brain         | 24              | 0             | >700                 | NA             |    |
| tgBov       | Control human | Brain         | 24              | 0             | >700                 | NA             |    |
| tgHu        | Control human | None          | 24              | 0             | >750                 | NA             |    |
| tgBov       | Control human | None          | 24              | 0             | >750                 | NA             |    |

\*vCJD, variant Creutzfeldt-Jakob disease; sCJD, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; dpi, days postinfection; ID, infectious dose; tgBov, bovine prion protein; tgHu, human prion protein; PBS, phosphate-buffered saline.

†The leukocyte(s) from a single vCJD case corresponding to a starting volume of 3 mL of blood were suspended in 1 mL of 5% glucose solution. The leukocyte suspension and the crude erythrocytes were homogenized by using a high speed cell disrupter. The leukocyte and erythrocyte homogenates (vCJD case) and crude plasma (vCJD and sCJD cases) were intracerebrally injected into mice (20 µL per mouse). For the 4 sCJD MM1 cases, brain homogenate (10%, temporal cortex) were also inoculated in tgHu. Mice were euthanized when they showed clinical signs of infection or after 650 or 750 dpi. Mice were considered infected when abnormal protease-resistant prion protein deposition was detected in brain tissue by using Western blot analysis with Sha31 monoclonal antibody: epitope amino acids 145–152 (YEDRYRE) of the sheep PrP sequence. For samples showing 100% attack rate, incubation periods are reported as mean (± SD). For other samples, individual incubation period of CJD-positive mice are presented; their infectious titers were estimated by using limiting dilution titration method (application of Poisson model) described by Brown et al (13).

‡Leukocyte titer is expressed as ID/mL of the starting whole blood. Plasma and erythrocyte titers are expressed as ID/mL of inoculum.

§24 mice were inoculated; 10 died because of the acute toxicity of the sample.



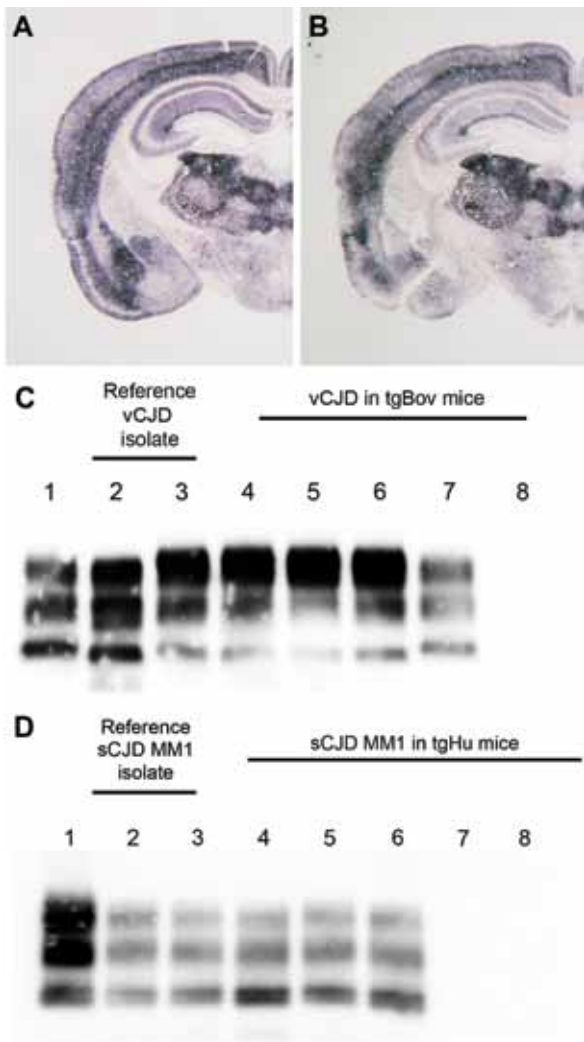


Figure. Abnormal prion protein ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) detection by using Western blot (WB) and paraffin-embedded tissue (PET) blot in the brain of transgenic mice expressing the methionine 129 variant of the human prion protein (PrP) (tgHu) or bovine PrP (tgBov). A, B) PET blot  $\text{PrP}^{\text{res}}$  distribution in coronal section (thalamus level) of tgHu mice inoculated with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) MM1 isolates (10% brain homogenate): A) reference isolate used for the endpoint titration in Table 1; B) sCJD case 1 (Table 2). C)  $\text{PrP}^{\text{res}}$  WB of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) reference isolate (used for endpoint titration in Table 1) and tgBov mice inoculated with the same vCJD reference isolate or vCJD blood fractions. Lane 1, WB-positive control; lanes 2 and 3, reference vCJD isolate; lane 4, leukocytes; lane 5, erythrocytes; lane 6, plasma; lane 7, WB-positive control; lane 8, healthy human plasma in tgBov. D) ( $\text{PrP}^{\text{res}}$  Western blot of the sCJD reference isolate (used for endpoint titration in Table 1) and tgHu mice inoculated with the same sCJD reference isolate and plasma from sCJD cases. A proteinase K-digested classical scrapie isolate in sheep was used as positive control for the blots in panels C and D. ( $\text{PrP}^{\text{res}}$  immunodetection in PET and Western blots was performed by using Sha31 monoclonal antibody (epitope: 145YEDRYRE152 of the human PrP). Lane 1, WB-positive control; lanes 2 and 3, reference sCJD MM1 isolate; lane 4, brain tissue from case 1; lane 5, plasma from case 1; lane 6, plasma from case 3; lane 7, plasma from case 2; lane 8, plasma from case 4.

preparation was performed by using laboratory scale hematologic protocols (online Technical Appendix, [wwwnc.cdc.gov/EID/article/20/1/13-0353-Techapp1.pdf](http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/20/1/13-0353-Techapp1.pdf)), not by following the procedure applied by blood banking services. This method implies that the leucodepletion that is applied to blood labile products in most countries to reduce the vCJD bloodborne transmission risk was not performed. Brain tissue samples from each of the 4 sCJD cases were also inoculated with tgHu. On the basis of the incubation period (Table 2) and  $\text{PrP}^{\text{res}}$  distribution pattern in the brain as assessed by using paraffin-embedded tissue blot, the TSE agents in those isolates were indistinguishable from those in the MM1 sCJD case that was used for endpoint titration (Figure, panel A).

No TSE clinical signs or  $\text{PrP}^{\text{res}}$  accumulation were observed in the tgBov or tgHu mice inoculated with phosphate-buffered saline or brain and plasma from healthy human controls. The 3 blood fractions from the vCJD-affected patient caused a positive result but low attack rate among tgBov mice (Table 2). On the basis of these results, infectivity in erythrocytes and plasma was estimated to be 2.12 infectious dose (ID)/mL of inoculum. In leukocytes, the infectious titer was estimated to be 2.23 ID/mL of whole blood. According to these values and the hematocrit of the sample (online Technical Appendix), the global infectious titer whole blood in the tested patient would be  $\approx 4.45$  ID/mL. Such infectious level is approximately equivalent to 1.4  $\mu\text{g}$  of the reference vCJD brain sample that was endpoint-titrated (Table 1).

In tgHu mice, positive transmission was observed among mice inoculated with 2 of 4 plasma samples (Table 2). The infectious titers in both positive plasma samples were estimated to be 2.12 and 3.7 ID/mL of plasma, which is equivalent to 0.3–0.5  $\mu\text{g}$  of the reference sCJD MM1 brain sample that was endpoint titrated (Table 1). However, because of the limited number of mice inoculated ( $n = 24$ ) and the overall sensitivity of the assay (upper CI limit 6.24 ID/mL), the absence of transmission in mice inoculated with the 2 other plasma samples cannot be interpreted conclusively.

In tgBov inoculated with vCJD and tgHu inoculated with sCJD, the  $\text{PrP}^{\text{res}}$  banding patterns observed by Western blot in animals challenged with brain homogenate and blood components were identical (Figure, panels C, D). These results support the contention that the TSE agent propagated in tgBov mice and tgHu were vCJD and sCJD agents, respectively.

## Conclusions

The data reported here confirm the presence of infectivity in erythrocytes, leukocytes, and plasma from vCJD-affected patients and demonstrate unambiguously the presence of infectivity in the plasma of some, but not all, sCJD-affected patients. The infectivity levels that we

measured in the tested vCJD and sCJD blood components were comparable to those reported in various TSE animal models. The number of cases included in our study was limited; a new experiment that would include a larger number of cases and different blood fractions from sCJD cases will be necessary to refine the data. However, these results represent a substantial input for assessing the risk for interindividual bloodborne transmission of sCJD and vCJD.

### Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (UK-Edinburgh) for providing variant CJD brain samples.

This work was supported by a grant from the European Commission: Protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research (PRIORITY, N°222887; project no. FP7-KBBE-2007-2A) and by grants from the JPND program (DEMTEST: Biomarker based diagnosis of rapid progressive dementias-optimization of diagnostic protocols, 01ED1201A). The study in Germany was funded by the Robert Koch-Institute through funds of the Federal Ministry of Health (grant no. 1369-341).

Mr Douet is assistant lecturer in ophthalmology at the National Veterinary School of Toulouse and a PhD student in the TSE group in the UMR INRA ENVT 1225 unit. His primary research interests are the pathogenesis of the prion disease with special emphasis on the risk of iatrogenic transmission.

### References

- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 1996;39:767–78. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410390613>
- Brown P, Brandel JP, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:901–7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1806.120116>
- Brown P, Cervenakova L, Diringer H. Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Lab Clin Med*. 2001;137:5–13. <http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2001.111951>
- Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*. 1994;35:513–29. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410350504>
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997;389:498–501. <http://dx.doi.org/10.1038/39057>
- Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*. 2004;364:527–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16811-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16811-6)
- Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, et al. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia*. 2010;16:296–304. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02181.x>
- Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet*. 2001;358:208–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05411-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05411-3)
- Andréoletti O, Litaïse C, Simmons H, Corbiere F, Lugan S, Costes P, et al. Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002782. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002782>
- Béringue V, Vilotte JL, Laude H. Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*. 2008;39:47. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2008024>
- Castilla J, Gutiérrez Adán A, Brun A, Pintado B, Ramirez MA, Parra B, et al. Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol*. 2003;148:677–91. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0958-4>
- Padilla D, Beringue V, Espinosa JC, Andreoletti O, Jaumain E, Reine F, et al. Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1001319. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001319>
- Markus RA, Frank J, Groshen S, Azen SP. An alternative approach to the optimal design of an LD50 bioassay. *Stat Med*. 1995;14:841–52. <http://dx.doi.org/10.1002/sim.4780140812>
- Brown P, Cervenakova L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN. Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion*. 1999;39:1169–78. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39111169.x>

---

Address for correspondence: Olivier Andreoletti, UMR Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire INRA, ENVT, 31076 Toulouse, France; email: o.andreoletti@envt.fr







### **3. EFFICACITE DE LA LEUCO-DEPLETION DANS LA PREVENTION DU RISQUE TRANSFUSIONNEL ASSOCIE AUX EST**

Le risque de voir émerger un nombre important de cas secondaire de vMCJ consécutifs à l'utilisation thérapeutique de produits sanguins, combinée à l'absence de test de criblage validé pour la détection du vMCJ et ou du sMCJ, a amené les autorités sanitaires de nombreux pays à déployer des mesures de prévention systématiques souvent contraignantes et coûteuses

Parmi ces mesures, l'application depuis une quinzaine d'années d'une leuco-déplétion systématique des concentrés de globules rouges (par l'ensemble des pays européens et le Canada) et, en France, des unités de plasma reste l'une des plus discutées. L'efficacité potentielle et les limites éventuelles de cette mesure restent pour nombre de pays trop incertaines pour en justifier l'utilisation.

Dans la revue que nous présentons ici nous avons compilé et analysé les éléments disponibles dans la littérature afin d'alimenter notre propre réflexion sur l'efficacité potentielle de cette mesure et les travaux nécessaires qui permettraient d'en caractériser l'impact bénéfique sur le risque de transmission des EST chez l'homme.

C'est sur cette réflexion que reposent les travaux expérimentaux que nous présentons dans les deux dernières parties de notre travail expérimental.



# Leukoreduction and blood-borne vCJD transmission risk

Jean Yves Douet<sup>a</sup>, Raymond Bujdoso<sup>b</sup>, and Olivier Andréoletti<sup>a</sup>

## Purpose of review

Risk assessments for transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease predicted that leukocyte reduction would be inefficient at preventing transmission of the disease by blood transfusion. Nevertheless, approximately 14 years ago, a significant proportion of European countries decided to implement leukocyte reduction treatment within their human blood supplies in order to mitigate the risk of human prion disease transmission.

## Recent findings

Current epidemiological studies seem to indicate that leukocyte reduction has had a positive impact on reducing the risk. In addition, over the last 5 years, various experimental studies carried out in animal models have confirmed that leukocyte reduction provides a high, but not absolute, protection against transmission of prion disease by blood transfusion. Observations that show the efficacy of blood-borne prion transmission is more dependent on the viability of leukocytes than the level of infectivity present in the blood product make a significant contribution to understanding the risk of prion infection by blood transfusion.

## Summary

Considering the potential for significant numbers of subclinical variant Creutzfeldt–Jakob disease individuals in at least the United Kingdom, these findings strongly support the continuation of systematic leukoreduction for blood donations collected in individuals born before the effective prevention of human dietary exposure to bovine spongiform encephalopathy.

## Keywords

leukoreduction, transfusion, transmission prevention, variant Creutzfeldt–Jakob disease

## INTRODUCTION

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies, are fatal neurodegenerative disorders that occur naturally in sheep (scrapie), cattle [bovine spongiform encephalopathy (BSE)] and humans [Creutzfeldt–Jakob disease (CJD)]. In 1996, a new form of CJD, termed variant CJD (vCJD) was identified in humans and is believed to be due to zoonotic transmission of the agent that causes BSE in cattle, probably as a consequence of dietary exposure to prion-contaminated bovine products [1,2]. vCJD differs from other human prion diseases in several aspects. In particular, an early and persistent accumulation of prions occurs in peripheral lymphoid tissue of vCJD-infected patients, whereas in individuals affected by other forms of human prion disease, prions are restricted principally to the central and peripheral nervous system [3]. The observation of the presence of vCJD prions in human lymphoid tissue, together with the reports of prion infectivity in the blood of animals with

asymptomatic experimental prion disease [4,5], raised major concerns with regards to the potential for blood-borne vCJD transmission.

In this context, and before any vCJD blood-borne transmission had been recognized, several preventive measures were implemented in a number of European countries. In addition to the deferral of ‘at risk’ donors, a measure that varies according to indigenous BSE-exposure risk in a particular country, leukoreduction has been proposed to mitigate the risk of vCJD transmission as a consequence of iatrogenic use of human blood and its fractionated products. Between 1998 and 2000, France,

<sup>a</sup>UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôte Agent Pathogène, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France and <sup>b</sup>Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK

Correspondence to Olivier Andréoletti, Toulouse, France. Tel: +33 5 61 19 38 95; e-mail: o.andreoletti@envt.fr

**Curr Opin Hematol** 2015, 22:36–40

DOI:10.1097/MOH.000000000000101

## KEY POINTS

- In the United Kingdom, a recent study indicated a high potential subclinical vCJD prevalence (one in 2000 in people born between 1941 and 1985) in those individuals eligible for blood donation.
- Five blood-borne vCJD cases have been identified in the United Kingdom in patients who received nonleukoreduced blood products.
- In Europe, no blood-borne vCJD case has been observed in people who received blood products prepared after the implementation of the leukoreduction (14 years ago).
- In transmissible spongiform encephalopathy animal models, leukoreduction very efficiently reduced the transmission of the disease by blood transfusion.
- Viable leukocytes transmit prion disease with a very high efficiency by the transfusion route which is a likely explanation of the high beneficial impact of leukoreduction on blood-borne prion disease transmission.

Ireland, the United Kingdom, Portugal and Canada introduced systematic leukoreduction from labile blood products and, in 2001, also from plasma in France. However, the potential efficacy of leukoreduction for prevention of prion infectivity transmission was debated and other countries, for example the USA, did not implement this control measure. However, according to rodent prion disease models only approximately 50% of the detectable prion infectivity in blood is associated with leukocytes [4,5]. Consequently, leukoreduction was considered to be an insufficient measure to prevent blood-borne vCJD transmission [6].

Between 2003 and 2007, four vCJD cases were reported in individuals within the United Kingdom who had received red blood cell (RBC) concentrates [7–10]. In 2008, abnormal prion protein (PrP) was detected in a post-mortem spleen sample from a hemophilic patient who had received purified factor VIII prepared from plasma batches that included donations from individuals who later developed vCJD [7]. Collectively, these particular cases of vCJD infection strongly support the view that this condition can be transmitted by blood transfusion. More than 14 years after the implementation of leukoreduction measures in the European Union, we have reexamined the rationale of this measure and its potential beneficial consequence on blood-borne vCJD transmission risk.

## BLOOD-BORNE PRION INFECTIVITY

In early 2000, most of the knowledge relating to the presence of prion infectivity in blood relied on

information from rodent prion disease models. In these experimental systems, prion infectivity titers were reported to vary between 1 and 10 ID<sub>50</sub>/ml of blood during the asymptomatic phase and up to 100 ID<sub>50</sub>/ml during the clinical phase of the disease [4,11]. Infectious prion titers were measured in these bioassays by intracerebral inoculation of blood, or blood fractions, in autologous combinations of inocula and animal bioassay. The observed infectious prion titers were equivalent to the level of infectivity found in 10<sup>-6</sup>–10<sup>-8</sup> g of brain tissue from animals at the terminal stage of prion disease. It was found that approximately 40% of the prion infectivity was associated with the buffy coat fraction, the remainder was found principally in plasma [4,6]. Importantly, buffy coat-associated prion infectivity could apparently be washed off by rinsing these cells with phosphate-buffered saline [10]. Platelets were shown to have little, if any, prion infectivity [12].

Subsequent experiments in other animal species, whereby donor blood material was assessed by bioassay in a host via intracerebral inoculation, have investigated the distribution of prion infectivity in various blood fractions. In sheep, naturally or experimentally infected with scrapie, infectious prion titers in whole blood were similar to those observed in rodents (<35 ID<sub>50</sub>/ml) when measured by bioassay in ovine PrP transgenic mice [13]. Prion infectivity was detected in plasma from scrapie-infected sheep, but in a lower proportion to that found in the blood of prion-diseased mice and hamster models [14]. Moreover, a substantial level of prion infectivity was detected in sheep platelets, and infectivity associated with leukocytes was not reduced by the washing of these cells [13]. Similar observations were reported in deer naturally infected with chronic wasting disease [15].

Recent bioassays carried out in PrP transgenic mice using blood harvested at *postmortem* from a vCJD-affected patient have shown the presence of prion infectivity in RBCs, plasma and white blood cells (WBCs) [16<sup>\*\*\*</sup>]. The blood fractions used in these assays had been prepared in 2000 using laboratory-scale hematological protocols, but did not include leukoreduction. The infectious titer of whole blood in the bioassayed vCJD sample was estimated to be approximately 4.45 ID<sub>50</sub>/ml, which is 10<sup>-6</sup>–10<sup>-7</sup> lower than that found in 1 g of brain from a vCJD-affected patient at terminal disease. Importantly, the leukocyte-associated prion infectivity of the vCJD blood sample could not be reduced by rinsing of the cells, similar to that found in ruminant animal models. Recently, disease-associated PrP was detected in WBCs from vCJD patients using in-vitro protein misfolding cyclic amplification [17<sup>\*\*</sup>].



Collectively, these data support the view that prion infectivity levels in the blood of vCJD patients and different animal prion disease models are similar. However, they also demonstrated that interspecies variations exist with regards to distribution of infectivity in different blood fractions.

### **BLOOD TRANSFUSION-MEDIATED PRION DISEASE MODELS**

Current risk assessments for transfusion-mediated transmission of vCJD by blood or blood-derived products rely on infectious titers measured by intracerebral inoculation of blood material in an animal bioassay [18]. However, the intracerebral inoculation of prions is unlikely to recapitulate the cellular and molecular events that occur as a consequence of prion infection by blood transfusion, a process that involves the administration of large numbers of viable cells and/or a large volume of material intravenously injected into the recipient.

The relative similarity in size between sheep and humans allows the transfusion of ruminant blood volumes that are relevant to human medicine. In addition, the pathogenesis of vCJD mirrors features similar to natural classical scrapie in sheep, for example, the presence of prions in peripheral lymphoid tissue of affected individuals. Consequently, sheep prion disease models were considered to be relevant models for the assessment of the risks associated with vCJD blood-borne transmission [19,20].

In early 2000, transfusion of whole blood collected from asymptomatic sheep infected with either natural scrapie or experimental BSE resulted in prion transmission to recipient sheep [21,22]. Using the sheep transfusion model, it was also confirmed that RBCs, plasma, platelets and buffy coat prepared by similar protocols to those used in transfusion medicine can transmit prion disease [23,24]. In two different sheep scrapie models, the transfusion of 200 ml of whole blood collected during the preclinical phase of the condition was able to transmit the disease with 100% efficacy [13,24]. However, in other sheep prion disease studies the transfusion of 400 ml of whole blood at a late stage of incubation of the disease reportedly failed to cause transmission of prion disease in less than 40% of the recipients [21,23]. Features of the different sheep prion disease models, such as age of animals used, PrP genotype of the animals and/or the prion strain used for inoculation, could contribute to an explanation for the discrepancies between the results of these different models. However, these sheep blood transfusion studies collectively suggest that in a proportion of prion-infected blood donors, the level of prionemia may

be insufficient to allow prion disease transmission by blood transfusion [25].

### **LEUKOCYTES AND PRION TRANSMISSION EFFICACY**

The relative ability of whole blood, plasma and WBCs to transmit prion disease upon transfusion into recipients was assessed in an experimental sheep scrapie model. It was shown that the intravenous administration of 200  $\mu$ l of whole blood harvested during the asymptomatic phase was sufficient to infect recipient scrapie-free sheep. This high efficiency of transmission by transfusion contrasts with the low infectious prion titers measured in blood by intracerebral inoculation in mice (<32 ID<sub>50</sub>/ml) and with the fact that administration by the intravenous route of brain homogenate that contains 10<sup>3</sup> ID<sub>50</sub> (of the same prion strain) was necessary to transmit the disease.

Moreover, these studies also showed that despite similar infectious titers, as determined by intracerebral inoculation in rodents, plasma and cellular blood products displayed a substantially different capacity to transmit the disease by the transfusion route. The intravenous administration of 200 ml fresh crude plasma to sheep transmitted the disease with limited efficacy, but no transmission was observed in animals that received 20 ml of plasma. In contrast, WBCs displayed a similar ability to whole blood in its efficacy to infect recipient sheep. These results demonstrated that the ability of blood and blood-derived products to transmit prion disease by the transfusion route does not depend solely on their infectious titer. Strikingly, although the fixation of WBCs with paraformaldehyde did not affect their infectious titer when measured by intracerebral inoculation in mice, it dramatically impaired their ability to transmit the disease by the transfusion route in sheep [14]. These findings support the hypothesis that viable leukocytes transmit prion disease with a very high efficiency and suggest that leukoreduction might have a more beneficial impact on blood-borne prion disease transmission than previously expected [14,24].

### **THE IMPACT OF LEUKOREDUCTION ON PRION TRANSMISSION VIA THE TRANSFUSION ROUTE**

Two different transfusion studies carried out in sheep provided important information related to the impact of leukoreduction on prion transmission by labile blood products [23,24]. In both cases, blood components were prepared following processes that were similar to those used in human transfusion medicine. In the first study, leukoreduction and nonleukoreduction of RBCs, plasma and platelet

concentrate collected from BSE-infected sheep were transfused in healthy recipient animals. A substantially lower attack rate was observed in sheep transfused with leukoreduced products compared to those that received nonleukoreduced fractions. However, some of the leukoreduced RBC (two out of 29), plasma (one out of 29) and platelet concentrate (one out of 29) units still transmitted the disease [23].

The second study was carried out in the experimental scrapie infection model that was used to establish the minimal volume of whole blood that enabled prion disease transmission (see previous paragraph). In this experiment, whole blood units from scrapie-infected sheep were pooled in order to obtain large blood batches. This allowed a parallel test of the capacity of whole blood and different leukoreduced and nonleukoreduced blood products to transmit prion disease by the transfusion route. These studies showed that clinical prion disease was observed in all sheep that received whole blood, buffy coat or RBCs. No clinical disease was observed in recipient sheep transfused with leukoreduced RBCs. However, in two out of the 15 sheep that received leukoreduced RBCs, post-mortem analysis following euthanasia of the apparently healthy animals revealed the presence of abnormal PrP in lymphoid tissues. Similarly, although three out of the five sheep that received fresh plasma developed scrapie disease, only one of the leukoreduced plasma recipients was found to be positive for the condition [24]. All of the tested leukoreduced blood products complied with the current European standards in terms of residual number of leukocytes. However, the leukoreduction process does not eliminate all leukocytes from blood products, and it can be hypothesized that a more stringent process could further reduce the transmission of prion disease. In order to answer this question, experiments aimed at establishing the minimal number of WBCs required for prion disease transmission by the transfusion route have been initiated.

Collectively, these studies have shown that in sheep scrapie models, standard leukoreduction of RBC, plasma and platelets results in an imperfect, but significant, reduction of prion disease transmission. These results directly contradict the assumption that, due to the presence of nonleukocyte associated infectivity in blood, leukoreduction should be ineffective in preventing transfusion-mediated prion transmission.

### **THE IMPACT OF LEUKOREDUCTION ON VARIANT CREUTZFELDT–JAKOB DISEASE TRANSMISSION**

Animal models that have investigated the impact that leukoreduction has had on prion infection by

the transfusion route have been extremely valuable in the knowledge they have provided, as it is not possible to gain this information from a purely human system. However, human epidemiological studies can help to assess the role that leukoreduction has had on reducing the impact of vCJD blood-borne transmission. One aspect to consider is the cohort of individuals who received blood, or labile blood products collected from donors who subsequently developed vCJD. In the United Kingdom and in France, 24 out of the 177 and three out of the 21 identified vCJD cases, respectively, had been in receipt of blood donations that had been used to prepare labile products that were transfused in a total of 66 recipients in the United Kingdom and 42 recipients in France [10]. The vast majority of these recipients were transfused with RBCs and approximately half of these samples were prepared after implementation of leukoreduction [10]. To date, four vCJD cases in the United Kingdom were reported in the group of individuals who received nonleukoreduced RBCs. Three of the recipients developed clinical vCJD disease within 6–8.5 years after transfusion whereas the fourth died 5 years after transfusion of cardiovascular causes but showed abnormal PrP accumulation in the spleen at *postmortem* [7–9]. The fact that no vCJD cases have been reported in individuals who received leukoreduced RBCs suggest a beneficial impact of this process on reducing blood-borne transmission of the disease. However, this statement must be tempered as a significant proportion of these blood recipients died within 5 years following their transfusion and less than 50% survived for more than 10 years, which may have been shorter than the time required for the onset of clinical vCJD. Moreover, it cannot be assumed that recipients that are still alive will not develop vCJD in the future.

A second aspect to consider is the potential number of vCJD-infected individuals in the UK population. In a recent study, 32 441 appendix samples, collected during surgery from patients born between 1941 and 1985, were tested by immunohistochemistry for presence of abnormal PrP accumulation. This study indicated a potential subclinical vCJD prevalence of approximately one in 2000 of this age cohort (95% confidence interval ranging from one in 3500 to one in 1250) [26<sup>\*\*\*</sup>]. Whether these potential subclinical vCJD-infected individuals will develop clinical disease during their natural life span remains uncertain. However, under the assumption that each vCJD-infected individual could represent a source of prion transmission through blood donation, the lack of vCJD cases in people who received leukoreduced labile blood products up to 14 years after the implementation

of this measure in the United Kingdom supports the opinion that this process has had a positive impact on the risk of vCJD transmission by blood transfusion.

## CONCLUSION

Studies in animal models of prion disease and human vCJD epidemiological observations have provided a converging view that leukoreduction of labile blood products is an efficient measure to reduce the risk of prion transmission by transfusion. The efficacy of leukoreduction goes against the conclusions of different risk assessments that predicted this process was unlikely to be effective in the prevention of blood-borne vCJD transmission. These risk assessments relied on the assumption that prion transmission by the transfusion route was dependent principally on the infectious titer of the transfused blood component. However, transfusion experiments in animal models have demonstrated that transmission efficiency is more dependent on the viability of transfused cells than on the infectious titers of the blood components. These findings would suggest that revision of some of the key assumptions in vCJD blood-borne risk assessments may be necessary. In the meantime, considering the potential for significant numbers of subclinical vCJD individuals in at least the United Kingdom, these findings strongly support the continuation of systematic leukoreduction for blood donations collected in individuals born before the effective prevention of human dietary exposure to BSE.

## Acknowledgements

None.

## Conflicts of interest

The authors certify that they have no conflict of interest.

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, *et al.* Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389:498–501.
2. Collinge J, Sidle KC, Meads J, *et al.* Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996; 383:685–690.
3. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt–Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997; 349:99–100.
4. Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, *et al.* The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 1998; 38:810–816.
5. Brown P, Cervenakova L, McShane LM, *et al.* Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt–Jakob disease in humans. *Transfusion* 1999; 39:1169–1178.
6. Gregori L, Gurgel PV, Lathrop JT, *et al.* Reduction in infectivity of endogenous transmissible spongiform encephalopathies present in blood by adsorption to selective affinity resins. *Lancet* 2006; 368:2226–2230.

7. Peden A, McCardle L, Head MW, *et al.* Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 2010; 16:296–304.
8. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, *et al.* Possible transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363:417–421.
9. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, *et al.* Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004; 364:527–529.
10. Lefrere JJ, Hewitt P. From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France. *Transfusion* 2009; 49:797–812.
11. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, *et al.* Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003; 43:1687–1694.
12. Holada K, Vostal JG, Theisen PW, *et al.* Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J Virol* 2002; 76:4649–4650.
13. Lacroux C, Vilette D, Fernandez-Borges N, *et al.* Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol* 2012; 86:2056–2066.
14. Andreoletti O, Litaize C, Simmons H, *et al.* Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002782.
15. Mathiason CK, Hayes-Klug J, Hays SA, *et al.* B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol* 2010; 84:5097–5107.
16. Douet JY, Zafar S, Perret-Liaudet A, *et al.* Detection of infectivity in blood of ■ persons with variant and sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:114–117.

Blood fractions from one confirmed vCJD case (RBCs, plasma and WBCs) and plasma samples from four sporadic CJD MM1 cases were inoculated intracerebrally in mice. All three blood fractions from the vCJD-affected individual caused positive transmission in mice. Positive transmission was also observed in mice inoculated with two out of four sporadic CJD plasma samples. These data confirm for the first time the presence of infectivity in the RBCs, WBCs and plasma from vCJD-affected patients. They also demonstrate unambiguously the presence of infectivity in the plasma of some but not all sporadic CJD-affected patients.

17. Lacroux C, Comoy E, Moudjou M, *et al.* Preclinical detection of variant CJD ■ and BSE prions in blood. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1004202.

In this study, appropriate conditions for highly efficient and specific in-vitro generation of vCJD/BSE PrP<sup>Sc</sup> were identified using protein misfolding cyclic amplification (PMCA). PMCA was subsequently used to detect vCJD/BSE PrP<sup>Sc</sup> in blood. In both sheep and primate prion disease models, PMCA enabled the identification of infected asymptomatic individuals. Samples that included buffy coat from vCJD-affected patients and healthy controls were tested blind. These analyses identified three out of the four tested vCJD-affected patients and no false positives were observed in 141 healthy controls. The negative results observed in one of the tested vCJD cases concur with results reported by others and raise the question of the potential absence of prionemia in certain patients. These results open new possibilities for vCJD screening and its prevention by iatrogenic transmission.

18. Turner ML, Ludlam CA. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt–Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol* 2009; 144:14–23.
19. Ironside JW, Bishop MT, Connolly K, *et al.* Variant Creutzfeldt–Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study. *BMJ* 2006; 332:1186–1188.
20. Ironside JW, Hilton DA, Ghani A, *et al.* Retrospective study of prion-protein accumulation in tonsil and appendix tissues. *Lancet* 2000; 355:1693–1694.
21. Hunter N, Foster J, Chong A, *et al.* Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 2002; 83 (Pt 11):2897–2905.
22. Houston F, Foster JD, Chong A, *et al.* Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 2000; 356:999–1000.
23. McCutcheon S, Alejo Blanco AR, Houston EF, *et al.* All clinically-relevant blood components transmit prion disease following a single blood transfusion: a sheep model of vCJD. *PLoS One* 2011; 6:e23169.
24. Lacroux C, Bougard D, Litaize C, *et al.* Impact of leucocyte depletion and prion reduction filters on TSE blood borne transmission. *PLoS One* 2012; 7:e42019.
25. Gregori L, Yang H, Anderson S. Estimation of variant Creutzfeldt–Jakob disease infectivity titers in human blood. *Transfusion* 2011; 51:2596–2602.
26. Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, *et al.* Prevalent abnormal prion protein ■ in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* 2013; 347:f5675.

The total number of vCJD clinical cases identified so far remains limited (225 patients worldwide). However, the prevalence of vCJD-infected and asymptomatic individuals in the BSE exposed population remains extremely uncertain. Abnormal PrP accumulation has been reported in lymphoid tissues from affected patients and in some asymptomatic individuals. The screening of abnormal PrP detection in lymphoid tissues was proposed as an approach to estimate the prevalence of vCJD carriers. On this basis, a first retrospective analysis of stored lymphoid tissues indicated that vCJD prevalence in the United Kingdom could approach one out of 4000 individuals. A second study reported the testing for abnormal PrP accumulation in 32 441 appendix samples, collected during surgery on patients born between 1941 and 1985. On the basis of these data, statistical models indicated a likely vCJD prevalence estimate of one in 2000 in this age cohort (95% confidence interval ranging from one in 3500 to one in 1250). These figures indicate that although vCJD clinical cases are currently relatively low, the disease still represents a major issue for public health.

#### 4. TRANSMISSIBILITE DES EST PAR LES LEUCOCYTES ET SOUS POPULATIONS LEUCOCYTAIRES

L'ensemble des travaux expérimentaux portant sur la transmission des EST par voie transfusionnelle en modèles animaux (ovins et cervidés) indiquent la grande virulence de la fraction leuco-plaquettaire par rapport aux autres compartiments sanguins. L'efficacité des cellules blanches sanguines à transmettre la maladie semble davantage liée à leur capacité à interagir avec l'organisme du receveur qu'à leur titre infectieux.

Ces travaux démontrent également l'efficacité probable des procédures de leuco-réduction pour la réduction des risques de transmission d'EST par les produits sanguins labiles en médecine transfusionnelle. Malgré leur apparente efficacité, les procédures de leuco-réduction ne semblent toutefois pas en mesure de prévenir de manière absolue, dans les modèles animaux utilisés pour leur évaluation, la transmission des EST.

La leuco-réduction permet de diminuer les concentrations moyennes de leucocytes dans les différents produits sanguins labiles en deçà de seuils prédéterminés sans toutefois permettre leur élimination totale.

Dans ce contexte, nous avons réalisé, dans un modèle ovin d'EST, des travaux visant à :

- caractériser le nombre minimal de leucocytes suffisant pour transmettre la maladie par voie transfusionnelle.
- établir la capacité de différentes sous populations leucocytaires (lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes/macrophages) à transmettre la maladie.

Nos résultats indiquent que, dans le modèle étudié, l'administration de  $10^4$  à  $10^5$  leucocytes suffisent à transmettre la maladie. Ils démontrent également que si différentes sous populations leucocytaires présentent des titres infectieux similaires, leur capacité à transmettre une EST par voie transfusionnelle est éminemment variable.

1 **Mono-nucleated blood cell populations display different abilities to**  
2 **transmit Prion disease by the transfusion route**

3 Jean Yves Douet<sup>1\*</sup>, Caroline Lacroux<sup>1\*</sup>, Claire Litaise<sup>1</sup>, Séverine Lugan<sup>1</sup>, Fabien Corbière<sup>1</sup>, Hugh  
4 Simmons<sup>2</sup>, Naima Aron<sup>1</sup>, Pierrette Costes<sup>1</sup>, Hervé Cassard<sup>1</sup> and Olivier Androletti<sup>1</sup>

5  
6 <sup>1</sup> *UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de*  
7 *Toulouse, 23 Chemin des Capelles 31076 Toulouse, France*

8 <sup>2</sup> *AH VLA Weybridge, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom*

9  
10  
11  
12  
13 \* : both authors contributed equally to this work

14  
15 **Running title: Cell population specific blood borne TSE transmission risk**

16  
17 Corresponding author: O. Androletti

[o.androletti@envt.fr](mailto:o.androletti@envt.fr)

18

19

20 **Abstract**

21 Previous experiments carried out in a sheep scrapie model demonstrated that the transfusion of  
22 200 $\mu$ L has an apparent 100% efficacy for disease transmission. They also indicate that, despite their  
23 apparent low infectious titer, the intravenous administration of white blood cells (WBC) result in an  
24 efficient disease transmission.

25 In this study, using the same TSE animal model, we aimed at determining the minimal number of  
26 white blood cells and the specific abilities of mono-nucleated cell populations to transmit scrapie by  
27 the transfusion route.

28 Our result confirmed that the transfusion of 100 $\mu$ L but not 10 $\mu$ L of fresh whole blood collected in  
29 asymptomatic but scrapie infected sheep donors can transmit the disease. They also show that the  
30 intravenous administration of  $10^5$  WBCs are sufficient to cause scrapie in recipients sheep. Cell-  
31 sorted CD45R+ (B lymphocytes), CD4+/CD8+ (T lymphocytes) and CD14+  
32 (monocytes/macrophages) blood sub-populations displayed comparable infectious titers by  
33 bioassays in ovine PrP transgenic mice. However the intravenous administration of  $10^6$  CD45+ or  
34 CD4/8+ living cells were able to transmit the disease, whereas the administration of similar number  
35 of CD14+ failed to infect the recipients.

36 These data support the contention that monoculeated blood cells' populations display different risk  
37 to transmit TSE transmission by transfusion route. They also represent an important input for the  
38 blood borne TSE risk transmission risk assessment of and for refining the target performance of  
39 leuko-reduction processes that are currently applied in transfusion medicine to mitigate the TSE  
40 transmission risk.

41

42

## 43 **Introduction**

44 Transmissible spongiform encephalopathies (TSE), or prion diseases, are fatal neurodegenerative  
45 disorders occurring in sheep (scrapie), cattle (bovine spongiform encephalopathy - BSE), or humans  
46 (Creutzfeldt-Jakob disease - CJD).

47 In 1996, a new form of TSE, named variant CJD (v-CJD) was identified in human. Variant CJD  
48 was demonstrated to be due to the same TSE agent that causes cattle BSE and its emergence in  
49 humans was considered to be the consequence of a dietary exposure to BSE contaminated products  
50 (1, 2). To date four vCJD cases were reported in individuals within the UK who had received red  
51 blood cell concentrates (RBCs) (3-6). In addition, abnormal prion protein was detected in a post-  
52 mortem spleen sample from a hemophilic patient who had received purified Factor VIII prepared  
53 from plasma batches that included donations from individuals who later developed vCJD(3).  
54 Collectively, these particular cases of vCJD infection strongly support the view that this condition  
55 can be transmitted by blood transfusion.

56

57 A decade ago, transmission of experimental BSE and natural Scrapie were reported to occur  
58 following transfusion of whole blood and/or buffy-coat collected in asymptomatic incubating sheep  
59 (7, 8). These observations opened new perspective for investigating the potential role of blood in  
60 the TSE agent pathogenesis and provided an alternative model to rodents for studying the behaviour  
61 and distribution of TSE agent in this tissue. In addition, the possibility to collect blood volumes  
62 comparable to those used in transfusion medicine and the similarities in the pathogenesis of sheep  
63 TSE and v-CJD in human lead to consider that sheep model would represent a pertinent source of  
64 information (9).

65 Recently infectivity measurement in blood fraction collected from a vCJD affected patient and  
66 scrapie affected sheep indicated that in both situation the infectivity levels and the partition of  
67 infectivity in blood compartments are similar. This further reinforced the pertinence of data  
68 collected in TSE infected sheep for assessing the vCJD blood borne transmission risk.

69 The relative ability of whole blood, plasma and white blood cells (WBCs) to transmit prion disease  
70 upon transfusion into recipients was assessed. It was shown that the intravenous administration of  
71 200µl of whole blood harvested during the in an experimental sheep scrapie model asymptomatic  
72 preclinical phase was sufficient to infect recipient scrapie-free sheep. However this experiment  
73 failed to determine what would be the minimal volume of blood that is able to transmit the disease.

74  
75 This high efficiency of transmission by transfusion contrasts with the low infectious titers measured  
76 in blood by intra-cerebral inoculation in mice (<32 ID<sub>50</sub> per mL) and with the fact that  
77 administration by the intravenous route of brain homogenate that contains 10<sup>3</sup> ID<sub>50</sub> (of the same  
78 prion strain) was necessary to transmit the disease(10).

79  
80 Moreover, these studies also showed that despite similar infectious titers, as determined by intra-  
81 cerebral inoculation in rodents, plasma and cellular blood products displayed a substantially  
82 different capacity to transmit the disease by the transfusion route. The intravenous administration of  
83 200 mL fresh crude plasma to sheep transmitted the disease with limited efficacy but no  
84 transmission was observed in animals that received 20 mL of plasma (11, 12). In contrast, the  
85 WBCs displayed a similar ability to whole blood in its efficacy to infect recipient sheep.

86 These results demonstrated that the ability of blood and blood-derived products to transmit prion  
87 disease by the transfusion route does not depend solely on their infectious titer and pointed out the  
88 importance that WBC population might play in the transmission of the disease by the transfusion  
89 route (10).

90  
91 In this study, using the same Scrapie infection model we aimed at determining the minimal volume  
92 of blood and the minimal number of White blood cell that are able to transmit the disease. We  
93 further characterized infectivity levels in different peripheral blood mononucleated cells population  
94 and their ability to infect TSE free recipients by transfusion route.

95 Our results indicate that as little as 10<sup>5</sup> WBC and 100µL of blood collected in asymptomatic  
96 scrapie infected sheep can transmit the disease. They also demonstrate unambiguously that despite



97 comparable infectious titers PBMC subpopulations display dramatically different abilities to  
98 transmit the disease.  
99

## 100 **Methods and Materials**

101

### 102 **Ethics Statement**

103 All animal experiments have been performed in compliance with our institutional and national  
104 guidelines, in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC.  
105 Experimental protocol was approved by the INRA Toulouse/ENVT ethics committee.

106

### 107 **PG127 classical scrapie oral inoculation model**

108 The classical scrapie isolate was derived from experimentally VRQ/VRQ affected sheep (PG127  
109 isolate). 6-10 months old TSE-free cheviot sheep were orally challenged with 2g equivalent of brain  
110 material (5% brain homogenate in glucose). This isolate has previously been end point titrated in  
111 tg338 mice (13). Animals were then observed till the occurrence of clinical signs (around 200 days  
112 post inoculation) and culled when exhibiting locomotor signs of the disease that impaired their  
113 feeding capacities. After culling, each animal was necropsied and a variety of lymphoid tissues  
114 (Spleen, third eye lid, mesenteric lymph node, prescapular lymph node and tonsil) and central  
115 nervous system were collected.

116

### 117 **TSE free recipient sheep**

118 TSE free VRQ/VRQ cheviot sheep were produced in the DEFRA ‘TSE free flock’ which is a  
119 unique source able to provide VRQ/VRQ animals that can be considered free from classical scrapie  
120 (14). The animals included in our experiments were imported in France and housed before their use  
121 in experiments in a dedicated scrapie free farm near situated at 30km of the experimental facilities  
122 and, to avoid the possibility of cross contamination, dedicated staff (who had no contact with the  
123 infected animals) were used. PrP genotype of each sheep included in the experiment was checked  
124 by sequencing the Exon 3 of the *Prnp* gene as previously described (15, 16).

125

**126 Blood collection and WBC preparation**

127 Whole blood was collected from the jugular vein using citrate dextrose (35 ml) /250 mL blood  
128 collection pouch (Macopharm ref MSE3500Q). 600 mL of blood were collected from each donor.  
129 For WBC preparation, 45 mL whole blood was transferred in 15 ml conic tubes before  
130 centrifugation at 3600 rpm for 10 min at room temperature. Plasma was removed and buffy coat  
131 was collected using a disposable hard bulb pipette. Buffy coat were then mixed volume/volume  
132 with ACK solution (NH<sub>4</sub>CL 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 1mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM, pH 7.4) for 5 min RT. The  
133 obtained white blood cells were then washed 3 times with PBS. Cell concentration was established  
134 by counting either using Mallasez's cell or automatic cell counter. Cells were aliquoted and when  
135 not used for transfusion stored -80°C freezing.

136

**137 PBMC preparation and cell sorting**

138 Blood from the same whole blood pouch collected for preparing WBC and whole blood dilution  
139 experiment was used to prepare PBMC. The whole blood was diluted in an equal amount of HBSS  
140 and 25mL of diluted blood was decanted into 50mL conic tube before adding 12.5mL of 1.077g/mL  
141 Ficoll solution (Ficoll-Paque Plus, GE healthcare life sciences ref 17-440-03). Tubes were  
142 centrifuged 20 min, 1000g at 20°C. PBMC aneal was collected by pipetting and cells were washed  
143 twice in HBSS and stored on ice.

144 Cells were labelled using FITC coupled anti ovine CD4 (Serotec, ref MCA2213F, 1/100 diluted),  
145 CD8 (serotec MCA837F, 1/100 diluted), CD45R (Serotec, ref MC2221F, 1/50 diluted), CD14  
146 (clone VPM65, 1µg/mL). Labelled cells were the incubated using Anti-FITC Mab coupled to  
147 magnetic beads (Miltenyi Biotec, ref 130-048-701) according to manufacturer's recommendations.  
148 Positive selection was achieved using two successive passages on MS separation columns (Miltenyi  
149 Biotec ref 130-048-701) according to manufacturer recommendations. Purity of the sorted cell sub  
150 populations and viability of cells (PI labelling) were controlled by flow cytometry (control of 2 10<sup>4</sup>  
151 event per fraction). In each fraction cell concentration was established by counting using a

152 Mallasez's cell. After counting cells necessary for transfusion experiment were harvested and  
153 transferred into a 100 ml 5% glucose perfusiojon pouch. Remaining cells were split in  $10^6$  cells  
154 aliquots, pelleted and pellet stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

155

#### 156 **Whole Blood, WBC and cell fraction transfusion**

157 Whole blood, WBC and PBMC were transfused / intravenously administered in individual  
158 recipients. Recipient sheep were anesthetized by IV administration of Ketamine / Diazepam (2mg  
159 and 0.1mg per Kg respectively) and a catheter (16G) was installed in the jugular vein. This catheter  
160 was used for transfusions or intravenous administrations.

161 In the whole blood titration by transfusion route, the required whole blood volumes were sampled  
162 from the collection bag using a sterile syringe and either transferred into a new pouch or gently re-  
163 suspended in a sterile 5% glucose solution (QSP 100mL), before administration (gravity) to  
164 recipients. In the WBC/PBMC experiment, WBC were gently re-suspended in a 200mL sterile  
165 pouch of isotonic (5%) glucose before infusion (gravity) over a 20-30 min period. All transfusions  
166 were performed within the 6 hours following blood collection.

167

#### 168 **Bioassay**

169 Mouse bioassays were carried out in ovine VRQ PrP transgenic mice (tg338), which are considered  
170 to be highly efficient for the detection of sheep scrapie infectivity (17). High sensitivity of tg338  
171 mice for detection of both PG127 scrapie and Langlade scrapie isolate was previously reported (13).  
172 At least six mice were intracerebrally inoculated with each sample (20 $\mu\text{L}$ ). Mice were clinically  
173 monitored until the occurrence of TSE clinical signs, at which time they were culled. CNS and  
174 spleen samples were individually collected and analyzed by Western blot (WB).

175

#### 176 **PrP<sup>Sc</sup> Western-blot detection (WB)**

177 A Western blot kit (TeSeE Western Blot, Bio-Rad) was used following the manufacturer's  
178 recommendations. For each sample 250  $\mu$ L of 10% brain homogenate were submitted to PrP<sup>Sc</sup>  
179 extraction. In PMCA, 20 $\mu$ L of amplicon were mixed with 230 $\mu$ L of 10% negative brain  
180 homogenate before extraction step. The obtained pellet was denaturated in Laemmli's buffer (15 $\mu$ L)  
181 before being loaded neat or diluted (see figure 4) on a 12% acrylamide gel, before electrophoresis  
182 and blotting. Immunodetection was performed using Sha31 which recognizes the 145-152 sequence  
183 of PrP (YEDRYYYRE) (18), conjuged to horseradish peroxidase (at 0,06  $\mu$ g per ml). Peroxidase  
184 activity was revealed using ECL substrate (Pierce).

185

186

187 **Results**

188 Four susceptible genotype (VRQ/VRQ) sheep were orally inoculated with the PG127 scrapie  
189 isolate. They all developed a TSE with incubation periods ranging from 196 dpi to 219 dpi. At a late  
190 preclinical stage of the incubation period (180 dpi) 600 mL of blood was collected from each of  
191 these animals.

192 Infectivity titer in the whole blood from each donor was measured by Intracerebral inoculation (IC)  
193 of mice (n=18) expressing the VRQ variant of the ovine PrP (tg338). In all four donors the  
194 measured blood infectious titer was lower than 10 ID per mL. In one of the fourth sheep (D1) the  
195 apparent infectious titer was below the sensitivity of the bioassay. These values were comparable  
196 with those previously measured in the blood of PG127 scrapie sheep using the same tg338 mice  
197 (table1). 100mL, 10mL, 1mL, 0.1mL and 0.01mL of the whole blood from each donor were  
198 transfused immediately following collection into VRQ/VRQ TSE free recipients (table 2).  
199 Whatever the donor, sheep transfused with 1 mL and higher volume of blood developed a clinical  
200 TSE with incubations periods varying between 190 and 274 days.

201 Only one of the recipient that had been transfused with 100 $\mu$ L dose developed Scrapie. According  
202 to infectious titer measured by IC inoculation in tg338 mice, this volume of blood contained 0.63  
203 (CI 95% :0.1 – 1.94) ID. None the animal that received 10 $\mu$ L of blood developed a clinical TSE or  
204 displayed detectable amount of abnormal PrP in their peripheral tissues or central nervous system.  
205 These results are consistent with the view that the minimal volume of whole blood that is able to  
206 transmit the disease ranges between 10 $\mu$ L and 100  $\mu$ L.

207

208 In parallel, white blood cells (WBC) were prepared using the same whole blood pouches collected  
209 from each donors. WBC that had been extensively was to eliminate platelets were re-suspended in  
210 5% glucose solution. Within the four hours following the blood collection, 100mL glucose 5%  
211 solution containing  $10^6$  to  $10^3$  WBC from each donor were prepared and administrated by the  
212 intravenous route to VRQ/VRQ TSE free recipients (table 2).

213 A clinical TSE was observed in sheep that received  $10^6$  WBC prepared from three out the four  
214 donors and in a sheep that received  $10^5$  cells prepared from one of those donors. No clinical signs or  
215 abnormal PrP accumulation was observed in animals that received lower number of WBC ( $10^4$  and  
216  $10^3$  cells). These results indicate that, in the TSE model we used, the minimal number of WBC that  
217 enabled the disease transmission was comprised between  $10^5$  and  $10^4$  cells.

218 According to the blood numeration carried out in the four donors, 1mL of blood contained between  
219 4.5 and 7.3  $10^6$  WBC cells (Table 3). These values make consistent the similar efficacy of the  
220 disease transmission in sheep that received 100 $\mu$ L of whole blood or  $10^5$ - $10^6$  WBCs.

221 In order to assess potential differences between blood mononucleated cells in their abilities to  
222 transmit TSE by the transfusion route, a variety of mono-nucleated cell sub-populations were sorted  
223 using magnetic beads technology. Cells were labelled using antibodies raised against different  
224 leukocyte phenotypic markers (CD14, CD4/8, CD45R). A double positive selection was used to  
225 ensure that the sorted cell fractions had purity greater than 90% as assessed by flow-cytometry  
226 (table 4).  $10^6$  to  $10^4$  cells from each purified fraction were intravenously administered to TSE free  
227 recipient sheep within the 5 hours following blood collection (table 2).

228 In parallel,  $10^6$  cells of each cell type from each donor sheep were homogenized and intracerebrally  
229 inoculated into tg338 mice groups (n=6 or 7 per sample) (table 4).

230 Infectivity levels were estimated on the basis of the attack rate incubation and periods recorded in  
231 tg338 mice (table 5) indicated comparable infectivity levels in CD4/8+, CD45R+ and CD14+ cells.

232 This contrasted with the fact that while  $10^6$  CD45R+ cells from all the four donors transmitted the  
233 disease to their recipients sheep, the same number of CD14+ cells failed to cause a prion infection  
234 in any of the recipients (table 4). Only a part of the recipients that received  $10^6$  CD4/8+ and none of  
235 those who received  $10^5$  CD45+ or CD4+ cells were found positive.

236

237 **Discussion**

238

239 **Minimal volume of blood**

240 In this study the transfusion of 100 $\mu$ L of whole blood collected from an infected but asymptomatic  
241 donor can be sufficient to transmit the disease. No transmission was observed in 10 $\mu$ L whole blood  
242 transfusion recipients. The infectious titers that we measured in the whole blood used for the  
243 transfusion experiment were lower than 10 ID/mL. These infectious titers values are similar to those  
244 established in a previous study in similar animals (VRQ/VRQ sheep) infected with the same scrapie  
245 isolate(10, 11). Interestingly in this experiment transmission was observed following transfusion of  
246 1 mL of blood that contained less than 10 ID as measured by bioassay in tg338 mice. These data  
247 complete and expand the results that we previously reported and confirm that the risk of TSE  
248 transmission by blood transfusion cannot be assessed considering solely their relative infectious  
249 titer(10).

250

251 **WBC transmission efficacy and leuco-depletion**

252 Approximately 15 years ago a significant proportion of European countries decided to implement  
253 leukocyte reduction treatment within their human blood supplies in order to mitigate the risk of  
254 human prion disease transmission (20). According to the standard in transfusion medicine applied in  
255 most countries, red blood cell unit that are aimed at transfusion are to contain less than 10<sup>6</sup>  
256 WBC(6). Current epidemiological studies seem to indicate that leukocyte reduction has had a  
257 positive impact on reducing the risk of vCJD transmission by transfusion(20).

258 Various experimental studies carried out in animal models of prion disease have confirmed that  
259 leukocyte reduction, as applied in human transfusion medicine, provides a high but absolute  
260 protection against transmission of prion disease by blood transfusion(11, 21).

261 Our study demonstrates that, 10<sup>5</sup> WBC harvested in sheep infected with scrapie at preclinical stage  
262 of the disease are still able in a proportion of cases to transmit the disease. This value is lower than



263 the leuko-reduction target value and this is a possible explanation of the imperfect efficacy of  
264 leuko-reduction to prevent TSE transmission by RBC transfusion in this model. This finding  
265 support the view that establishing a lower WBC number as a standard for leuco depletion in human  
266 medicine might further mitigate the risk of vCJD transmission by transfusion route.

267

### 268 **PBMC display different abilities to transmit the disease**

269 The presence of infectivity in various peripheral blood mononucleated cell populations, such as  
270 lymphocytes and monocytes/macrophages, has been reported in both CWD infected cervids and  
271 scrapie infected sheep(12, 22). The ability of lymphocyte to transmit the disease by transmission  
272 route that we observed is consistent with the finding reported by other authors in these two TSE  
273 infection models.

274 Only a part of the recipients that received  $10^6$  CD45+ or CD4/8+ and none of those who received  
275  $10^5$  of these cells were found positive. This observation combined with the relative efficacy of  
276 disease transmission following intravenous administration of WBC and the relative proportion of  
277 CD45+ and CD4/8+ (lymphocytes represent about 5% of the WBC, see table 3) in WBC strongly  
278 support the view that, in the studied TSE model, CD45+ and CD4/8+ cells on their own cannot be  
279 responsible for the entire capacity of WBC to transmit the disease. This implies that other WBC  
280 populations participates to the global efficacy of the disease transmission. In that context the  
281 question of the potential infectivity of poly-nucleated cells and their capacity to transmit the disease  
282 remain to be explored.

283

284 CD14+ cells displayed infectious titer that were at least similar to those observed in nCD45+ and  
285 CD45+ sub-population (as assessed by bioassay in tg338), However the intravenous administration  
286 of  $10^6$  these cell failed to transmit the disease while the administration of the same number of B  
287 lymphocytes or T lymphocytes caused scrapie. This demonstrates, that independently to their  
288 infectious load, WBC population display different abilities to transmit the disease. Previous

289 experiments evidenced that paraformaldehyde fixation impair the capacity of WBC to transmit  
290 Scrapie(10).

291 Together these findings strongly support the view that the physiological functions of WBC  
292 populations play a crucial role in the disease transmission by transfusion route.

293

## References

- 294  
295  
296  
297 1. **Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L,**  
298 **Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ.** 1997. Transmissions to  
299 mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**:498-501.
- 300 2. **Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF.** 1996. Molecular analysis of prion  
301 strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]. *Nature* **383**:685-690.
- 302 3. **Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar**  
303 **CM, Hill FG, Ironside JW.** 2010. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically  
304 asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* **16**:296-304.
- 305 4. **Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG.** 2004.  
306 Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*  
307 **363**:417-421.
- 308 5. **Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW.** 2004. Preclinical vCJD after  
309 blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**:527-529.
- 310 6. **Lefrere JJ, Hewitt P.** 2009. From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion  
311 transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France. *Transfusion*  
312 **49**:797-812.
- 313 7. **Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ.** 2000. Transmission of BSE by  
314 blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**:999-1000.
- 315 8. **Hunter N, Houston F.** 2002. Can prion diseases be transmitted between individuals via  
316 blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Dev Biol* **108**:93-98.
- 317 9. **Ironside JW, Head MW.** 2004. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by  
318 blood and blood products. *Haemophilia* **10 Suppl 4**:64-69.
- 319 10. **Andreoletti O, Litaize C, Simmons H, Corbiere F, Lugan S, Costes P, Schelcher F,**  
320 **Vilette D, Grassi J, Lacroux C.** 2012. Highly efficient prion transmission by blood  
321 transfusion. *PLoS Pathog* **8**:e1002782.
- 322 11. **Lacroux C, Bougard D, Litaize C, Simmons H, Corbiere F, Dernis D, Tardivel R,**  
323 **Morel N, Simon S, Lugan S, Costes P, Weisbecker JL, Schelcher F, Grassi J, Coste J,**  
324 **Andreoletti O.** 2012. Impact of Leucocyte Depletion and Prion Reduction Filters on TSE  
325 Blood Borne Transmission. *PLoS One* **7**:e42019.
- 326 12. **Lacroux C, Vilette D, Fernandez-Borges N, Litaize C, Lugan S, Morel N, Corbiere F,**  
327 **Simon S, Simmons H, Costes P, Weisbecker JL, Lantier I, Lantier F, Schelcher F,**  
328 **Grassi J, Castilla J, Andreoletti O.** 2012. Prionemia and leukocyte-platelet-associated  
329 infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol* **86**:2056-2066.
- 330 13. **Andreoletti O, Orge L, Benestad SL, Beringue V, Litaize C, Simon S, Le Dur A, Laude**  
331 **H, Simmons H, Lugan S, Corbiere F, Costes P, Morel N, Schelcher F, Lacroux C.** 2011.  
332 Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* **7**:e1001285.
- 333 14. **Simmons HA, Simmons MM, Spencer YI, Chaplin MJ, Povey G, Davis A, Ortiz-Pelaez**  
334 **A, Hunter N, Matthews D, Wrathall AE.** 2009. Atypical scrapie in sheep from a UK  
335 research flock which is free from classical scrapie. *BMC Vet Res* **5**:8.
- 336 15. **Arsac JN, Andreoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL, Baron T.** 2007.  
337 Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98  
338 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis* **13**:58-65.
- 339 16. **Moreno CR, Moazami-Goudarzi K, Laurent P, Cazeau G, Andreoletti O, Chadi S,**  
340 **Elsen JM, Calavas D.** 2007. Which PrP haplotypes in a French sheep population are the  
341 most susceptible to atypical scrapie? *Arch Virol* **152**:1229-1232.
- 342 17. **Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte**  
343 **JL, Sarradin P, Benestad SL, Laude H.** 2005. A newly identified type of scrapie agent  
344 can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
345 **102**:16031-16036.

- 346 18. **Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, Creminon C, Vilette D,**  
347 **Lehmann S, Grassi J.** 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their  
348 capacity to inhibit PrP<sup>Sc</sup> replication in infected cells. *J Biol Chem* **280**:11247-11258.
- 349 19. **Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Maillet S, Mathey J, Lugan S, Corbiere F, Cassard**  
350 **H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-**  
351 **Tarisse C, Morel N, Schelcher F, Grassi J, Andreoletti O.** 2008. Prions in milk from  
352 ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* **4**:e1000238.
- 353 20. **Douet JY, Bujdoso R, Andreoletti O.** 2015. Leukoreduction and blood-borne vCJD  
354 transmission risk. *Current opinion in hematology* **22**:36-40.
- 355 21. **McCutcheon S, Alejo Blanco AR, Houston EF, de Wolf C, Tan BC, Smith A, Groschup**  
356 **MH, Hunter N, Hornsey VS, Macgregor IR, Prowse CV, Turner M, Manson JC.** 2011.  
357 All Clinically-Relevant Blood Components Transmit Prion Disease following a Single  
358 Blood Transfusion: A Sheep Model of vCJD. *PLoS One* **6**:e23169.
- 359 22. **Mathiason CK, Hayes-Klug J, Hays SA, Powers J, Osborn DA, Dahmes SJ, Miller KV,**  
360 **Warren RJ, Mason GL, Telling GC, Young AJ, Hoover EA.** 2010. B cells and platelets  
361 harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol*  
362 **84**:5097-5107.
- 363 23. **Brown P, Cervenakova L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN.** 1999.  
364 Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform  
365 encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-  
366 Jakob disease in humans. *Transfusion* **39**:1169-1178.
- 367  
368  
369

**Table 1** Infectivity in the Whole blood of VRQ/VRQ sheep orally challenged with PG127 scrapie agent as determined by intracerebral inoculation in tg 338 mice

| <b>Donor</b> | <b>Total inoculated volume<br/>( whole blood)</b> | <b>Number of<br/>inoculated mice</b> | <b>Number of<br/>positive mice</b> | <b>ID per mL of whole blood</b> |
|--------------|---|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <b>D1</b>    | 340 $\mu$ L                                       | 17                                   | 0/17                               | < 8,81*                         |
| <b>D2</b>    | 340 $\mu$ L                                       | 17                                   | 2/17                               | 6.3 (1 - 19.4)                  |
| <b>D3</b>    | 360 $\mu$ L                                       | 18                                   | 1/18                               | 2.9 (0.2 – 12.6)                |
| <b>D4</b>    | 360 $\mu$ L                                       | 18                                   | 1/18                               | 2.9 (0.2 – 12.6)                |

Blood was collected from the four TSE free VRQ/VRQ donor sheep that had been orally challenged with PG127 scrapie (D1, D2, D3, D4). The date of collection from the infected animals was 210 days post inoculation. Donors developed clinical scrapie two to five weeks following blood collection. They were euthanized at 207 days, 219 days, 217 days and 196 days post inoculation (dpi) respectively.. Whole blood was inoculated intracerebrally into 18 tg338 mice (20 $\mu$ L per mouse). Two mice (D1 and D2 donors) died within the first days following inoculation. Mice were euthanized when they showed clinical signs of infection or after 250 dpi. Mice were considered infected when abnormal PrP depositions were detected in brain. Infectious titers were estimated using limiting dilution titration method (application of Poisson model) described by Brown et al (23). Infectious titers are given as the most likely infectious titer and, in parentheses, the values of the lower and upper limits of the 95% confidence interval. When no transmission was observed the detection limit of the bioassay tested is indicated (upper boundary of the 95% of the confidence interval).

**Table 2:** Incubation period of VRQ/VRQ TSE free recipient sheep transfused with whole blood, WBC or cell sorted WBC subpopulation collected in four VRQ/VRQ sheep orally inoculated with PG127 classical scrapie isolate.

|  |                             | <b>D1</b>    |                         | <b>D2</b>    |                         | <b>D3</b>    |                         | <b>D4</b>    |                         |
|--|-----------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|
|  |                             | <b>incub</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> | <b>Incub</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> | <b>incub</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> | <b>incub</b> | <b>PrP<sup>Sc</sup></b> |
| <b>Whole blood</b>                     | <b>10 mL</b>                | 183 dpi      | +                       | 177 dpi      | +                       | 207 dpi      | +                       | 184 dpi      | +                       |
|  | <b>1 mL</b>                 | 213 dpi      | +                       | 190 dpi      | +                       | 274 dpi      | +                       | 215 dpi      | +                       |
|  | <b>0.1 mL</b>               | >450 dpi     | -                       | 232 dpi      | +                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>0.01 mL</b>              | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
| <b>WBC</b>                             | <b>10<sup>6</sup> cells</b> | >450 dpi     | +                       | 230 dpi      | +                       | 218 dpi      | +                       | 220 dpi      | +                       |
|  | <b>10<sup>5</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | 254 dpi      | +                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>4</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>3</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
| <b>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b> | <b>10<sup>6</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | 195 dpi      | +                       | >450 dpi     | +                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>5</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>4</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
| <b>CD45R<sup>+</sup></b>               | <b>10<sup>6</sup> cells</b> | 305 dpi      | +                       | 224 dpi      | +                       | >450 dpi     | +                       | 240 dpi      | +                       |
|  | <b>10<sup>5</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>4</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
| <b>CD14<sup>+</sup></b>                | <b>10<sup>6</sup> cells</b> | >450 dpi     |                         | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>5</sup> cells</b> | >450 dpi     |                         | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |
|  | <b>10<sup>4</sup> cells</b> | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       | >450 dpi     | -                       |

Four susceptible VRQ/VRQ sheep (identified as D1-4) sheep were orally challenged with 2g of brain homogenate ( $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC in tg338 mice) between 6 and 10 months of age. The sheep were euthanized 207 days, 219 days, 217 days and 196 days post inoculation (dpi) respectively. In VRQ/VRQ recipients, occurrence of scrapie was confirmed by histopathology (vacuolar change in central nervous system) and detection of abnormal PrP deposits in central nervous system and lymphoid tissues. At 180 dpi whole blood was collected from each donor and a 200mL volume was transfused to TSE free VRQ/VRQ recipients, within the 6 hours following collection. Recipients were observed till occurrence of the clinical signs. 450 days post transfusion recipients that were apparently still healthy were killed. Incubation period in recipients are presented (in days). All recipients were tested for presence of abnormal PrP deposition in brain and various lymphoid tissues by immunohistochemistry.

**Table 3:** WBC counting and formula in the four VRQ/VRQ sheep orally inoculated with PG127 classical scrapie isolate.

|   | <b>D1</b> | <b>D2</b> | <b>D3</b> | <b>D4</b> |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Red Blood Cells (<math>10^9</math>/mL)</b>   | 11.97     | 10.5      | 10.55     | 12.11     |
| <b>Platelets (<math>10^6</math>/mL)</b>         | 357       | 359       | 281       | 496       |
| <b>White Blood Cells (<math>10^6</math>/mL)</b> | 5.56      | 5.93      | 7.34      | 4.45      |
| <b>Neutrophils (<math>10^6</math>/mL)</b>       | 1.73      | 1.86      | 1.87      | 1.29      |
| <b>Lymphocytes (<math>10^6</math>/mL)</b>       | 3.38      | 3.32      | 4.45      | 2.84      |
| <b>Monocytes (<math>10^6</math>/mL)</b>         | 0.23      | 0.21      | 0.25      | 0.10      |
| <b>Eosinophil (<math>10^6</math>/mL)</b>        | 0.19      | 0.52      | 0.72      | 0.21      |
| <b>Basophil (<math>10^6</math>/mL)</b>          | 0.03      | 0.02      | 0.05      | 0.01      |

Four susceptible VRQ/VRQ sheep (identified as D1-4) sheep were orally challenged with 2g of brain homogenate ( $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC in tg338 mice) between 6 and 10 months of age. The sheep were eutanized 207 days, 219 days, 217 days and 196 days post inoculation (dpi) respectively. Whole blood (600 mL) was collected from each donor and 180 days post inoculation.

**Table 4** Intracerebral inoculation of tg338 mice with WBC and cell sorted mononuclear cell sub-populations prepared from VRQ/VRQ sheep orally inoculated PG127 scrapie

|                | <b>D1</b>              |                           | <b>D2</b>              |                            | <b>D3</b>              |                           | <b>D4</b>              |                           |                   |       |     |        |
|----------------|------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|-------|-----|--------|
|                | <b>Fraction purity</b> | <b>tg338 transmission</b> | <b>Fraction purity</b> | <b>tg338 transmission.</b> | <b>Fraction purity</b> | <b>tg338 transmission</b> | <b>Fraction purity</b> | <b>tg338 transmission</b> |                   |       |     |        |
| <b>PBMC</b>    | -                      | 6/6                       | 96±5                   | -                          | 6/6                    | 100±3                     | -                      | 6/6                       | 86±2              | -     | 6/6 | 105±14 |
| <b>CD14+</b>   | 98,2%                  | 6/6                       | 110±9                  | 96,4%                      | 6/6                    | 96±11                     | 95,1%                  | 6/6                       | 107±9             | 95,2% | 5/6 | 123±9  |
| <b>CD4/8+</b>  | 97,1%                  | 6/6                       | 90±5                   | 96,1%                      | 6/6                    | 90±2                      | 95,3%                  | 6/6                       | 108±4             | 95,5% | 5/6 | 110±16 |
| <b>CD45R+-</b> | 95,3%                  | 5/6                       | 123±11                 | 98,2%                      | 6/6                    | 118±16                    | 99,2%                  | 3/6                       | 100, 104,<br>106* | 97,3% | 6/6 | 103±7  |

Four susceptible VRQ/VRQ sheep (identified as D1, D2, D3, and D4) aged between 6 and 10 months were orally challenged with 2g of brain homogenate ( $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC in tg338 mice). These animals were sampled at 180 dpi. The sheep were euthanized 207 days, 219 days, 217 days and 196 days post inoculation (dpi) respectively). Classical scrapie occurrence was confirmed by histopathology (vacuolar change in central nervous system) and detection of abnormal PrP deposits in central nervous system and lymphoid tissues. Whole Blood (150 mL) samples were used for PBMC preparation. CD14+, CD14- (FITC labelled VPM65 MAb), CD4/8 + and CD4/8 - (FITC labelled SBU/T4 and SBU/T8 Mab), CD45R + and CD45R - (FITC labelled 20.29 Mab) subpopulation were sorted using anti- FITC coated magnetic beads and two passages on MACS mini-columns. The purity of sorted cells was assessed by Flow cytometry (percentage of FL1 labelled cell -2  $10^4$  events) and is indicated in table (Fract. purity). After preparation cells were counted and aliquots of  $5 \times 10^6$  cells prepared before grinding in 200µL of a 5% glucose solution. Each homogenate was inoculated intra-cerebrally to tg338 mice (n=6, 20µL per mouse). Equivalent number of cells inoculated in each mouse is indicated. Mice were then observed till occurrence of clinical signs or killed after 200 days post inoculation. Mice were considered positive when abnormal PrP deposition was detected in brain. Incubation periods are presented as mean +/-SD except for that dilution with which less than 50% of mice were found positive. In that case (\*) incubation times of the positive mice are individually presented.



**Table 5** End-point titration in tg338 mice of one 10% brain homogenate collected in VRQ/VRQ sheep orally inoculated with PG127 scrapie.

| <b>Brain homogenate 10%</b> |                      |                                     |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| <b>Dilution</b>             | <b>Positive mice</b> | <b>Mice incubation (mean+/- SD)</b> |
| <b>neat</b>                 | 6/6                  | 64±4                                |
| <b>10<sup>-1</sup></b>      | 6/6                  | 76±3                                |
| <b>10<sup>-2</sup></b>      | 6/6                  | 87±2                                |
| <b>10<sup>-3</sup></b>      | 6/6                  | 97±5                                |
| <b>10<sup>-4</sup></b>      | 3/6                  | 110±4                               |
| <b>10<sup>-5</sup></b>      | 2/6                  | 117-121*                            |
| <b>10<sup>-6</sup></b>      | 0/6                  | >200                                |
| <b>10<sup>-7</sup></b>      | 0/6                  | >200                                |

10% weight/volume homogenate was prepared using posterior brainstem from VRQ/VRQ sheep inoculated with PG127 scrapie isolate and at the terminal stage of disease. Group of 6 mice that over-express the VRQ ovine PrP (tg338) were intracerebrally (20µL) inoculated with successive 1/10 dilutions of this homogenate. These data were already used in a previous publication (13).

## 5. DETECTION PRECLINIQUE DES PRIONS DANS LES LEUCOCYTES SANGUINS

Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun test validé permettant une détection non invasive et sensible des individus en incubation de sMCJ ou de vMCJ.

Les données obtenues grâce aux modèles animaux ont été déterminantes pour une évaluation rationnelle des risques de transmission iatrogène des MCJ. Ces travaux ont en effet confirmé la réalité d'une infectiosité potentielle du sang et posé les bases du niveau de sensibilité nécessaire à la détection. Pour autant, il est illusoire, à l'aune des contraintes techniques et opérationnelle inhérentes à ces modèles (coût, durée d'incubation, etc.) d'envisager développer des tests de détection qui soient applicables de manière rapide et à grande échelle.

Au cours de ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés en matière de détection de certains Prions par des outils *in vitro* d'amplification (PMCA) ou de détection d'infectiosité *ex vivo*. (infection de cultures cellulaires, et de coupes organotypiques)

Dans la dernière partie de notre travail nous avons donc comparé l'efficacité de ces différentes techniques pour la détection de Prions, à partir de leucocytes et de plaquettes issus de moutons en incubation de tremblante.

Nos résultats indiquent que:

- Le bioessai et la PMCA à partir de leucocytes sont efficaces pour la détection de la prionémie, y compris à des temps très précoces de l'incubation.
- Les techniques *ex vivo*, ont permis également de détecter l'infectiosité de manière efficace mais à des temps moins précoces.
- Quelle que soit la techniques mise en œuvre, les leucocytes sont une cible pertinente pour le développement d'un test de détection des Prions dans le sang.



# White Blood Cell-Based Detection of Asymptomatic Scrapie Infection by *Ex Vivo* Assays

Sophie Halliez<sup>1</sup>, Emilie Jaumain<sup>1</sup>, Alvina Huor<sup>2</sup>, Jean-Yves Douet<sup>2</sup>, Séverine Lugan<sup>2</sup>, Hervé Cassard<sup>2</sup>, Caroline Lacroux<sup>2</sup>, Vincent Béringue<sup>1</sup>, Olivier Andréoletti<sup>2</sup>, Didier Vilette<sup>2\*</sup>

**1** INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UR892, Virologie Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France, **2** UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France

## Abstract

Prion transmission can occur by blood transfusion in human variant Creutzfeldt-Jakob disease and in experimental animal models, including sheep. Screening of blood and its derivatives for the presence of prions became therefore a major public health issue. As infectious titer in blood is reportedly low, highly sensitive and robust methods are required to detect prions in blood and blood derived products. The objectives of this study were to compare different methods - *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays - to detect prion infectivity in cells prepared from blood samples obtained from scrapie infected sheep at different time points of the disease. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) and bioassays in transgenic mice expressing the ovine prion protein were the most efficient methods to identify infected animals at any time of the disease (asymptomatic to terminally-ill stages). However scrapie cell and cerebellar organotypic slice culture assays designed to replicate ovine prions in culture also allowed detection of prion infectivity in blood cells from asymptomatic sheep. These findings confirm that white blood cells are appropriate targets for preclinical detection and introduce *ex vivo* tools to detect blood infectivity during the asymptomatic stage of the disease.

**Citation:** Halliez S, Jaumain E, Huor A, Douet J-Y, Lugan S, et al. (2014) White Blood Cell-Based Detection of Asymptomatic Scrapie Infection by *Ex Vivo* Assays. PLoS ONE 9(8): e104287. doi:10.1371/journal.pone.0104287

**Editor:** Byron Caughey, Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH, United States of America

**Received:** May 12, 2014; **Accepted:** July 7, 2014; **Published:** August 14, 2014

**Copyright:** © 2014 Halliez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from DIM Malinf (Paris, France, grant no. 110208), the Alliance Biosecure Foundation (SafeCJD project), the EU FP7 project "PRIORITY" and CONCOTSA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: d.vilette@envt.fr

## Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases are deadly infectious neurodegenerative diseases naturally affecting a broad range of mammalian species including humans (Creutzfeldt-Jakob disease-CJD), goats, sheep (scrapie), cattle (bovine spongiform encephalopathy-BSE) and cervids (chronic wasting disease-CWD). Mammalian prions are thought to consist in aggregated and misfolded forms of a host protein, the prion protein (PrP), encoded by the *Prnp* gene. While TSE present sporadic and familial origins, they also can be acquired. Transmission can be achieved by several ways. In humans, a novel form of CJD, named variant (v) CJD and first reported in 1996, likely results from the infection by BSE agent through alimentation [1]. The subclinical period can vary from several weeks to decades depending of different parameters including the prion strain, the transmission route, the host species, the *Prnp* and possibly other polymorphisms. Importantly, prions replicate in tissues other than the nervous system, mainly lymphoid tissues. It is notably the case for vCJD and eventually the clinical phase could even not appear resulting in an asymptomatic carriage of vCJD infection [2,3]. To date, there is no certitude about asymptomatic vCJD prevalence. Concerning the United Kingdom population where the reported number of BSE cases was the highest, recent data obtained from the survey of appendix tissue archives suggest a

prevalence of subclinical infection in around 1 in 2000 in age-relevant population [4]. The detection of blood prions has been demonstrated in a number of experimentally or naturally infected animal species including rodents [5,6], cervids [7], sheep [8], goats [9] and non-human primates [10]. Importantly, four cases of vCJD transmission were reported in individuals that were transfused with blood from asymptomatic donors that subsequently developed vCJD, strongly arguing that human blood can be infectious as well [11–13]. More recently, transgenic mice bioassay detected infectivity in some sporadic CJD plasma samples [14]. Even if the infectious titers in blood seem low (as assessed by intracerebral inoculation into susceptible mice), positive transmission following transfusion of as little as a few hundreds microliters of scrapie infected whole blood suggested that disease transmission by transfusion might be much more efficient than previously assumed [15]. Therefore prevention of vCJD transmission by blood transfusion is a major public health issue.

Distribution of prion infectivity among blood components may substantially vary depending on the host species and/or the prion agent. While previous studies in rodents [6], primates [10], cervids [16] and sheep [17] have clearly established that at least part of blood infectivity is associated with white blood cells (WBC), infectivity was detected in platelets from vCJD-infected mice [18], CWD-infected deer [16] and scrapie- [19] and BSE-infected sheep [20] but not in hamsters [21]. The contribution of plasma to blood

infectivity also depends on the experimental paradigm. In rodents, up to fifty percent of blood infectivity is recovered from plasma [18] while plasma does not seem to be infectious in cervids [16]. In sheep, plasma is consistently infectious albeit less than whole blood [20]. For human, available data are scarce but suggest that plasma from CJD individuals may contain prions [14].

Sensitive and accurate detection of blood prions are required to design pertinent tests for non invasive early diagnostic, to improve the safety of blood transfusion and blood-derived products and to study the species/agent-dependant blood prionemia in infected animals or individuals. In the recent years, blood detection tests targeting abnormal PrP have been developed, some of which - Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) [22] and QuIC [23] - rely on prion-seeded amplification. Abnormal PrP has been PMCA-amplified from blood components of various asymptomatic animal species including rodents [24], sheep and cervids [25] while eQuIC allowed identification of positive plasmas from preclinical hamsters [26]. Abnormal PrP enrichment methods, such as plasminogen-based capture can be coupled to *in vitro* prion amplification to optimize the detection [27]. Of note, abnormal PrP was detected in vCJD blood samples by a steel binding/ELISA assay without any amplification step [28]. On the other hand, blood prions can also be detected by infectivity assays, notably for titration purposes. These assays involve blood transfusion in the original host [16,29] or intracerebral inoculation of blood components into susceptible mice [6,15,16,18,29]. Quite recently, *ex vivo* assays have been developed to detect brain-derived prion infectivity without resorting to animal inoculation [30–32].

In this work, we aimed at comparing in the same experimental model the relative sensitivity and specificity of these different assays to detect prion in blood. We chose sheep experimentally infected with classical scrapie to isolate WBC and platelets at different stages of the incubation period. Infectivity of the different samples was tested by PMCA and bioassay in ovine PrP transgenic mice (tg338) mice. WBC were also subjected to the ovRK13 cell-based assay and to the Cerebellar Organotypic Slice Culture Assay (COSCA). Our data show that cell-based assay and COSCA are sensitive enough to detect prion infectivity in WBC from asymptomatic sheep. This study confirms the earlier finding that WBC are a suitable target for preclinical detection of infection and extends the number of complementary tools for prion detection in blood cells.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal experiments have been performed in compliance with our institutional and French national guidelines, in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC. The experimental protocols were approved by the INRA Toulouse/ENVV ethics committees, and were performed in the approved animal facilities (C 31 555 27) of author's institution by an agreed experimenter (311055503). All efforts were made to minimize suffering.

### PG127 classical scrapie model

Oral inoculation of the PG127 sheep isolate has been described in detail previously [19]. Briefly, five 6- to 10-month-old TSE-free cheviot sheep were orally challenged with a 2-g equivalent of brain material (PG127 isolate previously endpoint titrated in tg338 mice). Animals were then observed until the occurrence of clinical signs (around 200 days post inoculation) and euthanized when exhibiting locomotor signs of the disease that impaired feeding.

After culling, each sheep was necropsied and lymphoid and brain tissues were sampled for PrPSc detection.

### Blood collection, white blood cell and platelet preparation

Whole blood was collected from the jugular vein using citrate dextrose (35 mL) in a 250-mL blood collection pouch (MSE3500Q; Macopharma). Preparation of white blood cells and platelet samples were as described previously [19]. For WBC preparation, whole blood transferred into 15-ml conic tubes was centrifuged at 3,600 rpm for 10 min. Plasma was removed and the collected buffy coat was then mixed with an equal volume of ACK solution (NH<sub>4</sub>CL, 0.15 M; KHCO<sub>3</sub>, 1 mM; Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1 mM; pH 7.4) for 5 min at room temperature (RT). The obtained white blood cells then were washed 3 times with PBS. Cell aliquots were freeze-dried at -80°C until used. For platelets, whole blood was centrifuged for 15 min at 300×g in 5-ml borosilicate tubes at room temperature. The top third of the plasma was collected and centrifuged for 30 min at 3,000×g. The supernatant was eliminated and the pellet resuspended in PBS (pH 7.4) before two additional washings. Pellets were resuspended in PBS, and the absence of both leukocytes and red cells was checked by direct microscopic examination in a Thomas' cell and Sysmex XT-2000i automat [19].

### Bioassay

Mouse bioassays were carried out in ovine VRQ PrP transgenic mice (tg338), which are highly sensitive for detection of PG127 sheep scrapie infectivity [15]. Six mice were intracerebrally inoculated with each sample (20 µL). Mice were clinically monitored until the occurrence of TSE clinical signs, at which time they were culled. Brain accumulation of PrP<sup>res</sup> was confirmed in clinically-affected mice.

### PMCA

PMCA in a Misonix 4000 sonicator was carried out as previously described [19] with brain homogenate from tg338 mice as substrate. After the first round (96 cycles), the 2<sup>nd</sup> round reactions were seeded with 1/10 of the first round. Samples were then processed for PrP<sup>res</sup> analysis by immunoblotting.

### Organotypic Slice Cultures and COSCA

Cerebella were dissected from 10- to 12-day-old tg338 transgenic mice (tg338) over-expressing the VRQ allele of the ovine prion protein [33]. Preparation and culture of the slices were performed as described in the protocol published for the POSCA [30]. Briefly cerebella were embedded in 2.5%-low-melting-point agarose (Invitrogen) dissolved in Gey's balanced salt solution (Eurobio) supplemented with the glutamate receptor antagonist kynurenic acid (1 mM) (Sigma) and glucose (33 mM) (Sigma). 350-mm-thick slices were cut on a vibratome (HM650V, Microm), then recovered from the agarose and placed on 6-well Millicell culture inserts (Millipore) by groups of 8 to 10 slices. The inserts were transferred to a cell culture plate and cultured in sterile slice culture medium (SCM) composed of 50% minimum essential medium (Gibco), 25% basal medium Eagle (Gibco) and 25% horse serum (Gibco) and supplemented with glucose, penicillin/streptomycin and stable Glutamine (PAA). The slices were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and the culture medium was exchanged three times a week.

Frozen pellets of WBC were resuspended in SCM at 5.10<sup>5</sup> cells/µL. For quantification purposes, serial dilutions of brain stock prepared from terminally ill tg338 mice experimentally infected

**Table 1.** Evaluation of the infectivity present in platelets prepared from scrapie infected sheep by two different methods: PMCA and inoculation into tg338 mice (bioassay).

| Donor |                  | -1 dpi | 50 dpi        | 80 dpi       | 130 dpi      | 180 dpi       |
|-------|------------------|--------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| D1    | PMCA             | 0/5    | 0/5           | 5/5          | 5/5          | 5/5           |
|       | Bioassay (tg338) | 0/6    | 0/6           | 6/6 (109±8)  | 5/6 (110±10) | 1/6 (117)     |
| D2    | PMCA             | 0/5    | 1/5           | 5/5          | 5/5          | 5/5           |
|       | Bioassay (tg338) | 0/6    | 1/6 (128)     | 6/6 (112±5)  | 1/6 (154)    | 0/6           |
| D3    | PMCA             | 0/5    | 3/5           | 5/5          | 5/5          | 5/5           |
|       | Bioassay (tg338) | 0/6    | 2/6 (135,138) | 4/6 (110±5)  | 6/6 (105±17) | 4/6 (118±3)   |
| D4    | PMCA             | 0/5    | 0/5           | 5/5          | 5/5          | 5/5           |
|       | Bioassay (tg338) | 0/6    | 0/6           | 5/6 (120±11) | 6/6 (119±6)  | 1/6 (124)     |
| D5    | PMCA             | 0/5    | 0/5           | 5/5          | 5/5          | 5/5           |
|       | Bioassay (tg338) | 0/6    | 0/6           | 1/6 (142)    | 3/6 (116±8)  | 2/6 (132,152) |

Five susceptible VRQ/VRQ sheep were orally challenged with 2 g of brain homogenate ( $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC in tg338 mice) between 6 and 10 months of age. The five VRQ/VRQ sheep respectively died at 198, 193, 198, 194 and 191 days post inoculation (dpi). Classical scrapie was confirmed by histopathology (vacuolar change in central nervous system) and detection of abnormal PrP deposit in central nervous system and lymphoid tissues. At different time points, whole blood was collected from each donor and aliquots of platelets corresponding to 15 mL of plasma were prepared. Platelet homogenates (in 200 µL) were inoculated in groups of six tg338 mice. Mice were monitored up to occurrence of TSE compatible clinical sign onset or killed at 250 days post inoculation. All mice were tested for presence of abnormal PrP deposition in brain. Incubation period in mice are presented in days (+/-SD). When less than 3 mice were positive, individual incubation period are given. In parallel the same homogenates were tested by PMCA (using tg338 mice brain homogenate as substrate). Each sample was run in 5 replicates for 2 successive rounds and the number of positive reactions is presented.

doi:10.1371/journal.pone.0104287.t001

with PG127 scrapie strain and a  $10^{-2}$  dilution of a brain from a non-infected tg338 mouse (negative control) were prepared in SCM. After 7 to 10 days in vitro (DIV), WBC suspensions ( $10^6$  cells/slice) and brain dilutions (2 µL/slice) were applied on slices (8 to 10 slices per condition). The slices were then culture for an additional 42 DIV.

Slices were harvested by scrapping and homogenized at 20 µg/µL in 5% sterile glucose solution with a Rybolyser (Hybaid, Middlesex, U.K.). For analysis, samples corresponding to 50 µL of homogenate (~2 slices equivalent) were processed then loaded on the gel. Briefly, PrP<sup>RCS</sup> was extracted by the Bio-Rad test protocol, by using 20 µg/mL proteinase K (PK) for 10 min at 37°C. After denaturation, the samples were run on 12% Criterion XT Bis-Tris gels (Bio-Rad), electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and immunoblotted with biotinylated anti-PrP antibody Sha31b [34]. Immunoreactivity was revealed by chemiluminescence (reagents by Amersham Pharmacia Biosciences), imaged via a GeneGnome machine (Syngene) and the software GeneSnap (Syngene) and quantified via the software geneTools (Syngene).

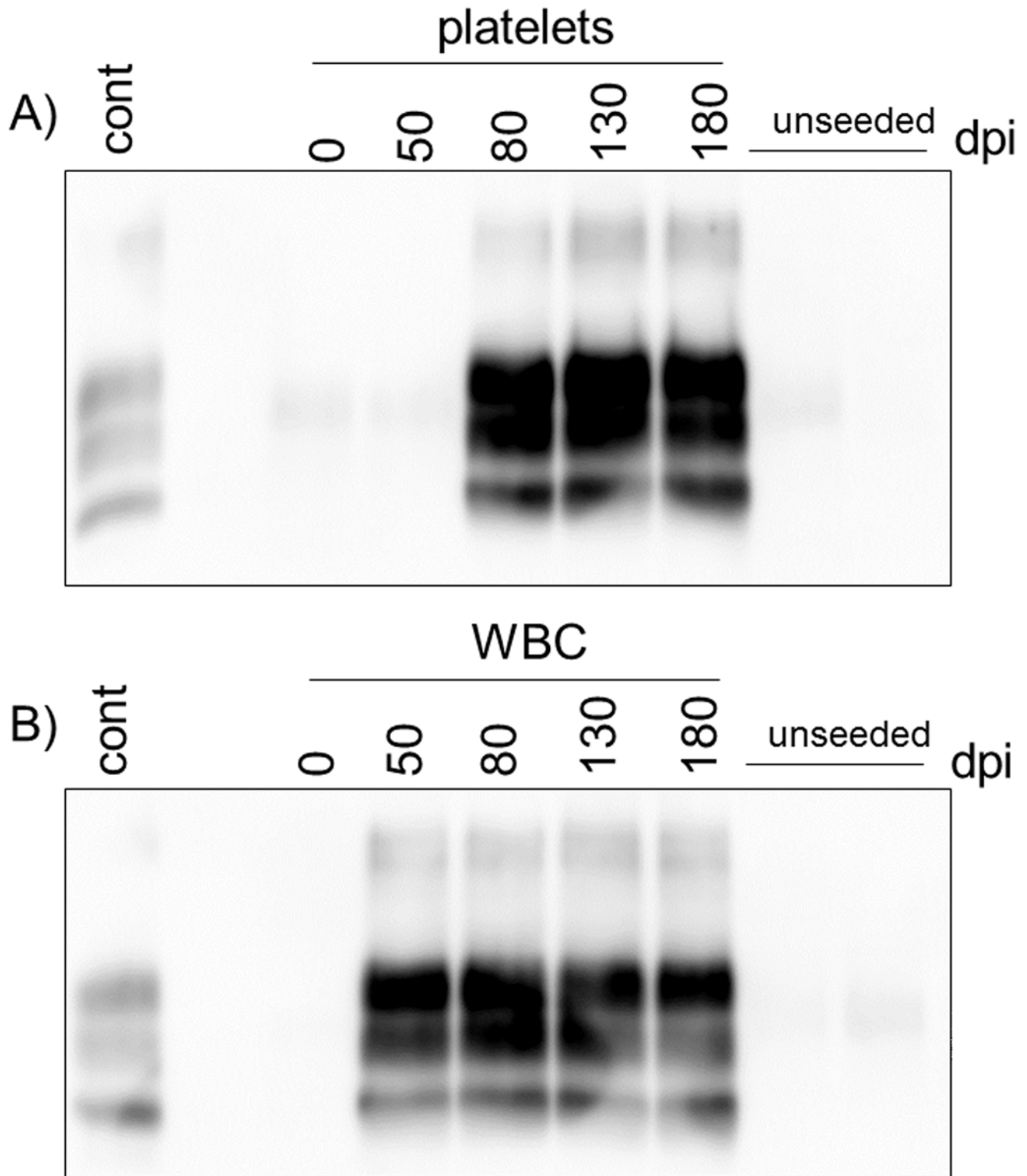
### Cell-based assay

WBC ( $5 \times 10^7$  cells) were homogenized in 200 µL of a 5% sterile glucose solution with a high-speed homogenizer (TeSeE Pprocess 48 system) and diluted to 800 µL with cell culture medium (Opti-MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 µg/mL of doxycycline). The cell-based assay procedure has been described previously [31]. Confluent ovRK13 cells grown in six-well plates were overlaid with 300 µL of the WBC homogenates. Two hours later, 300 µL of cell culture medium were added and the cells were incubated overnight. The inoculum was removed and the inoculation procedure was repeated once. After a further overnight incubation, 900 µL of cell culture medium were added and the cells were incubated for 5 more days. The inoculum was removed and fresh medium (3 mL with 1 µg/mL of doxycycline) was added. Infection was allowed to proceed for 3 more weeks with one medium change per week. Four weeks post inoculation,

the cells from each well were trypsinized, cell pellets were resuspended in 500 µL of 5% sterile glucose and were homogenized with the high-speed homogenizer. Half of the resulting cell extracts (250 µL in 3 ml of culture medium with 1 µg/mL of doxycycline) was used to inoculate ovRK13 for a second round of cell assay. Four weeks later, cell cultures were rinsed with cold PBS and solubilized for 10 min at 4°C in Triton-DOC lysis buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.5% Triton-X100, 0.5% sodium deoxycholate). The lysates were clarified by low speed centrifugation (425×g, 1 min) and cellular proteins in the post-nuclear supernatants were quantified by bicinchoninic acid (BCA, Pierce). Digestion of 750 µg of proteins with PK (recombinant grade, Roche) was performed for 2 h at 37°C with a mass ratio of 4 µg of PK per mg of cellular proteins and the reaction was stopped by addition of Pefabloc (Sigma-Aldrich) to 4 mM. PK-digested samples were centrifuged for 30 min at 20,000×g and pellets were analyzed by western blot. Samples separated by 12% SDS-PAGE electrophoresis were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad). The western blots were stained for PrP with Sha31 mAb [34]. Filters were developed using an ECL+ reagent kit (Amersham-GE Healthcare) and visualized with a Bio-Rad VersaDoc imaging system.

### Results and Discussion

Five sheep, homozygous for the VRQ allele of ovine PrP, were orally challenged with 2 g of classical scrapie brain homogenate between 6 and 10 months of age. This brain homogenate (PG127 isolate), previously end-point titrated in tg338 mice, has a titer of  $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC [35]. The five sheep (D1 to D5) were euthanized at terminal stage of prion disease at 198, 193, 198, 194 and 191 days post inoculation (dpi), respectively. Classical scrapie was confirmed by histopathology (vacuolar change in central nervous system) and detection of abnormal PrP deposit in the central nervous system and lymphoid tissues. At different time points during the asymptomatic phase (i.e. 50, 80, 130 days post inoculation (dpi)) and during the clinical phase of the disease



**Figure 1. PMCA analysis of white blood cells and platelets samples.** Platelets (A) and white blood cells (WBC) (B) from sheep D2 collected at the indicated time points (dpi) were subjected to two successive rounds of PMCA. Unseeded reactions were run in parallel. Samples were processed for PrP<sup>res</sup> isolation and analyzed by immunoblotting. A western-blotting positive control (cont) is included in each gel. doi:10.1371/journal.pone.0104287.g001

(180 dpi), whole blood was collected from each recipient sheep and aliquots of platelets and WBC were prepared according to standard fractionation protocols. Four different methods were

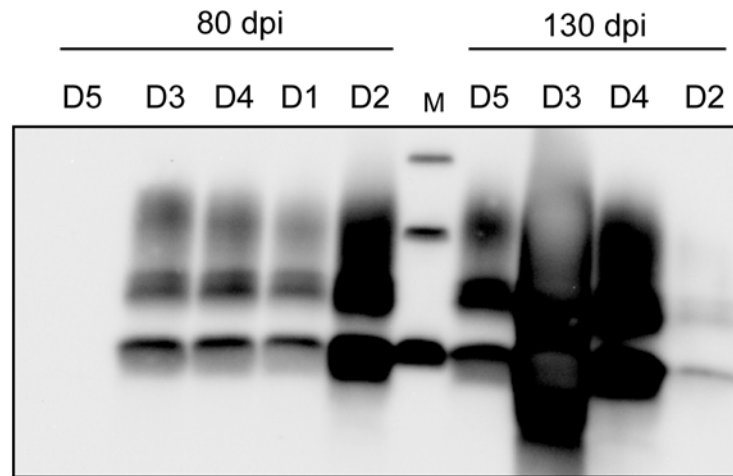
tested in parallel to detect PG127 prion infectivity or abnormal PrP in these samples: PMCA, mouse bioassay, Scrapie Cell Assay (SCA) and COSCA.

**Table 2.** Evaluation of the infectivity present in white blood cells prepared from scrapie infected sheep by four different methods: PMCA, SCA, Cerebellar Organotypic Slice Culture Assay (COSCA) and inoculation into tg338 mice (bioassay).

| Donor     |                         | -1 dpi | 50 dpi        | 80 dpi       | 130 dpi     | 180 dpi      |
|-----------|-------------------------|--------|---------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>D1</b> | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 5/5           | 5/5          | 5/5         | 2/5          |
|           | <b>SCA</b>              | n.d.   | Negative      | Positive     | n.d.        | Positive     |
|           | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | Positive     |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | 0/6    | 5/6 (106±9)   | 6/6 (93±4)   | 6/6 (95±2)  | 6/6 (101±2)  |
|           | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 5/5           | 5/5          | 5/5         | 5/5          |
| <b>D2</b> | <b>SCA</b>              | n.d.   | n.d.          | Positive     | Positive    | n.d.         |
|           | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | Negative     |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | n.d.   | 6/6 (114±11)  | 6/6 (103±15) | 6/6 (105±4) | 5/6 (110±5)  |
|           | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 5/5           | 5/5          | 5/5         | 5/5          |
|           | <b>SCA</b>              | n.d.   | n.d.          | Positive     | Positive    | n.d.         |
| <b>D3</b> | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | Positive     |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | n.d.   | 3/6 (122±6)   | 6/6 (100±7)  | 6/6 (88±7)  | 6/6 (103±12) |
|           | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 5/5           | 5/5          | 5/5         | 5/5          |
|           | <b>SCA</b>              | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | n.d.         |
|           | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | Negative     |
| <b>D4</b> | <b>Bioassay (tg338)</b> | n.d.   | 6/6 (104±8)   | 6/6 (85±2)   | 6/6 (99±2)  | 6/6 (111±4)  |
|           | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 5/5           | 5/5          | 5/5         | 5/5          |
|           | <b>SCA</b>              | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | n.d.         |
|           | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | Negative      | Positive     | Positive    | Negative     |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | n.d.   | 2/6 (127,128) | 5/5 (108±7)  | 6/6 (103±7) | 6/6 (100±5)  |
| <b>D5</b> | <b>PMCA</b>             | 0/5    | 0/6           | 3/6 (117±3)  | 5/6 (113±8) | 4/6 (129±9)  |
|           | <b>SCA</b>              | n.d.   | 0/6           | 0/6          | 1/6 (125)   | 0/6          |
|           | <b>COSCA (tg338)</b>    | n.d.   | 0/6           | 0/6          | 0/6         | 0/6          |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | neat   | 1/1000        | 0/6          | 0/6         | 0/6          |
|           | <b>Bioassay (tg338)</b> | 1/10   | n.d.          | 0/6          | 0/6         | 0/6          |

Five susceptible VRQ/VRQ sheep were orally challenged with 2 g of brain homogenate ( $10^{6.6}$  ID<sub>50</sub>/g IC in tg338 mice) between 6 and 10 months of age. The five VRQ/VRQ sheep respectively died at 198, 193, 198, 194 and 191 days post inoculation (dpi). Classical scrapie was confirmed by histopathology (vacuolar change in central nervous system) and detection of abnormal PrP deposit in central nervous system and lymphoid tissues. At different time points whole blood was collected from each donor and aliquots of  $10^6$  white blood cells corresponding to 15 mL of plasma were prepared. These cells were tested by *in vitro* (PMCA), *ex vivo* (SCA and COSCA) and *in vivo* (bioassay) approaches in parallel. For PMCA (using tg338 mice brain homogenate as substrate), each sample was run in 5 replicates for 2 successive rounds and the number of positive reactions is presented. For SCA,  $4 \times 10^7$  white blood cells were inoculated to ovRk13 cells and abnormal PrP accumulation was assayed 60 days later. For COSCA, 8–10 cerebellar slices prepared from tg338 pups received  $10^6$  cells (in 2  $\mu$ L) each and were cultured for 42 days then tested for the presence of abnormal PrP. For bioassay,  $10^8$  white blood cells (in 200  $\mu$ L) were inoculated in groups of six tg338 mice. Mice were monitored up to occurrence of TSE compatible clinical sign onset or killed after 250 days post inoculation. All mice were tested for presence of abnormal PrP deposition in brain. Incubation period in mice are presented in days ( $\pm$ SD). When less than 3 mice were positive, individual incubation periods are given. Not done: n.d.

doi:10.1371/journal.pone.0104287.t002

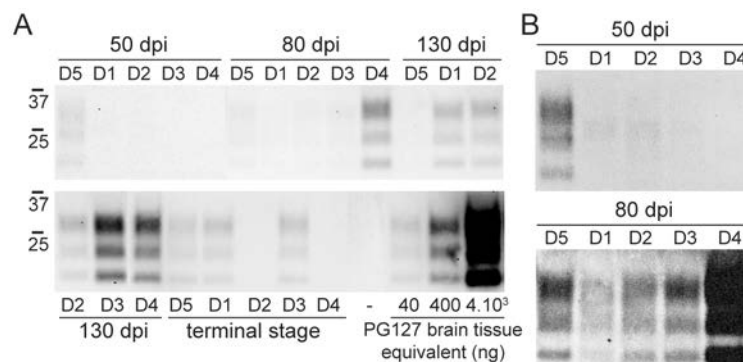


**Figure 2. Cell-based assay of white blood cells infectivity from asymptomatic scrapie sheep.** White blood cells from 5 infected sheep (D1 to D5) were isolated 80 days and 130 days post inoculation (dpi) when sheep were still asymptomatic. White blood cell homogenates ( $4 \times 10^7$  cells) were inoculated to recipient ovRK13 cells. After 2 successive rounds of cell assay, the cultures were assayed for PrP<sup>res</sup> by immunoblotting. PrP<sup>res</sup> level is higher in cells infected with D3 130 dpi sample but its banding pattern is similar to that in cells infected with the other samples. M are molecular mass marker proteins (20, 30 and 40 kDa). doi:10.1371/journal.pone.0104287.g002

Platelets samples were used to seed PMCA reactions using tg338 mice brain homogenate as substrate. Each sample, run in 5 replicates, was subjected to 2 successive rounds. The results are shown in table 1 with a typical immunoblot in fig 1A. PrP<sup>res</sup> amplification was observed for all platelets samples collected 80 dpi onwards. Notably, consistent and robust detection was achieved even for platelets samples that showed incomplete transmission to tg338 mice (see below). This is a further illustration that PMCA is more sensitive than bioassay for detection of prions [36–38] including PG127 [39]. With 50 dpi samples, consistent PrP<sup>res</sup> amplification was not achieved and no PrP<sup>res</sup> was observed with platelets collected before inoculation. For the bioassay, groups of six tg338 transgenic mice over-expressing the VRQ allele of the ovine prion protein [33] were inoculated intracerebrally with each sample to be tested. Mice were monitored up to occurrence of TSE compatible clinical sign onset or killed 250 days post inoculation (i.e., approximately twice the incubation time at

limiting dilution). All the mice were tested for presence of PK-resistant PrP (PrP<sup>res</sup>) deposition in brain. Platelet homogenates corresponding to 15 mL of plasma prepared at the different time points from the 5 donor sheep were inoculated and the results are presented in table 1. No transmission was observed with platelets collected before inoculation. All platelets samples collected at days 80, 130 and 180 transmitted the disease to the recipient mice, except for sheep D2 at 180 dpi. For most of the platelets samples the attack rate was not 100%. At 50 dpi, no transmission occurred with the platelets from 3 donor sheep and low transmission rate was observed with platelets from the 2 other sheep (D2 and D3).

WBC homogenates were tested by PMCA in the same conditions than platelets. All WBC samples collected at 50 dpi and later lead to PrP<sup>res</sup> amplification (table 2 and see fig 1B for a representative western blot). No PrP<sup>res</sup> was detected when PMCA reactions were seeded with sheep WBC collected before experimental infection. These data demonstrate that PMCA allows a



**Figure 3. Evaluation of the infectivity present in white blood cells prepared from scrapie infected sheep by Cerebellar Organotypic Slice Culture Assay.** Immunoblots of PK-treated slice culture homogenates probed with anti-PrP antibody Sha31, showing PrP<sup>res</sup> accumulation in slice culture. (A) Cerebellar organotypic slices were prepared from tg338 pups and maintained in culture during 42 days *in vitro* after exposure to white blood cells prepared from five scrapie infected sheep (D1, D2, D3, D4 and D5) at different times: 50 days post inoculation (dpi), 80 dpi, 130 dpi and at the terminal stage (180 dpi). For quantification purposes, slice cultures were also exposed to serial dilutions of PG127 scrapie-infected brain stock prepared from terminally ill tg338 mice, previously used [31]. To visualize low levels of PrP<sup>res</sup>, membranes were exposed over-night (B). doi:10.1371/journal.pone.0104287.g003



consistent and early detection of abnormal PrP in WBC from infected sheep. In bioassay experiments, infectivity was detected as early as 50 dpi in WBC of the 5 donor sheep, although the attack rate was not 100% for 3 of them (D1, D3 and D5) (table 2). At later time points, all WBC samples (except D2 at 180 dpi) transmitted the disease with 100% attack rates (table 2). However, mean incubation periods for D1, D3 and D4 samples at 180 dpi were statistically longer ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney-Wilcoxon test) than those of the corresponding 150 dpi samples, suggesting that WBC may be less infectious at 180 dpi. End-point titration of D5 WBC confirmed that WBC infectivity was close to the  $ID_{50}$  as the attack rates dropped after a single 10-fold dilution. Of note, only WBC collected at 130 dpi elicited transmission (1 out of 6) after 100-fold dilution. These results confirm the early and persistent prionemia associated with WBC already observed in this experimental model. In PMCA as in bioassay experiments, apparent infectivity associated with platelets is weaker than apparent infectivity associated with WBC, thus WBC only were used to compare the four different methods.

To determine if WBC infectivity could also be detected through a cell-based assay, we used a cell-based procedure recently developed for sensitive detection of PG127 prions [31]. In this paradigm, recipient ovRK13 cells were inoculated with WBC homogenates collected at different time points as for tg338 mouse bioassay (table 2). Inoculated ovRK13 cells were maintained for 8 weeks before being solubilized and assayed for the presence of PrP<sup>res</sup> as a marker of prion infection. The large majority (9 out of 10) of the WBC samples assayed and collected at days 80, 130 and at the terminal stage of the disease (180 dpi) lead to infection of the recipient ovRK13 cells, as assessed by western blot detection of PrP<sup>res</sup> (see fig. 2 for a representative immunodetection). Three samples collected at 50 dpi were also tested in parallel and did not lead to detectable PrP<sup>res</sup> in the inoculated ovRK13 cells (table 2).

We adapted COSCA from the Prion Organotypic Slice Culture Assay (POSCA) [30–32], an *ex vivo* method allowing to titrate prions in a cerebral tissue context. Prion infection with WBC or brain homogenate was performed 7 to 10 days after cerebellar organotypic slices were established from tg338 mice. Then the slices were cultured for 42 additional days *in vitro* (DIV) and the presence of PrP<sup>res</sup> was assessed by western blot analysis. We first compared, by endpoint titration the sensitivity of the tg338-derived COSCA to that of the tg338 mouse bioassay, by using a pool of 127S brain homogenate (the strain derived from PG127 serial transmission to tg338 mice and cloned by limiting dilution). The equivalent of 4 nanograms of 127S-infected tg338 brain was sufficient to elicit PrP<sup>res</sup> detection in slice cultures after 42 DIV (Fig. S1,  $n = 2$ ). By comparison, the limiting dilution for tg338 mice transmission corresponds to 2 ng of brain tissue [31]. This confirmed the high sensitivity of the COSCA assay to titrate

prions. WBC extracts, collected at different time points from the five donor sheep, were directly loaded onto the slices along with serially diluted sheep PG127 scrapie-infected brain homogenate. As observed with the SCA, a high proportion (12 out of 15) of the samples collected between 80 dpi and the end stage (180 dpi) elicited detectable PrP<sup>res</sup> accumulation in slice cultures (table 2). Only one (D5) out of the five samples collected at 50 dpi was positive by COSCA (fig. 3A, B). Slices infected with D2, D3 and D4 WBC collected at 130 dpi accumulated higher PrP<sup>res</sup> levels, consistent with the higher infectivity detected by bioassay. PrP<sup>res</sup> levels in slices infected with 130 dpi samples were equivalent to those observed after infection with 40 to 400 ng of PG127 brain tissue equivalent, while 80 dpi and end stage samples were less positive than those infected with 40 ng of PG127 brain tissue equivalent (fig. 3A,B).

All of the methods tested in this work confirm that WBC are the most suitable candidates to screen for blood prion infectivity during the asymptomatic stage of the disease. Among the different methods, PMCA (2 rounds) and mouse bioassay are the most sensitive as they consistently detect abnormal PrP and infectivity, respectively, at the first time point (50 dpi) tested in this study. Our results demonstrate that *ex vivo* methods (cell-based assay and COSCA) are sensitive enough to detect prion infectivity in WBC of preclinical scrapie sheep, and as such represent an ethical alternative to mouse bioassay to study blood prionemia. Studies with cell culture models have reported that live cells transmit infection much more efficiently than dead cells [40,41]. Further experiments are required to determine whether sensitivity of cell-based and COSCA assays may be improved by using freshly-isolated instead of frozen pellets of WBC.

## Supporting Information

**Figure S1 Sensitivity of the Cerebellar Organotypic Slice Culture Assay.** Immunoblots of PK-treated slice culture homogenates probed with anti-PrP antibody Sha31, showing PrP<sup>res</sup> accumulation in slice cultures. Cerebellar organotypic slices were prepared from tg338 pups and maintained in culture during 42 days *in vitro* after exposure to serial dilutions of PG127 scrapie-infected brain stock prepared from terminally ill tg338 mice, previously used [31]. (TIF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SH EJ VB OA DV. Performed the experiments: SH EJ AH JYD SL HC CL VB OA DV. Analyzed the data: SH EJ AH JYD SL HC CL VB OA DV. Contributed to the writing of the manuscript: SH VB OA DV.

## References

- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, et al. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498–501.
- Beringue V, Herzog L, Jaumain E, Reine F, Sibille P, et al. (2012) Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science* 335: 472–475.
- Bishop MT, Diack AB, Ritchie DL, Ironside JW, Will RG, et al. (2013) Prion infectivity in the spleen of a PRNP heterozygous individual with subclinical variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 136: 1139–1145.
- Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, et al. (2013) Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* 347: f5675.
- Brown P, Cervenakova L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, et al. (1999) Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* 39: 1169–1178.
- Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, MacAuley C, Gajdusek DC, et al. (1998) The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 38: 810–816.
- Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, et al. (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314: 133–136.
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356: 999–1000.
- Dassanayake RP, Schneider DA, Herrmann-Hoesing LM, Truscott TC, Davis WC, et al. (2012) Cell-surface expression of PrPC and the presence of scrapie prions in the blood of goats. *J Gen Virol* 93: 1127–1131.
- Bons N, Lehmann S, Mestre-Frances N, Dormont D, Brown P (2002) Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion* 42: 513–516.

11. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, et al. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417–421.
12. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364: 527–529.
13. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, et al. (2006) Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 368: 2061–2067.
14. Douet JY, Zafar S, Perret-Liaudet A, Lacroux C, Lugan S, et al. (2014) Detection of infectivity in blood of persons with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis* 20: 114–117.
15. Andreoletti O, Litaise C, Simmons H, Corbiere F, Lugan S, et al. (2012) Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog* 8: e1002782.
16. Mathiason CK, Hayes-Klug J, Hays SA, Powers J, Osborn DA, et al. (2010) B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol* 84: 5097–5107.
17. Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, et al. (2008) Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 112: 4739–4745.
18. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, Kolchinsky S, McShane L, et al. (2003) Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 43: 1687–1694.
19. Lacroux C, Vilette D, Fernandez-Borges N, Litaise C, Lugan S, et al. (2012) Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol* 86: 2056–2066.
20. McCutcheon S, Alejo Blanco AR, Houston EF, de Wolf C, Tan BC, et al. (2011) All clinically-relevant blood components transmit prion disease following a single blood transfusion: a sheep model of vCJD. *PLoS One* 6: e23169.
21. Holada K, Vostal JG, Theisen PW, MacAuley C, Gregori L, et al. (2002) Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J Virol* 76: 4649–4650.
22. Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121: 195–206.
23. Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, et al. (2008) Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* 5: 211–212.
24. Tattum MH, Jones S, Pal S, Collinge J, Jackson GS (2010) Discrimination between prion-infected and normal blood samples by protein misfolding cyclic amplification. *Transfusion* 50: 996–1002.
25. Rubenstein R, Chang B, Gray P, Piltch M, Bulgin MS, et al. (2010) A novel method for preclinical detection of PrPSc in blood. *J Gen Virol* 91: 1883–1892.
26. Orru CD, Wilham JM, Raymond LD, Kuhn F, Schroeder B, et al. (2011) Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *MBio* 2: e00078–00011.
27. Segarra C, Bougard D, Moudjou M, Laude H, Beringue V, et al. (2013) Plasminogen-based capture combined with amplification technology for the detection of PrP(TSE) in the pre-clinical phase of infection. *PLoS One* 8: e69632.
28. Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, et al. (2011) Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 377: 487–493.
29. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, et al. (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83: 2897–2905.
30. Falsig J, Aguzzi A (2008) The prion organotypic slice culture assay—POSCA. *Nat Protoc* 3: 555–562.
31. Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, Huor A, Lacroux C, et al. (2011) A simple, versatile and sensitive cell-based assay for prions from various species. *PLoS One* 6: e20563.
32. Klohn PC, Stoltze L, Flechsig E, Enari M, Weissmann C (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11666–11671.
33. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, Reine F, Lai TL, et al. (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16031–16036.
34. Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y, et al. (2005) Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280: 11247–11258.
35. Andreoletti O, Orge L, Benestad SL, Beringue V, Litaise C, et al. (2011) Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* 7: e1001285.
36. Johnson CJ, Aiken JM, McKenzie D, Samuel MD, Pedersen JA (2012) Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (PMCAb). *PLoS One* 7: e35383.
37. Makarava N, Savtchenko R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV (2012) Fast and ultrasensitive method for quantitating prion infectivity titre. *Nat Commun* 3: 741.
38. Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, et al. (2010) Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* 6: e1001217.
39. Moudjou M, Sibille P, Fichet G, Reine F, Chapuis J, et al. (2013) Highly infectious prions generated by a single round of microplate-based protein misfolding cyclic amplification. *MBio* 5: e00829–00813.
40. Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, et al. (2002) Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* 12: 523–530.
41. Paquet S, Langevin C, Chapuis J, Jackson GS, Laude H, et al. (2007) Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J Gen Virol* 88: 706–713.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

### 1. DES OUTILS DE DETECTION ADAPTES AUX AGENTS DES EST HUMAINES

L'absence d'outil permettant la détection sensible de l'infectiosité associée aux agents responsables des EST humaines a longtemps représenté un écueil pour l'étude de ces maladies et pour l'évaluation des risques de transmission des EST associées aux tissus et fluides biologiques.

Les travaux que nous avons réalisés représentent, dans ce domaine, un progrès significatif. Ils démontrent l'efficacité des modèles de souris transgéniques sur-exprimant les gènes *PRNP* bovin et humain pour la détection du vMCJ et de certaines formes de la sMCJ. Ils apportent également des éléments forts, démontrant la pertinence biologique des titres infectieux mesurés dans de tels modèles, pour l'évaluation relative des risques de transmission chez les hôtes naturels.

L'outil que nous avons ainsi validé a permis de démontrer la présence d'infectiosité dans des fractions sanguines issues de patients atteints de vMCJ et sMCJ. Il nous permet dès à présent, d'envisager la caractérisation d'autres risques de transmission iatrogène des maladies à Prions humaines. Nous avons ainsi entamé des travaux visant à confirmer ou infirmer la présence d'infectiosité dans des cornées issues de patients atteints sMCJ (ainsi qu'à étudier la capacité d'une greffe de cornée à transmettre la maladie). Nous envisageons également une caractérisation de la présence d'infectiosité dans une large variété de tissus et fluides biologiques humains (organes lymphoïdes, tissu digestifs, liquide cérébro-spinal, urine...).

Il serait toutefois inexact de considérer que les deux modèles de souris que nous avons utilisés représentent une 'panacée' pour la détection des agents responsables de MCJ.

En effet, nous n'avons étudié, dans le cadre de nos travaux sur le sMCJ, que des tissus et fluides biologiques issus de cas de type MM1 (patients homozygotes pour la méthionine au codon 129 avec un profil biochimique PrP<sup>res</sup> en Western blot de type 21 kDa). Or, l'ensemble des éléments actuellement disponibles en matière de sMCJ indique que plusieurs agents des EST sont responsables de cette maladie<sup>348</sup>. La diversité biologique de ces agents n'est à l'heure actuelle qu'incomplètement caractérisée<sup>442</sup>. Sans présumer du spectre final de cette diversité, il est probable que les outils permettant une détection efficace des différents types de sMCJ soient différents, au même titre que les modèles permettant de détecter les agents responsables du vMCJ et du sMCJ MM1 diffèrent.

De plus, même si l'utilisation des bioessais sur souris est un modèle expérimental robuste, elle requiert des durées de mise en œuvre qui restent très longues. Compte tenu des progrès apparents réalisés en matière de détection de certains Prions par des outils *in vitro* d'amplification<sup>327, 472</sup> ou de détection d'infectiosité (modèles cellulaires et coupes organotypiques)<sup>17, 150, 198</sup>, la transposition de ces techniques aux agents de MCJ paraît accessible.

Sur un plan opérationnel, de réels progrès ont été réalisés ces dernières années en matière d'amplification *in vitro* des Prions responsables de la vMCJ (PMCA)<sup>266</sup> ou de certains Prions responsables de sMCJ (Quic, *quaking-induced conversion*)<sup>342, 343</sup>. Toutefois, ces progrès ne doivent pas masquer les difficultés rencontrées. En effet, il reste toujours difficile d'amplifier les agents des MCJ par PMCA et il n'y a pas de modèles cellulaires permissifs (avec une sensibilité suffisante) à l'infection par les sMCJ ou le vMCJ identifié à ce jour.

Sur un plan conceptuel, ces difficultés traduisent le décalage qui existe entre le développement de techniques de détection de plus en plus performantes et une compréhension toujours limitée des processus de réplifications et de propagation des Prions. A l'heure actuelle, malgré la sensibilité parfois surprenante des techniques de détection, personne n'est capable d'expliquer les mécanismes à l'œuvre dans la propagation d'un Prion dans un tube d'amplification de PMCA ou la fibrillation de la protéine PrP recombinante dans un test de type QuiC.

## **2. PRIONEMIE ET MCJ : QUELLE PERTINENCE ?**

La mise en évidence d'infectiosité dans certains compartiments sanguins de patients atteints de vMCJ et sMCJ représente une donnée importante pour l'évaluation des risques de transmission de ces maladies par le sang et les produits dérivés du sang.

Malgré leur valeur, ces résultats présentent un certain nombre de limites. Tout d'abord, le nombre d'échantillon (notamment pour le vMCJ) apparaît trop réduit pour permettre de considérer que les titres infectieux rapportés soit généralisables à l'ensemble des cas de vMCJ. La variabilité observée quant à la présence d'infectiosité dans le plasma des patients atteints de sMCJ confirme le bien-fondé de cette position. Il semble donc indispensable de tester un nombre suffisant d'échantillons de vMCJ afin de fournir un jeu de données rendant compte de différences interindividuelles potentielles en matière de prionémie.

Il semble également difficile de considérer que les résultats que nous avons obtenus chez les patients atteints de sMCJ de type MM1 doivent être directement généralisés à l'ensemble des cas de sMCJ. Dans ce contexte, de nouveaux travaux visant à détecter la présence

d'infectiosité (avec des outils appropriés) dans le sang de patients atteints d'autres formes de sMCJ doivent être envisagés.

Enfin, la nature même des échantillons sanguins sur lesquels nous avons travaillé soulève quelques interrogations sur la pertinence des résultats que nous avons obtenus, pour l'évaluation des risques de transmission des MCJ par le sang et les produits dérivés du sang. En effet, les échantillons testés provenaient tous de patients cliniquement atteints et il est légitime de s'interroger sur l'origine de la prionémie que nous avons observée. S'agit-il d'un phénomène constitutif, qui existe chez des patients en phase asymptomatique de la maladie ou cette prionémie reflète-t-elle une fuite terminale de l'agent pathogène depuis le système nerveux central, à la faveur d'une altération de l'intégrité de la barrière hémato-méningée ?

Les données recueillies dans les modèles animaux d'EST et en particulier chez les primates infectés par le vMCJ apportent des éléments forts permettant de soutenir l'existence d'une prionémie précoce et permanent lors de vCJD chez l'homme<sup>266, 313</sup>. Par contre, chez les patients atteints de sMCJ, la question reste entière.

Plusieurs pistes semblent envisageables pour répondre éventuellement à cette question. Tout d'abord, l'utilisation de modèle primates, qui présente l'avantage d'être permissif à la sMCJ et dans lequel (après infection soit par voie centrale, soit par voie périphérique) il serait possible de collecter des échantillons de sang à différents stades de la maladie.

Une autre piste possible serait la collecte d'échantillons de sang chez des individus porteurs de mutations du gène *PRNP* (MCJ familiales). Certaines mutations du gène *PRNP*, comme la mutation E200K, sont responsables de maladies à Prions proches de celles observées chez les patients atteints de sMCJ<sup>163</sup>. Il reste toutefois difficile de juger de la pertinence de ces formes familiales de MCJ pour le sMCJ (différence potentielle de schéma pathogénique). Par ailleurs, une approche de ce type soulève des questions éthiques sensibles.

### **3. CONSEQUENCES ET INCERTITUDES SANITAIRES**

Au-delà de leurs limites, les résultats que nous avons obtenus en matière de présence du vMCJ dans le sang amènent également à s'interroger sur les mesures actuellement appliquées pour la prévention des risques de transmission par voie transfusionnelle de cette maladie.

Comme nous l'avons décrit à plusieurs reprises dans l'introduction à ce travail, les différents modèles d'évaluation des risques de transmission des MCJ reposent pour l'essentiel sur les titres infectieux observées dans les compartiments sanguins des modèles rongeurs d'EST. La distribution de l'infectiosité observée chez les rongeurs, est apparue au cours des années 2000

comme très différents de celle observée dans d'autres modèles animaux d'EST (ovins infectés par la tremblante et l'ESB, cervidés infectés par le CWD).

Malgré leurs limites, nos résultats indiquent que la distribution de l'infectiosité dans les compartiments sanguins chez les patients atteints de vMCJ est vraisemblablement plus proche de ce qui est décrit dans les modèles ruminants de la maladie que dans les modèles rongeurs. Une conséquence directe de ce constat semble la nécessité d'une révision des modèles d'évaluation des risques de transmission du vMCJ par le sang.

Il serait toutefois regrettable que cet exercice se limite à cette seule modification. En effet, les travaux menés au cours des dernières années (et à laquelle notre 4ème publication contribue) indiquent clairement, que les risques de transmission des maladies à Prions par la voie transfusionnelle ne peuvent être évalués à l'aune unique des titres infectieux des différents compartiments sanguins.

La mise en évidence dans, un modèle ovin d'EST d'une transmission de la maladie par la transfusion de 100µL ou de 10<sup>5</sup> cellules blanches contraste en effet de façon notable avec toutes les évaluations des risques produites jusqu'à présents par les agences en charge de la sécurité sanitaire des produits de santé. Nous ne pouvons évidemment pas affirmer, en l'état actuel des connaissances, que ce que nous avons observé dans les modèles ovins d'EST soit transposable directement à l'homme. Il serait néanmoins difficilement compréhensible, qu'une évaluation des risques ne puisse envisager cette hypothèse, dans les différents scénarios qu'elle prendra en compte.

Comme nous l'avons déjà largement discuté dans la publication n°3 de notre travail, la leuco-réduction, mise en place au début des années 2000 en Europe, a probablement eu un impact positif en matière de réduction des risques de transmission secondaire du vMCJ par transfusion. A l'heure actuelle, les dispositifs de déleucocytations appliqués en France garantissent la présence de moins de 10<sup>6</sup> leucocytes par unité de concentrés de globule rouges et de moins de 10<sup>4</sup> leucocytes par unité de plasma. Ces chiffres correspondent à la nécessité de ne pas dégrader le tissu sanguin (perte d'hémoglobine) ou le plasma (-perte de volume et de protéines), pour un bénéfice thérapeutique avéré (réduction des risques d'allo-immunisation anti-HLA ou de transmission du *Cytomégalo*virus).

Les données que nous avons produites indiquent, dans les limites de validité du modèle ovin d'EST utilisé, que l'administration de 10<sup>5</sup> cellules blanches permet de transmettre la maladie, avec une très faible efficacité. Dans l'hypothèse où ce modèle serait considéré comme pertinent pour l'évaluation des risques de vMCJ chez l'homme, il semble donc souhaitable de

recommander, lorsque cela est techniquement possible, une révision des seuils de performance des dispositifs de déleucocytations appliqués aux concentrés de globules rouges.

#### **4. VERS UNE GESTION RATIONNELLE DES RISQUES DE TRANSMISSION DES MCJ ?**

Les incertitudes relatives à la capacité de transmission de sMCJ par voie sanguine et à la prévalence de cette maladie couplée à l'incapacité de cribler les donneurs de sang pour identifier les individus effectivement atteints ont conduit au début des années 2000 à la mise en place du système de « prévention » actuellement en vigueur

Ces mesures (cf.4.4.3) reposent principalement sur l'élimination des dons issus de patients ayant potentiellement été exposé à l'agent de l'ESB (séjour en Grande Bretagne durant l'épidémie d'ESB) en une leuco-réduction systématique.

Après 15 années d'application, il paraît intéressant de revenir sur la rationalité de ce système et de s'interroger sur les possibilités que les progrès des connaissances relatives au vMCJ seraient susceptibles de lui apporter.

Au début des années 2000, le spectre d'une épidémie majeure de vMCJ a amené dans un contexte sanitaire et médiatique difficile les autorités à réagir rapidement. Il est relativement étonnant de constater aujourd'hui que les connaissances relatives à la prévalence de vMCJ en France demeurent très fragiles. Les programmes développés par les autorités au Royaume-Uni pour estimer la fréquence des porteurs de la maladie afin de calibrer les mesures de protections contre les risques de transmission iatrogènes, illustrent que malgré les difficultés de la tâche, celle-ci n'est pas impossible.

Si le nombre de cas cliniques de vMCJ enregistré aujourd'hui en fait une maladie très rare, dont beaucoup considèrent qu'elle ne représente pas un risque réel, la fréquence du nombre de porteurs asymptomatiques constatée en Grande Bretagne (1/2000) et l'estimation faite que celle-ci serait de 10 fois inférieure en France (1/20 000 personnes) est une source d'inquiétude très légitime.

Dans cette situation, il est étonnant de constater qu'aucune mesure visant à confirmer ou infirmer ces chiffres n'ait été préconisée ni par les agences d'évaluation des risques, ni par les organes politique en charge de leur gestion. Cette situation est d'autant plus curieuse qu'au cours des trois dernières années sont apparus des tests sanguins<sup>112, 266</sup>, certes imparfaits mais qui permettraient de manière assez aisée de réaliser un sondage épidémiologique dans la population de donneurs de sang.

Ces tests apparaissent par ailleurs aujourd'hui (après dix années de développement) comme une solution potentielle de criblage systématique des donneurs de sang. Leur évaluation (validation) formelle se heurte à des problèmes liés à la disponibilité d'échantillons biologiques pertinents (nombre de cas, absence d'échantillons issus de personnes en phase préclinique) et à des considérations éthiques très légitimes. Toutefois, force est de constater que les autorités sanitaires ainsi que les acteurs de la filière transfusionnelle semblent peu enclin à soutenir leur évaluation et leur développement, leur préférant l'application de mesures déjà en place, mais dont les coûts réels et l'efficacité sont tout autant sujet à interrogation. Pour autant, un rapport de 2013\* sur la filière sang en France préconise, « Prenant en compte les études scientifiques convergentes, de mettre fin au retrait de lots systématique pour cause de détection de sMCJ ».

## 5. QUELLE ORIGINE POUR LA PRIONEMIE ?

La présence d'infectiosité dans le tissu sanguin est un fait qui peut être considéré comme établi dans une large majorité de maladie à Prion.

Dans les modèles animaux d'EST, cette prionémie est un phénomène relativement précoce, ce qui soulève des questions quant à son origine<sup>146, 268</sup>. Plusieurs hypothèses sont envisageables.

Tout d'abord, la prionémie pourrait être un phénomène purement passif de diffusion du prion dans le tissu sanguin depuis les organes lymphoïdes et le système nerveux central, dans les phases plus tardives de la maladie. Cette hypothèse pourrait être compatible avec les observations réalisées en modèle rongeurs d'EST où l'essentiel de l'infectiosité est associée au plasma et où l'infectiosité associée aux cellules blanches peut en être apparemment détachée par simple lavage<sup>227, 280</sup>. Par contre, cette hypothèse va à l'encontre des observations recueillies chez les ruminants (et aussi chez l'homme) où les plaquettes sont associées une infectiosité significative et où l'infectiosité associée aux cellules blanches résiste à des lavages drastiques de ces cellules<sup>269</sup>.

Alternativement la présence d'infectiosité dans le sang pourrait être consécutive à une contamination de certains éléments figurés du sang à partir de ces mêmes sources puis à une répllication autonome de l'agent infectieux dans le compartiment sanguin.

Une autre hypothèse serait que les éléments figurés du sang seraient porteurs d'une infectiosité qui leur est transmise par leurs progéniteurs médullaires. Si des niveaux

---

\* [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_Veran\\_filiere-sang.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Veran_filiere-sang.pdf) consulté le 25/01/15



d'infectiosité relativement élevés ont été rapportés dans la moelle osseuse d'individus atteints de différentes formes d'EST<sup>291, 412</sup>, la nature exacte des cellules en cause (stroma / cellules sanguines) n'a jamais clairement été établie.

Plusieurs approches, plus ou moins complexes, semblent susceptibles d'apporter des éléments de réponses. Il paraît d'abord opportun d'explorer à partir de moelle osseuse issue de différentes espèces animales modèle d'infection pour les EST (ovin rongeurs et primates par exemple), la présence d'infectiosité dans les différentes populations médullaires. A cet effet, la mise en œuvre de tri cellulaire sur la base de marqueurs membranaires permet, sur la base des outils disponibles, d'isoler plusieurs lignages cellulaires (Précurseurs, lignée différenciées) et de caractériser ensuite leur titres infectieux relatifs. Alternativement, l'irradiation létale (rongeurs) permettrait de déterminer si l'infectiosité est associée au compartiment répliatif (radiosensible) ou non répliatif (radiatorésistant) médullaires.

Cette approche n'est pas exempte de défauts et de limites. Il est en effet difficile à partir de tri cellulaire de parvenir à des niveaux de puretés très élevés (<98%) et la présence de débris de stroma dans les populations triées ne peut être exclue.

Dans ce contexte, une approche basée sur l'utilisation de chimères hématopoïétiques apparaît comme un système intéressant pour tenter de répondre à la question. L'existence de souris congéniques C57Bl6 sur fond *Prnp*<sup>KO</sup> permet d'envisager, après irradiation létale, différentes solutions de reconstitution hématopoïétique qui permettent d'évaluer indépendamment, le rôle des compartiments lymphoïde et médullaire et la capacité des cellules sanguines à répliquer le prion (expression de PrP). Toutefois, le recours à l'irradiation létale limite le choix des modèles animaux d'EST aux seuls rongeurs. Or, nous avons déjà évoqué à plusieurs reprises, que la prionémie pourrait correspondre à des compartiments différents en fonction des espèces considérées, donnant une pertinence limitée pour l'Homme à ces travaux.

## CONCLUSION

---

Les travaux que nous avons réalisés contribuent à une meilleure évaluation des risques de transmission iatrogène des MCJ par voie transfusionnelle. Ils ont nécessité pour leur mise en œuvre le développement (ou l'adaptation) et la validation de méthodes permettant de quantifier les Prions humains.

Ces outils, malgré leurs limites, permettent à présent d'envisager une étude systématique des tissus et des fluides biologiques humains utilisés à des fins médicales. Ces données apparaissent comme essentielles à une évaluation rationnelle des risques de transmission iatrogénique des MCJ et à l'élaboration de politiques de prévention basées sur des faits scientifiques, mieux adaptées et proportionnées.

Cependant, le contexte sanitaire et économique actuel semblent peu propice à voir cet exercice se réaliser.

L'absence de prise en compte, depuis 10 ans, par les agences sanitaires de l'évolution des connaissances en matière de transmission des maladies à Prion par voie transfusionnelle illustre les difficultés que le système de gestion des risques sanitaires rencontre à faire évoluer son appréciation des risques dans le domaine.

De même, l'absence de mise en œuvre des mesures permettant d'estimer un paramètre essentiel tel que la fréquence des porteurs de vMCJ dans la population française renforce l'idée d'un attentisme politique, face à un problème sanitaire devenu accessoire aux yeux des médias et du plus grand nombre.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. **(BIOHAZ) EPoBH.** Joint Scientific Opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans. *EFSA journal*. 2011;**9**(1):1945-2056.
2. **Abid K, Soto C.** The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2006;**63**(19-20):2342-51.
3. **Aguzzi A.** Prion diseases, blood and the immune system: concerns and reality. *Haematologica*. 2000;**85**(1):3-10.
4. **Aguzzi A, Heikenwalder M.** Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*. 2006;**4**(10):765-75.
5. **Aguzzi A, Klein MA, Montrasio F, et al.** Prions: pathogenesis and reverse genetics. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;**920**:140-57.
6. **Aguzzi A, Polymenidou M.** Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*. 2004;**116**(2):313-27.
7. **Akowitz A, Sklaviadis T, Manuelidis L.** Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nucleic acids research*. 1994;**22**(6):1101-7.
8. **Alper T, Cramp WA, Haig DA, et al.** Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*. 1967;**214**(5090):764-6.
9. **Alper T, Haig DA.** Protection by anoxia of the scrapie agent and some DNA and RNA viruses irradiated as dry preparations. *J Gen Virol*. 1968;**3**(2):157-66.
10. **Alper T, Haig DA, Clarke MC.** The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*. 1966;**22**(3):278-84.
11. **Andreoletti O, Berthon P, Levavasseur E, et al.** Phenotyping of Protein-Prion (PrP<sup>sc</sup>)-accumulating Cells in Lymphoid and Neural Tissues of Naturally Scrapie-affected Sheep by Double-labeling Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 2002;**50**(10):1357-70.

12. **Andreoletti O, Berthon P, Marc D, et al.** 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.* 2000;**81 Pt 12**:3115-26.
13. **Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A, et al.** PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol.* 2002;**83**(Pt 10):2607-16.
14. **Andreoletti O, Litaise C, Simmons H, et al.** Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog.* 2012;**8**(6):e1002782.
15. **Andreoletti O, Orge L, Benestad SL, et al.** Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog.* 2011;**7**(2):e1001285.
16. **Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, et al.** PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med.* 2004;**10**(6):591-3.
17. **Arellano-Anaya ZE, Savistchenko J, Mathey J, et al.** A simple, versatile and sensitive cell-based assay for prions from various species. *PloS one.* 2011;**6**(5):e20563.
18. **Arnold ME, Hawkins SA, Green R, et al.** Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): estimation of tissue infectivity according to incubation period. *Vet Res.* 2009;**40**(1):8.
19. **Baldauf E, Beekes M, Diringer H.** Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol.* 1997;**78**(Pt 5):1187-97.
20. **Balkema-Buschmann A, Eiden M, Hoffmann C, et al.** BSE infectivity in the absence of detectable PrP(Sc) accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle. *J Gen Virol.* 2011;**92**(Pt 2):467-76.
21. **Barmada S, Piccardo P, Yamaguchi K, et al.** GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2004;**16**(3):527-37.
22. **Baron GS, Caughey B.** Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *J Biol Chem.* 2003;**278**(17):14883-92.
23. **Barron RM, Manson JC.** A gene-targeted mouse model of P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Clin Lab Med.* 2003;**23**(1):161-73.

24. **Barron RM, Thomson V, Jamieson E, et al.** Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. *Embo J.* 2001;**20**(18):5070-8.
25. **Barron RM, Thomson V, King D, et al.** Transmission of murine scrapie to P101L transgenic mice. *J Gen Virol.* 2003;**84**(Pt 11):3165-72.
26. **Beck KE, Vickery CM, Lockey R, et al.** The interpretation of disease phenotypes to identify TSE strains following murine bioassay: characterisation of classical scrapie. *Vet Res.* 2012;**43**:77.
27. **Beekes M, Baldauf E, Diringer H.** Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol.* 1996;**77**(Pt 8):1925-34.
28. **Beekes M, McBride PA.** Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett.* 2000;**278**(3):181-4.
29. **Beekes M, McBride PA.** The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Journal.* 2007;**274**(3):588-605.
30. **Beekes M, McBride PA, Baldauf E.** Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol.* 1998;**79**(Pt 3):601-7.
31. **Beghi E, Gandolfo C, Ferrarese C, et al.** Bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: facts and uncertainties underlying the causal link between animal and human diseases. *Neurol Sci.* 2004;**25**(3):122-9.
32. **Bellworthy SJ, Hawkins SA, Green RB, et al.** Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec.* 2005;**156**(7):197-202.
33. **Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, et al.** Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol.* 1995;**76** ( Pt 3):509-17.
34. **Benbow G.** Spongiform encephalopathies in zoo animals. *The Veterinary Record.* 1994;**135**(20):488.
35. **Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, et al.** Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology.* 1992;**42**(1):149-56.

36. **Benestad SL, Arzac JN, Goldmann W, et al.** Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res.* 2008;**39**(4):19.
37. **Benestad SL, Austbo L, Tranulis MA, et al.** Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res.* 2012;**43**:87.
38. **Benestad SL, Sarradin P, Thu B, et al.** Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003;**153**(7):202-8.
39. **Beringue V, Andreoletti O, Le Dur A, et al.** A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci.* 2007;**27**(26):6965-71.
40. **Beringue V, Demoy M, Lasmezas CI, et al.** Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol.* 2000;**190**(4):495-502.
41. **Béringue V, Herzog L, Jaumain E, et al.** Facilitated Cross-Species Transmission of Prions in Extranuclear Tissue. *Science (New York, NY).* 2012;**335**(6067):472-5.
42. **Beringue V, Vilotte JL, Laude H.** Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res.* 2008;**39**(4):47.
43. **Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, et al.** Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet.* 1977;**1**(8009):478-9.
44. **Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, et al.** Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* 1995;**375**(6533):698-700.
45. **Bessen RA, Marsh RF.** Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol.* 1992;**66**(4):2096-101.
46. **Bessen RA, Marsh RF.** Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol.* 1992;**73** ( Pt 2):329-34.
47. **Bessen RA, Marsh RF.** Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol.* 1994;**68**(12):7859-68.
48. **Bieschke J, Weber P, Sarafoff N, et al.** Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;**101**(33):12207-11.
49. **Billeter M, Riek R, Wider G, et al.** Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;**94**(14):7281-5.
50. **Bishop MT, Will RG, Manson JC.** Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;**107**(26):12005-10.

51. **Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science (New York, NY)*. 1982;**218**(4579):1309-11.
52. **Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB.** Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1992;**267**(23):16188-99.
53. **Bosque PJ, Ryou C, Telling G, et al.** Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**(6):3812-7.
54. **Bossers A, Belt P, Raymond GJ, et al.** Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;**94**(10):4931-6.
55. **Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, et al.** Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;**276**(42):39145-9.
56. **Brandel JP, Peckeu L, Haïk S.** The French surveillance network of Creutzfeldt–Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide. *Transfus Clin Biol*. 2013;**20**(4):395-7.
57. **Bratosiewicz-Wasik J, Liberski PP, Golanska E, et al.** Regulatory sequences of the PRNP gene influence susceptibility to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*. 2007;**411**(3):163-7.
58. **Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, et al.** Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*. 1997;**146**(1):104-12.
59. **Brown DR, Wong BS, Hafiz F, et al.** Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*. 1999;**344 Pt 1**:1-5.
60. **Brown P.** Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sang*. 2005;**89**(2):63-70.
61. **Brown P.** Transmissible Spongiform Encephalopathy: From its Beginnings to Daniel Carlton Gajdusek. In: Zou W-Q, Gambetti P, editors. *Prions and Diseases*;10.1007/978-1-4614-5305-5\_1 : Springer New York; 2013. p. 1-19.
62. **Brown P, Brandel JP, Sato T, et al.** Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis*. 2012;**18**(6):901-7.
63. **Brown P, Cervenakova L, Diringner H.** Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Lab Clin Med*. 2001;**137**(1):5-13.

64. **Brown P, Gajdusek DC.** Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet*. 1991;**337**(8736):269-70.
65. **Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, et al.** The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion*. 1998;**38**(9):810-6.
66. **Bruce.** Strain typing studies of Scrapie and BSE. In: Baker H.F RRM, editor. *Prion diseases*. Totowa: Humana; 1992. p. 223-36.
67. **Bruce M, Chree A, McConnell I, et al.** Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994;**343**(1306):405-11.
68. **Bruce ME.** Scrapie Strain Variation and Mutation. *British Medical Bulletin*. 1993;**49**(4):822-38.
69. **Bruce ME.** TSE strain variation. *Br Med Bull*. 2003;**66**:99-108.
70. **Bruce ME, Boyle A, Cousens S, et al.** Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol*. 2002;**83**(Pt 3):695-704.
71. **Bruce ME, Dickinson AG.** Biological Evidence that Scrapie Agent Has an Independent Genome. *J Gen Virol*. 1987;**68**(1):79-89.
72. **Bruce ME, Fraser H.** Scrapie strain variation and its implications. *Current topics in microbiology and immunology*. 1991;**172**:125-38.
73. **Bruce ME, McConnell I, Fraser H, et al.** The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol*. 1991;**72**(Pt 3):595-603.
74. **Bruce ME, McConnell I, Will RG, et al.** Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet*. 2001;**358**(9277):208-9.
75. **Bruce ME, Will RG, Ironside JW, et al.** Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997;**389**(6650):498-501.
76. **Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al.** Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol*. 1995;**5**(4):459-66.
77. **Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, et al.** Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993;**73**(7):1339-47.



78. **Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al.** Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*. 1992;**356**(6370):577-82.
79. **Burthem J, Urban B, Pain A, et al.** The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood*. 2001;**98**(13):3733-8.
80. **Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, et al.** Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*. 2004;**117**(1):27-36.
81. **Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, et al.** Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol*. 2006;**117**(2-4):103-16.
82. **Buschmann A, Groschup MH.** Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis*. 2005;**192**(5):934-42.
83. **Cabral AL, Lee KS, Martins VR.** Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;**277**(7):5675-82.
84. **Caramelli M, Ru G, Casalone C, et al.** Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Rec*. 2001;**148**(17):531-6.
85. **Carleton A, Tremblay P, Vincent JD, et al.** Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Arch*. 2001;**442**(2):223-9.
86. **Casaccia P, Ladogana A, Schmittinger S, et al.,** editors. Detection of scrapie agent in blood : viremia in transmissible dementias ? Senile dementias. II International Symposium; 1988 ; Paris: Eurotext.
87. **Cashman NR, Caughey B.** Prion diseases--close to effective therapy? *Nat Rev Drug Discov*. 2004;**3**(10):874-84.
88. **Cassard H, Torres JM, Lacroux C, et al.** Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*. 2014;**5**:5821.
89. **Castilla J, Gutierrez Adan A, Brun A, et al.** Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol*. 2003;**148**(4):677-91.
90. **Castilla J, Morales R, Saa P, et al.** Cell-free propagation of prion strains. *Embo J*. 2008;**27**(19):2557-66.

91. **Castilla J, Saa P, Hetz C, et al.** In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 2005;**121**(2):195-206.
92. **Castilla J, Saa P, Morales R, et al.** Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods in enzymology*. 2006;**412**:3-21.
93. **Castilla J, Saa P, Soto C.** Detection of prions in blood. *Nat Med*. 2005;**11**(9):982-5.
94. **Cathala F, Brown P, Chatelain J, et al.** Maladie de Creutzfeldt-Jakob en France. Intérêt des formes familiales. Existe-t-il un gène gouvernant la durée de l'incubation ? *Presse Méd*. 1986;**15**(8):379-82.
95. **Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, et al.** N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol*. 1991;**65**(12):6597-603.
96. **Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, et al.** Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion*. 2003;**43**(12):1687-94.
97. **Chakrabarti O, Ashok A, Hegde RS.** Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends in biochemical sciences*. 2009;**34**(6):287-95.
98. **Chandler RL.** Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*. 1961;**1**(7191):1378-9.
99. **Chandler RL, Fisher J.** Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet*. 1963;**282**(7318):1165.
100. **Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al.** Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. 1985;**315**(6017):331-3.
101. **Chianini F, Fernandez-Borges N, Vidal E, et al.** Rabbits are not resistant to prion infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;**109**(13):5080-5.
102. **Chihota CM, Gravenor MB, Baylis M.** Investigation of trace elements in soil as risk factors in the epidemiology of scrapie. *Vet Rec*. 2004;**154**(26):809-13.
103. **Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, et al.** Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;**104**(48):18946-51.
104. **Cohen FE, Pan KM, Huang Z, et al.** Structural clues to prion replication. *Science (New York, NY)*. 1994;**264**(5158):530-1.

105. **Colby DW, Wain R, Baskakov IV, et al.** Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog.* 2010;**6**(1):e1000736.
106. **Colling SB, Collinge J, Jefferys JG.** Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett.* 1996;**209**(1):49-52.
107. **Collinge C, Merk B, Lautenschlager EP.** Mechanical evaluation of fracture fixation augmented with tricalcium phosphate bone cement in a porous osteoporotic cancellous bone model. *J Orthop Trauma.* 2007;**21**(2):124-8.
108. **Collinge J, Sidle KC, Meads J, et al.** Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 1996;**383**(6602):685-90.
109. **Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, et al.** Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet.* 2006;**367**(9528):2068-74.
110. **Cooke CM, Rodger J, Smith A, et al.** Fate of prions in soil: detergent extraction of PrP from soils. *Environ Sci Technol.* 2007;**41**(3):811-7.
111. **Cordier-Dirikoc S, Chabry J.** Temporary depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells delays lymphoinvasion after intraperitoneal scrapie infection. *J Virol.* 2008;**82**(17):8933-6.
112. **Coste J.** An overview of the diagnostic tools. *Transfus Clin Biol.* 2013;**20**(4):412-5.
113. **Crespo-Burillo JA, Hernando-Quintana N, Marta-Moreno J.** Creutzfeldt-jakob disease secondary to dural graft performed in 1988. *Eur Neurol.* 2014;**72**(1-2):82-4.
114. **Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, et al.** Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis.* 2005;**19**(1-2):255-65.
115. **Cronier S, Gros N, Tattum MH, et al.** Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J.* 2008;**416**(2):297-305.
116. **Cuillé J, Chelle PL.** La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Cr Hebd Acad Sci.* 1936;**203**:1552-4.
117. **Cuillé J, Chelle PL.** La tremblante du mouton est-elle déterminée par un virus filtrable? *Cr Hebd Acad Sci.* 1938;**206**:1687-8.
118. **Cuillé J, Chelle PL.** Trasmision expérimentale de la tremblante à la chèvre. *Cr Hebd Acad Sci.* 1939;**208**:1687-8.

119. **Deleault AM, Deleault NR, Harris BT, et al.** The effects of prion protein proteolysis and disaggregation on the strain properties of hamster scrapie. *J Gen Virol.* 2008;**89**(Pt 10):2642-50.
120. **Deleault NR, Geoghegan JC, Nishina K, et al.** Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem.* 2005;**280**(29):26873-9.
121. **Deleault NR, Harris BT, Rees JR, et al.** Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;**104**(23):9741-6.
122. **Deleault NR, Kasczak R, Geoghegan JC, et al.** Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro. *Biochemistry.* 2010;**49**(18):3928-34.
123. **Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, et al.** Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;**109**(22):8546-51.
124. **Deleault NR, Walsh DJ, Piro JR, et al.** Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;**109**(28):E1938-46.
125. **DeMarco ML, Daggett V.** From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;**101**(8):2293-8.
126. **Deslys JP.** Prions et risques pour la transfusion sanguine : le point en 2003. *Transfus Clin Biol.* 2003;**10**(3):113-25.
127. **Deslys JP, Marce D, Dormont D.** Similar Genetic Susceptibility in Iatrogenic and Sporadic Creutzfeldt-Jakob-Disease. *J Gen Virol.* 1994;**75**:23-7.
128. **Detwiler LA.** Scrapie. *Rev Sci Tech.* 1992;**11**(2):491-537.
129. **Detwiler LA, Baylis M.** The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech.* 2003;**22**(1):121-43.
130. **Dexter G, Tongue SC, Heasman L, et al.** The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock. *BMC Vet Res.* 2009;**5**:38.
131. **Di Guardo G, Marruchella G.** Faecal CWD prion excretion and inflammation. *New Microbiol.* 2010;**33**(2):183-4.

132. **Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, et al.** Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res.* 2004;**64**(2):719-27.
133. **Diaz-Espinoza R, Soto C.** High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;**19**(4):370-7.
134. **Dickinson AG.** Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.* 1976;**44**:209-41.
135. **Dickinson AG, Outram GW.** In: Court LA, Cathala F, editors. *Virus non conventionnels et affections du système nerveux central.* Paris: Masson; 1983. p. 3-16.
136. **Dickinson AG, Outram GW.** Operational limitations in the characterization of the infective units of Scrapie. In: Curt LA CF, editor. *Virus non conventionnels et affection du système nerveux central.* Paris: Masson; 1983. p. 3-16.
137. **Dickinson AG, Outram GW.** Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp.* 1988;**135**:63-83.
138. **Dickinson AG, Taylor DM.** Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med.* 1978;**299**(25):1413-4.
139. **Diringer H.** Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) virus-induced amyloidoses of the central nervous system (CNS). *Eur J Epidemiol.* 1991;**7**(5):562-6.
140. **Diringer H, Gelderblom H, Hilmert H, et al.** Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature.* 1983;**306**(5942):476-8.
141. **Dodelet VC, Cashman NR.** Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood.* 1998;**91**(5):1556-61.
142. **Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, et al.** M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol.* 2012;**5**(2):216-25.
143. **Drisaldi B, Stewart RS, Adles C, et al.** Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 2003;**278**(24):21732-43.
144. **Duffy P, Wolf J, Collins G, et al.** Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 1974;**290**(12):692-3.
145. **Eigen M.** On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol.* 1996;**4**(6):216-8.
146. **Elder AM, Henderson DM, Nalls AV, et al.** In vitro detection of prionemia in TSE-infected cervids and hamsters. *PLoS one.* 2013;**8**(11):e80203.

147. **Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, et al.** Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol.* 1999;**144**(3):431-45.
148. **Espinosa JC, Herva ME, Andreoletti O, et al.** Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. *Emerg Infect Dis.* 2009;**15**(8):1214-21.
149. **Espinosa JC, Morales M, Castilla J, et al.** Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J Gen Virol.* 2007;**88**(Pt 4):1379-83.
150. **Falsig J, Aguzzi A.** The prion organotypic slice culture assay - POSCA. *Nature Protocols.* 2008;**3**(4):555-62.
151. **Fediaevsky A, Maurella C, Noremark M, et al.** The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res.* 2010;**6**:9.
152. **Felten DL, Felten SY.** Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun.* 1988;**2**(4):293-300.
153. **Fischer M, Rulicke T, Raeber A, et al.** Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 1996;**15**(6):1255-64.
154. **Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, et al.** PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol.* 2002;**76**(5):2434-9.
155. **Ford MJ, Burton LJ, Li H, et al.** A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience.* 2002;**111**(3):533-51.
156. **Foster JD, Hunter N, Williams A, et al.** Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec.* 1996;**138**(23):559-62.
157. **Foster JD, Parnham DW, Hunter N, et al.** Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol.* 2001;**82**(Pt 10):2319-26.
158. **Foster PR.** Prions and blood products. *Ann Med.* 2000;**32**(7):501-13.
159. **Fraser H, Bruce ME, Chree A, et al.** Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol.* 1992;**73** ( Pt 8):1891-7.

160. **Fraser H, Dickinson AG.** The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol.* 1968;**78**(3):301-11.
161. **Fraser H, Dickinson AG.** Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol.* 1973;**83**(1):29-40.
162. **Fraser H, Pearson GR, McConnell I, et al.** Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec.* 1994;**134**(17):449.
163. **Friedman-Levi Y, Meiner Z, Canello T, et al.** Fatal prion disease in a mouse model of genetic E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog.* 2011;**7**(11):e1002350.
164. **Gajdusek DC, Gibbs CJ.** Transmission of Two Subacute Spongiform Encephalopathies of Man (Kuru and Creutzfeldt-Jakob Disease) to New World Monkeys. *Nature.* 1971;**230**(5296):588-91.
165. **Gajdusek DC, Gibbs CJ.** Transmission of Kuru from Man to Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) 8 Years after Inoculation. *Nature.* 1972;**240**(5380):351-.
166. **Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M.** Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature.* 1966;**209**(5025):794-6.
167. **Gale P.** The prion/lipid hypothesis--further evidence to support the molecular basis for transmissible spongiform encephalopathy risk assessment. *J Appl Microbiol.* 2007;**103**(6):2033-45.
168. **Gambetti P, Cali I, Notari S, et al.** Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathol.* 2011;**121**(1):79-90.
169. **Garske T, Ghani AC.** Uncertainty in the tail of the variant Creutzfeldt-Jakob disease epidemic in the UK. *PloS one.* 2010;**5**(12):e15626.
170. **Garza MC, Monzon M, Marin B, et al.** Distribution of Peripheral PrPSc in Sheep with Naturally Acquired Scrapie. *PloS one.* 2014;**9**(5):e97768.
171. **Genovesi S, Leita L, Sequi P, et al.** Direct detection of soil-bound prions. *PloS one.* 2007;**2**(10):e1069.
172. **Geoghegan JC, Miller MB, Kwak AH, et al.** Trans-Dominant Inhibition of Prion Propagation *In Vitro* Is Not Mediated by an Accessory Cofactor. *PLoS Pathog.* 2009;**5**(7):e1000535.
173. **Georgsson G, Sigurdarson S, Brown P.** Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol.* 2006;**87**(Pt 12):3737-40.

174. **Gerstmann J.** Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wien Med Wochenschr.* 1928;**78**:906-08.
175. **Gerstmann J, Sträussler, E., Scheinker, I.** Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Neurol.* 1936;**154**:736-62.
176. **Gibbs CJ, Asher DM, Koblina A, et al.** Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994;**57**(6):757-8.
177. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC.** Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science (New York, NY).* 1973;**182**(107):67-8.
178. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Latarjet R.** Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;**75**(12):6268-70.
179. **Giese A, Brown DR, Groschup MH, et al.** Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* 1998;**8**(3):449-57.
180. **Giese A, Groschup MH, Hess B, et al.** Neuronal Cell-Death in Scrapie-Infected Mice Is Due to Apoptosis. *Brain Pathol.* 1995;**5**(3):213-21.
181. **Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, et al.** Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ.* 2013;**347**:f5675.
182. **Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, et al.** Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci.* 2010;**30**(18):6367-74.
183. **Glatzel M, Aguzzi A.** Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2000;**2**(6):613-9.
184. **Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, et al.** Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol.* 2005;**62**(4):545-52.
185. **Goldmann W, O'Neill G, Cheung F, et al.** PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. *J Gen Virol.* 1999;**80** ( Pt 8):2275-83.



186. **Gordon WS.** Advances in veterinary research. Looping-ill, tick born fever and scrapie. *Vet Rec.* 1946;**58**(47):516-25.
187. **Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, et al.** Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;**101**(22):8342-7.
188. **Gregori L, Lambert BC, Gurgel PV, et al.** Reduction of transmissible spongiform encephalopathy infectivity from human red blood cells with prion protein affinity ligands. *Transfusion.* 2006;**46**(7):1152-61.
189. **Griffith JS.** Self-replication and scrapie. *Nature.* 1967;**215**(5105):1043-4.
190. **Griffiths PC, Spiropoulos J, Lockey R, et al.** Characterisation of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol.* 2010.
191. **Groschup MH, Buschmann A.** Rodent models for prion diseases. *Vet Res.* 2008;**39**(4):32.
192. **Hadlow WJ.** SCRAPIE AND KURU. *The Lancet.* 1959;**274**(7097):289-90.
193. **Hadlow WJ.** Kuru likened to scrapie: the story remembered. *Phil Trans R Soc B.* 2008;**363**(1510):3644.
194. **Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, et al.** The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med.* 2003;**9**(9):1121-3.
195. **Haley NJ, Mathiason CK, Zabel MD, et al.** Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PloS one.* 2009;**4**(11):e7990.
196. **Haley NJ, Seelig DM, Zabel MD, et al.** Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PloS one.* 2009;**4**(3):e4848.
197. **Halliez S, Passet B, Martin-Lannerée S, et al.** To Develop With Or Without The Prion Protein. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2014;**2**.
198. **Halliez S, Reine F, Herzog L, et al.** Accelerated, spleen-based titration of variant CJD infectivity in transgenic mice expressing human prion protein with sensitivity comparable to survival time bioassay. *J Virol.* 2014;10.1128/jvi.01118-14 Epub 2014/05/23.
199. **Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, et al.** Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1989;**274**(1):1-13.

200. **Harder A, Jendroska K, Kreuz F, et al.** Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet.* 1999;**87**(4):311-6.
201. **Harris DA.** Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull.* 2003;**66**:71-85.
202. **Harris DA, Huber MT, van Dijken P, et al.** Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry.* 1993;**32**(4):1009-16.
203. **Harris DA, Lele P, Snider WD.** Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;**90**(9):4309-13.
204. **Hawkins SAC, Simmons HA, Gough KC, et al.** Persistence of ovine scrapie infectivity in a farm environment following cleaning and decontamination. *Vet Rec.* 2015;**176**(4):99.
205. **Hay B, Barry RA, Lieberburg I, et al.** Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein. *Molecular and cellular biology.* 1987;**7**(2):914-20.
206. **Hayward PA, Bell JE, Ironside JW.** Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994;**20**(4):375-83.
207. **Head MW, Northcott V, Rennison K, et al.** Prion protein accumulation in eyes of patients with sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2003;**44**(1):342-6.
208. **Head MW, Peden AH, Yull HM, et al.** Abnormal prion protein in the retina of the most commonly occurring subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *British Journal of Ophthalmology.* 2005;**89**(9):1131-3.
209. **Heckmann JG, Lang CJ, Petruch F, et al.** Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;**63**(3):388-90.
210. **Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, et al.** A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science (New York, NY).* 1998;**279**(5352):827-34.
211. **Heggebo R, Gonzalez L, Press CM, et al.** Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol.* 2003;**84**(Pt 5):1327-38.

212. **Heggebo R, Press CM, Gunnes G, et al.** Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol.* 2002;**83**(Pt 2):479-89.
213. **Heggebo R, Press CM, Gunnes G, et al.** Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol.* 2000;**81 Pt 9**:2327-37.
214. **Heppner FL, Christ AD, Klein MA, et al.** Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med.* 2001;**7**(9):976-7.
215. **Herms J, Tings T, Gall S, et al.** Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci.* 1999;**19**(20):8866-75.
216. **Herzog C, Riviere J, Lescoutra-Etcheagaray N, et al.** PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol.* 2005;**79**(22):14339-45.
217. **Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang.* 2006;**91**(3):221-30.
218. **Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, et al.** Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet.* 1999;**353**(9148):183-9.
219. **Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, et al.** The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature.* 1997;**389**(6650):448-50, 526.
220. **Hill AF, Joiner S, Linehan J, et al.** Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;**97**(18):10248-53.
221. **Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, et al.** Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain.* 2003;**126**(Pt 6):1333-46.
222. **Hill AF, Zeidler M, Ironside J, et al.** Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet.* 1997;**349**(9045):99-100.
223. **Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, et al.** Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol.* 2004;**203**(3):733-9.
224. **Hirsch TZ, Hernandez-Rapp J, Martin-Lannere S, et al.** PrP<sup>C</sup> signalling in neurons: from basics to clinical challenges. *Biochimie.* 2014;**104**:2-11.

225. **Hoffmann C, Eiden M, Kaatz M, et al.** BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res.* 2011;**42**:21.
226. **Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, et al.** Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 2007;**88**(Pt 3):1048-55.
227. **Holada K, Vostal JG, Theisen PW, et al.** Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J Virol.* 2002;**76**(9):4649-50.
228. **Hoshi K, Yoshino H, Urata J, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology.* 2000;**55**(5):718-21.
229. **Hourrigan JL.** The scrapie control program in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 1990;**196**(10):1679.
230. **Hourrigan JL, Klingsporn AL, McDaniel HA, et al.** Natural scrapie in a goat. *J Am Vet Med Assoc.* 1969;**154**(5):538-9.
231. **Houston F, Foster JD, Chong A, et al.** Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet.* 2000;**356**(9234):999-1000.
232. **Hunter N, Foster J, Chong A, et al.** Transmission of prion diseases by blood transfusion. *The Journal of general virology.* 2002;**83**(Pt 11):2897-905.
233. **Ironside JW.** Pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Virol Suppl.* 2000;**16**:143-51.
234. **Ironside JW.** Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood transfusion and blood therapies. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia.* 2006;**12 Suppl 1**:8-15; discussion 26-8.
235. **Ironside JW, Head MW.** Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood and blood products. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia.* 2004;**10 Suppl 4**:64-9.
236. **Jackson GS, Burk-Rafel J, Edgeworth JA, et al.** A highly specific blood test for vCJD. *Blood.* 2014;**123**(3):452-3.
237. **Jackson WS, Borkowski AW, Faas H, et al.** Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice. *Neuron.* 2009;**63**(4):438-50.
238. **Jarrett JT, Lansbury PT, Jr.** Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* 1993;**73**(6):1055-8.

239. **Jeffrey M, Gonzalez L.** Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Current topics in microbiology and immunology*. 2004;**284**:65-97.
240. **Jeffrey M, Ryder S, Martin S, et al.** Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol*. 2001;**124**(4):280-9.
241. **Johnson CJ, Pedersen JA, Chappell RJ, et al.** Oral transmissibility of prion disease is enhanced by binding to soil particles. *PLoS Pathog*. 2007;**3**(7):e93.
242. **Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, et al.** Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog*. 2006;**2**(4):e32.
243. **Jones S, Batchelor M, Bhelt D, et al.** Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem J*. 2005;**392**(Pt 2):309-12.
244. **Jouvin-Marche E, Attuil-Audenis V, Aude-Garcia C, et al.** Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J Immunol*. 2006;**176**(6):3490-7.
245. **Kaatz M, Fast C, Ziegler U, et al.** Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *Am J Pathol*. 2012;**181**(2):515-24.
246. **Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, et al.** Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem*. 2005;**95**(5):1373-86.
247. **Kellings K, Prusiner SB, Riesner D.** Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994;**343**(1306):425-30.
248. **Kim SJ, Rahbar R, Hegde RS.** Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2001;**276**(28):26132-40.
249. **Kimberlin RH, Cole S, Walker CA.** Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*. 1987;**68**(Pt 7):1875-81.
250. **Kimberlin RH, Field HJ, Walker CA.** Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol*. 1983;**64 Pt 3**:713-6.

251. **Kimberlin RH, Walker C.** Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol.* 1977;**34**(2):295-304.
252. **Kimberlin RH, Walker CA.** Evidence that the Transmission of One Source of Scrapie Agent to Hamsters Involves Separation of Agent Strains from a Mixture. *J Gen Virol.* 1978;**39**(3):487-96.
253. **Kimberlin RH, Walker CA.** Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol.* 1980;**51**(Pt 1):183-7.
254. **Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H.** The Genomic Identity of Different Strains of Mouse Scrapie Is Expressed in Hamsters and Preserved on Reisolation in Mice. *J Gen Virol.* 1989;**70**(8):2017-25.
255. **Kimberlin RH, Walker CA, Millson GC, et al.** Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci.* 1983;**59**(3):355-69.
256. **Kittelberger R, Chaplin MJ, Simmons MM, et al.** Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest.* 2010;**22**(6):863-75.
257. **Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, et al.** Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem.* 1998;**379**(6):655-66.
258. **Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al.** Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* 1994;**370**(6489):471-4.
259. **Kocisko DA, Come JH, Priola SA, et al.** Cell-free formation of protease-resistant prion protein [see comments]. *Nature.* 1994;**370**(6489):471-4.
260. **Konold T, Davis A, Bone G, et al.** Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res.* 2007;**3**:2.
261. **Konold T, Moore SJ, Bellworthy SJ, et al.** Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res.* 2008;**4**:14.
262. **Kraehenbuhl JP, Neutra MR.** Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;**16**:301-32.
263. **Krautler NJ, Kana V, Kranich J, et al.** Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell.* 2012;**150**(1):194-206.

264. **Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, et al.** Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*. 1999;**400**(6741):225-6.
265. **Lacroux C, Bougard D, Litaise C, et al.** Impact of leucocyte depletion and prion reduction filters on TSE blood borne transmission. *PloS one*. 2012;**7**(7):e42019.
266. **Lacroux C, Comoy E, Moudjou M, et al.** Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog*. 2014;**10**(6):e1004202.
267. **Lacroux C, Simon S, Benestad SL, et al.** Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*. 2008;**4**(12):e1000238.
268. **Lacroux C, Vilette D, Fernandez-Borges N, et al.** Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol*. 2012;**86**(4):2056-66.
269. **Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, et al.** Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*. 2005;**64**(9):1586-91.
270. **Laferriere F, Tixador P, Moudjou M, et al.** Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics. *PLoS Pathog*. 2013;**9**(10):e1003702.
271. **Lantos PL, Bhatia K, Doey LJ, et al.** Is the neuropathology of new variant Creutzfeldt-Jakob disease and kuru similar? *Lancet*. 1997;**350**(9072):187-8.
272. **Laplanche JL, Chatelain J, Dussaucy M, et al.** Inherited prion disease. *BMJ*. 1993;**306**(6880):794-5.
273. **Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, et al.** BSE transmission to macaques. *Nature*. 1996;**381**(6585):743-4.
274. **Latarjet R, Muel B, Haig DA, et al.** Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature*. 1970;**227**(5265):1341-3.
275. **Lauren J.** Cellular prion protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;**38**(2):227-44.
276. **Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, et al.** Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*. 2009;**457**(7233):1128-32.
277. **Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, et al.** Prion protein glycosylation. *J Neurochem*. 2005;**93**(4):793-801.

278. **Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, et al.** A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;**102**(44):16031-6.
279. **Lefrère J-J.** Le risque de contamination par le prion lors de la transfusion de produits sanguins labiles. *Transfus Clin Biol.* 2007;**14**(1):25-34.
280. **Lefrere JJ, Hewitt P.** From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France. *Transfusion.* 2009;**49**(4):797-812.
281. **Lehmann S, Milhavet O, Mange A.** Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomedecine & pharmacotherapie.* 1999;**53**(1):39-46.
282. **Levavasseur E, Metharom P, Dorban G, et al.** Experimental scrapie in 'plt' mice: an assessment of the role of dendritic-cell migration in the pathogenesis of prion diseases. *J Gen Virol.* 2007;**88**(Pt 8):2353-60.
283. **Lewis V, Hooper NM.** The role of lipid rafts in prion protein biology. *Front Biosci.* 2011;**16**:151-68.
284. **Lezmi S, Bencsik A, Baron T.** PET-blot analysis contributes to BSE strain recognition in C57Bl/6 mice. *J Histochem Cytochem.* 2006;**54**(10):1087-94.
285. **Li J, Browning S, Mahal SP, et al.** Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science (New York, NY).* ;**327**(5967):869-72.
286. **Liberski PP, Plucienniczak A, Hrabec E, et al.** Isolation and purification of scrapie-associated fibrils and prion protein from scrapie-infected hamster brain. *J Comp Pathol.* 1989;**100**(2):177-85.
287. **Ligios C, Cancedda MG, Madau L, et al.** PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie. *Arch Virol.* 2006;**151**(10):2007-20.
288. **Linden R, Martins VR, Prado MA, et al.** Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* 2008;**88**(2):673-728.
289. **Lindenbaum S.** Review. Understanding kuru: the contribution of anthropology and medicine. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;**363**(1510):3715-20.
290. **Lloyd SE, Mead S, Collinge J.** Genetics of prion diseases. *Current opinion in genetics & development.* 2013;**23**(3):345-51.



291. **Loeuillet C, Lemaire-Vieille C, Naquet P, et al.** Prion replication in the hematopoietic compartment is not required for neuroinvasion in scrapie mouse model. *PLoS one*. 2010;**5**(10).
292. **Lubick N.** Prions in soil. *Environ Sci Technol*. 2007;**41**(3):669-70.
293. **Ma J, Lindquist S.** Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP<sup>Sc</sup>-like conformation in the cytosol. *Science (New York, NY)*. 2002;**298**(5599):1785-8.
294. **Ma X, Benson CH, McKenzie D, et al.** Adsorption of pathogenic prion protein to quartz sand. *Environ Sci Technol*. 2007;**41**(7):2324-30.
295. **Mabbott NA, Mackay F, Minns F, et al.** Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*. 2000;**6**(7):719-20.
296. **Mabbott NA, MacPherson GG.** Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*. 2006;**4**(3):201-11.
297. **Maddox RA, Belay ED, Curns AT, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of corneal transplants. *Cornea*. 2008;**27**(7):851-4.
298. **Maignien T, Shakweh M, Calvo P, et al.** Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*. 2005;**298**(2):293-304.
299. **Makarava N, Baskakov IV.** The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem*. 2008;**283**(23):15988-96.
300. **Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, et al.** Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol*. 2010;**119**(2):177-87.
301. **Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, et al.** Stabilization of a prion strain of synthetic origin requires multiple serial passages. *J Biol Chem*. 2012;**287**(36):30205-14.
302. **Mallucci GR, Ratté S, Asante EA, et al.** Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J*. 2002;**21**(3):202-10.
303. **Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, et al.** 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*. 1994;**8**(2-3):121-7.
304. **Manuelidis E, Gorgacs E, Manuelidis L.** Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Science (New York, NY)*. 1978;**200**(4345):1069-71.

305. **Manuelidis EE, Angelo JN, Gorgacz EJ, et al.** Experimental creutzfeldt-jakob disease transmitted via the eye with infected cornea. *N Engl J Med.* 1977;**296**(23):1334-6.
306. **Manuelidis EE, Kim JH, Mericangas JR, et al.** Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. *Lancet.* 1985;**2**(8460):896-7.
307. **Manuelidis L.** Vaccination with an attenuated Creutzfeldt-Jakob disease strain prevents expression of a virulent agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;**95**(5):2520-5.
308. **Manuelidis L, Sklaviadis T, Akowitz A, et al.** Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;**92**(11):5124-8.
309. **Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann- Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain.* 1981;**104**(3):559-88.
310. **Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol.* 1979;**5**(2):177-88.
311. **Mathiason CK, Hayes-Klug J, Hays SA, et al.** B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol.* 2010;**84**(10):5097-107.
312. **McCutcheon S, Alejo Blanco AR, Houston EF, et al.** All clinically-relevant blood components transmit prion disease following a single blood transfusion: a sheep model of vCJD. *PloS one.* 2011;**6**(8):e23169.
313. **McDowell KL, Nag N, Franco Z, et al.** Blood reference materials from macaques infected with variant Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Transfusion.* 2014;10.1111/trf.12841 Epub 2014/08/27.
314. **McIntyre KM, del Rio Vilas VJ, Gubbins S.** No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. *BMC Vet Res.* 2008;**4**:13.
315. **McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB.** A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell.* 1983;**35**(1):57-62.
316. **McLean CA.** Review. The neuropathology of kuru and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;**363**(1510):3685-7.

317. **McLean CA, Ironside JW, Alpers MP, et al.** Comparative neuropathology of Kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host. *Brain Pathol.* 1998;**8**(3):429-37.
318. **Mead S, Poulter M, Uphill J, et al.** Genetic risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2009;**8**(1):57-66.
319. **Medori R, Tritschler HJ, Leblanc A, et al.** Fatal Familial Insomnia, a Prion Disease with a Mutation at Codon-178 of the Prion Protein Gene. *New England Journal of Medicine.* 1992;**326**(7):444-9.
320. **Merz PA, Rohwer RG, Kasczak R, et al.** Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science (New York, NY).* 1984;**225**(4660):437-40.
321. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, et al.** Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 1981;**54**(1):63-74.
322. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, et al.** Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature.* 1983;**306**(5942):474-6.
323. **Meyer N, Rosenbaum V, Schmidt B, et al.** Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J Gen Virol.* 1991;**72** ( Pt 1):37-49.
324. **Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, et al.** Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;**83**(8):2310-4.
325. **Mikol J.** Neuropathology of prion diseases. *Biomed Pharmacother.* 1999;**53**(1):19-26.
326. **Millhauser GL.** Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease. *Annu Rev Phys Chem.* 2007;**58**:299-320.
327. **Moda F, Pritzkow S, Soto C.** Protein Misfolding Cyclic Amplification. In: Zou W-Q, Gambetti P, editors. *Prions and Diseases*;10.1007/978-1-4614-5305-5\_6 : Springer New York; 2013. p. 83-92.
328. **Moffatt SL, Pollock GA.** Creutzfeldt-Jakob disease: perceptions and realities of risk. *Clinical & experimental ophthalmology.* 2006;**34**(7):635-6.
329. **Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, et al.** Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science (New York, NY).* 2000;**288**(5469):1257-9.
330. **Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al.** Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of molecular biology.* 1999;**292**(4):797-817.

331. **Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, et al.** Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol.* 2001;**82**(Pt 8):2017-24.
332. **Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, et al.** Signal transduction through prion protein. *Science (New York, NY).* 2000;**289**(5486):1925-8.
333. **Moya KL, Sales N, Hassig R, et al.** Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc Res Tech.* 2000;**50**(1):58-65.
334. **Nishida N, Tremblay P, Sugimoto T, et al.** A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest.* 1999;**79**(6):689-97.
335. **Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, et al.** Serum withdrawal-induced apoptosis in ZrchI prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol Immunol.* 2007;**51**(4):457-66.
336. **Nishina K, Deleault NR, Lucassen RW, et al.** In vitro prion protein conversion in detergent-solubilized membranes. *Biochemistry.* 2004;**43**(9):2613-21.
337. **Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, et al.** Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog.* 2006;**2**(2):e12.
338. **Oesch B, Westaway D, Prusiner SB.** Prion protein genes: evolutionary and functional aspects. *Current topics in microbiology and immunology.* 1991;**172**:109-24.
339. **Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al.** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985;**40**(4):735-46.
340. **Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, et al.** Detection of disease-associated prion protein in the posterior portion of the small intestine involving the continuous Peyer's patch in cattle orally infected with bovine spongiform encephalopathy agent. *Transbound Emerg Dis.* 2011;**58**(4):333-43.
341. **Okada H, Miyazawa K, Fukuda S, et al.** The presence of disease-associated prion protein in skeletal muscle of cattle infected with classical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med Sci.* 2014;**76**(1):103-7.
342. **Orru CD, Bongianini M, Tonoli G, et al.** A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med.* 2014;**371**(6):519-29.
343. **Orru CD, Groveman BR, Hughson AG, et al.** Rapid and Sensitive RT-QuIC Detection of Human Creutzfeldt-Jakob Disease Using Cerebrospinal Fluid. *mBio.* 2015;**6**(1).

344. **Ott CM, Lingappa VR.** Signal sequences influence membrane integration of the prion protein. *Biochemistry*. 2004;**43**(38):11973-82.
345. **Owen JP, Maddison BC, Whitlam GC, et al.** Use of thermolysin in the diagnosis of prion diseases. *Molecular biotechnology*. 2007;**35**(2):161-70.
346. **Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, et al.** Homozygous Prion Protein Genotype Predisposes to Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Nature*. 1991;**352**(6333):340-2.
347. **Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, et al.** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;**90**(23):10962-6.
348. **Parchi P, Strammiello R, Giese A, et al.** Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathologica*. 2011;**121**(1):91-112.
349. **Pattison IH.** Transmission of scrapie to the goat. *Lancet*. 1957;**272**:104-5.
350. **Pattison IH.** Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. *Vet Rec*. 1965;**77**(47):1388-90.
351. **Pattison IH, Gordon WS, Millson GC.** Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol*. 1959;**69**:300-12.
352. **Pattison IH, Millson GC.** Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol*. 1960;**70**:182-93.
353. **Pattison IH, Millson GC.** Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol*. 1961;**71**:101-9.
354. **Pauly PC, Harris DA.** Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem*. 1998;**273**(50):33107-10.
355. **Peden A, Head M, Ironside J.** Risk of Transmission of Creutzfeldt–Jakob Disease by Blood Transfusion. In: Zou W-Q, Gambetti P, editors. *Prions and Diseases*;10.1007/978-1-4614-5338-3\_8 : Springer New York; 2013. p. 121-38.
356. **Peden A, McCardle L, Head MW, et al.** Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. 2010;**16**(2):296-304.
357. **Peden AH, Head MW, Ritchie DL, et al.** Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*. 2004;**364**(9433):527-9.

358. **Perera WS, Hooper NM.** Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol.* 2001;**11**(7):519-23.
359. **Peretz D, Supattapone S, Giles K, et al.** Inactivation of prions by acidic sodium dodecyl sulfate. *J Virol.* 2006;**80**(1):322-31.
360. **Peretz D, Williamson RA, Legname G, et al.** A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron.* 2002;**34**(6):921-32.
361. **Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, et al.** Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol.* 2003;**162**(4):703-17.
362. **Petersen RB, Goldfarb LG, Tabaton M, et al.** A novel mechanism of phenotypic heterogeneity demonstrated by the effect of a polymorphism on a pathogenic mutation in the PRNP (prion protein gene). *Mol Neurobiol.* 1994;**8**(2-3):99-103.
363. **Petit CS, Besnier L, Morel E, et al.** Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers.* 2013;**1**(2):e24377.
364. **Piro JR, Supattapone S.** Photodegradation illuminates the role of polyanions in prion infectivity. *Prion.* 2011;**5**(2):49-51.
365. **Prinz M, Montrasio F, Klein MA, et al.** Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;**15**:15.
366. **Priola SA, Caughey B, Race RE, et al.** Heterologous PrP molecules interfere with accumulation of protease-resistant PrP in scrapie-infected murine neuroblastoma cells. *J Virol.* 1994;**68**(8):4873-8.
367. **Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, NY).* 1982;**216**(4542):136-44.
368. **Prusiner SB.** Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;**95**(23):13363-83.
369. **Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, et al.** Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry.* 1980;**19**(21):4883-91.
370. **Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, et al.** Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* 1983;**35**(2 Pt 1):349-58.

371. **Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, et al.** Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;**78**(11):6675-9.
372. **Pucci A, D'Acqui LP, Calamai L.** Fate of prions in soil: interactions of RecPrP with organic matter of soil aggregates as revealed by LTA-PAS. *Environ Sci Technol.* 2008;**42**(3):728-33.
373. **Puckett C, Concannon P, Casey C, et al.** Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet.* 1991;**49**(2):320-9.
374. **Rabinstein AA, Whiteman ML, Shebert RT.** Abnormal diffusion-weighted magnetic resonance imaging in Creutzfeldt-Jakob disease following corneal transplantations. *Arch Neurol.* 2002;**59**(4):637-9.
375. **Race R, Chesebro B.** Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature.* 1998;**392**(6678):770.
376. **Race R, Jenny A, Sutton D.** Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis.* 1998;**178**(4):949-53.
377. **Race R, Meade-White K, Raines A, et al.** Subclinical Scrapie Infection in a Resistant Species: Persistence, Replication, and Adaptation of Infectivity during Four Passages. *J Infect Dis.* 2002;**186** Suppl 2:S166-70.
378. **Rachidi W, Riondel J, McMahon HM, et al.** La protéine du prion et le cuivre : un lien mystérieux. *Pathologie Biologie.* 2005;**53**(4):244-50.
379. **Raymond CR, Aucouturier P, Mabbott NA.** In vivo depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol.* 2007;**179**(11):7758-66.
380. **Revault M, Quiquampoix H, Baron MH, et al.** Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochimica et biophysica acta.* 2005;**1724**(3):367-74.
381. **Rezaei H, Choiset Y, Eghiaian F, et al.** Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *Journal of molecular biology.* 2002;**322**(4):799-814.
382. **Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, et al.** Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol.* 2007;**25**(1):132-8.

383. **Riesner D, Kellings K, Wiese U, et al.** Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Developments in biological standardization*. 1993;**80**:173-81.
384. **Rigou P, Rezaei H, Grosclaude J, et al.** Fate of prions in soil: adsorption and extraction by electroelution of recombinant ovine prion protein from montmorillonite and natural soils. *Environ Sci Technol*. 2006;**40**(5):1497-503.
385. **Roucou X, Gains M, LeBlanc AC.** Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res*. 2004;**75**(2):153-61.
386. **Roucou X, LeBlanc AC.** Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2005;**83**(1):3-11.
387. **Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, et al.** Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec*. 2001;**148**(1):7-13.
388. **Saborio GP, Permanne B, Soto C.** Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 2001;**411**(6839):810-3.
389. **Saeki K, Matsumoto Y, Matsumoto Y, et al.** Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;**219**(1):47-52.
390. **Safar J, Wille H, Itri V, et al.** Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998;**4**(10):1157-65.
391. **Safar JG, Geschwind MD, Deering C, et al.** Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;**102**(9):3501-6.
392. **Sailer A, Bueler H, Fischer M, et al.** No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*. 1994;**77**(7):967-8.
393. **Saunders C, Herbert P, Rowe G, et al.** In-vitro evaluation of the PALL Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter as a secondary device following primary leucoreduction. *Vox Sang*. 2005;**89**(4):220-8.
394. **Saunders SE, Bartz JC, Telling GC, et al.** Environmentally-relevant forms of the prion protein. *Environ Sci Technol*. 2008;**42**(17):6573-9.
395. **Schneider B, Mutel V, Pietri M, et al.** NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;**100**(23):13326-31.



396. **Schneider K, Fangerau H, Michaelsen B, et al.** The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull.* 2008;**77**(6):343-55.
397. **Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, et al.** The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol.* 2000;**156**(1):51-6.
398. **Scott M, Foster D, Miranda C, et al.** Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 1989;**59**(5):847-57.
399. **Scott M, Will R, Ironside J, et al.** Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;**96**(26):15137-42.
400. **Scott MR, Supattapone S, Nguyen HO, et al.** Transgenic models of prion disease. *Arch Virol Suppl.* 2000;**16**:113-24.
401. **Shyng SL, Huber MT, Harris DA.** A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1993;**268**(21):15922-8.
402. **Sigurdson CJ.** A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res.* 2008;**39**(4):41.
403. **Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, et al.** De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;**106**(1):304-9.
404. **Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, et al.** The most infectious prion protein particles. *Nature.* 2005;**437**(7056):257-61.
405. **Simmons MM, Konold T, Simmons HA, et al.** Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res.* 2007;**3**:20.
406. **Simmons MM, Moore SJ, Konold T, et al.** Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis.* 2011;**17**(5):848-54.
407. **Simonic T, Duga S, Strumbo B, et al.** cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS letters.* 2000;**469**(1):33-8.

408. **Siso S, Chianini F, Eaton SL, et al.** Disease phenotype in sheep after infection with cloned murine scrapie strains. *Prion*. 2012;**6**(2):174-83.
409. **Sklaviadis T, Akowitz A, Manuelidis EE, et al.** Nuclease treatment results in high specific purification of Creutzfeldt-Jakob disease infectivity with a density characteristic of nucleic acid-protein complexes. *Arch Virol*. 1990;**112**(3-4):215-28.
410. **Sklaviadis T, Dreyer R, Manuelidis L.** Analysis of Creutzfeldt-Jakob disease infectious fractions by gel permeation chromatography and sedimentation field flow fractionation. *Virus Res*. 1992;**26**(3):241-54.
411. **Sklaviadis TK, Manuelidis L, Manuelidis EE.** Physical properties of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*. 1989;**63**(3):1212-22.
412. **Sohn HJ, Lee YH, Green RB, et al.** Bone marrow infectivity in cattle exposed to the bovine spongiform encephalopathy agent. *Vet Rec*. 2009;**164**(9):272-4.
413. **Sowemimo-Coker S, Kacsak R, Kim A, et al.** Removal of exogenous (spiked) and endogenous prion infectivity from red cells with a new prototype of leukoreduction filter. *Transfusion*. 2005;**45**(12):1839-44.
414. **Sowemimo-Coker SO, Pesci S, Andrade F, et al.** Pall leukotrap affinity prion-reduction filter removes exogenous infectious prions and endogenous infectivity from red cell concentrates. *Vox Sang*. 2006;**90**(4):265-75.
415. **Stack MJ, Moore SJ, Vidal-Diez A, et al.** Experimental bovine spongiform encephalopathy: detection of PrP(Sc) in the small intestine relative to exposure dose and age. *J Comp Pathol*. 2011;**145**(2-3):289-301.
416. **Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, et al.** Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*. 1993;**32**(8):1991-2002.
417. **Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, et al.** Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987;**51**(2):229-40.
418. **Stewart RS, Drisaldi B, Harris DA.** A transmembrane form of the prion protein contains an uncleaved signal peptide and is retained in the endoplasmic Reticulum. *Molecular biology of the cell*. 2001;**12**(4):881-9.
419. **Stewart RS, Harris DA.** Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J Biol Chem*. 2001;**276**(3):2212-20.

420. **Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, et al.** Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* 2001;**508**(2):170-4.
421. **Tateishi J.** Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet.* 1985;**2**(8463):1074.
422. **Tateishi J, Tashima T, Kitamoto T.** Practical methods for chemical inactivation of Creutzfeldt-Jakob disease pathogen. *Microbiol Immunol.* 1991;**35**(2):163-6.
423. **Taylor D.** Inactivation of the BSE agent. *C R Biol.* 2002;**325**(1):75-6.
424. **Taylor DM.** Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J.* 2000;**159**(1):10-7.
425. **Taylor DM, Fernie K, McConnell I, et al.** Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Vet Microbiol.* 1999;**67**(1):13-6.
426. **Taylor DM, Fraser H, McConnell I, et al.** Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol.* 1994;**139**(3-4):313-26.
427. **Thackray AM, Hopkins L, Klein MA, et al.** Mouse-adapted ovine scrapie prion strains are characterized by different conformers of PrP<sup>Sc</sup>. *J Virol.* 2007;**81**(22):12119-27.
428. **Thackray AM, Hopkins L, Lockey R, et al.** Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie. *J Gen Virol.* 2011;**92**(6):1482-91.
429. **Thackray AM, Lockey R, Beck KE, et al.** Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates. *J Comp Pathol.* 2012;**147**(2-3):316-29.
430. **Thadani V, Penar PL, Partington J, et al.** Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J Neurosurg.* 1988;**69**(5):766-9.
431. **Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, et al.** Widespread PrP<sup>Sc</sup> accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep.* 2003;**4**(5):530-3.
432. **Tixador P, Herzog L, Reine F, et al.** The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog.* 2010;**6**(4):e1000859.
433. **Tobler I, Deboer T, Fischer M.** Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci.* 1997;**17**(5):1869-79.
434. **Tobler I, Gaus SE, Deboer T, et al.** Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature.* 1996;**380**(6575):639-42.

435. **Torres JM, Andreoletti O, Lacroux C, et al.** Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerg Infect Dis.* 2011;**17**(9):1636-44.
436. **Tullo AB, Buckley RJ, Kelly T, et al.** Transplantation of ocular tissue from a donor with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Exp Ophthalmol.* 2006;**34**(7):645-9.
437. **Tuo W, O'Rourke KI, Zhuang D, et al.** Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP<sup>Sc</sup> accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;**99**(9):6310-5.
438. **Turner ML, Ludlam CA.** An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol.* 2009;**144**(1):14-23.
439. **Tuzi NL, Cancellotti E, Baybutt H, et al.** Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol.* 2008;**6**(4):e100.
440. **Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, et al.** Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry.* 2002;**41**(42):12868-75.
441. **Uchiyama K, Ishida C, Yago S, et al.** An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease associated with corneal transplantation. *Dementia.* 1994;**8**:466-73.
442. **Uro-Coste E, Cassard H, Simon S, et al.** Beyond PrP<sup>res</sup> type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog.* 2008;**4**(3):e1000029.
443. **van Delft MF, Huang DC.** How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research.* 2006;**16**(2):203-13.
444. **van Duijn CM, Delasnerie-Laupretre N, Masullo C, et al.** Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet.* 1998;**351**(9109):1081-5.
445. **Van Everbroeck B, Dewulf E, Pals P, et al.** The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of Aging.* 2002;**23**(1):59-64.
446. **van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, et al.** Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol.* 1999;**121**(1):55-63.

447. **van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, et al.** Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl.* 2000;**16**:57-71.
448. **van Keulen LJ, Vromans ME, Dolstra CH, et al.** Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol.* 2008;**153**(3):445-53.
449. **Vidal E, Fernández-Borges N, Pintado B, et al.** Bovine Spongiform Encephalopathy Induces Misfolding of Alleged Prion-Resistant Species Cellular Prion Protein without Altering Its Pathobiological Features. *The Journal of Neuroscience.* 2013;**33**(18):7778-86.
450. **Vorberg I, Priola SA.** Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J Biol Chem.* 2002;**277**(39):36775-81.
451. **Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, et al.** Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet.* 2001;**358**(9277):171-80.
452. **Wadsworth JD, Joiner S, Linehan JM, et al.** Review. The origin of the prion agent of kuru: molecular and biological strain typing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;**363**(1510):3747-53.
453. **Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM.** The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. *J Biol Chem.* 2003;**278**(39):37241-8.
454. **Wang F, Wang X, Yuan CG, et al.** Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science (New York, NY).* 2010;**327**(5969):1132-5.
455. **Watts JC, Giles K, Patel S, et al.** Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog.* 2014;**10**(4):e1003990.
456. **Watts JC, Giles K, Stohr J, et al.** Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;**109**(9):3498-503.
457. **Webb PR, Powell L, Denyer M, et al.** A retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987. *J Vet Diagn Invest.* 2009;**21**(6):826-9.
458. **Weiss S, Proske D, Neumann M, et al.** RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol.* 1997;**71**(11):8790-7.
459. **Weissmann C, Bueler H, Fischer M, et al.** PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;**724**:235-40.

460. **Weissmann C, Fischer M, Raeber A, et al.** The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Int J Exp Pathol.* 1996;**77**(6):283-93.
461. **Wells GA.** Pathogenesis of BSE. *Vet Res Commun.* 2003;**27** Suppl 1:25-8.
462. **Wells GA, Hawkins SA, Green RB, et al.** Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec.* 1998;**142**(5):103-6.
463. **Wells GA, Spiropoulos J, Hawkins SA, et al.** Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet Rec.* 2005;**156**(13):401-7.
464. **Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, et al.** A Novel Progressive Spongiform Encephalopathy in Cattle. *Vet Rec.* 1987;**121**(18):419-20.
465. **Wells MA, Jackson GS, Jones S, et al.** A reassessment of copper(II) binding in the full-length prion protein. *Biochem J.* 2006;**399**(3):435-44.
466. **Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, et al.** Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell.* 1994;**76**(1):117-29.
467. **Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, et al.** Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell.* 1987;**51**(4):651-62.
468. **Westergard L, Christensen HM, Harris DA.** The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochimica et biophysica acta.* 2007;**1772**(6):629-44.
469. **White AR, Collins SJ, Maher F, et al.** Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol.* 1999;**155**(5):1723-30.
470. **Wiggins RC.** Prion stability and infectivity in the environment. *Neurochem Res.* 2009;**34**(1):158-68.
471. **Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ.** Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec.* 1991;**128**(9):199-203.

472. **Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, et al.** Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 2010;**6**(12):e1001217.
473. **Will RG, Ironside JW.** Oral infection by the bovine spongiform encephalopathy prion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;**96**(9):4738-9.
474. **Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al.** A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996;**347**(9006):921-5.
475. **Will RG, Matthews WB.** Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982;**45**(3):235-8.
476. **Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, et al.** Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet.* 1996;**98**(3):259-64.
477. **Wood JLN, Done SH.** Natural Scrapie in Goats - Neuropathology. *Vet Rec.* 1992;**131**(5):93-6.
478. **Wroe SJ, Pal S, Siddique D, et al.** Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet.* 2006;**368**(9552):2061-7.
479. **Yamaguchi N, Sakaguchi S, Shigematsu K, et al.** Doppel-induced Purkinje cell death is stoichiometrically abrogated by prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;**319**(4):1247-52.
480. **Yost CS, Lopez CD, Prusiner SB, et al.** Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature.* 1990;**343**(6259):669-72.
481. **Yuan JY, Yankner BA.** Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000;**407**(6805):802-9.
482. **Zeidler M, Stewart GE, Barraclough CR, et al.** New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet.* 1997;**350**(9082):903-7.
483. **Zerr I, Brandel JP, Masullo C, et al.** European surveillance on Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study for medical risk factors. *J Clin Epidemiol.* 2000;**53**(7):747-54.
484. **Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, et al.** Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;**103**(7):2184-9.

485. **Zigas V, Gajdusek DC.** Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust.* 1957;**44**(21):745-54.

486. **Zlotnik I, Rennie JC.** Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters. *J Comp Pathol.* 1965;**75**:147-57.