

CAHIER DE

Formation

N° 12

novembre 98

Biologie médicale

LES MALADIES À PRIONS



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



BIOFORMA



Cher Confrère,

BIOFORMA a le plaisir de vous présenter le Cahier de Formation de Biologie Médicale numéro 12 relatif aux : MALADIES à PRIONS

Dans le cadre de la formation continue conventionnelle nous sommes persuadés qu'il est indispensable d'apporter aux Biologistes les éléments de connaissance et de réflexion leur permettant l'abord de pathologies en forte croissance, préoccupantes pour la Santé Publique.

Maillon incontournable dans la chaîne de santé, le Biologiste et le laboratoire d'analyses de biologie médicale sont souvent les premiers interlocuteurs du patient et du clinicien.

Le dialogue Clinicien/Biologiste qui doit s'instaurer naturellement lorsque de réelles suspicions de maladies de ce type sont évoquées doit reposer sur une information complète et une documentation solide.

Nous espérons que ce Cahier répondra à vos attentes sur ce sujet.

Nous vous en souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

**Adrien BEDOSSA
Président**

**LES MALADIES
À PRIONS**

LISTE DES AUTEURS

■ **Claude DREUX**

Professeur émérite de Biochimie
Membre des Académies de Médecine et de Pharmacie
Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
4, Avenue de l' Observatoire
75270 - Paris Cedex 06

■ **Jeanne BRUGERE-PICOUX***

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort
Membre de l'Académie de Médecine
Unité de Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour
E.N.V.A.
7, Avenue du Général de Gaulle
94704 - Maisons-Alfort Cedex

■ **Jean-Philippe BRANDEL****

Docteur en Médecine
Neurologue
Unité 360 INSERM
Hôpital de la Salpêtrière
75270 Paris Cedex 06

■ **Jean-Louis LAPLANCHE***

Professeur de Biologie cellulaire
Biologiste des hôpitaux
Laboratoire de Biologie Cellulaire
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
4, Avenue de l'Observatoire
75270 - Paris Cedex 06

■ **Jacques-Christian DARBORD***

Professeur de Microbiologie
Chef du Laboratoire des Contrôles Biologiques
de la Pharmacie Centrale des Hôpitaux de Paris
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
4, Avenue de l'Observatoire
75270 - Paris Cedex 06

* Membre du Comité interministériel d'experts sur les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles et les prions (Président Pr. D. Dormont)

** Attaché au réseau d'épidémiologie de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (Hôpital de la Salpêtrière)

Les Spécialistes en Biologie Clinique doivent être informés sur les maladies à prions. Certes, ils ne sont pas encore concernés directement par ces affections car, malheureusement, le dépistage de l'agent infectieux n'est pas encore accessible aux laboratoires d'analyses de biologie médicale. D'ailleurs, la nature de cet agent est encore controversée. De plus, il n'existe pas de réaction immunologique connue permettant la recherche d'éventuels anticorps.

Cependant, compte tenu de la gravité de l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou maladie de « la vache folle »), de sa médiatisation, de la quasi certitude d'une transmission de l'ESB à d'autres espèces, dont l'Homme, il est indispensable que les biologistes puissent donner à leurs patients, et même à leurs correspondants cliniciens, des informations précises et exactes sur ces sujets.

*Après un premier chapitre consacré aux connaissances actuelles sur l'agent infectieux, sur la théorie de **S.B. PRUSINER** Prix Nobel 1997, et sur les différents types d'encéphalopathies spongiformes sporadiques ou génétiques, les principales données actuelles seront exposées par quatre Spécialistes reconnus des maladies à prions.*

*Le Professeur, **Jeanne BRUGERE-PICOUX** fera le point sur les encéphalopathies spongiformes animales et les risques de leur transmission à l'Homme. Le problème de la « barrière d'espèce », qui a fait l'objet de tant de déclarations contradictoires, sera bien entendu abordé.*

*Le Docteur **Jean-Philippe BRANDEL** traitera des différentes encéphalopathies spongiformes humaines, de leur diagnostic clinique et des facteurs de risques environnementaux. De la plus fréquente, Maladie de Creutzfeldt-Jakob ou MCJ, à la plus célèbre historiquement, le Kuru, dont la découverte valut à D.C. GAJDUSEK le prix Nobel en 1976.*

Actuellement, le nouveau variant de la MCJ (nv-MCJ), transmis par les bovins atteints d'ESB, mérite une attention particulière en Santé publique.

*Le Professeur **Jean-Louis LAPLANCHE**, spécialiste de la génétique des maladies à prions, abordera le chapitre, très important pour les biopathologistes, du diagnostic biologique. Celui-ci a fait d'incontestables progrès et, actuellement, la recherche de marqueurs de la destruction neuronale dans le liquide céphalo-rachidien permet de dépister la MCJ avec des pourcentages de 95% tant en sensibilité qu'en spécificité. De plus, l'identification de variants électrophorétiques de la PrP^{res}*

(voir définition dans le premier chapitre) permettrait de déterminer l'étiologie de la maladie. Le polymorphisme du codon 129 est, à cet égard, particulièrement intéressant à étudier surtout pour le diagnostic du nouveau variant de la MCJ.

*Le Professeur **Jacques-Christian DARBORD** traitera enfin du problème si important, pour les biologistes et les cliniciens (médecins et chirurgiens), de la décontamination et de la gestion du risque lié au matériel souillé. La résistance particulière de l'agent transmettant les encéphalopathies spongiformes rend cette question tout à fait cruciale. La catastrophique épidémie d'ESB serait due, semble-t-il, à une simplification de la préparation des farines destinées à l'alimentation du bétail. Les accidents survenus lors d'opérations neuro-chirurgicales seraient imputables à du matériel mal décontaminé. Nul doute que les Biologistes soient très concernés par cette question dans le cadre de leur propre laboratoire ou comme consultant des médecins et des chirurgiens.*

La Formation continue des Spécialistes en Biologie Clinique ne doit pas se limiter aux seuls examens de laboratoire. Elle doit aborder également les grands problèmes de sécurité sanitaire, si ces Biologistes veulent conserver leur rôle de conseiller des malades et des cliniciens. Il est très probable, de plus, que dans un avenir proche, le dépistage des maladies à prions humaines et animales pourra être effectué dans les laboratoires d'analyses médicales compétents en biochimie et en biologie cellulaire et moléculaire.

C. DREUX

I - LES PRIONS SONT-ILS DES AGENTS TRANSMISSIBLES DES MALADIES À PRIONS ?	9
II - LES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES ANIMALES ET LES RISQUES DE LEUR TRANSMISSION A L'HOMME	19
III - LES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES HUMAINES : DIAGNOSTIC CLINIQUE ET ANALYSE DES FACTEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX	41
IV - VERS UN DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MALADIES À PRIONS HUMAINES	53
V - MALADIES À PRIONS : MÉTHODES DE DÉCONTAMINATION, GESTION DU RISQUE LIÉ AU MATÉRIEL SOUILLÉ ET CONDUITE À TENIR AU LABORATOIRE	69

I - LES PRIONS SONT-ILS LES AGENTS TRANSMISSIBLES DES MALADIES A PRIONS ?

Claude Dreux

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Le titre de cette introduction au Cahier de Formation sur les maladies à prions ne constitue pas une boutade !

En effet, si aucun scientifique ne met actuellement en cause l'existence des prions et leur présence dans les « *Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles* » (ESST) humaines et animales, par contre le caractère infectieux de cette protéine fait toujours l'objet de controverses passionnées. C'est pourquoi l'expression « *d'agent transmissible non conventionnel* » (ATNC) est toujours utilisée.

En fait, pour le Spécialiste en biologie clinique soucieux de disposer d'un marqueur des ESST, ces discussions ne sont pas fondamentales. Par contre, pour l'infectiologue ou l'hygiéniste, il convient de savoir si ce sont vraiment les protéines prions qui sont responsables de la transmission de ces encéphalopathies.

Le biologiste doit cependant être éclairé sur la théorie de PRUSINER qui confère à une protéine un caractère infectieux, véritable révolution dogmatique puisque, jusqu'ici, la présence d'un acide nucléique était indispensable à la transmission d'une maladie.

Les ESST (maladie de Creutzfeldt-Jakob ou M.C.J. surtout) ou animales (Tremblante du mouton, Encéphalopathie Spongiforme Bovine ou ESB) concernées étant traitées par ailleurs, nous nous limiterons à l'agent transmissible.

Indiquons cependant que si la majeure partie de ces maladies sont liées au développement d'un agent infectieux, elles peuvent également avoir une origine génétique par mutation du gène codant pour la protéine prion.

■ I. LA PROTÉINE PRION

Le nom de PRION (anagramme approximatif de proteinaceous infectious particle) a été donné en 1982 par S.B PRUSINER (1), récent Prix Nobel, à ce qu'il affirme être l'agent infectieux des ESST.

Mais il existe une protéine prion normale, PrP^c, présente dans de nombreux tissus et surtout dans le cerveau. Cette protéine, très conservée au cours de l'évolution, est présente chez tous les mammifères. Le gène codant la PrP chez l'homme (PRNP) a été localisé sur le bras court du chromosome 20. Ce gène est exprimé essentiellement dans les neurones.

La théorie de PRUSINER confère à une forme anormale de la protéine (appelée PrP^{sc} ou PrP^{res} car elle devient résistante aux protéases par ce changement de conformation*) le pouvoir infectieux. Nous verrons plus en détail le mécanisme de la transmission des ESST d'après l'hypothèse de PRUSINER et les autres théories possibles.

Le rôle *physiologique* de la PrP est encore obscur. Des souris transgéniques sans PrP vivent apparemment normalement, mais présentent néanmoins des troubles du système nerveux central notamment chronobiologiques. La PrP interviendrait également dans le développement des cellules gliales. A noter que la PrP^c a été également retrouvée à la surface des lymphocytes qui paraissent jouer un rôle dans la transmission des maladies à prions par le sang (2).

Quant aux prions, constitués majoritairement, si ce n'est uniquement, de PrP^{sc}, ils présentent des caractères physico-chimiques et biologiques très particuliers :

- Résistance très importante à l'action de la protéinase K (PK)
- Insolubilité en présence des détergents
- Résistance élevée à la chaleur (jusqu'à 136°C)
- Résistance aux ultrasons
- Résistance aux rayonnements ultraviolets
- Résistance aux radiations ionisantes

De ce fait, les recommandations concernant le traitement des matériels supposés contaminés sont particulièrement drastiques (voir l'article de J.C. DARBORD).

Les méthodes récentes de la biologie structurale, en particulier la résonance magnétique nucléaire, ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle de PrP^c (Fig. I-1). La structure 3D de PrP^{sc} n'a pas été caractérisée. Un pourcentage élevé de structures secondaires en feuillet β la distingue néanmoins de PrP^c.

N.B. En règle générale, il vaut mieux utiliser le terme PrP^{sc} qui désigne toutes les formes de protéines prions « infectieuses » alors que PrP^{res} est limité aux formes résistantes à la protéinase K (PK). Il existerait des PrP^{sc} sensibles à la PK (9).

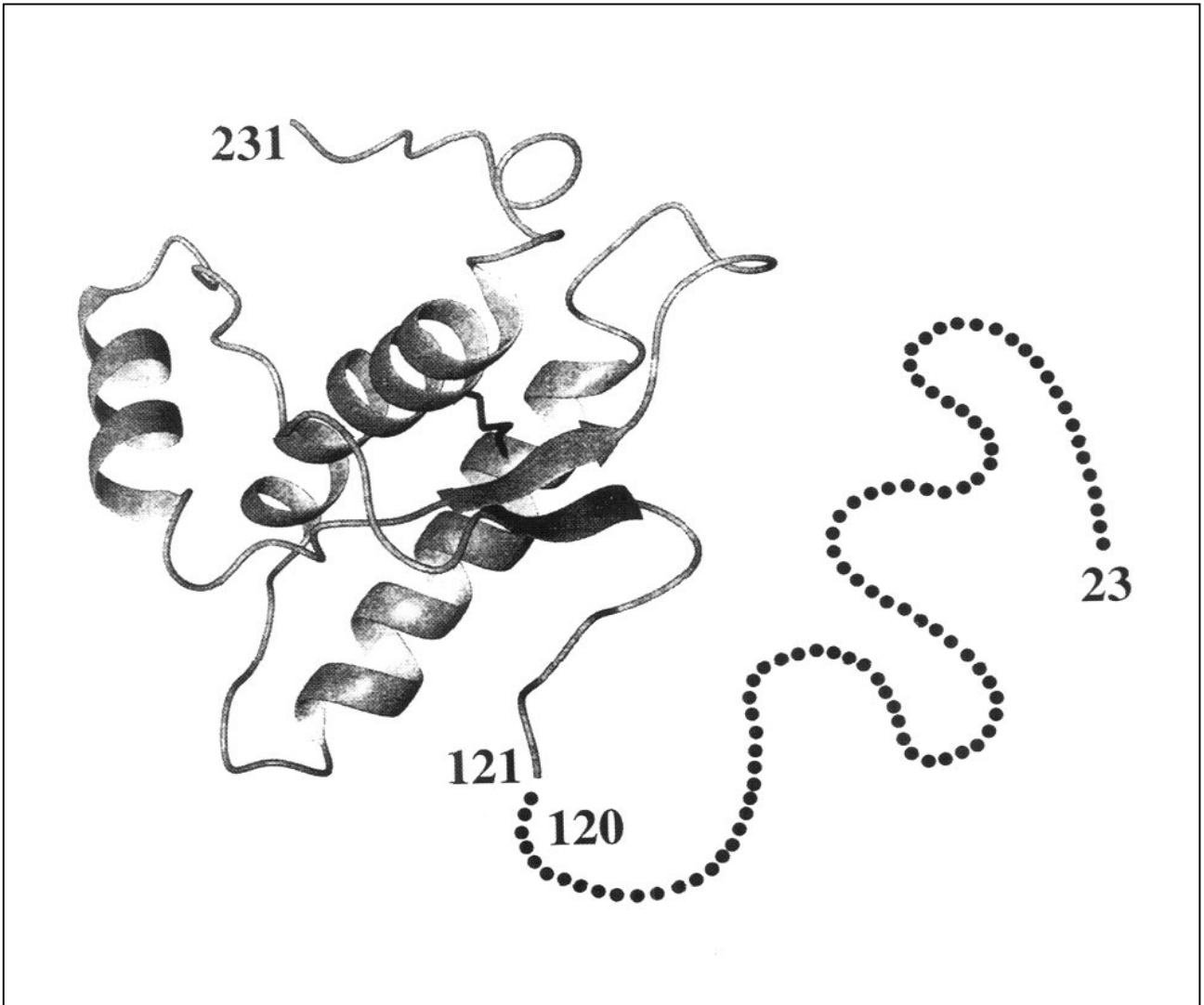


Figure I-1. Structure de la protéine prion PrP^c recombinante de rat, d'après R. RIEK et al, *FERS Letters* 1997, 413, 282-288.

Détermination effectuée sur le segment compris entre les acides aminés 121-231. On remarque plusieurs fragments hélicoïdaux.

■ II. LA THÉORIE DU PRION, AGENT INFECTIEUX

Plusieurs revues générales en français ont été consacrées à cette théorie iconoclaste défendue depuis plus de 15 ans par S.B. PRUSINER (3). Les lecteurs pourront consulter ces articles pour connaître le détail des arguments en faveur ou en opposition avec les affirmations du récent Prix Nobel. (4) (5) (6). Nous nous contenterons d'en résumer les principaux éléments.

La PrP^{sc} de conformation anormale, s'associerait avec le PrP^c normale de l'hôte induisant dans cette dernière un changement de structure la transformant en PrP^{sc}. Ainsi, à chaque synthèse d'une nouvelle protéine PrP^c l'association avec PrP^{sc} donnerait naissance à une nouvelle molécule anormale. Ces PrP^{sc} particulièrement résistantes à la protéolyse, s'accumuleraient conduisant ainsi à la mort cellulaire. Dans ses derniers schémas, S.B. PRUSINER, fait intervenir une autre protéine encore inconnue, nommée protéine X, qui jouerait un rôle particulier dans le phénomène de la « *barrière d'espèce* » (voir plus loin).

Ce schéma est tout à fait contraire à la génétique classique qui confère aux seuls acides nucléiques (ADN et ARN) l'information nécessaire à la synthèse protéique et à la structure tridimensionnelle des protéines. « A une fibre polypeptidique correspond une seule structure protéique » affirmait Jacques MONOD en 1970. Cependant, d'autres théories ont été développées et, particulièrement, celle dite des molécules « *chaperonnes* » de J.P. LIAUTARD (7). Ces protéines pourraient servir de « tuteur » à d'autres molécules, permettant à celles-ci d'acquérir leur structure tridimensionnelle au cours de leur synthèse. En outre, des phénomènes du même type que ceux décrits pour les prions ont été observés dans des levures par F. LACROUTE en 1971 et confirmés récemment (8).

L'accumulation de la PrP^{sc} au niveau cellulaire provoquerait des dépôts de type amyloïde chez les malades atteints d'ESST. Au microscope électronique on observe des aspects en fibrilles ou en bâtonnets caractéristiques, appelés SAF (Scrapie Associated Fibrils) ou prion yods, véritables polymères de PrP^{sc}.

Bien que la majorité des spécialistes des maladies à prions, adoptent aujourd'hui les hypothèses de S.B. PRUSINER, quelques uns hésitent encore à abandonner la génétique classique !

Il est vrai que l'hypothèse du prion seul permet difficilement d'expliquer l'existence de plusieurs souches d'agents infectieux correspondant à divers temps d'incubation des maladies (plus de vingt souches ont été isolées chez la souris). En effet, cela remettrait en cause la théorie d'une structure unique pour une même protéine. Cependant, les profils électrophorétiques différents et reproductibles obtenus pour la PrP^{sc} tendent à prouver qu'il existe bien plusieurs types de conformations. Quatre ont été déjà observés chez l'homme : deux dans les cas sporadiques de M.C.J., un dans la maladie transmise par l'hormone de croissance d'origine humaine, et un chez les patients atteints du nouveau variant de la M.C.J. (nv-MCJ) transmis par les bovins atteints d'ESB.

Les autres théories avancées sont celles d'un virus d'un type encore inconnu et du « *virino* »

L'existence d'un *virus* doté d'une variabilité génétique rendrait bien compte de la diversité des souches. L'argument principal réside dans la dissociation entre les marqueurs de l'infection et l'infectiosité.

Les expériences de l'équipe de D. DORMONT (9) qui ont montré le caractère infectieux de cerveaux de souris inoculés par l'agent de l'ESB et ne contenant pas de PrP^{Sc} résistante à la PK, viennent à l'appui de cette démonstration.

Cependant, cette théorie virale est fortement contredite par l'absence de réaction immunitaire observée dans toutes les maladies à prions et la très grande résistance des agents infectieux aux méthodes de destruction des virus. Enfin, aucun virus ou rétrovirus connu ne correspond à l'agent infectieux en cause.

Le modèle du *virino* consiste à reconnaître la présence d'une protéine PrP mais englobant un acide nucléique dissimulant celui-ci aux agents habituellement dénaturants des ADN ou ARN. Cette théorie est séduisante car elle rend compte de la variabilité des souches et de l'absence de réponse immunitaire. Cependant, il n'a pas été possible de mettre en évidence un acide nucléique dans les préparations de matériel infectant.

■ III. LES RÉCEPTEURS CELLULAIRES DES PRIONS

Des études récentes (10) font état de l'existence de protéines capables d'interagir avec la PrP : la protéine du choc thermique Hsp60 et le précurseur du récepteur de la laminine ou LRP. On a pensé ainsi que le LRP pouvait constituer un récepteur de PrP à la surface des neurones.

De ce fait, chez des hamsters infectés expérimentalement, les concentrations de LRP sont élevées seulement dans les organes cibles de l'agent infectieux. Une bonne corrélation est observée entre le taux de LRP et de PrP^{Sc} accumulés dans ces organes.

Ainsi, le LRP pourrait avoir plusieurs rôles : récepteur de la PrP normale intervenant dans son internalisation avec accélération de ce processus lors de l'accumulation de la PrP^{Sc}. La distribution importante de LRP dans les organes lymphoïdes est en accord avec l'hypothèse d'un rôle important joué par cette protéine dans la réplication de l'agent infectieux.

■ IV. CARACTÉRISTIQUES DE L'AGENT TRANSMISSIBLE

La transmission de l'agent des ESST a été obtenue expérimentalement par diverses voies dont les plus efficaces sont les voies intracérébrale et intraspinale puis par ordre décroissant : intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et enfin orale. Cette transmissibilité dépend d'ailleurs des espèces : la voie orale est 40.000 fois moins efficace que la voie intracérébrale chez la souris, mais un million de fois moins chez le hamster. L'efficacité dépend aussi de l'agent infectieux : celui de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) semble transmis assez facilement par voie orale (500 mg de cerveau de bovin peuvent contaminer un mouton). Une autre variable est constituée par le temps d'incubation de la maladie qui varie avec la voie de transmission, les espèces considérées et la quantité de matériel infectieux. Il en est de même pour l'expression clinique et neuropathologique de la maladie.

Il existe, par exemple, une vingtaine de souches différentes provenant de moutons atteints de tremblante. Les prions humains sont également variables comme on l'a observé après inoculation à la souris. Ce caractère de variabilité des souches constitue, nous l'avons vu, l'argument majeur des partisans de l'existence d'un virus comme agent infectieux des ESST.

Cependant, une exception doit être signalée : celle de l'agent de l'ESB. Il semble n'exister qu'une seule souche conservée quand on change d'espèce. C'est un important argument pour la transmission de l'ESB à différents mammifères dont les primates et l'homme (n v-MCJ) (11).

Le problème de la *barrière d'espèce* a été particulièrement étudié ces dernières années compte tenu de son importance épidémiologique. La production de souris transgéniques avec des gènes PrP modifiés ou provenant d'une autre espèce a permis de montrer combien cette barrière était susceptible de modifications. L'introduction d'un gène PrP de hamster chez la souris rend cette espèce sensible à l'inoculation d'extraits cérébraux de hamsters malades avec des périodes d'incubation fonction du nombre de copies du transgène (de 500 à 50 jours).

Il existerait un facteur cellulaire (la protéine X de PRUSINER citée plus haut) susceptible de modifier la sensibilité d'une même espèce à l'introduction d'une PrP d'une autre espèce. L'homologie de structure entre PrP intervient aussi. Seize acides aminés séparent seulement les PrP de la souris et du hamster. La PrP bovine a plus d'homologie avec la PrP humaine que la PrP ovine, ce qui pourrait expliquer la sensibilité plus grande de l'homme à l'ESB qu'à la tremblante du mouton.

■ V. GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES MALADIES À PRIONS

A côté des formes sporadiques et transmissibles des maladies à prions, il existe des maladies génétiques liées au polymorphisme du gène PRNP et à l'existence de mutations.

Chez des souris transgéniques il a été démontré que la séquence primaire de la PrP modulait la période d'incubation, conditionnait la neuropathologie et, comme nous l'avons vu précédemment, modifiait la barrière d'espèce. Des changements d'acides aminés dans la PrP de l'hôte peuvent influencer considérablement la sensibilité à l'infection. C'est pourquoi, par exemple, il pourrait apparaître, chez l'homme, de nouveaux cas de nv-MCJ d'incubation plus longue que ceux décrits en 96-97 (14).

Au niveau du gène PRNP humain, une vingtaine de mutations ont été décrites correspondant aux formes familiales de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et des autres ESST. (3) (4) (12). D'autres ont été étudiées chez les ovins et les bovins (13) (Fig. 1-2).

Nous résumerons simplement les principales mutations observées, des données complémentaires pouvant être trouvées dans les chapitres rédigés par J.P. BRANDEL et J.L. LAPLANCHE.

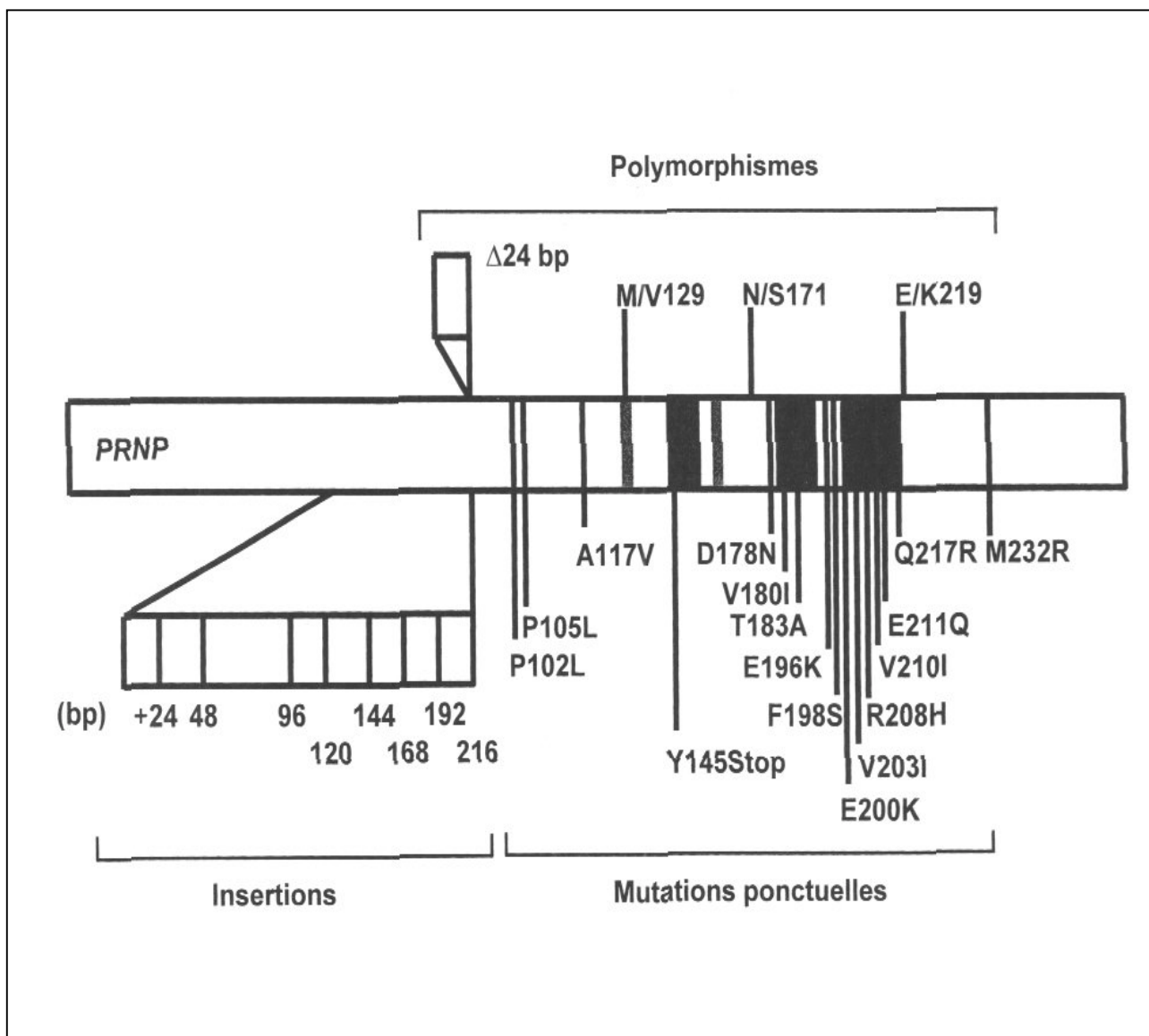


Figure I-2. Mutations et polymorphismes du gène PRNP d'après J.L. LAPLANCHE.

Représentation schématique de la séquence codante du gène de la protéine prion (PRNP). Deux types de mutation ont été identifiées : des insertions d'une taille variant de 24 à 216 paires de bases et, à l'heure actuelle, 16 mutations ponctuelles. Quatre polymorphismes, dont une délétion de 24 paires de bases sont connus. Seul le polymorphisme du codon 129 paraît jouer un rôle significatif dans la prédisposition génétique vis-à-vis des formes sporadiques et acquises de la MCJ.

Des familles de diverses origines (américaines, anglaises, allemandes, japonaises, françaises, marocaines...) présentent une mutation au niveau du codon 102. La substitution d'une alanine par une valine sur le codon 117 serait associée à une forme de syndrome de GERSTMANN - STRÄUSSLER - SCHEINKER (S.G.S.S.) avec démence alors qu'une mutation en 102 conduit à une forme cérébelleuse. On voit donc que le type de mutation induit des formes cliniques différentes.

En ce qui concerne la M.C.J., la mutation la plus fréquente a lieu sur le codon 200 avec substitution d'une lysine à un acide glutamique. Elle a été trouvée dans différents foyers à forte incidence de M.C.J. (en Tchécoslovaquie, en Grèce et au Maghreb).

Une mutation au niveau du codon 178 a été observée dans des familles européennes. En France, 17 membres d'une même famille ont été trouvés porteurs de cette mutation à travers quatre générations (15). Cette M.C.J. d'origine génétique survient précocement (40 à 50 ans) et évolue assez longuement (21 mois en moyenne).

Le polymorphisme du codon 129 portant sur les acides aminés méthionine et valine est particulièrement intéressant à étudier. Alors que dans la population générale la distribution est de 40% pour les homozygotes MM, 50% pour l'hétérozygote MV et 10% pour les homozygotes VV, elle devient 74% pour MM, 15% pour MV et 11% pour VV. Le génotype 129 MM constitue donc le premier facteur de risque génétique (6 fois supérieur) pour la forme sporadique de la M.C.J.. Il apparaît aussi comme le plus fréquent dans le nv-MCJ d'origine bovine (voir plus haut). Par contre, le génotype 129 MV semble partiellement protecteur.

En outre, chez les individus 129 MM, la durée de la maladie est plus courte que chez les autres génotypes.

Pour en terminer avec ces quelques exemples des remarquables avancées dans la génétique des maladies à prions, citons les observations concernant le gène de l'apolipoprotéine E (ApoE). L'allèle E4 codant l'apo E4 est excédentaire dans 61 cas français de M.C.J. par rapport aux témoins (16). Or, l'allèle E4 constitue également un facteur de risque bien identifié de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie caractérisée par des dépôts amyloïdes au niveau du cerveau aurait-elle d'autres points de convergence avec les E.S.S.T. ?

L'étude des mutations et polymorphisme du gène PRNP a apporté des données nouvelles concernant l'origine des maladies à prions. D'ores et déjà, on peut envisager un diagnostic prénatal des formes familiales précoces de ces maladies.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) PRUSINER S.B., Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216 : 136-144.
- (2) KLEIN M.A., FRIGG R., RAEBER A.J. et al, A crucial role of 13 cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997; 390 : 687-690.
- (3) PRUSINER S.B., Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *JIBS* 1996; 21 : 482-487.
- (4) LAPLANCHE J.L., Agents transmissibles non conventionnels et protéine prion : manque-t-il encore quelque chose ?. *Ann Biol Clin* 1997; 55 : 395-407.
- (5) LASMEZAS C.I., DESLYS R., DORMONT D., L'agent secret des maladies à prions. *La Recherche* 1997 ; 299 :46-53.
- (6) LAURENT M., Les prions : entre dogme et réalités. *Med Sci* 1998; 14 : 475-478.
- (7) LIAUTARD J.P., Les prions sont-ils des molécules chaperonnes mal repliées ?. *Med Sci* 1992; 8 : 55-57.
- (8) WICKNER R.B., URE3 as an altered URE2 protein : evidence for a prion analog in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Science* 1994; 264 : 566-569.
- (9) LASMEZAS C.I., DESLYS J.P., ROBAIN O. et al, Transmission of the BSE agent in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997; 275 : 402-405.
- (10) LASMEZAS C.I., DESLYS J.P., DORMONT D., Une première étape dans l'identification de récepteurs cellulaires de la protéine prion. *Med Sci* 1998; 14 : 595-599.
- (11) BRUCE M.E., WILL R.G., IRONSIDE J.W. et al, Transmission to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389 : 498-501.
- (12) DREUX C., LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., Les démences transmissibles humaines maladies à prions ?. *Bull Acad Natle Med* 1992; 176 : 1219-1291.
- (13) LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., WESTAWAY D. et al, PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 1993; 5 : 30-37.
- (14) MOORE R.C., HOPE J., Mc BRIDE P.A. et al, Mice with gene targetted prion protein alterations show that PRNP, Sinc and Prni are congruent. *Nature Genetics* 1998; 18 : 118-125.
- (1.5) LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., THOMAS S., LAUNAY J.M., GAULTIER C., DEROUESNE C.. Uncommon phenotype for a codon 178 mutation of the human PrP gene. *Ann Neurol* 1992; 31 : 345.
- (16) AMOUYEL P., VIDAL O., LAUNAY J.M., LAPLANCHE J.L., The apolipoprotein E alleles as major susceptibility factors for Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1994; 344 : 1315-1318.

II - LES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES ANIMALES ET LES RISQUES DE LEUR TRANSMISSION À L'HOMME

Jeanne BRUGÈRE-PICOUX

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Il a fallu une annonce très officielle du ministère de la santé britannique, le 20 mars 1996, pour que des maladies qui étaient peu connues comme *la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)*, *la tremblante du mouton* ou *l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)* soit « médiatisées » dans une crise européenne sans précédent dans le domaine de l'élevage et des industries de l'agro-alimentaire. En effet, selon les scientifiques britanniques, il y avait peut-être une relation entre l'ESB (plus connue maintenant sous le nom de « maladie de la vache folle ») et dix cas d'une nouvelle forme variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (nv-MCJ) chez l'homme. Les arguments scientifiques pour ou contre cette suspicion firent l'objet d'un grand nombre de publications très souvent reprises par les médias. Malheureusement le risque « ESB » pour l'homme fut confirmé en octobre 1997 (1).

Cette émergence médiatique attira l'attention du public (et des scientifiques) sur les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST). L'agent responsable est encore mal connu d'où les dénominations d'« agent transmissible non conventionnel » (ATNC) ou « prion » selon les hypothèses concernant sa nature strictement protéique ou non (cf. article Cl. Dreux).

Les ESST sont caractérisées par une atteinte dégénérative du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) évoluant lentement, après une longue période d'incubation, vers une issue toujours fatale. Ces lésions dégénératives (uniquement observées au microscope) sont caractérisées principalement par une perte de la substance nerveuse avec l'apparition de vacuoles dans la substance grise et dans les neurones d'où l'observation de trous donnant un aspect d'éponge (qualifié de spongieuse) au tissu cérébral. Ces lésions apparaissent progressivement pendant la période d'incubation de la maladie (qui est particulièrement longue par comparaison avec la durée de vie de chaque espèce concernée) et cette neuro-dégénérescence finit par se traduire cliniquement par des troubles nerveux.

I. LES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES TRANSMISSIBLES ANIMALES

Les ESST animales présentent un double déterminisme infectieux et génétique et sont rencontrées dans les conditions naturelles chez les ruminants les félidés et le vison (cf. tableau I). D'autres espèces ont pu présenter la maladie à la suite d'une inoculation expérimentale si de nombreuses conditions sont réunies :

- (1) phénomène de « barrière d'espèce » très faible entre la souche d'ATNC inoculée et l'animal hôte ;
- (2) prédisposition génétique de l'animal inoculé ;
- (3) dose inoculée suffisante pour que la durée d'incubation ne soit pas supérieure à la durée de vie de l'hôte;
- (4) voie d'inoculation...

Par exemple, l'ATNC bovin peut provoquer une ESST chez le porc par inoculation intracérébrale alors que la voie orale n'a pas permis cette reproduction expérimentale. D'autres part, certaines espèces semblent particulièrement résistantes. Ainsi, le lapin et les oiseaux n'ont jamais été atteints d'une ESST confirmée dans les conditions naturelles ou expérimentales jusqu'à ce jour.

Hôte	Maladie	Origine	Première observation	Première Transmissibilité
Mouton	Tremblante	Infection par un ATNC ovin*	1730	1936
Chèvre	Tremblante	Infection par un ATNC ovin ou caprin*	1872	1938
Vison	ETV	Infection par un ATNC ovin ou bovin*	1947	1965
Cerf Mulet	MDC	Inconnue	1967	1983
Nyala	ES	Infection par l'ATNC bovin*	1985	1992
Bovin	ESB	Infection par un ATNC ovin ou bovin*	1986	1988
Eland	ES	Infection par l'ATNC bovin*	1990	nd
Grand Koudou	ES	Infection par l'ATNC bovin*	1986	1992
Chat	ESF	Infection par l'ATNC bovin*	1990	1992
Oryx	ES	Infection par l'ATNC bovin*	1990	1992
Guépard	ESF	Infection par l'ATNC bovin*	1192	nd
Ocelot	ESF	Infection par l'ATNC bovin*	1992	nd
Puma	ESF	Infection par l'ATNC bovin*	1992	nd
Tigre	ESF	Infection par l'ATNC bovin*	1992	nd
Mouflon	Tremblante	Infection par un ATNC bovin ou ovin*	1992	nd
Bison	ES	Infection par l'ATNC bovin*	1997	nd

* Infection observée chez un individu génétiquement prédisposé
 ETV: encéphalopathie transmissible du vison
 MD : Maladie du dépérissement chronique
 ES : encéphalopathie spongiforme
 ESB : encéphalopathie spongiforme bovine
 ESF : encéphalopathie spongiforme féline
 nd : non démontrée

Tableau I : Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles animales

I.1- Encéphalopathies spongiformes transmissibles des ruminants

I.1.1- Tremblante du mouton et de la chèvre

La tremblante, prototype des encéphalopathies spongiformes transmissibles, sévit dans le monde entier. De nombreux pays ont signalé cette maladie, à la suite le plus souvent de l'importation de moutons d'origine européenne. S'agissant d'une affection considérée comme une maladie honteuse, son incidence reste encore mal évaluée car les éleveurs de moutons ne souhaitent pas toujours signaler son existence dans leurs troupeaux. En effet ceux-ci connaissent le discrédit que peut jeter l'apparition de la tremblante dans un troupeau du fait du caractère de prédisposition héréditaire lié à la maladie. Cette prédisposition héréditaire permet d'expliquer les différences observées sur les résultats des enquêtes épidémiologiques réalisées dans le monde : les pertes annuelles varient de 1 à 20% dans les troupeaux affectés. Ces pourcentages peuvent être augmentés lorsque le mode de contamination est iatrogène (vaccins). Chez la chèvre la maladie semble moins fréquente que chez le mouton.

➤ Symptômes

Les différents noms donnés à la tremblante du mouton ou de la chèvre témoignent de la variabilité des symptômes observés lors de l'apparition de la maladie : maladie convulsive, maladie folle, vertigo, prurigo lombaire, *Scrapie* en anglais venant du verbe *Scrape* (gratter), *Traberkrankheit* en allemand (maladie du trot) en raison des troubles locomoteurs observés. La symptomatologie de la tremblante est bien connue et très caractéristique. Après une période d'incubation remarquablement longue, de plusieurs mois (au minimum 10 mois) à plusieurs années (en général 1 à 2 ans), les manifestations cliniques peuvent présenter de nombreuses variations mais elles traduisent toujours des troubles nerveux sensitifs et moteurs évoluant sur un à douze mois.

Au début, l'animal reste écarté du troupeau, ayant perdu son instinct grégaire. On observe un prurit (démangeaisons) siégeant souvent au niveau de la tête et en région dorso-lombaire. Ce prurit peut être mis en évidence par une pression exercée sur les régions prurigineuses (ceci entraîne de la part du mouton une attitude de satisfaction en élevant légèrement la tête avec un mouvement de mâchonnement). Ce prurit peut s'accompagner d'un léchage excessif. On observe aussi une hyperexcitabilité (hyperréaction au moindre stress) accompagnée de tremblements d'abord localisés (tête) et transitoires puis de plus en plus fréquents, allant en se généralisant. On note aussi fréquemment des grincements de dents. Ces troubles de la sensibilité augmentent considérablement lorsque les animaux sont stressés. D'autres symptômes, moins fréquents, peuvent être notés : anomalies de postures, troubles de la miction avec incontinence.

Plus tard, l'état général se détériore, associé au développement d'une incoordination locomotrice : l'animal maigrit, les tremblements sont continus et les lésions de grattage s'accroissent allant jusqu'à l'excoriation et à la formation d'hématomes. L'incoordination locomotrice est caractérisée par une démarche hésitante, incertaine, accompagnée de trébuchements ou d'une chute. Souvent on peut observer une démarche rapide produisant l'allure typique du « mouton qui trotte avec les antérieurs et galope avec les postérieurs ». On note aussi une hypermétrie (l'animal se tient les quatre membres écartés, comme s'il était déséquilibré lors de la station debout).

Malgré un début d'affaiblissement, l'appétit est conservé et la prise de nourriture semble normale. On observe ensuite l'aggravation des troubles moteurs puis une évolution vers un décubitus permanent avant l'issue fatale.

➤ *Diagnostic*

En règle générale le diagnostic de la tremblante est relativement facile lorsque les symptômes deviennent caractéristiques. Beaucoup plus difficile sera la détection des premiers symptômes pour l'éleveur ou le vétérinaire non averti. Ce diagnostic repose aussi sur des données épidémiologiques (régions géographiques et troupeaux où la tremblante est connue, caractère héréditaire de la maladie, cohabitation avec un troupeau ovin atteint...).

La mise au point d'un test ante-mortem, et mieux, ante-clinique est une nécessité en médecine vétérinaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas encore de test validé pouvant être utilisé en pratique courante sur l'animal vivant. Chez le mouton atteint de tremblante, Schreuder et coll (2) ont montré que l'on pouvait détecter par immunocytochimie la PrP^{res} dans les amygdales de moutons dès l'âge de 5 mois soit à la moitié de la durée de la période d'incubation la plus courte connue pour la tremblante. Un autre test, urinaire, non spécifique, a été étudié mais sans une validation permettant de recommander son utilisation en pratique courante. (3).

Au laboratoire, la confirmation d'une suspicion clinique de tremblante est obtenue habituellement avec un examen histologique, même s'il ne représente pas un moyen fiable à 100 p. cent pour confirmer l'existence de la maladie. L'astrocytose, les vacuolisations neuronales ou la spongieuse du neuropile, sans être pathognomoniques des ESST, constituent néanmoins une forte présomption surtout lorsqu'elles sont associées. L'immunohistochimie (méthode permettant la mise en évidence de l'ATNC sur des coupes histologiques avec des anticorps spécifiques) représente une aide importante pour ce diagnostic histologique mais n'est pas encore utilisée en routine.

Dans des laboratoires plus spécialisés bénéficiant d'un microscope électronique l'observation des filaments associés à la tremblante ou « scrapie-associated fibrils » (SAF) peut représenter une aide au diagnostic rapide (48 heures) de la tremblante du mouton. Cette méthode représente pour l'instant le meilleur compromis entre l'utilisation courante et la certitude du résultat.

La souris est sensible à l'ATNC du mouton ou de la chèvre mais le test d'inoculation à cet animal de laboratoire n'est pas toujours fiable pour confirmer la tremblante.

➤ *Modes de contamination*

Bien que le caractère transmissible de la tremblante du mouton ait été montré dès 1936, on peut être surpris du manque de connaissances des scientifiques sur les modalités exactes de cette transmission dans les conditions naturelles. Ceci est lié d'une part à la très longue période d'incubation d'une maladie où de nombreux facteurs de risques peuvent intervenir (effet de la dose infectante, une forte dose entraînant un raccourcissement de cette période, facteurs génétiques...) et d'autre part au coût d'une telle recherche. La transmission de la maladie chez le mouton pourrait être horizontale, de mouton à mouton par l'intermédiaire d'un aliment contaminé mais aussi verticale (contamination de l'agneau pendant la gestation) ou pseudo-verticale (contamination de l'agneau au moment ou juste après l'agnelage). Le risque lié aux transferts d'embryons ou au sperme, a toujours fait l'objet de discussions sans pouvoir être exclu.

Dans les conditions du terrain, la voie orale semble tenir une place privilégiée dans la transmission de la tremblante car la maladie a été reproduite expérimentalement chez le Mouton et chez la Chèvre après l'ingestion de placenta de brebis infectées, reproduisant ainsi une possibilité de contamination dans les conditions naturelles d'un élevage (4). Cependant on ne sait toujours pas si cette contamination se réalise uniquement avec une seule dose infectante ou si de multiples doses relativement faibles peuvent avoir un effet cumulatif. On sait qu'une exposition prolongée d'un agneau au sein d'un troupeau infecté augmentait de façon significative la probabilité d'une transmission horizontale (5): selon la date de la séparation entre l'agneau et sa mère (où, après le sevrage, le troupeau) le risque d'apparition de la tremblante augmente progressivement : 10% à la naissance, 16% à 4 mois (au sevrage), 29% à 9 mois, 41% à 20 mois. Des expériences similaires chez la chèvre ont abouti aux mêmes résultats (5). Ces observations concernant une cohabitation prolongée au sein d'un troupeau atteint permettent de retenir deux hypothèses

- (1) La probabilité d'ingestion par le sujet sain d'une dose infectante efficace augmente avec le temps d'exposition au sein du troupeau;
- (2) De faibles doses infectantes cumulées dans le temps peuvent, à partir d'un certain taux, se révéler efficaces comme c'est le cas pour des intoxications chroniques.

De nombreuses observations confirment la possibilité d'une transmission horizontale dans la tremblante naturelle, qu'il s'agisse de la progéniture de brebis infectées ou d'animaux (moutons ou chèvres) provenant de parents indemnes mis en contact direct avec des sujets atteints dans une bergerie ou sur une pâture (voire contaminés par l'intermédiaire de pâtures où des animaux infectés avaient séjourné) (5).

La transmission horizontale pourrait être liée à une contamination importante de l'environnement du troupeau avec les enveloppes fœtales. Cette hypothèse est confortée par l'expérience de Brown et Gajdusek (6) ayant enterré un cerveau de hamster atteint de tremblante et ayant démontré que la perte de l'infectiosité de l'ATNC avait été relativement faible au bout de trois années. Dans le cas de la tremblante naturelle, la contamination alimentaire pourrait être aussi possible par l'intermédiaire d'un vecteur comme le montre une expérience islandaise en 1996 portant sur les acariens du fourrage.

Avec l'exemple de l'ESB, une contamination des petits ruminants par l'ATNC bovin suite à la consommation des farines anglaises avant leur interdiction (en juillet 1988 au Royaume-Uni et en décembre 1994 en France) ne peut pas être exclue puisque l'on sait que l'on peut reproduire une tremblante en faisant ingérer au mouton comme à la chèvre 0,5g de cervelle bovine infectée (7).

D'autres modes de contamination « accidentels » ont été notés comme, par exemple, chez le mouton, la transmission iatrogène de l'agent infectieux par l'intermédiaire d'un vaccin formolé contre le «*Louping-ill* ». Cette découverte fortuite montra surtout la grande résistance de l'ATNC au formol habituellement utilisé comme désinfectant!

➤ *Prédisposition génétique à la tremblante*

Depuis les premiers travaux de 1990 de Goldman et coll sur le polymorphisme génétique ovin, plusieurs polymorphismes caractérisant une prédisposition à la tremblante sont maintenant connus chez le mouton : la mutation A/V (alanine ou A₁₃₆ → valine ou V₁₃₆), observée sur le codon 136, la mutation R/Q sur le codon 171 (arginine ou R₁₇₁ → glutamine ou Q₁₇₁). D'autres sites de mutation ont été décelés sur le gène PrP du mouton en position 112, 154, 137 et 211.

Ainsi, on peut considérer que l'homozygotie PrP^{ARR} (soit AA₁₃₆/RR₁₅₄/RR₁₇₁) correspond à une « résistance génétique » à la tremblante mais il existe tout de même des exceptions puisque des japonais ont découvert un mouton de race Suffolk homozygote PrP^{ARR} ayant développé une tremblante !

La complexité de ces travaux liés à l'étude du polymorphisme du gène PrP ovin présente néanmoins un intérêt fondamental, celui de pouvoir envisager une sélection génétique des reproducteurs portant les allèles de résistance à la tremblante et peut-être de vérifier s'il existe des formes purement familiales de tremblante dans certains troupeaux (comme dans les ESST humaines). Cependant, selon Hunter et coll (8), la présence de moutons de race Suffolk ou Cheviot très susceptibles génétiquement à la tremblante en Australie et en Nouvelle-Zélande, pays considérés comme indemnes de tremblante, permet de penser que cette maladie ne peut être uniquement génétique et qu'il faut l'intervention d'un facteur infectieux pour qu'elle se déclare.

➤ *Moyens de lutte*

En l'absence de tout traitement efficace sur le terrain, seule l'élimination des animaux atteints et la prévention de l'apparition de la maladie dans les troupeaux peut être envisagée.

I.1.2- Les ESST chez les ruminants sauvages

➤ *La maladie du dépérissement chronique (MDC) des cervidés en Amérique du Nord*

Cette ESST fut décrite chez les cervidés à partir de 1967 dans les parcs du Colorado et du Wyoming aux États-Unis et dans une réserve canadienne. Son origine est inconnue. Elle ne semble pas liée à une contamination par des ovins atteints de tremblante bien que des moutons et des chèvres apparemment sains aient pu cohabiter avec les cervidés. Jusqu'en 1992, cette maladie n'a pas eu de graves répercussions économiques en Amérique du Nord. Cependant cette affection peut représenter un réel problème pour les fermes de cervidés destinés à une consommation humaine.

➤ *Les ESST des ruminants sauvages dans les parcs zoologiques britanniques*

On peut remarquer que la MDC n'a été décrite chez les cervidés que sur le continent américain (États-Unis et Canada). En ce qui concerne les cas observés chez les cervidés de zoo au Royaume-Uni ceux-ci sont liés à une contamination par l'agent de l'ESB présent dans les farines de viandes. Le premier cas fut observé chez un Nyala en 1985. D'autres espèces furent contaminées comme le gemsbok, l'élan du cap, l'oryx d'Arabie et le grand koudou. Aucune affection de ce type n'a été observé dans les parcs zoologiques en France.

Enfin, citons également l'observation de six cas de tremblante dans deux troupeaux de mouflons (ou moutons sauvages) au Royaume-Uni.

I.1.3- L'encéphalopathie spongiforme bovine

Si les descriptions des ESST chez les petits ruminants ou les ruminants sauvages n'eurent guère de retentissement, il en fut tout autrement à partir de 1987 avec l'annonce de l'ESB au Royaume-Uni du fait de l'importance du nombre de bovins atteints et des retombées économiques de cette affection pour le pays touché.

La maladie bovine s'est révélée très proche par ses aspects cliniques de la tremblante du mouton. Mais alors que, chez le mouton, il semble que la tremblante puisse être due à différentes souches d'ATNC, il n'en est pas de même pour l'ESB pour laquelle une seule souche semble avoir été reconnue, tout du moins de façon prédominante.

➤ *Épidémiologie de l'ESB*

L'encéphalopathie spongiforme bovine fut observée pour la première fois entre avril 1985 et février 1986 chez neuf vaches dans un même troupeau. Avec l'apparition de nouveaux cas les épidémiologistes anglais constatèrent rapidement que le seul facteur commun à tous les bovins atteints par l'ESB était l'apport de

Avant 1981/82	1981/82	1985/86	Juillet 1988
Pas de maladie	Pas de maladie	Maladie	Maladie
Exposition à l'agent dans l'aliment insuffisante pour provoquer la maladie	Augmentation de l'exposition à l'agent dans l'aliment permettant une contamination	La contamination réalisée en 1981/82 conduit, après 4 à 5 ans d'incubation, à la maladie en 1985/86	Arrêt de la contamination par l'aliment par décision réglementaire
Minimum de recyclage de tissu bovin infecté	Augmentation de la quantité de tissu bovin infecté recyclé (taux relativement faible)	Recyclage important de tissu bovin infecté provoquant une augmentation importante du nombre de cas d'ESB en 1989	Pas de recyclage

Tableau II. *Origine de l'épidémie d'ESB (18)*

farines de viandes et d'os (FVO) (cf. tableau II), L'hypothèse retenue fut alors celle d'une contamination par des carcasses de moutons atteints de tremblante, mais rien n'exclut formellement l'hypothèse d'un agent bovin primitif amplifié par le recyclage des carcasses de bovins.

Depuis la mise en place en juin 1988 de la surveillance épidémiologique de cette nouvelle maladie jusqu'en juin 1998, on a enregistré 171 789 cas en Grande-Bretagne (174 781 cas pour le Royaume-Uni dont 1770 pour l'Irlande du Nord) (9). La figure 1 nous montre que l'interdiction des farines contaminées en juillet 1988 s'est révélée efficace puisque, après 5 années d'incubation en moyenne, on observe une décroissance des cas d'ESB à partir de 1993. Après 10 ans, 35 p. cent des fermes n'ont eu qu'un seul cas alors que 69 % ont eu 4 cas ou moins. Il est cependant difficile d'estimer parfaitement tous les aspects épidémiologiques de l'ESB au Royaume-Uni si l'on tient compte des chiffres du « Ministry of Agriculture, Fisheries and Food » (MAFF) rapportant le nombre de cas d'ESB dans certaines fermes atteintes et révélés dans le « Farmers Weekly » du 12 avril 1996 (tableau III). Il s'agit de la première publication signalant un grand nombre de cas d'ESB supérieur à 10 dans plusieurs troupeaux. Aucune étude épidémiologique n'a été publiée pour le moment à propos de ces fermes (dont nous ne connaissons pas les effectifs actuels ou cumulés depuis 1986) ayant présenté plus de 10 cas. Les quelques fermes ayant un grand nombre de cas pourraient être exclues de cette étude épidémiologique car il est possible qu'il s'agisse plutôt de « fermes ESB » ayant « recueilli » les cas de suspicion de quelques fermiers peu scrupuleux désirant garder le statut de « fermes indemnes » leur permettant d'exporter leurs produits. L'absence d'identification pérenne des bovins anglais pouvait permettre cette fraude.

Fin août 1996, une étude statistique sur l'épidémiologie de l'ESB tenant compte de plusieurs variables comme la période d'incubation de l'ESB, la possibilité de contamination et la susceptibilité à différents âges, la démographie de la population bovine au Royaume-Uni, a permis de noter (10) :

	Nombre de cas	Nombre de fermes
	1-10	29 599
	11-20	2 607
	21-30	704
	31-40	225
	41-50	89
	51-60	31
	61-70	12
	71-80	5
	81-90	3
	91-100	1
	Plus de 100	2

Tableau III: Cas d'ESB confirmés au Royaume-Uni en 1996 (Nombre total des cas=159320)

- (1) la diminution progressive de l'effectif du cheptel britannique de 1974 (13,6 millions de têtes) à 1995 (9,5 millions de têtes) ;
- (2) le risque maximal de contamination est estimé surtout vers l'âge de 1, 31 ans ;
- (3) l'aliment a été infectant surtout en 1988 au Royaume-Uni (figures 1 et 2) ;
- (4) le nombre d'animaux atteints par transmission maternelle serait de 5100 jusqu'à la fin de 1995 puis de 340 pour la période allant de 1996 à 2001.
- (5) quel que soit le risque de transmission maternelle, une évolution vers l'extinction de l'ESB est observée virtuellement pour l'année 2001.

Dès 1988, dans certains pays, on pouvait s'attendre à l'apparition de cas d'ESB « importés » chez des bovins d'origine britannique ou de cas d'ESB « autochtones » ayant été contaminés par des farines anglaises. Ceci a été observé dès 1989 en République d'Irlande (305 cas en octobre 1998) puis progressivement dans d'autres contrées comme la Suisse (292 cas en octobre 1998), la France (43 cas en octobre 1998), le Portugal (157 cas en octobre 1998) puis, en 1997, la Belgique (6 cas), les Pays-Bas (3 cas), Luxembourg (1 cas) et en 1998 le Liechtenstein (1 cas) (figure 3). Les quelques cas « importés », plus sporadiques, ont été signalés au sultanat d'Oman (2 cas en 1989), aux Iles Malouines (un cas en 1989), au Danemark (un cas en 1992), en Allemagne (6 cas depuis 1992), au Canada (un cas en 1993) en Italie (2 cas en 1994) (11).

Si l'on compare l'évolution de l'épidémie des cas européens avec celle de la Grande Bretagne, où l'on observe une décroissance à partir de 1993, on note :

- (1) que cette décroissance des cas d'ESB n'est observée qu'une année plus tard dans le reste du Royaume-Uni et trois ans plus tard en Suisse ;
- (2) que d'autres pays européens ne présentent pas une diminution du nombre de leur cas en 1996 mais au contraire une spectaculaire augmentation ;

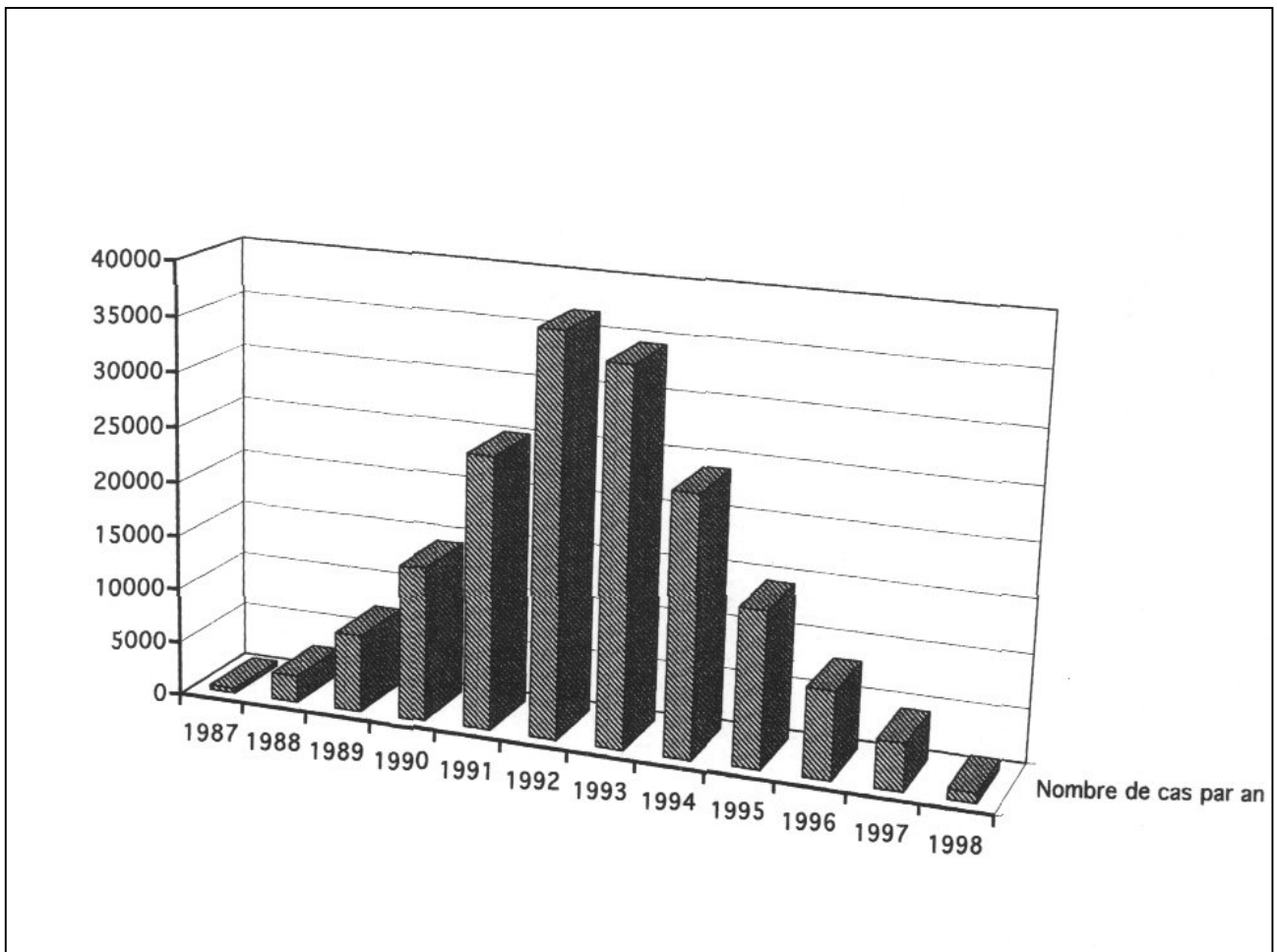


Figure II-1. Nombre de cas d'ESB par an en Grande Bretagne (en juin 1998)

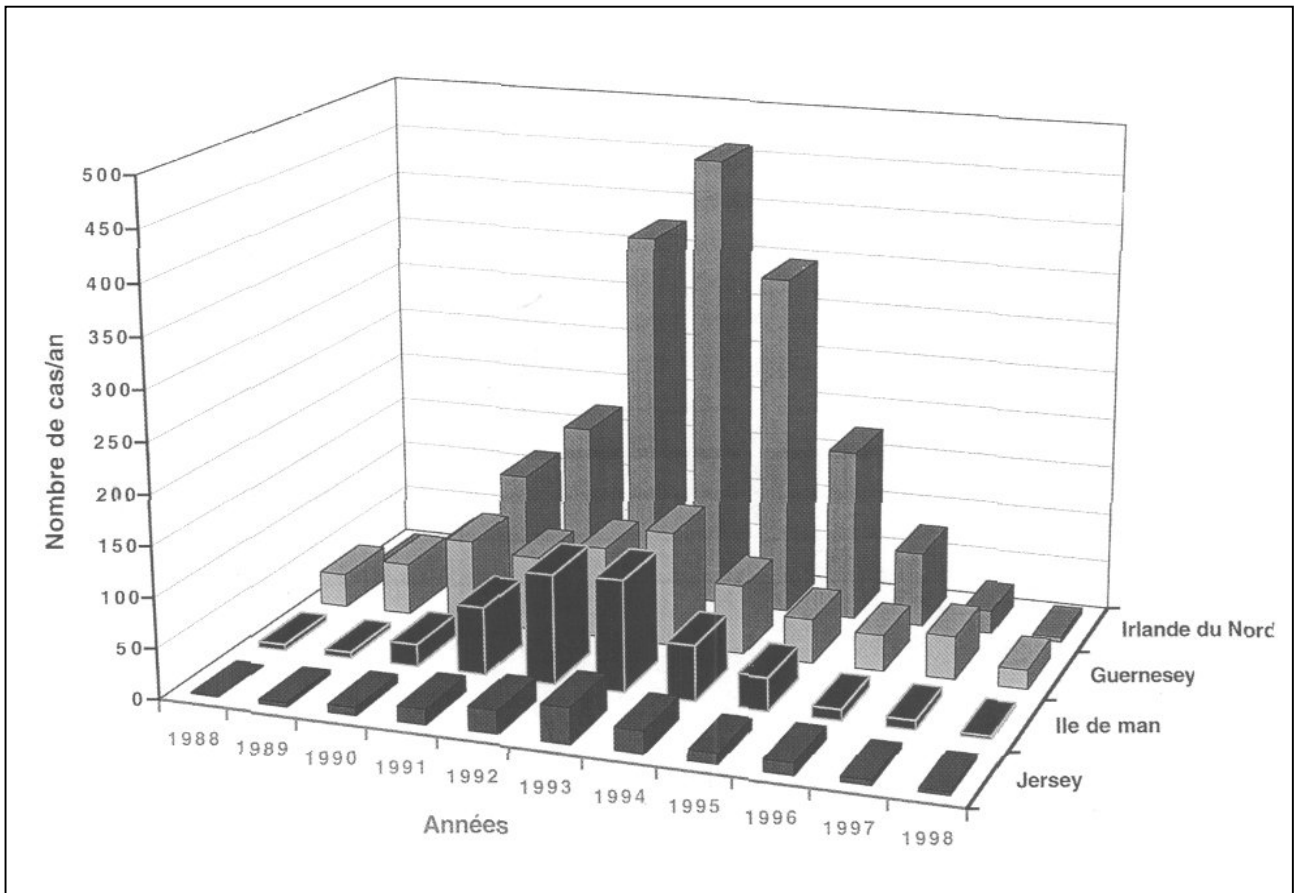


Figure II-2. Nombre de cas annuels d'ESB au Royaume-Uni hors de Grande-Bretagne en juin 1998

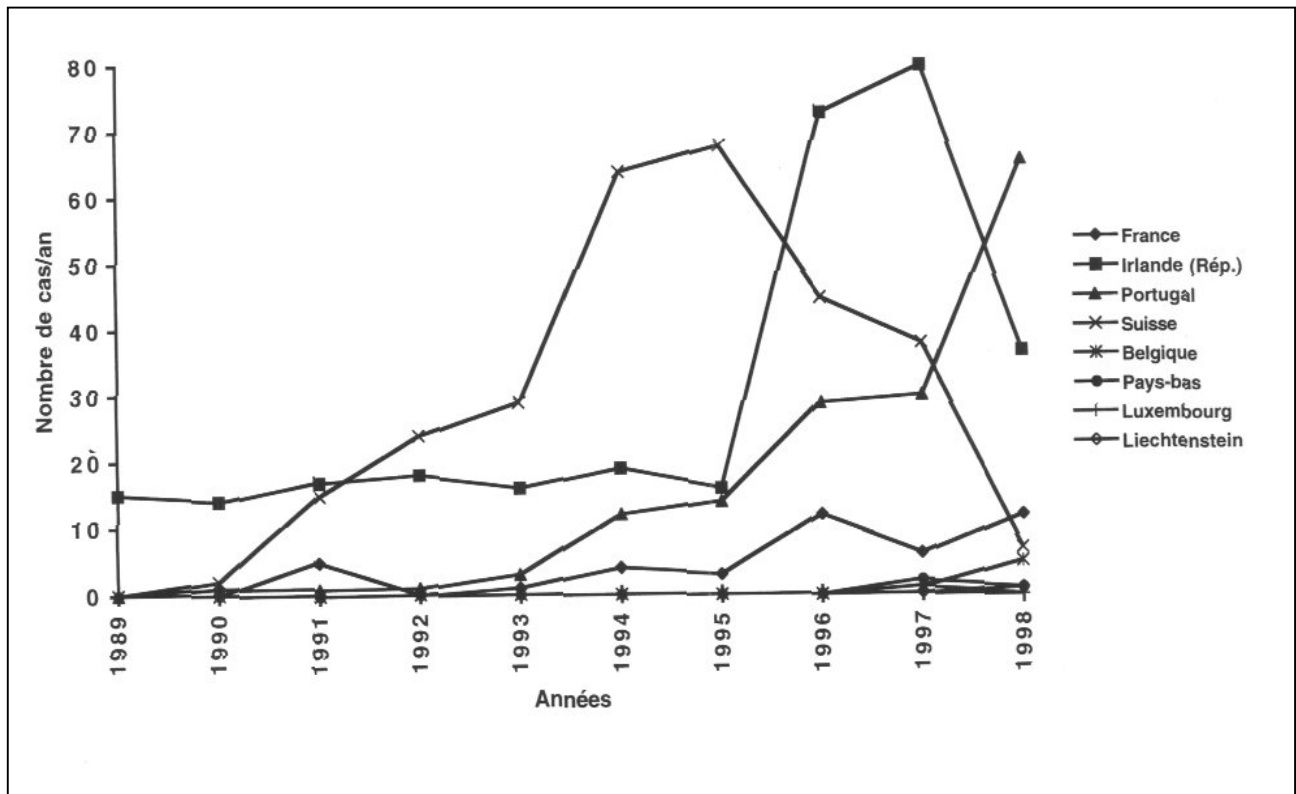


Figure II-3. Cas d'ESB observés en Europe (hors Royaume-Uni) en octobre 1998

Date de la 1ère déclaration	Pays	Cas d'ESB déclarés	Cas importés déclarés	Cas importés estimés
1989	Irlande	229	12	911
1989	Iles Malouines	1	1	-
1989	Oman			
1990	Suisse	262	0	0
1991	France	29	0	32
1992	Danemark	1	1	29
1992	Allemagne	6	6	243
1993	Canada	1	1	0
1994	Portugal	82	7	262
1994	Italie	0	2	50
1997	Pays-bas	2	0	44
1997	Belgique	1	0	17
-	Espagne	0	0	54

Tableau IV : Cas d'encéphalopathie spongiforme bovine confirmés dans certains pays (11,12).

- (3) que le nombre de cas d'ESB « importés » est relativement faible dans les pays atteints si l'on tient compte de l'estimation de près de 1700 bovins anglais atteints parmi les 57 600 bovins ayant été exportés vers les autres pays européens (cf. tableau IV) (12).

Rappelons également une suspicion aux États-Unis chez des vaches abattues à la suite d'un « syndrome de la vache couchée », qui montre que l'ESB pourrait reconnaître d'autres origines que les farines anglaises contaminées. Ceci est tout à fait vraisemblable si l'on rappelle le cas de « tremblante sur un bœuf » observé en France en 1883 (13).

➤ *Animaux asymptomatiques entrés dans la chaîne alimentaire*

Les chiffres précités ne correspondent qu'aux cas cliniquement décelés (en fin d'évolution de l'ESB), déclarés aux autorités sanitaires et non aux bovins en phase d'incubation de l'ESB, abattus avant l'apparition des signes cliniques. En effet, l'âge d'abattage des bovins étant souvent inférieur à 3 ans alors que la durée moyenne de la période d'incubation est de 5 ans, il y a certainement eu une introduction de bovins, contaminés et asymptomatiques dans la chaîne alimentaire. Chez ces bovins, certains tissus pouvaient représenter un risque potentiel de contamination pour l'homme avant la mise en place progressive des mesures de précaution que nous connaissons maintenant. Près de 446 000 bovins ont pu être consommés avant l'interdiction des abats potentiellement dangereux à la fin de 1989 puis près de 283 000 bovins avant la fin de 1995 (10). Le nombre total de bovins infectés depuis le début de la contamination (à la fin des années 70) jusqu'à la fin de 1995 pourrait être égal à 903 000. Il importe surtout maintenant d'évaluer combien d'encéphales (ou autres tissus potentiellement infectants) ont pu être incorporées (volontairement ou accidentellement) dans des préparations de « viande » (hamburger ? pâtés ?...) destinées à l'alimentation humaine.

➤ *Cas d'ESB « nés après l'interdiction des farines » (NAIF)*

Avec l'arrêt de l'apport de farines de viande et d'os dans l'alimentation des ruminants anglais depuis juillet 1988, on pouvait espérer la disparition progressive des cas d'ESB chez les bovins. Ce ne fut pas le cas pour 36 522 bovins nés après cette date et recensés au 12 juin 1998. L'apparition de ces cas « nés après l'interdiction des farines » ou NAIF peut être expliquée

- par l'utilisation des stocks de farines de viandes restant dans les fermes dans les mois qui suivirent l'interdiction;
- par des contaminations croisées du fait de l'utilisation de ces FVO anglaises dans l'alimentation des porcs et des volailles (l'interdiction totale des farines pour l'alimentation des animaux de rente au Royaume-Uni en 1996 permettra de vérifier cette hypothèse) ;
- par une éventuelle transmission verticale du prion bovin de la vache au veau ;
- par une transmission horizontale (contamination de l'environnement ? contamination par ingestion du colostrum ?...).

L'apparition de cas NAIF nés en 1992, 1993 ou 1994 ne permet pas de retenir une contamination exclusivement par les farines. La possibilité d'une transmission verticale ne peut plus être exclue sans pour autant que l'on puisse expliquer les modalités de cette transmission (génétique ? contamination *in utero* ? transmission périnatale par l'intermédiaire des enveloppes fœtales ou du colostrum ?...). La transmission par le lait semble peu probable dans la mesure où celle-ci n'a jamais été démontrée dans le Kuru, la tremblante ou les élevages de bovins allaitants. On n'a pas vérifié s'il existait des routes très spécifiques de transmission périnatale. Seules des inoculations par la voie conjonctivale et par la voie orale avaient permis de reproduire la tremblante. La possibilité d'une contamination liée à une atteinte cutanée a souvent été évoquée, comme la plaie ombilicale chez l'agneau ou la morsure chez le vison d'élevage (en particulier au moment des repas). Gajdusek avait d'ailleurs souligné que la transmission du Kuru, attribuée à un endocannibalisme, pouvait être aussi due à une contamination au niveau d'érosions cutanées ou muqueuses, en particulier lors de grattage de nez ou de frottement des yeux. Il a d'ailleurs été démontré que la contamination par scarification pouvait présenter une efficacité comparable à celle de la voie intrapéritonéale, intraveineuse ou périverneuse (alors que le dépôt d'une dose sur la peau saine ne provoque pas d'infection).

➤ *Symptômes*

Les symptômes apparaissent après une longue période d'incubation (5 ans en moyenne). C'est pourquoi la maladie sera surtout observée dans les élevages de vaches laitières.

Lorsque l'ESB apparaît dans un élevage, l'attention de l'éleveur est attirée en premier lieu par une modification du comportement de l'animal. La vache est nerveuse (craintive), refuse d'entrer dans la salle de traite ou peut réagir violemment par des coups de pied lors d'une manipulation. Elle reste à l'écart du troupeau au pâturage. Parfois elle peut devenir franchement agressive. D'autres symptômes neurologiques apparaissent avec des troubles locomoteurs ou des anomalies de posture. Des troubles de la sensibilité seront aussi observés (appréhension, hyperesthésie, grincements de dents, prurit...). Les symptômes s'aggravent progressivement vers une issue toujours fatale.

➤ *Diagnostic*

Le diagnostic clinique de l'ESB est relativement facile en raison de l'évolution subaiguë de cette maladie. La confirmation expérimentale des cas d'ESB s'effectue encore après la mort de l'animal, par l'examen des lésions histologiques. L'examen des prélèvements, effectués au niveau du bulbe, permet de reconnaître l'ESB avec une quasi-certitude. Les lésions sont caractéristiques, avec une spongieuse du neuropile, une gliose et une vacuolisation neuronale souvent importante dans les cas d'ESB.

L'observation au microscope électronique des filaments associés à la tremblante ou à l'ESB ou « scrapie-associated fibrils » (SAF) représente également une aide au diagnostic rapide (en 48 heures) de ces affections mais cette technique n'est pas utilisée en routine. Le diagnostic peut être aussi confirmé par la recherche de la protéine « prion » pathologique par Western-blot à partir d'homogénats de cerveau.

Comme pour la tremblante, il n'existe pas encore de test validé permettant de confirmer les suspicions d'ESB avant la mort de l'animal ou mieux, de dépister les bovins asymptomatiques. Seuls des tests non spécifiques ont été utilisés : le marqueur urinaire fait encore l'objet d'études alors que le marqueur protéique 14-3-3, retrouvé dans le liquide céphalorachidien ne permet plus d'espérer une détection précoce des bovins en début de phase clinique d'ESB (14).

I.2- Encéphalopathie transmissible du vison d'élevage

Contrairement aux ESST des ruminants, l'encéphalopathie transmissible du vison (ETV) est rare et purement accidentelle car elle n'a été observée que dans des fermes élevant des visons contaminés par leur nourriture (à base de carcasses de ruminants ne pouvant être utilisées pour la consommation humaine).

L'ETV représente un excellent exemple de cul-de-sac épidémiologique pour ces encéphalopathies transmissibles animales liées à une contamination par l'alimentation. Depuis la première description de cette maladie en 1947 dans deux élevages américains du Wisconsin et du Minnesota, quelques cas ont été décrits aux Etats-Unis (en 1961 et 1963), au Canada (en 1963) puis en Finlande (en 1965) ainsi qu'en Allemagne (en 1970) et en Russie (en 1974) (15).

A l'heure actuelle, chez le vison, aucune mutation responsable de la maladie, ni aucun polymorphisme lié à la résistance ou la susceptibilité à cette pathologie n'ont été décrit

En règle générale on considérait que l'ETV était surtout la conséquence d'une alimentation avec des carcasses de moutons atteints de tremblante en raison des symptômes rappelant la maladie du mouton qui était alors la seule ESST animale connue jusqu'en 1980. Mais, curieusement, en 1985, l'apparition de cette maladie à Stetsonville aux États-Unis dans un élevage de visons n'ayant consommé que des carcasses de bovins suscita l'intérêt de l'équipe américaine de Marsh et coll d'autant plus que l'éleveur était sûr de n'avoir jamais donné de viande ovine à ses visons. Au contraire, il récupérait des carcasses provenant de vaches abattues suite à un « syndrome de la vache couchée ». Ce syndrome est observé le plus souvent chez des vaches relativement grasses couchées trop longtemps à la suite d'une affection métabolique (hypocalcémie) ou après un vêlage difficile ayant entraîné des lésions neuromusculaires, mais peut comprendre d'autres causes de paralysie, y compris des neuropathies d'origine infectieuse.

En effet, Marsh et coll avaient déjà noté que la sensibilité du vison à plusieurs souches d'ATNC de diverses origines (moutons anglais ou américains, chèvre anglaise, souris) pouvait être très variable: avec les différentes souches ovines inoculées, soit le vison était résistant (cas des souches anglaises), soit il ne présentait pas une maladie aussi rapidement que dans les conditions naturelles (c'est-à-dire avec un temps d'incubation de 7 à 12 mois). On peut aussi remarquer que d'une part, les essais de contamination par la voie orale du vison avec des souches américaines de tremblante ovine (et non des souches anglaises) n'ont jamais été positifs et d'autre part, les premiers cas d'ETV ont été observés aux États-Unis avant les premières descriptions de la tremblante dans ce pays. L'incident de Stetsonville amena Marsh et Hartsough à orienter leurs recherches vers l'hypothèse d'une maladie bovine semblable à la tremblante à l'origine de l'ETV. Cette hypothèse fut vérifiée avec l'inoculation intracérébrale d'un ATNC vison à deux bovins. Ceux-ci présentèrent une encéphalopathie spongiforme 18 et 19 mois plus tard et les visons ayant ingéré le cerveau de ces bovins ont présenté une ETV en 7 mois (16).

Cette étude est importante pour deux raisons : (1) il s'agit de la première reproduction expérimentale d'une ESST chez un bovin; (2) cette forte suspicion d'une ESB aux États-Unis avant l'épidémie catastrophique au Royaume-Uni témoigne de la possibilité de quelques rares cas sporadiques (familiaux ? spontanés ?) de cette maladie bovine dans de nombreux pays.

L'ESST du vison n'est rencontrée que de façon sporadique mais, lorsqu'elle apparaît, cette affection est une catastrophe pour l'élevage atteint : le taux de mortalité dépasse souvent 50%, pouvant atteindre 100%. Chez le vison, la maladie apparaît insidieusement, après 7 à 12 mois d'incubation, avec un changement du comportement (hyperexcitabilité, hyperesthésie, augmentation de l'agressivité). L'animal délaisse les endroits habituels pour les défécations. A ce stade, on remarque une baisse de la consommation alimentaire puis, en quelques jours, des troubles locomoteurs (perte d'équilibre) avec des chutes sur le côté, souvent un état hébété, parfois des tremblements. Au fur et à mesure de l'évolution, l'ataxie locomotrice s'aggrave, le vison mord tous les objets à sa portée (on peut aussi observer une automutilation sévère). La mort survient 2 à 7 semaines après le début des signes cliniques.

I.3- Encéphalopathie spongiforme féline

Avec l'annonce, le 10 mai 1990, d'une encéphalopathie spongiforme transmissible chez Max, un chat siamois anglais, nous avons connu la première crise médiatique importante concernant l'ESB. C'était la première fois que l'on observait une encéphalopathie spongiforme dans les conditions naturelles chez le chat. Cette maladie féline, ainsi que la démonstration d'une transmission expérimentale de l'agent bovin au porc (uniquement par la voie intracérébrale) 6 mois plus tard, furent à l'origine de l'interdiction des abats bovins spécifiés dans l'alimentation des animaux (bétail et animaux de compagnie). Si le chat s'était révélé sensible expérimentalement à l'agent de la MCJ il faut remarquer qu'il n'avait jamais été possible de lui transmettre la tremblante ou le Kuru. C'est pourquoi on suspecta rapidement une origine bovine à cette ESST féline, ce qui fut confirmé. L'étude de ces cas d'ESF est particulièrement importante dans la mesure où l'on a observé la contamination d'une famille et d'espèces jusque-là indemnes par un agent nouveau en médecine vétérinaire.

Depuis 1990, d'autres cas d'ESF ont été signalés chez des chats domestiques britanniques. En septembre 1998, le nombre de chats domestiques ayant présenté une encéphalopathie spongiforme féline (ESF) est de 85 en Angleterre, trois autres cas ayant été signalés l'un en Irlande du Nord, l'autre en Norvège et le troisième au Liechtenstein (9). D'autres félidés sauvages (tigre, ocelot, guépard et puma) se révéleront également atteints par cette affection dans des parcs zoologiques au Royaume-Uni ou à la suite d'une importation du Royaume-Uni, comme ce fut le cas pour un guépard importé dans un zoo français et ayant déclaré la maladie au début de l'année 1997.

La maladie naturelle affecte des chats adultes, le plus souvent à partir de l'âge de 4 ans. Les principaux symptômes sont représentés par des troubles locomoteurs (ataxie) et des modifications du comportement (agressivité, arrêt du toilettage, prostration), une hyperesthésie et des tremblements musculaires. Généralement, après trois mois d'observation de ces symptômes s'aggravant progressivement, les propriétaires souhaitent l'euthanasie de leur animal.

■ II. RISQUES DE TRANSMISSION DES ESST ANIMALES À L'HOMME

Bien que les ESST animales soient connues depuis longtemps il a fallu attendre les années trente pour découvrir avec les vétérinaires français Cuillé et Chelle que la tremblante était transmissible. En 1959, un vétérinaire américain, Hadlow, attira l'attention sur la similarité des lésions histologiques observées dans la tremblante et le Kuru. Il écrivit alors à Gajdusek de vérifier la transmissibilité ou non de cette affection humaine au singe. Avec la démonstration de la transmissibilité du Kuru dans les années soixante apparaissait la notion du risque d'une contamination pour l'homme, tout d'abord avec la tremblante du mouton puis surtout avec l'ESB. Pour mieux évaluer ce risque, il faut connaître les tissus animaux potentiellement infectants, ceci afin de mettre en place les mesures de précaution nécessaires à éviter tout risque de contamination pour l'homme. La divergence entre les mesures prises ou non prises dans les différents pays européens ou aux réunions de la communauté européenne témoigne des difficultés rencontrées pour évaluer le risque d'une transmission de la « maladie de la vache folle à l'homme » face à un consommateur demandant le « risque zéro »

I.1- Classement des tissus infectants

Pendant la durée d'incubation de la maladie on sait que l'agent se réplique tout d'abord dans les cellules mononucléées du sang et des tissus lymphoïdes. La colonisation du système nerveux central s'effectue vraisemblablement par la voie des nerfs splanchniques (la progression de l'ATNC y a même été estimée à près d'un mm par jour) et aussi par le nerf pneumogastrique. Si, dans la rate, l'infectiosité atteint un plateau persistant jusqu'à la mort de l'individu, il n'en est pas de même dans le système nerveux central où cette infectiosité, apparue plus tardivement, progresse de façon exponentielle. L'étude de l'infectiosité des tissus (connue surtout dans le cas de la tremblante du mouton) a permis un classement par l'O.M.S. des tissus à risque. Cependant, ce classement ne tient pas compte de la phase pré-clinique de la maladie où des tissus lymphoïdes peuvent se révéler plus infectants que le système nerveux central, le titre infectieux étant cependant moins élevé chez un animal apparemment sain (tableau V) ! Des discussions sont actuellement en cours à Bruxelles pour reclasser ces « matériaux à risques ».

I.2- Les mesures de précaution pour limiter les risques liés aux ESST

➤ Mesures prises avant le 20 mars 1996

Si, en mars 1989, le rapport Southwood fut l'un des premiers à mettre en évidence un risque pour l'homme en signalant aux vétérinaires la possibilité d'une contamination lors des vélages en raison de l'infectiosité des placentas déjà connue chez le mouton, il fallut attendre le 13 novembre 1989 pour que l'on interdise pour la consommation humaine, en Angleterre et dans le Pays de Galles, les « abats bovins spécifiés » ou ABS (cerveau, moelle épinière, thymus, amygdales,

	Phase préclinique	Phase clinique
CATÉGORIE I Titre infectieux important		Cerveau Moelle épinière Œil °
CATÉGORIE II Titre infectieux moyen	<i>Ganglions lymphatiques (GL) Rate, amygdales, iléon Colon</i>	GL, Rate, amygdales, iléon Colon (proximal) <i>Hypophyse</i> <i>LCR</i> <i>Surrénales</i> ° <i>Placenta</i> °
CATÉGORIE III Titre infectieux faible (IIIa) Titre infectieux minime (IIIb)	<i>GL, Colon</i> <i>Thymus</i> <i>Nerf sciatique</i> <i>Cerveau</i>	Colon (distal) Hypophyse Nerf sciatique Muqueuse nasale Surrénales Thymus, moelle osseuse LCR, foie, poumons, Pancréas
CATÉGORIE IV Pas de titre infectieux détectable		Muscles squelettiques*, cœur Mamelle, colostrum*, lait Caillot sanguin*, sérum, fèces Rein, thyroïde, glandes salivaires*, salive Ovaire*, utérus*, testicules, vésicules séminales

* Titre infectieux décelé de façon anecdotique (dont certains cas demandant une confirmation)

° Tissu non signalé dans le classement de l'OMS

En italique: classements différents de celui de l'OMS (phase préclinique ou changement de catégorie)

Tableau V : Classification des tissus en fonction de leur titre infectieux dans les encéphalopathies transmissibles

intestins et rate) provenant de bovins âgés de plus de 6 mois. Pour beaucoup, il s'agissait d'une mesure de précaution suffisante car l'on se reposait sur la notion de barrière d'espèce, souvent évoquée pour expliquer l'absence apparente d'une transmission de la tremblante du mouton à l'homme. Mais, après les expériences de transmission de l'ESB par voie orale à la souris ou par voie intracérébrale ou intraveineuse au bovin, l'annonce, le 10 mai 1990, d'un premier cas naturel d'encéphalopathie spongiforme féline (ESF) chez un chat anglais, fut à l'origine de la première prise de conscience d'un risque éventuel pour l'homme. La crainte augmenta quelques mois plus tard avec la démonstration d'un autre franchissement de la barrière d'espèce lors de l'inoculation intracérébrale de porcs. C'est alors que ces mêmes ABS provenant de bovins âgés de plus de 6 mois furent interdits à la fois dans les aliments du bétail et à l'exportation dans les autres pays européens en septembre 1990 (l'interdiction d'exportation des ABS britanniques vers les pays tiers sera prise encore plus tard en juillet 1991).

Les spécialistes britanniques avaient considéré que l'interdiction de ces ABS provenant de bovins âgés de plus de 6 mois était suffisante pour protéger le consommateur en tenant compte des connaissances acquises avec la tremblante du mouton et du fait que l'agent de l'ESB n'était retrouvé que dans le système nerveux central des bovins atteints dans les conditions naturelles. En fait, il faut aussi souligner que ceci permettait l'exportation de veaux vivants en Europe continentale, les anglais étant fort peu consommateurs de la viande de ces animaux. Depuis 1990, nous avons eu souvent l'occasion de souhaiter l'extension de l'interdiction des ABS (en particulier de nature lymphoïde) aux veaux de moins de 6 mois importés sur notre territoire par mesure de précaution. Cette mesure ne fut en fait appliquée qu'au Royaume-Uni en 1994, quand les scientifiques britanniques démontrèrent que l'on pouvait retrouver l'agent de l'ESB dans l'iléon de veaux inoculés par la voie orale. Paradoxalement, en France, un arrêté ministériel du 1er juin 1995 autorisait même l'importation à partir du Royaume-Uni de ces abats sur notre territoire. La possibilité d'une transmission maternelle de la vache au veau (maintenant démontrée sans que l'on en connaisse les modalités) pouvait justifier cette mesure, les tissus lymphoïdes pouvant se révéler plus infectants que le système nerveux central au début de la phase d'incubation de la maladie (cependant avec des titres relativement faibles). La notion de tissus infectants en phase préclinique aurait dû être prise en compte par l'OMS en raison du jeune âge d'abattage de beaucoup de bovins, souvent inférieur à 2 ans, lors de l'établissement de la liste des tissus infectants à partir des données connues dans la tremblante du mouton.

Dans le domaine de la santé publique, les médecins s'intéressaient davantage au risque iatrogène rencontré dans la MCJ en particulier lorsqu'il s'agissait des produits dérivés du système nerveux central. Le problème du risque transfusionnel fut évoqué en France à partir de 1992. Quant à l'ESB, c'est surtout vers la fin de l'année 1995 que le risque de transmission à l'homme fut de nouveau une question d'actualité au Royaume-Uni du fait de l'atteinte de 4 fermiers et de deux adolescents. Alors que le nombre de cas d'ESB déclarés par jour était en décroissance, les anglais, découvrant que la législation sur les ABS n'était pas parfaitement appliquée dans les abattoirs, renforcèrent leurs mesures de précaution.

➤ *Mesures prises après le 20 mars 1996 (jusqu'en décembre 1997)*

A partir du 20 mars 1996, l'annonce officielle d'une possible relation entre l'ESB et la nv-MCJ au Royaume-Uni déclencha un véritable cyclone, à l'origine de la prise en compte de multiples mesures de précaution dans de nombreux pays, la France en particulier, qui fut la première à demander un embargo sur tous les produits bovins d'origine anglaise. Cet embargo a ainsi amené la suspicion sur certains produits considérés jusqu'alors comme produits à risque potentiel extrêmement faible comme la gélatine, le sperme, les suifs...

Par ailleurs, les recommandations du comité interministériel français sur les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) et les prions, mis en place en avril 1996, ont été à l'origine de nombreux textes réglementaires destinés à prendre toutes les précautions nécessaires face à l'incertitude d'un risque, certes toujours non démontré, mais que l'on ne peut plus ignorer.

Parmi ces mesures nous soulignerons surtout les textes de juin 1996 concernant la préparation des farines de viandes :

- préparation à partir d'une matière première saine, provenant du cinquième quartier, en excluant les saisies d'abattoirs et les cadavres ;
- contrôle des circuits des farines destinées à l'alimentation animale et des farines « à risque » destinées à être incinérées, les contaminations croisées (voire une utilisation frauduleuse de ces farines) étant évoquées par les anglais pour expliquer le grand nombre de cas « nés après l'interdiction des farines » (NAIF). Les farines ne seront distribuées qu'aux animaux de rente (porcs, volailles, lapins, poissons) pour lesquels aucune ESST n'a jamais été décrite dans les conditions naturelles.

D'autres mesures se rapportent au risque lié à l'éventuelle consommation par l'homme de tissus infectants. C'est ainsi que les ABS de vaches ayant pu ingérer des farines anglaises, ont été interdits avec une marge de sécurité d'une année (bovins nés avant 1991). On peut remarquer que cette liste d'ABS comporte le thymus, inexistant chez une vache adulte.

La possibilité d'un passage de l'agent bovin au mouton a été également pris en compte (il suffit de 0,5g de cervelle bovine pour infecter par la voie orale un mouton et les farines n'ont été interdites qu'en 1994 chez les petits ruminants). Le système nerveux central des sujets âgés de plus d'un an est interdit à la consommation. Cependant, si le danger lié à la tremblante est démontré, il serait alors logique d'interdire le système nerveux à un âge beaucoup plus jeune ainsi que les tissus lymphoïdes (3 mois).

➤ *Efficacité des mesures de précaution*

Les mesures prises depuis l'apparition de l'ESB permettent de considérer que le risque a été surtout important avant l'interdiction des abats spécifiés potentiellement dangereux dans l'alimentation humaine (en 1989 en Angleterre puis en 1990 en Europe continentale). Cependant, d'autres possibilités de contamination ont été possibles, en particulier avec les viandes séparées mécaniquement ou VSM (la colonne vertébrale ne fut interdite dans les VSM qu'en décembre 1995 au Royaume-Uni). De plus, lors de l'abattage des bovins (étourdissement au pistolet pneumatique), on a pu retrouver des embols de tissu nerveux dans l'artère pulmonaire... Par ailleurs, on peut remarquer que les ganglions lymphatiques n'ont jamais été, comme les amygdales, classés parmi les abats bovins spécifiés ABS alors que l'on connaît expérimentalement leur infectiosité chez le mouton.

Enfin, il faut se rappeler que l'ESB était avant son apparition sûrement une maladie rare chez les bovins. Elle devrait redevenir rare mais ne disparaîtra pas totalement.

En octobre 1998, alors que le nombre de cas de nv-MCJ a augmenté (29 cas dont un français), la persistance de la crise médiatique est liée à l'impossibilité de connaître combien de personnes ont pu être contaminées, en particulier au Royaume-Uni car de nombreuses incertitudes demeurent :

- dans quelles conditions ce type de contamination a-t-elle pu se réaliser (aliment à risque, dose infectante...) ?

- quel est le nombre de personnes pouvant avoir été potentiellement contaminées ? En raison du faible nombre de cas observés et de la méconnaissance de la période d'incubation de la nv-MCJ, il n'existe pas de paramètres permettant une épidémiologie prédictive. Un article récent a souligné les difficultés d'une telle prédiction avec des chiffres variant, selon les paramètres hypothétiques retenus, de 75 cas à près de 80 000 (17).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell L, Drummond D., Suttie A., McCardie L., Chree, Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J. Transmissions to mice indicate that « new variant » CJD is caused by the BSE agent *Nature*, 1997 ; 389 : 498-501
- (2) Schreuder B.E.C., Van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M., Smits M.A. Tonsillar, Biopsy and PrP^{Sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie *Vet. Rec.*, 1998 ; 142 : 564-568
- (3) Brugère H., Banissi C., Brugère-Picoux, J., Chatelain J., Buvet R. Recherche d'un témoin biochimique urinaire de l'infection du Mouton par la tremblante. *Bull Acad Vét de France*, 1991; 64 : 139-145
- (4) Pattison I.H., Hoare M.N., Jebbett J.N., Watson W.A, Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep *Vet Rec*, 1972; 90 : 465-468
- (5) Hourrigan J.L., Klingsporn A.L. Scrapie : Studies on vertical and horizontal transmission In « Bovine spongiform encephalopathy. The BSE dilemma » Serono Symposia USA, Norwell, Massachusetts, Ed. C.J. Gibbs, Ed. Springer New York 1996, pp. 59-83
- (6) Brown P., Gajdusek D.C. Survival of scrapie virus after 3 years interment. *Lancet*, 1991; 337 : 269-270
- (7) Foster J.D., Hope J., Fraser H. - Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, 1993 ; 133 : 339-341
- (8) Hunter N., Cairns D., Foster J.D., Smith G., Dickinson A.G., Goldmann W., Donnelly K. Is scrapie solely a genetic disease. *Nature*, 1997; 386 : 137
- (9) Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain (december 1997). A progress report of Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF)
- (10) Anderson R.M., Donnelly C.A., Ferguson N.M., Woolhouse M.E.J., Watt C.J., Udy H.J., Mmawhinney, Dunstan S.P., Southwood T.R.E., Wilesmith J.W., Ryan J.B.M., Hoinville L.J., Hillerton J.E., Austin A.R., Wells G.A.H. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 1996 ; 382 : 779-788
- (11) Office International des Epizooties, Informations sanitaires (en octobre 1998).
- (12) Schreuder B.E.C., Wilesmith J.W., Ryan J.B.M., Straub O.C. Risk of BSE from the import of cattle from the United Kingdom into countries of the European Union. *Vet Rec*, 1997 ; 141 : 187-190
- (13) Sarradet M. Un cas de tremblante sur un boeuf. *Rev Méd Vét*, 1883 ; 7 : 310-312
- (14) Robey W.W., Jackson R., Walters R.L., Brackett J.M., Harrington C.A., Killian W.R. Use of cerebrospinal fluid levels of 14-3-3 in predicting neurodegeneration in confirmed BSE symptomatic cattle. *Vet Rec*, 1998 ; 143 : 50-51
- (15) Marsh R.F., Hadlow W.J. Transmissible mink encephalopathy *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 1992; 11 : 539-550
- (16) Marsh R.F., Bessen R.A., Lehmann S., Hartsough G.R. Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol*, 1991; 72 : 589-594
- (17) Cousens S.N., Vynnycky E., Zeidler M., Will R.G., Smith P.G. Predicting the CJD epidemic in humans. *The Lancet*, 1997 ; 385 : 197-198
- (18) Bradley R. Bovine spongiform encephalopathy epidemiology. A brief review. *Livestock Production Science*, 1994 ; 38 : 5-16.

III - LES ENCÉPHALOPATHIES SPONGIFORMES HUMAINES : DIAGNOSTIC CLINIQUE ET ANALYSE DES FACTEURS DE RISQUE ENVIRONNEMENTAUX

Jean-Philippe Brandel

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Les encéphalopathies spongiformes humaines (ESH) sont des maladies transmissibles chez l'Homme comme chez l'animal.

Trois maladies apparaissent spontanément chez l'Homme : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) sporadique ou génétique (liée à une mutation du gène codant la protéine prion : gène PRNP), le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS) et l'Insomnie Fatale Familiale (IFF), deux affections toujours d'origine génétique. Il existe d'autre part, des formes transmises accidentellement à l'Homme : Kuru (observé en Nouvelle-Guinée) et MCJ iatrogènes survenant après greffes de cornée ou de dure-mère, stéréotaxie cérébrale ou traitement par hormone de croissance d'origine humaine. Le nouveau variant de MCJ (nv-MCJ) est la dernière des ESH décrite. Son émergence pose le problème de la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) à l'Homme.

Outre leur caractère transmissible, les ESH ont des caractéristiques communes : incubation longue et silencieuse, atteinte du système nerveux central sans réaction inflammatoire ou immunitaire, évolution vers le décès sans rémission, agent causal inconnu.

■ I. MCJ SPORADIQUE

La MCJ sporadique est la forme la plus fréquente (85 % des ESH). C'est une démence myoclonique accompagnée de divers signes neurologiques, survenant en moyenne à 60 ans.

I.1- Clinique

Dater le début de la maladie est parfois difficile. Des prodromes peuvent exister : asthénie, insomnie, anxiété, anorexie.

La maladie se déclare habituellement en quelques jours par l'apparition de signes neurologiques polymorphes et diversement associés attestant l'atteinte diffuse du système nerveux.

- La démence est constante au cours de l'évolution et reste le maître symptôme de la maladie. Elle est à l'origine de troubles de la mémoire, de l'orientation (temporelle ou spatiale), du langage, du calcul, des praxies ou des gnosies. Elle peut s'associer à des troubles du comportement : dépression, agitation, agressivité.
- Les myoclonies, plus ou moins précoces, existent dans plus de 80 % des cas. Elles sont diffuses, spontanées ou provoquées par un stimulus sensoriel (bruit, stimulation tactile ou douloureuse).
- Les troubles de l'équilibre, liés à une atteinte des voies cérébelleuses, apparaissent à un stade variable de l'évolution. Le syndrome cérébelleux peut toucher les membres supérieurs, entraîner des troubles d'élocution (dysarthrie) ou un nystagmus.
- Les troubles visuels peuvent se limiter à une gêne mal définie (brouillard ou distorsion). Le déficit est souvent plus marqué avec hémianopsie, diplopie ou perception erronée des couleurs. Les illusions et hallucinations sont les manifestations les plus spectaculaires. La survenue d'une cécité corticale est possible.
- Les signes pyramidaux et extra-pyramidaux (hypertonie, dystonies, tremblement, mouvements anormaux) sont inconstants.
- D'autres signes neurologiques peuvent être observés: paralysies oculomotrices, troubles de la déglutition, vertige. Des crises d'épilepsie ou un état de mal épileptique peuvent survenir. Une atteinte motrice par lésion de la corne antérieure de la moelle est très rare.
- Un état de mutisme akinétique est fréquent en fin d'évolution: le patient, grabataire, reste insensible à tout stimulus. L'alternance des phases veille-sommeil est cependant conservée.

I.2- Examens complémentaires

La gravité de la symptomatologie clinique contraste avec la normalité de la plupart des examens complémentaires. Les prélèvements sanguins usuels sont normaux (pas de syndrome inflammatoire, de désordre immunitaire, de sécrétion d'anticorps). L'examen usuel du liquide céphalo-rachidien (LCR) est normal. Le scanner cérébral est normal ou révèle une atrophie corticale non spécifique. Sur l'IRM encéphalique, peuvent exister des hypersignaux, visibles en T2 ou sur les séquences FLAIR. Ils sont situés dans les noyaux gris centraux (striatum et pallidum) ou dans certaines régions corticales. La valeur diagnostique de ces anomalies reste à établir. Le seul examen constamment anormal dans la MCJ est l'électroencéphalogramme (EEG) de veille. Au début de l'évolution, il peut n'être que ralenti. Puis des décharges d'ondes lentes de 1 à 2 Hz polymorphes, répétitives apparaissent. Dans un nombre variable de cas, FEEG devient caractéristique: présence de grapho-éléments simples bi- ou triphasiques paroxystiques, périodiques à 1 cycle par seconde (Court et Bert, 1995). Ces anomalies EEG peuvent disparaître à la phase terminale : il faut donc répéter l'EEG car la présence de l'activité périodique a une grande valeur diagnostique même si elle n'est en rien pathognomonique.

On ne dispose donc pas aujourd'hui d'examen permettant d'établir avec certitude le diagnostic à la phase clinique de maladie et encore moins à une phase pré-symptomatique. Cependant la détection de la protéine 14-3-3 dans le LCR des patients en phase évolutive de MCJ semble sensible et spécifique (Hsich et al., 1996). Cette bonne valeur diagnostique s'est confirmée dans notre série de patients avec une sensibilité de 91 % et une spécificité de 98 %. Les faux résultats positifs sont observés dans des situations pathologiques différentes de la MCJ : encéphalite herpétique, accident vasculaire récent, hémorragie méningée. Il semble qu'exceptionnellement la protéine 14-3-3 puisse être détectée dans le LCR de patients souffrant d'une maladie d'Alzheimer. Le dosage dans le LCR de la NSE (Neuron Specific Enolase), là encore dans un contexte clinique évocateur, est aussi un bon test diagnostique mais avec une sensibilité et une spécificité moindre que la protéine 14-3-3. Ces 2 marqueurs témoignent probablement d'une destruction neuronale massive.

I.3- Génétique: polymorphisme du codon 129

La génétique influence l'expression phénotypique des ESH, en dehors même de l'existence de toute mutation du gène PRNP. Dans le cas de la MCJ sporadique, le polymorphisme du codon 129 joue un rôle important. Pour un allèle donné, le codon 129 peut coder une méthionine (met) ou une valine (val). Un individu est donc homozygote (met/met ou val/val) ou hétérozygote (met/val). En France, 49 % de la population générale est hétérozygote (met/val), 41 % homozygote (met/met) et 10 % homozygote (val/val). Dans la MCJ sporadique, il y a un excès de l'homozygotie (71 % des patients sont met/met, 10 % val/val), il n'y a que 19 % de patients hétérozygotes met/val (Laplanche et al., 1994). L'homozygotie met/met est un facteur de risque pour la MCJ.

I.4- Neuropathologie

L'étude neuropathologique, par biopsie ou après autopsie permet seule un diagnostic de certitude. Elle révèle l'association lésionnelle caractéristique: perte neuronale, gliose astrocytaire, spongieuse (vacuoles arrondies au sein des terminaisons nerveuses) et rarement plaques amyloïdes (de type Kuru, marquées par le rouge Congo, le PAS ou les anticorps anti-PrP). D'un cas à l'autre, l'importance et la répartition des lésions varient.

I.5- Biochimie

Par une technique de Western-blot, la détection et l'étude des propriétés physicochimiques de la PrP est possible sur des fragments cérébraux congelés. La détection de PrP^{res} (résistante à la protéinase K) constitue une preuve diagnostique au même titre que l'étude neuropathologique. Au-delà de son intérêt diagnostique, cette technique permet de repérer les différentes souches de PrP, en fonction du profil de migration observé, dépendant du degré de glycosylation de la protéine.

I.6- Classification des cas

La classification que l'on utilise est appelée « classification de Masters ». Elle n'est qu'une forme très modifiée de la classification proposée en 1979 (Masters et al., 1979). Elle dérive surtout de l'étude multifactorielle de 124 cas anatomiquement vérifiés menée par P. Brown et F. Cathala, ayant permis de classer les principaux signes cliniques par ordre de fréquence (Brown et al., 1979). Les cas se répartissent selon 3 catégories :

- 1) **cas possible** : présence d'une démence d'évolution rapide associée à au moins 3 des signes cliniques suivants: myoclonies, syndrome cérébelleux, syndrome pyramidal ou extra-pyramidal, signes visuels, mutisme akinétique ;
- 2) **cas probable** : démence d'évolution rapide associée à au moins 2 des signes précédents avec un EEG caractéristique ;
- 3) **cas certain** : démence d'évolution rapide associée à au moins 1 des signes précédents avec un aspect neuropathologique caractéristique ou la présence de PrP^{res} dans le tissu cérébral.

I.7- Formes cliniques

La forme la plus fréquente de la maladie se rapproche de la forme pariéto-occipitale ou amaurotique décrite par Heidenhain (1929). Elle se caractérise par une démence, accompagnée de signes visuels (cécité corticale, agnosie visuelle) et des autres signes neurologiques diversement associés. L'EEG est souvent caractéristique. L'évolution est rapidement fatale.

Parmi les autres formes cliniques on distingue .

- la forme cérébelleuse, individualisée par Brownell et Oppenheimer, en 1965. Le symptôme inaugural est une ataxie cérébelleuse. Les fonctions intellectuelles sont normales au début;
- la forme thalamique, particulière par l'importance de la démence et des mouvements anormaux (Larcin et al., 1963) ;
- la forme amyotrophique, rare, caractérisée par l'association: démence, atteinte de la corne antérieure de la moelle (déficit moteur, amyotrophie, fasciculations) et syndrome extra-pyramidal;
- la forme japonaise, panencéphalique, particulière par l'existence de cellules dans le LCR, l'atteinte sévère de la substance blanche et l'évolution lente (Sadatoshi, et al., 1983).

L'observation de ces différentes formes cliniques est un premier argument en faveur de l'existence de différentes souches de prion à l'origine de la MCJ sporadique. Les variations du phénotype clinique (intensité de l'ataxie, présence ou non d'un EEG caractéristique, durée d'évolution...) en fonction du polymorphisme du codon 129 et du profil de migration de la PrPres en Western-blot, telles qu'elles ont pu être observées sur une petite série de patients (Parchi et al., 1995), constituent un deuxième argument, à confirmer sur des séries plus importantes.

I.8- Diagnostic différentiel

Devant une encéphalopathie myoclonique, il faut éliminer un trouble métabolique ou une intoxication. La suppression du facteur en cause entraîne la régression des signes. Devant des signes démentiels, le diagnostic est difficile quand la durée d'évolution de la MCJ est longue. Toutes les causes de démence peuvent être évoquées et surtout la démence d'Alzheimer. Devant une ataxie cérébelleuse, un syndrome paranéoplasique doit être éliminé.

Dans tous les cas, un diagnostic alternatif est à rechercher. Il est toutefois indispensable de poser le diagnostic de MCJ : car il impose de prendre des précautions particulières décontamination ou destruction du matériel utilisé pour certains examens.

I.9- Épidémiologie et facteurs de risque

La MCJ sporadique existe avec des caractéristiques constantes dans tous les pays: incidence autour de 1 cas par million, sex-ratio peu différent de 1, âge moyen de survenue autour de 60 ans, répartition homogène des cas (Delasnerie-Lauprêtre et Alpérovitch,1995). L'incidence varie peu en France (0,88 en 1992, 0,78 en 1993, 1,07 en 1994,1,26 en 1995 et 1,24 en 1996). L'évolution observée à partir de 1994 est liée à un meilleur recueil des données.

La cause de la MCJ sporadique est toujours inconnue. Les études cas-témoin ont pour but de chercher des facteurs de risque en comparant le risque associé à chaque facteur dans une population de malades et de témoins appariés. Au cours des années 1970-1980, des études ont été réalisées au Japon, aux États-Unis et en Grande-Bretagne. Aucun facteur de risque n'a pu être clairement isolé. Une méta-analyse reprenant les résultats de ces 3 études indique l'association significative de la MCJ avec les antécédents familiaux de MCJ ou des antécédents psychiatriques (Wientjens et al., 1996). L'étude cas-témoin, menée de 1993 à 1995 dans 6 pays de la communauté européenne a distingué 3 groupes de facteurs de risque les antécédents familiaux (MCJ, autre démence, maladie de Parkinson), les antécédents médicaux et chirurgicaux (interventions chirurgicales, troubles psychiatriques, transfusions}, les facteurs environnementaux (profession, contact avec les animaux, alimentation). Cette étude a permis d'inclure 405 patients présentant une MCJ certaine ou probable et autant de témoins hospitalisés, appariés sur le sexe et l'âge, ne souffrant pas de démence. Les résultats ont montré, dans le groupe des patients avec MCJ, une association significative avec les antécédents familiaux de démence (MCJ ou non) (RR 2,26 IC 95% 1,31-3,90). Aucune association n'a été trouvée avec les antécédents chirurgicaux ou de transfusion, avec l'activité professionnelle. Pour l'alimentation, les consommations de cervelle et de viande crue sont associées à un risque significatif chez les patients atteints de MCJ, respectivement (RR 1,68 IC 95% 1,18-2,39) et (RR 1,63 IC 95% 1,18-2,23). L'exposition à des peaux d'animaux non traitées ou à des fertilisants fabriqués avec de la corne et du sabot augmentent aussi le risque de MCJ, respectivement (RR 1,94 IC 95% 1,13-3,33) et (RR 2,32 IC 95% 1,38-2,91) (van Duijn et al., 1998). Ces résultats sont à interpréter en tenant compte des biais possibles: biais de sélection des témoins (l'absence de sujets déments pouvant expliquer l'association MCJ antécédent familial de démence), biais de réponse: recueil des données, direct pour les témoins, indirect pour les patients. La poursuite de telles études cas-témoin est indispensable pour confirmer ou non ces résultats.

■ II. MCJ GÉNÉTIQUE

Cinq à 15 % des cas de MCJ s'accompagnent de mutations ou d'insertions du gène PRNP, sans qu'il y ait toujours une histoire familiale de MCJ (Laplanche et al., 1994). La transmission de la maladie se fait sur le mode autosomique dominant. La mutation du codon 200 est la plus fréquente, notamment en France (Laplanche et al., 1994). Les insertions de nucléotides entre les codons 51 et 91 du gène PRNP (partie N terminale) sont associées à certaines MCJ. Les délétions n'entraînent pas de MCJ représentant un polymorphisme neutre (Laplanche et al., 1995). Le tableau clinique des MCJ liées à une anomalie génétique dépend du type de la mutation. La symptomatologie est plus ou moins stéréotypée en fonction des familles.

II.1- Mutation 200^{Lys}

Elle est à l'origine d'un tableau clinique proche de la MCJ sporadique: âge de début moyen : 56 ans, démence myoclonique, EEG souvent caractéristique, évolution rapide.

II.2- Mutation 178^{Asn}

La mutation 178 donne un tableau de MCJ quand le codon 129 de l'allèle qui porte la mutation code une valine. L'âge de survenue est plus précoce que pour la MCJ sporadique, la durée d'évolution plus longue (20 mois), l'EEG rarement caractéristique.

II.3- Mutations 180^{Ile}, 210^{Ile}, 232^{Arg}

Elles ont été découvertes de manière fortuite chez des patients présentant un tableau de MCJ sporadique. L'absence de caractère familial de ces mutations pourrait être due à leur faible pathogénicité (Laplanche et al., 1995).

11.4- Insertions

L'analyse des phénotypes n'est pas facile, car chaque insertion n'a été décrite qu'au sein d'une seule famille. Le tableau clinique peut être celui d'une MCJ d'apparition précoce (34 ans environ) et d'évolution lente (7 ans). Le nombre de motifs insérés influence les données de l'examen neuropathologique (Laplanche et al, 1995).

■ III. SYNDROME DE GERSTMANN-STRAUSSLER-SCHEINKER (SGSS)

Ce syndrome est une forme familiale et génétique rare d'ESH présentant, à l'examen neuropathologique, des plaques de PrP particulières dites multicentriques. La mutation 102 est la plus fréquente, elle existe dans plusieurs pays d'Europe et au Japon. La mutation 117 n'est observée que dans 2 familles (allemande et alsacienne). La mutation 198 ne touche qu'une famille américaine, la mutation 217 une famille suédoise, la mutation 145 une patiente japonaise et la mutation 105 n'existe qu'au Japon.

III. 1- Mutation 102^{Leu}

C'est la forme ataxique du SGSS. La maladie débute vers 40 ans par un syndrome cérébelleux. Apparaissent ensuite troubles oculomoteurs, signes pyramidaux et démence. Les myoclonies sont rares. La durée d'évolution est longue (1 à 11 ans). Au sein d'une même famille les signes cliniques peuvent être très variables.

III.2- Mutation 117^{Val}

C'est une mutation plus rare, observée notamment dans une famille alsacienne. Au sein de cette famille, la symptomatologie change d'une génération à l'autre démence isolée dans les 3 premières générations, association dans les autres à un syndrome pyramidal et pseudobulbaire. D'autres signes sont plus inconstants : myoclonies, syndrome cérébelleux, crises d'épilepsie, atteinte de la corne antérieure de la moelle. (Tranchant et al., 1991).

III.3- Mutations 198^{ser} et 217^{Arg}

Elles sont caractérisées par une neuropathologie particulière : plaques multicentriques et dégénérescences neurofibrillaires.

III.4- Mutation 145^{Stop}

Elle entraîne un tableau clinique proche de l'Alzheimer, d'évolution longue (21 ans), avec des plaques amyloïdes constituées par une PrP tronquée. Il n'existe actuellement aucune preuve de caractère familial et transmissible de cette forme de SGSS.

III.5- Mutation 105^{Leu}

Les symptômes cliniques sont dominés par une paraparésie spastique et une labilité émotionnelle. La démence est tardive. Il n'est pas démontré que cette affection se rattache vraiment au SGSS.

■ IV. INSOMNIE FATALE FAMILIALE

C'est une maladie exceptionnelle toujours liée à une anomalie du gène PRNP : mutation ponctuelle du codon 178 associée à un codon 129 codant une méthionine.

Elle se caractérise cliniquement par l'association de troubles du sommeil (insomnie, hallucinations), de troubles végétatifs (disparition des rythmes circadiens, hyperactivité sympathique), de difficultés motrices et d'une démence. Il peut exister des troubles de l'oculomotricité et des myoclonies. L'EEG de veille est perturbé mais non caractéristique. L'EEG de sommeil est également anormal. Les constatations neuropathologiques sont particulières: atteinte des noyaux dorsomédian et antérieur du thalamus, peu de lésion dans le cortex cérébral (Hauw et al., 1996).

■ V. KURU

Le Kuru (« trembler de peur » en langage Fore) a été observé en Nouvelle-Guinée (Gajdusek et Zigas, 1957). La transmission au chimpanzé a été réalisée en 1966 (Gajdusek et al.). La maladie était liée aux rites cannibales pratiqués dans cette tribu: consommation du cerveau par les femmes et les enfants (principalement contaminés), du muscle par les hommes. La maladie a disparu dès l'interdiction du cannibalisme. Depuis 1956, 2500 cas ont été observés dans 169 villages.

Les signes cliniques et l'évolution étaient stéréotypés. Après une phase de prodromes où pouvaient exister: fatigue, émotivité, céphalées et douleurs diffuses, le patient présentait une ataxie cérébelleuse avec tremblement, strabisme et dysarthrie. Une hypertonie et des mouvements anormaux choréiques ou athétosiques apparaissaient ensuite, associés ou non à des accès de rires spasmodiques. Le stade terminal était bref, marqué par une hypertonie extrapyramidale, une incontinence, une dysphagie. Le décès, après 3 à 9 mois d'évolution, était le plus souvent lié à une surinfection. Les examens biologiques étaient normaux. Les rares EEG pratiqués révélaient un ralentissement non caractéristique.

Les lésions neuropathologiques, situées dans le cortex cérébral mais surtout dans le cervelet et ses connexions, comprenaient une perte neuronale et une prolifération astrogliale importantes, une spongiose modérée et des plaques de type Kuru, unicentriques, dans 3/4 des cas.

■ VI. MCJ IATROGÈNES

Provoquées accidentellement par une procédure thérapeutique, l'introduction de l'agent infectieux peut se faire de deux manières : directement au contact du cerveau ou par voie périphérique (injection sous-cutanée ou intra-musculaire).

VI.1- Infection directe ou de proximité

Le tableau clinique est superposable à celui de la MCJ sporadique : démence constante et précoce, ataxie cérébelleuse et troubles visuels fréquents (Brown et al., 1992).

L'EEG est souvent caractéristique. Ces cas sont heureusement très rares. Le premier cas publié était celui d'une femme de 55 ans qui avait subi une greffe de cornée (Duffy et al., 1974). Depuis cette première publication, 2 cas de transmission par des électrodes de stéréotaxie pour repérage EEG d'un foyer épileptique profond ont été rapportés en 1977. Les électrodes avaient été utilisées pour localiser le point de départ des myoclonies d'un patient atteint de MCJ. Elles avaient été stérilisées par de l'alcool et du formaldéhyde. Pour ces 2 cas, il y a eu confirmation neuropathologique et transmission au chimpanzé à partir du broyat des cerveaux et d'une électrode (Brown et al., 1992). Quelques cas de contaminations par des instruments de neurochirurgie ont été rapportés. Tous les autres cas sont secondaires à des greffes de dure-mères prélevées sur des cadavres. Une quinzaine de cas a été publiée depuis 1988. Une publication japonaise rapporte 42 nouveaux cas avec des durées d'incubation allant de 18 mois à 12 ans (5,5 ans en moyenne) (Sato, 1998). Les dure-mères provenaient surtout du laboratoire Lyodura, en Allemagne. Les procédés de stérilisation ont été modifiés en 1987.

VI.2- Infection périphérique

Les premiers cas de MCJ secondaire à l'administration d'hormone de croissance d'origine humaine ont été identifiés en 1985 aux États-Unis. Des cas ont été décrits ensuite au Royaume-Uni, en Nouvelle-Zélande et au Brésil. Les premiers cas français sont apparus en 1991. On dénombre une centaine de cas dans le monde dont plus de 50 en France. Le risque, en France, existe pour les traitements effectués avant 1988, date à laquelle l'hormone recombinante fut utilisée. Il y a un risque plus important pour la période Janvier 1984-Juillet 1985.

La maladie débute par une ataxie cérébelleuse, des troubles de l'oculomotricité et un nystagmus. Il peut exister ensuite des troubles de l'humeur ou du comportement (euphorie, indifférence), une polyphagie, des troubles du sommeil, des tremblements ou des céphalées. Après quelques mois, apparaissent démence, troubles pyramidaux, myoclonies, déficits sensitifs et visuels. La durée d'évolution est en moyenne de 18 mois (Billette de Villemeur, 1996). Le tableau clinique est stéréotypé rappelant le Kuru plus que la MCJ sporadique. L'électrorétinogramme (ERG) est souvent anormal. L'EEG n'est presque jamais périodique. Les lésions neuropathologiques caractéristiques se localisent surtout dans les cortex cérébral et cérébelleux, dans les noyaux gris centraux et dans la moelle. Les plaques de type Kuru sont fréquentes.

■ VII. Nv-MCJ

Les données cliniques ont été publiées en 1996 (Will et al.). Le tableau clinique ressemble à celui du Kuru ou de la MCJ survenant après traitement par hormone de croissance. Le début est marqué par des troubles du comportement d'allure parfois psychiatrique. Il peut exister des douleurs ou des dysesthésies des membres inférieurs. L'ataxie cérébelleuse précède l'atteinte intellectuelle, constante en fin d'évolution. Les myoclonies sont discrètes ou absentes. Dans aucun des cas rapportés l'EEG n'est périodique. Tous les patients sont homozygotes met/met au codon 129 sans mutation du gène PRNP. La durée moyenne d'évolution est égale à 16 mois. Ce sont les données de l'examen neuropathologique qui font l'unité de cette nouvelle forme d'ESH : les lésions se situent principalement dans les noyaux gris centraux et le thalamus, mais surtout il existe de nombreuses plaques de PrP de type Kuru entourées de spongiose donnant un aspect en fleur, appelées « plaques florides ». De telles plaques, en si grand nombre, n'ont jamais été observées dans les autres ESH.

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un lien entre ESB et nv-MCJ : argument épidémiologique: apparition du nv-MCJ dans le pays où l'ESB est « épidémique » après 10 ans (durée compatible avec la durée d'incubation des ESH) ; arguments expérimentaux: l'inoculation intracérébrale de l'agent de l'ESB à trois macaques a entraîné l'apparition de signes d'ES avec des plaques florides (Lasmezas et al, 1996) ; argument biochimique: la migration électrophorétique de la PrP, par Western-blot, est identique pour tous les cas suspects d'être secondaires à l'agent de l'ESB (y compris tous les cas de nv-MCJ) (Collinge et al., 1996) ; argument expérimental chez la souris: l'infection par l'agent de l'ESB ou l'agent du nv-MCJ est à l'origine de signes cliniques et neuropathologiques stéréotypés chez tous les animaux (Bruce et al., 1997).

La diffusion des farines, les exportations de viande britannique, l'observation du cas français peuvent faire craindre l'apparition de nv-MCJ en dehors des frontières du Royaume-Uni.

■ VIII. CONCLUSION

Les ESH demeurent des maladies rares, de cause inconnue pour les formes sporadiques. On peut distinguer deux grands tableaux cliniques: la démence myoclonique d'évolution rapide (majorité des cas de MCJ sporadique, MCJ génétique et iatrogène avec infection du SNC par contiguïté) ; la forme ataxique d'évolution plus longue (Kuru, MCJ après hormone de croissance, nv-MCJ et certaines formes génétiques, en particulier certains SGSS).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Beck E., Daniel P.M., Kuru and Creutzfeldt- Jakob diseases neuropathological lesions and their significances. *Slow, Transmissibles diseases of the Nervous System*. 1979, 1 : 253-273. Stanley B. Prusiner, William J. Hallow eds. Academic Press.
- (2) Billette de Villemeur T, Deslys JP, Pradel A et al., Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France. *Neurology* 1996 ; 47 : 691-5.
- (3) Brown P, Cathala F, Sadowsky D et al., Creutzfeldt-Jakob disease in France II. Clinical characteristics of 124 consecutive verified cases during the decade 1968-1977. *Ann Neurol* 1979 ; 6 : 430-37.
- (4) Brown P, Preece MA, Will RG., « Friendly fire » in medicine : hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992; 340 : 24-27.
- (5) Brownell B, Oppenheimer DR., An ataxic form of subacute presenile polioencephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1965 ; 28 : 350-61.
- (6) 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.
- (7) Collinge J, Sidle KCL, Meals et al., Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. *Nature* 1996 ; 383 : 685-90.
- (8) Court L, Bert J., Electrophysiologie des encéphalopathies transmissibles. *Path Biol* 1995 ; 43 : 25-42.
- (9) Delasnerie-Lauprêtre N, Alperovitch A., Epidémiologie de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. *Path Biol* 1995 ; 43 : 22-4.
- (10) Duffy P, Wolf J, Collins G et al., Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease, *N Engl J Med* 1974 ; 299 : 692-3.
- (11) Gajdusek D.C., Zigas V, Degenerative disease of the Central Nervous System in New Guinea the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 1957; 257: 974-78.
- (12) Gajdusek D.C., Gibbs C.J.Jr., Alpers M., Experimental transmission of a kuru like syndrome in chimpanzees. *Nature* 1966 ; 209 : 794-96.
- (13) Larcin R, Brion S, Knochneviss A., Le syndrome de Creutzfeldt-Jakob et les syndromes cortico-striés du présenium. *Revue Neurologique* 1963 ; 109 : 419-41
- (14) Hauw JJ, Sazdovitch V, Seilhean D et al., The posology and neuropathology of human conditions related to unconventional infectious agents or prions. *European J of Neurol* 1996 ; 3 : 487-99.
- (15) Heidenhain A., Klinische und anatomische Untersuchungen über eine eigeneratige organische Erkrankung des Zentralnervensystems in Praesenium. *Zeitschrift für die gest Neurologie und Psychiatrie* 1929 ;118 : 49-114.
- (16) Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ et al., The 14-3-3 brain protein in cerebrospial fluid as a marker for transmissible spongiform encéphalopathies. *The New England Journal of Medicine* 1996; 335 : 924-30.
- (17) Laplanche JL, Beaudry P, Ripollet et al., Protéine prion : structure, fonctions et polymorphismes associés aux encéphalopathies spongiformes humaines. *Path Biol* 1995 ; 43 : 104-13.
- (18) Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP et al., Molecular genetics of prion diseases in France. *Neurology* 1994 ; 44 : 2347-51.
- (19) Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC et al., Creutzfeldt-Jakob disease : patterns of a worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 1979; 5 : 177-88.

- (20) Parchi P, Castellani R, Capellari S et al., Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39 : 767-778.
- (21) Sadatoshi T, Yoshogoro K., Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *Neurology* 1983; 33 : 1503-6.
- (22) Sato T., Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura-mater grafts in Japan, January 1979-May 1996. *Jama* 1998; 279 : 11-12.
- (23) Tranchant C, Doh-ura K, Steinmetz G et al., Mutation du codon 117 du gène du prion dans une maladie de Gerstmann-Sträussler-Scheinker. *Rev Neurol* 1991; 147 : 274-8.
- (24) Van Duijn CM, Delasnerie-Lauprêtre N, Masullo C et al., Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. *Lancet* 1998; 351 : 1081-1085.
- (25) Wientjens DPWM, Davanipour Z, Hofman A et al., Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease : a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 1996; 46 : 1287-91.
- (26) Will RG, Ironside JW, Zeidler M et al., A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347 : 921-5.

IV - VERS UN DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MALADIES À PRIONS HUMAINES

Jean-Louis Laplanche

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Alors que la plupart des affections virales, bactériennes ou parasitaires s'accompagnent d'une réponse biologique spécifique de l'hôte sur laquelle repose le plus souvent le diagnostic, il n'en est rien pour les maladies à prions. En effet, aucune réaction inflammatoire ni aucune réaction immunitaire spécifique ne viennent trahir la présence de ces agents dans un organisme contaminé.

Le diagnostic de maladie de Creutzfeldt-Jakob, la forme la plus fréquente de ces maladies rares que sont les maladies à prions humaines, repose encore largement sur le tracé électroencéphalographique dans un contexte de démence progressive avec myoclonies et atteintes neurologiques multifocales (voir l'article de JP Brandel). Cependant, le « nouveau variant » de la MCJ (nv-MCJ), la plupart des cas iatrogènes après traitement par l'hormone de croissance naturelle et jusqu'à 40% des cas de MCJ sporadique ne présentent pas d'EEG caractéristique. Cette médiocre sensibilité gêne l'établissement du diagnostic et par voie de conséquence trouble le tableau épidémiologique de la maladie dont certaines formes pourraient être sous-estimées.

La démonstration du caractère transmissible de la MCJ et des syndromes apparentés par inoculation du tissu cérébral au rongeur ou au primate, permet un diagnostic en théorie valide, quoique exposé au risque de faux négatifs, mais entaché d'un délai de réponse (de un à cinq ans selon le choix de l'hôte) difficilement compatible avec les nécessités modernes du diagnostic !

En raison des développements récents dont ils ont fait l'objet, cette revue s'est principalement focalisée sur l'intérêt du diagnostic génotypique, de l'étude des marqueurs de destruction du tissu cérébral dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et de la détection de la protéine prion pathologique en vue du diagnostic des maladies à prions humaines.

■ I. EXPLORATIONS BIOLOGIQUES USUELLES

Les explorations biochimiques et hématologiques usuelles, incluant les marqueurs de l'inflammation, sont habituellement normales. Dans environ un tiers des cas, une élévation modérée et transitoire des enzymes hépatiques est notée (transaminases, LDH, γ GT). L'analyse usuelle du LCR est peu informative. Le LCR est paucicellulaire mais une hyperprotéinorachie comprise entre 0,5 et 1g/L a été observée chez la moitié des patients. La présence de bandes oligoclonales confinée au LCR a quelquefois été rapportée.

■ II. LE DIAGNOSTIC GÉNOTYPIQUE (1) (2)

II.1- Mise en évidence d'une mutation du gène de la protéine prion (PRNP)

Les formes familiales de la MCJ, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et l'insomnie fatale familiale sont des maladies génétiques à transmission autosomique dominante provoquées par l'accumulation dans le SNC d'une PrP mutée. Ces formes familiales ne représentent que 10 à 15% des cas. La mise en évidence d'une mutation du gène de la protéine prion (PRNP) chez un malade permet de poser le diagnostic. PRNP est situé sur le bras court du chromosome 20 (20pter-p12). Seize mutations ponctuelles et huit insertions ont été identifiées à ce jour et sont responsables d'une grande variabilité du tableau clinique et/ou neuropathologique (voir l'article de JP Brandel). Certaines mutations ont été retrouvées dans de nombreux pays et résultent d'événements mutationnels distincts, comme la mutation E200K qui est de loin la plus fréquente (92 familles parmi les 200 qui ont été étudiées à travers le monde), d'autres au contraire n'ont été observées que dans quelques familles voire une famille unique. Après consentement éclairé du patient ou le plus souvent de ses proches, l'analyse de PRNP se réalise habituellement sur l'ADN extrait des leucocytes du sang périphérique prélevé sur EDTA (5-10 ml de sang) ou, dans le cadre d'études rétrospectives, à partir de tissus congelés. La compacité du gène, la totalité de la séquence codante étant incluse dans l'exon 2 du gène, permet la mise en œuvre de techniques de recherche de mutation, relativement rapides, comme l'électrophorèse en gradient de dénaturants (DGGE) ou la technique SSCP (« single-strand conformation polymorphism ») après amplification de la séquence codante par PCR. La caractérisation de la mutation se réalise ensuite par séquençage direct des produits d'amplification du gène.

Plusieurs familles sévèrement atteintes ont pu bénéficier d'un diagnostic anténatal réalisé sur l'ADN du trophoblaste, ayant abouti dans certains cas à des interruptions de grossesse (figure IV 1). Il avait été préalablement établi que, dans ces familles, la forme génétique était à pénétrance complète, c'est-à-dire que la maladie s'exprimait chez tous les porteurs de la mutation.

Approximativement 50% des patients porteurs d'une mutation de PRNP ne présentent pas d'histoire familiale claire d'une maladie semblable à la leur. Il est vraisemblable que pour un certain nombre d'entre eux, l'histoire familiale n'a pas pu être reconstituée faute de dossiers médicaux suffisamment étayés ou plus simplement en raison du décès prématuré des parents. A plusieurs occasions, cependant, des porteurs asymptomatiques âgés, (octo - voire nonagénaires) ont été découverts au cours d'enquêtes familiales qui concernaient un ou plusieurs de leurs enfants décédés de MCJ. Cette pénétrante génétique incomplète est surtout observée chez les porteurs de la mutation E200K, qui représente environ la moitié des mutations identifiées en France, ainsi que chez des porteurs d'autres mutations beaucoup moins fréquentes. Les déterminants génétiques ou environnementaux qui sont responsables de cette variabilité de l'âge d'apparition de la maladie sont encore largement ignorés.

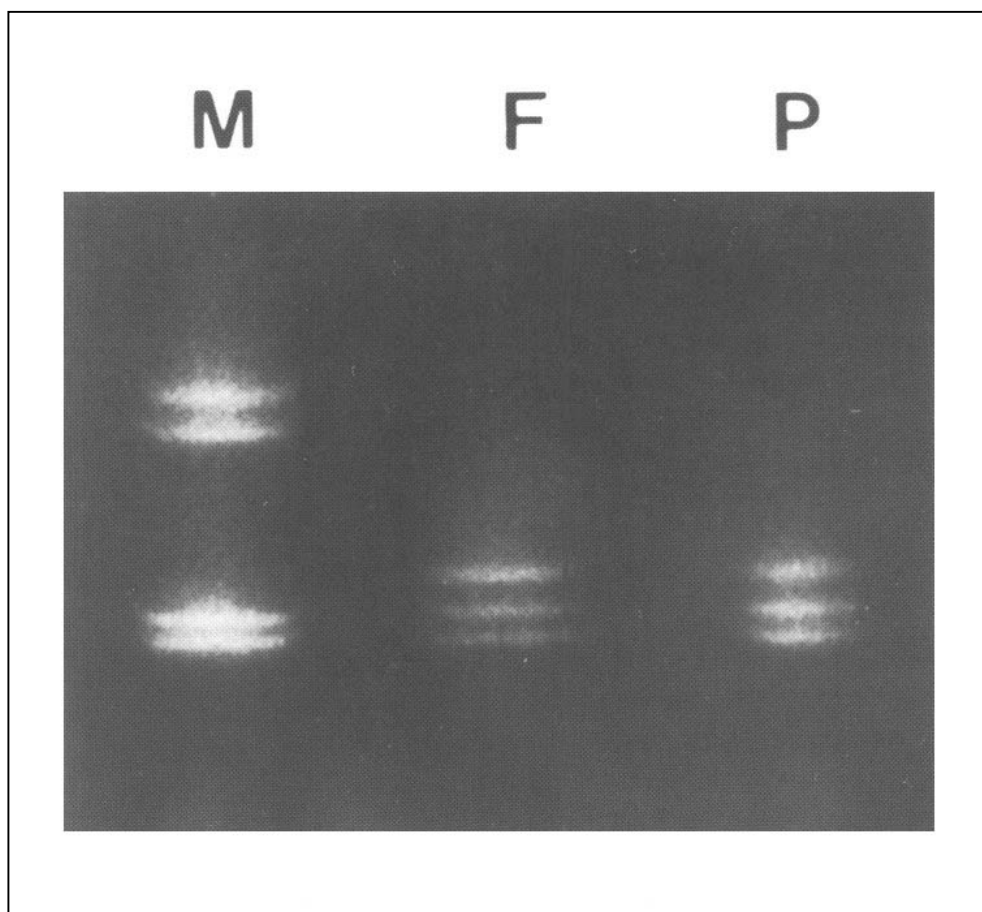


Figure IV 1.

Diagnostic anténatal dans le cadre d'un syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker lié à la mutation A117V du gène PRNP portée par la mère.

Les gènes PRNP des parents et du fœtus sont amplifiés par PCR et analysés par électrophorèse sur gel dénaturant.

Le profil de bandes observé chez le fœtus (F), identique à celui du père (P), indique qu'il n'est pas porteur de la mutation maternelle (M).

II.2- Le polymorphisme du codon 129 du gène PRNP

Le gène PRNP est le siège d'un polymorphisme biallélique touchant le codon 129 et définissant trois génotypes possibles: méthionine/méthionine (129MM), méthionine/valine (129MV) et valine/valine (129VV). La distribution de ce génotype dans la population générale est de 129MM=40%, 129MV=50% et 129VV=10% (n=92) très différente de celle observée chez les patients atteints de MCJ sporadique dont 75% environ sont 129MM contre 15% de 129MV et 10% de 129VV (n=128). Les génotypes 129MM et VV sont les facteurs de risque génétiques de la MCJ sporadique actuellement les mieux identifiés sans qu'on sache de quelle façon ils interviennent pour favoriser le développement de la maladie. Le génotypage isolé, avec une sensibilité de 85% mais une spécificité de 50% uniquement, n'a évidemment aucune valeur diagnostique mais peut constituer un argument supplémentaire lorsqu'il est confronté aux données cliniques, électroencéphalographiques et biologiques. L'homozygotie du codon 129 prédomine également chez les patients atteints de MCJ iatrogène et, à l'heure actuelle, tous les patients ayant développé une nv-MCJ sont homozygotes 129MM. Quelque soit l'étiologie, le génotype 129MV paraît donc retarder l'apparition de la maladie. Dans ces situations particulières, susceptibles d'évoluer avec le temps, on comprendra que le génotypage ne soit pas utilisé à des fins diagnostiques mais uniquement épidémiologiques.

■ III. LES MARQUEURS DE DESTRUCTION NEURONALE DANS LE LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

La neurodégénérescence massive qui caractérise la MCJ s'accompagne de la libération dans le LCR de constituants neuronaux ou astrocytaires qui peuvent être utilisés comme marqueurs de la maladie. Ces marqueurs ont profondément modifié l'approche diagnostique de la MCJ au cours de ces deux dernières années en contribuant au diagnostic du vivant du patient et non *post-mortem*.

Quatre protéines ont été récemment proposées comme marqueurs de la MCJ (Table I) et leur sensibilité et spécificité respectives sont présentées dans la Table II.

- **L'énolase neurone spécifique ou NSE** est une enzyme de la glycolyse, bien connue par ailleurs en tant que marqueur tumoral du cancer du poumon à petites cellules. Son dosage est aisé et accessible à tous les laboratoires. Sa détermination dans le LCR des patients suspects de MCJ a été suggérée en 1992 par Jimi et al. (3), puis reprise par Zerr et al. (4) en 1995 qui a proposé un seuil de significativité à 35ng/mL permettant d'obtenir une sensibilité de 80% et une spécificité de 92% (méthode ELISA). Nous avons choisi d'abaisser le seuil à 25ng/mL ce qui permet d'améliorer notablement la sensibilité du test qui atteint 88% sans en altérer la spécificité. La médiane des taux observés chez les malades s'établit autour de 50ng/mL. Nous n'avons pas noté de variations des taux selon le délai entre la ponction et le décès, la durée de la maladie, l'âge ou le sexe des

LCR	Neuroéolase spécifique (NSE)	Jimi et al, 1992 Zerr et al, 1995
	Protéine 14-3-3 (ex-p130/131)	Hsich et al, 1996
	Protéine Tau	Otto et al, 1997
	Protéine S-100	Otto et al, 1997
Sérum	Protéine S-100	Otto et al, 1998

Table 1. Marqueurs biologiques de la MCJ dans le LCR et le sérum

	Patients	Méthode	Seuil	Sensibilité	Spécificité
LCR					
NSE	275	EIA	25 ng/mL	88%	92%
14-3-3	270	WB	-	91%	98%
Tau	53 ¹	EIA	1530 pg/mL	100%	95%
S-100	129	LIA	2,5 ng/mL	94%	85%
Sérum					
S-100	224 ²	LIA	216 pg/mL	78%	81%

¹Otto et al,1997, J. Neurol.

² Otto et al,1998, BMJ.

EIA = méthode immunoenzymatique

LIA = méthode immunoluminométrique

WB = western-blot

Table 2. Marqueurs biologiques de la MCJ dans le LCR et le sérum : sensibilité et spécificité.

patients. Il faut noter que la NSE est peu stable au cours de la conservation à 4° ou -20°C et que sa concentration chute après une seule décongélation du LCR.

- L'utilisation de la **protéine 14-3-3** en tant que marqueur de la MCJ ne date que de 1996. En 1986, Harrington et al. (5) avaient mis en évidence par électrophorèse bidimensionnelle la présence, dans le LCR de patients atteints de MCJ, de deux protéines, baptisées p130/p131 faute d'identification précise. La lourdeur de la technique de détection n'a pas permis la diffusion de son application au diagnostic de MCJ. Dix ans plus tard, le microséquençage de p130/p131 a montré qu'il s'agissait de la protéine 14-3-3 (6).

La protéine 14-3-3 est très répandue dans le monde animal et végétal et est impliquée dans divers processus de régulation des signaux intracellulaires. Elle existe sous 7 isoformes différentes et participe aussi bien au contrôle de l'apoptose qu'à l'adressage des protéines destinées à la mitochondrie. Elle représente 1% des protéines cytosoliques du neurone. Sa détection est réalisée par immunotransfert à l'aide d'un anticorps anti 14-3-3 isoforme β avec révélation chimioluminescente qui met en évidence une bande de poids moléculaire apparent de 30 KDa (figure IV 2). Le problème majeur inhérent à ce type de technique manuelle est sa standardisation. Entre nos mains, la sensibilité de la détection de 14-3-3 est de 91% et sa spécificité de 98% sur une série de 270 patients suspects de MCJ (hors MCJ génétique et iatrogène). Ce marqueur est actuellement considéré comme étant le plus satisfaisant et va désormais prendre place dans une version réactualisée des critères diagnostiques de la MCJ (7) (8) (9). Un test ELISA pourrait très prochainement voir le jour. Un avantage de ce marqueur est sa grande stabilité aux différentes températures usuelles de conservation. Une conservation d'une semaine à température ambiante ou six cycles de congélation-décongélation n'ont pas altéré sa détection.

- Le dosage de la **protéine Tau** dans le LCR a été proposé en 1997 par Otto et al. (10) La protéine Tau est normalement associée aux microtubules du cytosquelette. La protéine est stable à -20°C et se conserve même après 5 cycles de congélation/décongélation. Malgré les performances très satisfaisantes du dosage dans le diagnostic de MCJ, le prix de la seule trousse actuellement disponible sur le marché représente un obstacle majeur.
- Le quatrième marqueur est la **protéine S-100**, qui est essentiellement d'origine astrocytaire (11). Il s'agit d'une protéine de fixation du calcium, stable au moins deux mois à 4° et -20°C et une semaine à température ambiante. La détection peut être immunoradio ou immunoluminométrique. Après évaluation, nous n'avons pas poursuivi l'exploitation de ce marqueur en raison d'une spécificité dans le diagnostic de MCJ (85%) inférieure à celle des marqueurs précédents (9).

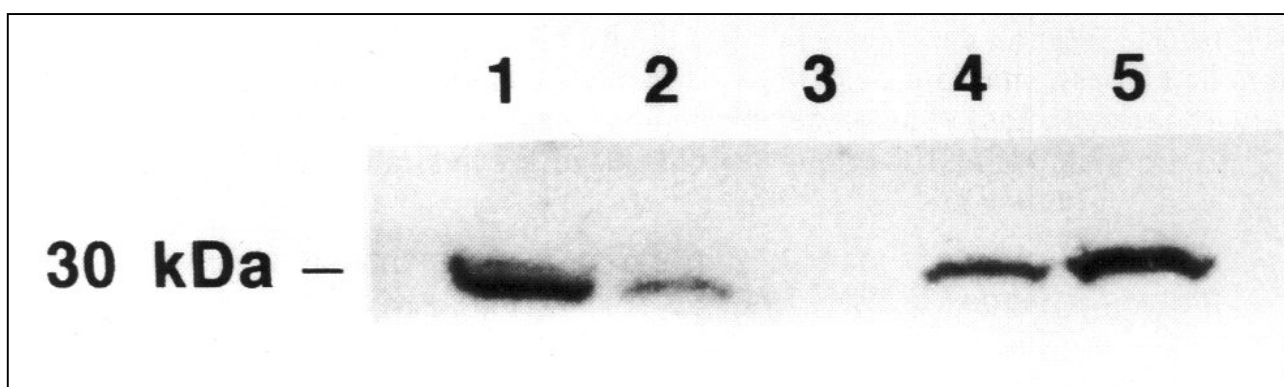


Figure IV 2.
Immunodétection de 14-3-3 dans le LCR.
 1-2 et 4-5= MCJ; 3=Maladie d'Alzheimer.

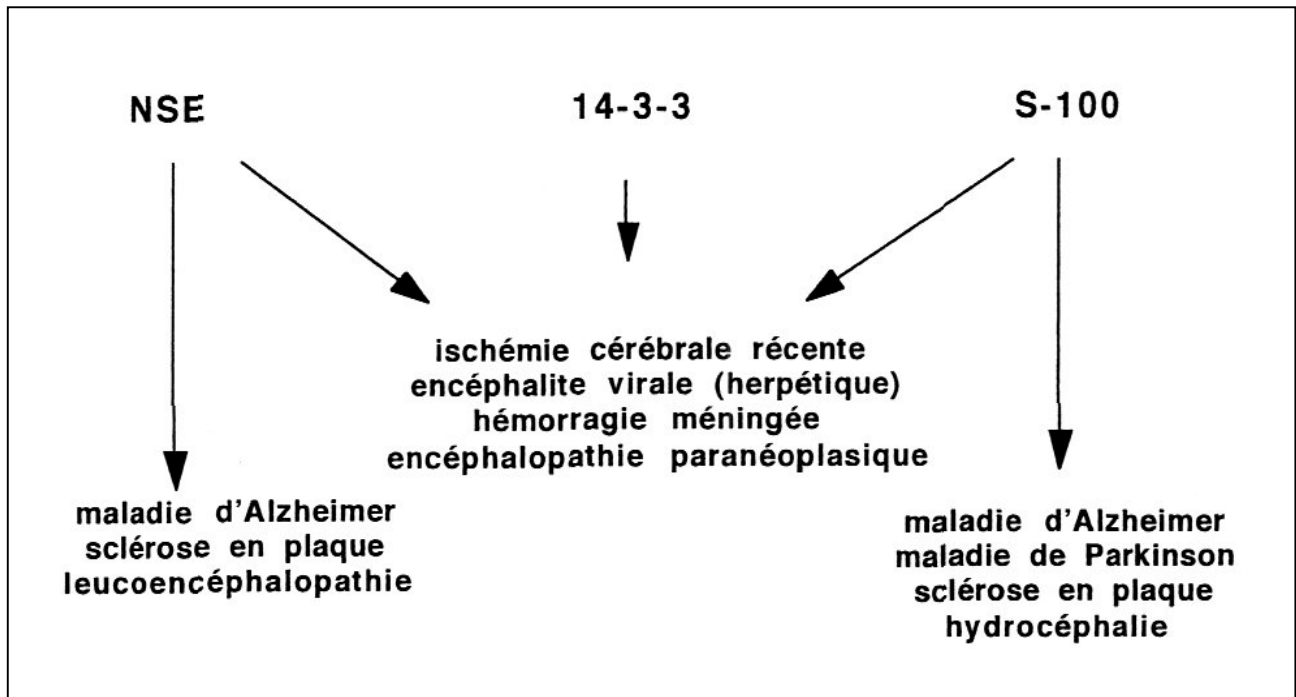


Figure IV-3.

Détection des marqueurs de destruction neuronale dans des situations autres que la MCJ.

III.1- Les résultats faussement positifs (figure IV 3)

De façon générale, toutes les pathologies conduisant à une destruction neuronale ou une réaction astrocytaire sont susceptibles de conduire à des élévations dans le LCR des quatre protéines passées en revue. Quatre causes de résultats faussement positifs se détachent très nettement : les accidents ischémiques cérébraux*, les encéphalites virales (herpétiques principalement), les encéphalopathies paranéoplasiques et les hémorragies méningées.

En dehors de ces causes, la protéine 14-3-3 a été détectée dans le LCR dans un cas d'intoxication barbiturique et un syndrome de Rett (6).

Dans notre expérience, 13 patients parmi 158 initialement suspects de MCJ mais dont le diagnostic a été réfuté par la suite, présentaient une NSE supérieure au seuil de 25 ng/mL. Le diagnostic final posé était : maladie d'Alzheimer (4 cas), anoxie cérébrale (2 cas), démence vasculaire (1 cas), sclérose en plaque (1 cas), tumeur (1 cas), maladie des corps de Lewy (1 cas), démence (1 cas), maladie auto-immune (1 cas) et sclérose en plaque (1 cas). Il convient de noter cependant que les concentrations n'étaient pas très élevées et variaient de 26 à 33 ng/mL, correspondant à la zone « grise » du test.

Des concentrations élevées de 5-100 ont également été rapportées en cas de maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, démence progressive, sclérose en plaque et hydrocéphalie (11).

* Cause des trois seuls résultats faussement positifs parmi 153 déterminations de 14-3-3 chez des patients dont le diagnostic initial de MCJ n'a pas été retenu du fait de leur évolution.

Il est évident que la recherche ou le dosage de ces marqueurs n'ont d'intérêt que dans une démarche diagnostique organisée visant à éliminer les causes de faux positifs énoncées ci-dessus, c'est-à-dire après les investigations neuroradiologiques (scanner, IRM) permettant d'éliminer une pathologie ischémique ou hémorragique. L'utilisation devenue systématique de ces marqueurs va probablement conduire à la mise en évidence de nouvelles situations de résultats faussement positifs.

III.2- Les résultats faussement négatifs

Quoique présentant des sensibilités élevées, ces marqueurs peuvent être mis en défaut dans environ 12% des cas de MCJ sporadique pour la NSE et 9% pour la protéine 14-3-3 dans nos séries. La raison exacte en est inconnue mais pourrait être en rapport avec le degré d'extension des lésions cérébrales qui conditionne la quantité de protéines relarguées dans le LCR. La positivité des marqueurs est constante dans les formes avancées, très démentielles, de la maladie qui correspondent à une atteinte corticale importante. Dans quelques occasions, la répétition de l'examen à distance a permis de voir se positiver les marqueurs.

Si la plupart des formes génétiques des maladies à prions s'accompagnent d'une élévation de la NSE dans le LCR, et de la détection de 14-3-3, certaines restent négatives. Elles correspondent à des atteintes très focalisées, comme celle du thalamus, dans l'insomnie fatale familiale (mutation 129M-D178N) ou du cervelet dans un syndrome de Gertmann-Sträussler-Scheinker lié à une insertion de 192 paires de bases dans PRNP.

Ces marqueurs sont également négatifs dans les cas iatrogènes de MCJ liée à l'hormone de croissance lorsque la ponction lombaire est réalisée à un stade très précoce de l'évolution correspondant à l'atteinte cérébelleuse initiale. Par contre, ils se positivent dans une phase plus avancée, démentielle de la maladie. Au Royaume-Uni, seuls trois des six patients atteints de la nv-MCJ présentaient une protéine 14-3-3 détectable (12).

La conclusion de ces observations est que ces marqueurs, principalement la protéine 14-3-3 et la NSE dans le LCR, ont une valeur certaine dans le diagnostic de MCJ chez des patients présentant une démence rapidement évolutive en dehors d'une pathologie cérébrale vasculaire ou infectieuse. Leurs valeurs prédictives positives respectives (exprimant la probabilité que le patient soit réellement atteint de MCJ en cas de détection de 14-3-3 ou de NSE > 25 ng/mL) de 97% et 89% sont élevées. Les valeurs prédictives négatives (exprimant la probabilité qu'un patient ne soit pas atteint lorsque les marqueurs sont négatifs) sont de 94% et 91%. La positivité permet d'éviter le recours à la biopsie cérébrale et l'identification puis la mise en œuvre rapide des procédures de décontamination des matériels médico-chirurgicaux qui ont été en contact avec le malade. Le diagnostic définitif n'étant néanmoins acquis qu'à l'issue de l'examen neuropathologique et/ou de la mise en évidence de PrP^{res} dans le tissu cérébral. Quoiqu'un résultat négatif ne puisse écarter définitivement une MCJ, il permet d'envisager de nouvelles investigations pouvant aboutir au diagnostic d'une maladie curable.

Par contre, de par leur nature même, ces marqueurs de destruction neuronale ne peuvent pas diagnostiquer précocement les différentes formes de MCJ pour lesquelles il est nécessaire en cas de forte suspicion clinique de réitérer la recherche ou dosage.

III.3- Dosage de la protéine S-100 dans le sérum

La protéine 14-3-3 n'est pas détectable dans le sérum et l'élévation de la NSE ne permet pas d'atteindre un niveau de sensibilité suffisant. Otto et al. (1998) (13) ont récemment proposé d'utiliser le dosage de la S-100 sérique dans l'exploration de la MCJ. Les performances sont décevantes puisque la sensibilité et la spécificité ne sont que de 80%, inférieures donc à celles de la NSE et de la 14-3-3 dans le LCR. L'accès plus aisé au sérum qu'au LCR est un argument à notre avis insuffisant pour justifier les performances moindres de ce test sanguin.

■ IV. L'EXAMEN NEUROPATHOLOGIQUE

L'examen neuropathologique post-mortem, très pratiqué et de grande valeur diagnostique sera évoqué mais nous renverrons pour l'essentiel le Biologiste intéressé aux articles spécialisés consacrés à ses différents aspects (14) qui sortent largement du cadre de ce chapitre.

Histologiquement, les trois lésions élémentaires les plus caractéristiques sont la perte neuronale, la spongiose et la gliose astrocytaire.

La perte neuronale est diffuse, touche le cortex profond et se majore avec la durée d'évolution. La spongiose est très fréquente, particulièrement caractéristique mais peut parfois manquer. Elle est constituée d'un semis de « bulles » qui peuvent devenir coalescentes, repérables au niveau du néocortex, des noyaux gris centraux, du thalamus, de l'amygdale, de l'hypothalamus et de la couche moléculaire du cervelet. La prolifération astrocytaire est massive. Des plaques amyloïdes uni - ou multicentriques arrondies ou spiculées sont visibles dans un nombre réduit de cas et se colorent par le Rouge Congo, le PAS et le Bleu Alcian. Ainsi, une plaqué circulaire « en oursin » entourée de bulles de spongiose est hautement évocatrice de la nv-MCJ (figure IV 4). Du vivant du malade, la biopsie cérébrale, si elle touche un territoire suffisamment lésé, peut permettre de reconnaître ces lésions et d'en faire le diagnostic. Compte tenu des précautions légitimes à prendre, ce geste tend à être abandonné.

En fait, les études les plus récentes ont révélé un spectre beaucoup plus étendu des lésions histologiques observables dans les maladies à prions humaines. Cette variabilité semble dépendre en particulier du type de mutation dans les formes familiales ou du génotype du codon 129 dans la MCJ sporadique (15) et les MCJ acquises. Une aide précieuse à l'examen histologique est apportée à présent par l'immunohistochimie appliquée à la recherche de la protéine prion pathologique.



Figure IV-4
Plaque floride dans le cerveau d'un patient atteint de nv-MCJ.
Coloration au rouge Congo.

(Cliché aimablement communiqué par le Pr. Kopp,
Hôpital Neurologique, Lyon).

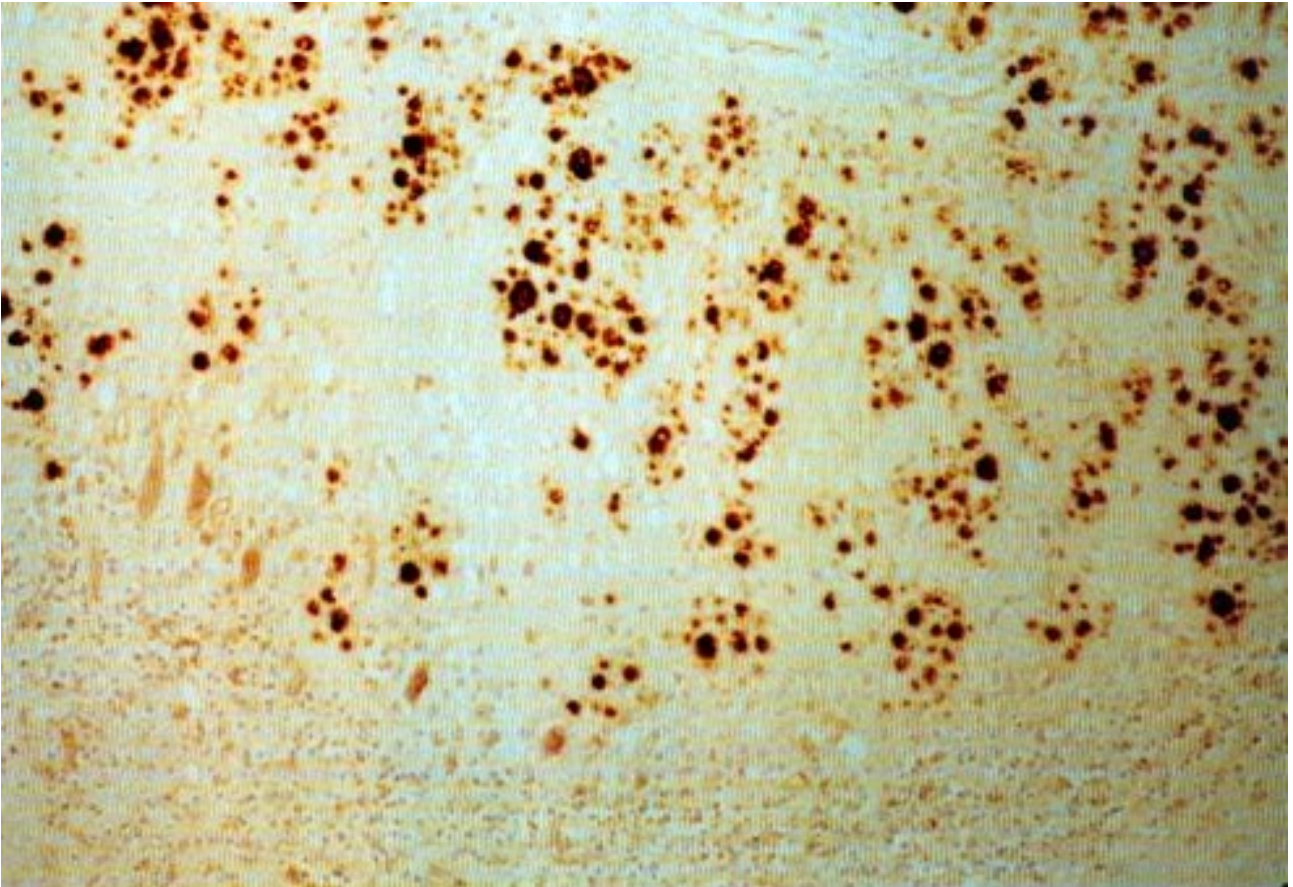


Figure IV-5.
*Plaques amyloïdes multicentriques dans le cervelet d'un patient atteint de SGSS
marquées par un anticorps anti-PrP (JLL-P36)*

(Cliché aimablement communiqué par le Pr. Brucher,
Université Catholique de Louvain, Bruxelles).

■ V. MISE EN ÉVIDENCE DE LA PROTÉINE PRION PATHOLOGIQUE

La forme pathologique de la protéine prion qui s'accumule dans le système nerveux central des patients est appelée HuPrP^c (Hu=« human », Sc=isoforme « scrapie ») par opposition à la forme normale de la protéine, HuPrP^c (c=« isoforme cellulaire ») présente à la surface des cellules et dont on ignore le rôle physiologique. Il s'agit de la propre PrP du malade qui a subi un changement conformationnel responsable de l'acquisition d'une résistance aux protéases empêchant son élimination et conduisant à la mort du neurone par apoptose. Dans les formes génétiques, les mutations affectant PrP^c sont probablement à l'origine de cette modification de la structure tridimensionnelle de la protéine alors que dans les formes acquises (MCJ iatrogène, nv-MCJ), ce sont des molécules de PrP^{Sc} introduites dans l'organisme qui imprimeraient leur propre conformation aux protéines HuPrP^c de l'hôte. Enfin, la forme sporadique de la MCJ résulterait d'un changement conformationnel fortuit de HuPrP^c dont la fréquence d'apparition serait de l'ordre de 1 pour 1 million.

- **L'immunohistochimie** : L'accumulation anormale de la PrP peut être visualisée usuellement par immunohistochimie sur coupes après biopsie ou nécropsie cérébrale. Différentes images peuvent être observées, du marquage diffus jusqu'à la mise en évidence de dépôts de PrP sous forme de plaques, dont la morphologie est caractéristique de certaines formes de maladies à prions (figure IV 5). Cependant, l'intensité de l'accumulation de PrP, le type d'anticorps utilisé, la nature du protocole de pré-traitement des lames et l'expérience du manipulateur sont des facteurs de variabilité des résultats qui ne doivent pas conduire au rejet du diagnostic lorsque l'immunomarquage se révèle négatif.
- **L'immunotransfert («Western-blot »)** : La méthode qui peut être considérée comme étant de référence est la recherche de PrP^{res} dans un extrait de tissu cérébral par des méthodes immunologiques. La détection de PrP^{res} est actuellement considérée comme étant pathognomonique des maladies à prions naturelles.

Cette recherche repose sur la sensibilité différentielle à une protéase, la protéinase K (PK), des formes normales et pathologiques de PrP. HuPrP^c est totalement détruite par la PK alors que HuPrP^{Sc} ne l'est que partiellement. On donne le nom de PrP^{res} au fragment de HuPrP^{Sc} résistant à la protéolyse. Le tissu cérébral peut-être d'origine biopsique ou nécropsique, ce dernier cas étant le plus fréquent. Quelques centaines de milligrammes de tissu cérébral sont broyés puis soumis à une digestion enzymatique ménagée par la protéinase K. L'extrait ainsi traité fait ensuite l'objet d'un immunotransfert (« Western-blot ») dont la révélation est assurée par un anticorps primaire anti-PrP, obtenu par immunisation du lapin ou de la souris, puis par un anticorps secondaire conjugué à une enzyme, la peroxydase par exemple, permettant une détection par chimioluminescence. Chez les malades, seule PrP^{res}, du fait de sa résistance à la PK, est détectable et classiquement identifiée sous la forme de trois bandes dont le poids moléculaire apparent est compris entre 20 et 30 KDa (contre 33-35KDa pour la forme non digérée).

Ces trois bandes correspondent aux formes di-, mono et aglycosylée de la protéine, appelées glycoformes de PrP.^{PrP^{res}} n'a, jusqu'à présent, jamais été identifiée dans d'autres maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. La spécificité de la recherche de PrP^{res} par immunotransfert est donc de 100%. Sa sensibilité n'a pas été évaluée mais il existe quelques situations de faux négatifs notamment si l'analyse est effectuée sur une biopsie cérébrale en raison d'une distribution inhomogène de PrP^{Sc} dans le cerveau. Idéalement, il convient d'examiner plusieurs localisations incluant au minimum, les cortex frontaux et pariétaux, les noyaux gris centraux et le cervelet, lorsque l'on dispose de la pièce autopsique. Une situation particulière est représentée par l'IFF dont les lésions et PrP^{Sc} ne sont présentes qu'au niveau du thalamus. La qualité de l'anticorps revêt ici encore une importance capitale; la mise à disposition récente d'un anticorps monoclonal, appelé 3F4, a permis d'améliorer les performances de l'immunotransfert.

Enfin, dans quelques situations de transmission expérimentales inter-spécifiques de maladies à prions {vache → souris, par exemple}, il n'a pas été possible de détecter de PrP^{res} dans le cerveau des animaux inoculés. Ce type d'observation fait penser qu'il pourrait exister des formes infectieuses de PrP^{Sc} qui ne seraient pas obligatoirement résistantes à l'action de la PK et donc non identifiables par la méthode qui vient d'être décrite.

V.1- Variantes électrophorétiques de PrP^{res} et applications

Plusieurs variantes électrophorétiques de PrP^{res} ont pu être identifiées (15) (16). Elles sont actuellement au nombre de quatre mais leur diversité pourrait être bien plus importante. Elles se distinguent les unes des autres par leur poids moléculaire apparent et/ou par l'intensité respective des trois glycoformes. Cette diversité reflète probablement l'existence de différentes conformations de PrP^{res}, toutes pathologiques, responsables de comportements électrophorétiques distincts. Un point essentiel est que ces variantes électrophorétiques ont pu être rattachées à diverses circonstances épidémiologiques et offriraient ainsi la possibilité de déterminer l'étiologie de la forme présentée par le malade (figure IV 6). Le type 1 est observé dans des cas de MCJ sporadiques homozygotes 129MM, le type 2 est également rencontré chez quelques uns de ces patients et chez tous les patients 129MV ou VV, atteints d'une MCJ sporadique. Le type 3 semble présent chez des patients ayant développé une MCJ iatrogène après traitement par l'hormone de croissance ou greffe de dure-mère mais ne serait pas exclusif de cette étiologie. Enfin, le type 4, n'a jusqu'à présent été identifié que chez les patients atteints de nv-MCJ. Il se caractérise par une représentation très majoritaire de la forme bi-glycosylée au dépend des formes mono- et aglycosylées. Il est à noter que les PrP^{res} de la souris, du chat et du Nyala expérimentalement ou accidentellement contaminés comme l'homme par l'agent de l'ESB, présentent aussi ce profil

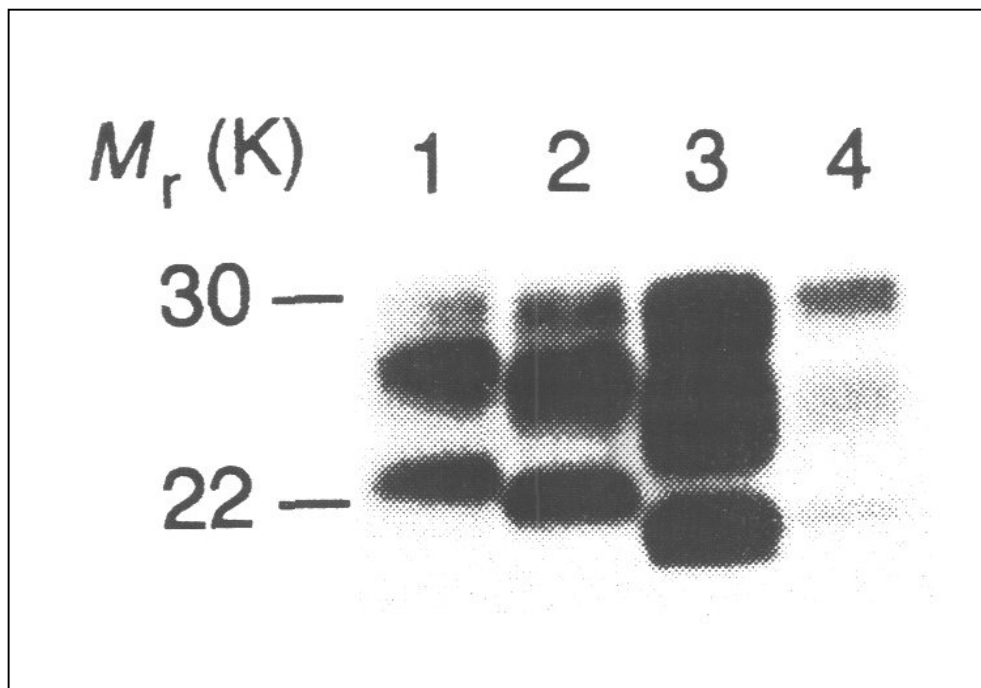


Figure IV-6.

Profils électrophorétiques de PrP^{res}.

Quatre types de profils électrophorétiques différents ont été reconnus jusqu'à présent.

Types 1 et 2 : MCJ sporadique,

type 3 : MCJ iatrogène (?) et type 4: nv-MCJ. D'après réf. 16.

électrophorétique singulier (16). On comprendra que l'immunotransfert ait acquis ces derniers temps une valeur diagnostique prépondérante dans l'exploration des patients suspects de nv-MCJ.

V.2- Recherche de PrP^{res} au niveau périphérique

La recherche de PrP^{res} au niveau périphérique a été entreprise afin d'éviter le recours à la biopsie cérébrale, qui non seulement aggrave la maladie mais constitue un acte chirurgical à risque. PrP^{res} a pu être détectée dans les amygdales, la rate et les ganglions lymphatiques de quelques patients atteints de nv-MCJ, par immunohistochimie ou immunotransfert (amygdales) (17). Ces localisations ne sont pas surprenantes et sont la conséquence de la contamination par voie digestive. Cette recherche s'est avérée jusqu'à présent négative dans les cas sporadiques, familiaux ou iatrogènes. Quelque soit l'étiologie, PrP^{res} n'a été détectée dans aucun fluide biologique.

Il faut enfin insister sur le fait que si l'immunotransfert en lui-même ne présente aucune difficulté technique importante, l'obtention et la manipulation des extraits cérébraux de malades sont des actes potentiellement à risques pour le personnel et l'environnement et qu'ils ne peuvent être entrepris que dans des laboratoires spécialement équipés utilisant des procédures particulières de traitement et d'élimination des déchets.

■ VI. CONDITIONS DE MANIPULATIONS DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les procédures générales de décontamination seront abordées dans le prochain chapitre. Précisons seulement que la manipulation des extraits cérébraux humains en vue de la réalisation de l'immunoblot pour la détection de PrP^{res} doit être effectuée dans une enceinte de niveau de confinement 3 ce qui réserve cette analyse à des laboratoires spécialisés. Les mesures de protection universelles, prises dans le cadre des bonnes pratiques de laboratoire sont suffisantes lors de la manipulation d'échantillons biologiques (sang, urine, LCR) provenant de patients atteints de MCJ : port de gants, de lunettes et de surblouses, incinération du matériel (tubes, embouts). En cas de bris de tubes au sol, sur paillasse ou dans la centrifugeuse, un traitement des surfaces ou des objets contaminés doit être réalisé avec de la soude 1N pendant une heure (sauf objets en aluminium) ou de l'Eau de Javel fraîchement diluée au demi (6° chlorométrique).

■ VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les maladies à prions humaines sont rares mais posent un problème de Santé Publique. Une bonne connaissance de l'épidémiologie de la maladie nécessite de disposer d'outils diagnostiques fiables. Le diagnostic de certitude repose toujours sur l'examen neuropathologique et la mise en évidence de PrP^{res} dans le tissu cérébral, mais il est obtenu post-mortem. L'étude du LCR a désormais l'avantage de permettre une orientation diagnostique du vivant du patient avec un degré de confiance suffisant. Le Biologiste peut ainsi maintenant participer à l'exploration des syndromes démentiels myocloniques qui ne sont pas rares et fiants certains se révèlent être d'authentiques MCJ.

Cependant, quelque soit la sensibilité et la spécificité des tests utilisés (table 3), ceux-ci ne constituent qu'une étape sur le chemin du diagnostic des maladies à prions. Le marqueur permettant à la fois leur diagnostic précoce et spécifique n'est pas encore disponible. L'obtention récente d'un anticorps monoclonal spécifique de PrP^{sc} permettant de s'affranchir de l'épreuve de digestibilité par la protéinase K entretient cet espoir (18).

	Sensibilité	Spécificité
EEG	70%	> 95%
LCR (14-3-3)	91%	98%
PRNP (mutation)	15%	100%
Neuropathologie	> 95%	> 95%
PrP ^{res}	> 95 %	100%

Table 3. Sensibilité et spécificité des principaux tests diagnostiques de la MCJ.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Laplanche J.L., Génétique moléculaire des maladies à prions. *Pathol Biol*, 1995; 43 : 104-113.
- (2) Laplanche J.L., Delasnerie-Lauprêtre N., Brandel J.P., Chatelain J., Beaudry P., Alpérovitch A., Launay J.M., Molecular genetics of prion diseases in France. *Neurology* 1994; 44 : 2347-2351.
- (3) Jimi T., Wakayama Y, Shibuya S., Nakata H., Tomaru T., Takahashi Y, Kosaka K., Asano T., Kato K., High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *CCA* 1992; 211 : 37-46.
- (4) Zerr I., Bodemer M., Räcker S., Grosche S., Poser S., Kretzschmar H., Weber T., Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1995; 345 : 1609-1610.
- (5) Harrington M.G., Merrill C.R., Asher D.M., Gajdusek D.C., Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *New Engl J Med* 1986; 315 : 279-283.
- (6) Hsich G., Kenney K., Gibbs C., Lee K., Harrington M., The 14-3-3 brain protein in CSF as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *New Engl J Med* 1996; 335 : 924-930.
- (7) Lee K.H., Harrington M.G., Premortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by cerebrospinal fluid analysis. *Lancet* 1996; 348: 887.
- (8) Zerr I., Bodemer M., Gefeller O., Otto M., Poser S., Wilfang J., Windl O., Kretzschmar H.A., Webet T., Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998; 43 : 32-40.
- (9) Beaudry P., Cohen P., Brandel J.P., Delasnerie-Lauprêtre N., Richard S., Launay J.M., Laplanche J.L., 14-3-3, neuron-specific enolase and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dementia* (sous presse).
- (10) Otto M., Wiltfang J., Tumani H., Zerr I., Lantsch M., Kornhuber J., Weber T., Kretzschmar H.A., Poser S., Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Letters* 1997; 225: 210-212.
- (11) Otto M., Stein H., Szudra A., Zerr I., Bodemer M., Gefeller O., Poser S., Kretzschmar H.A., Mäder M., Weber T., S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 1997; 244 : 566-570.
- (12) Will, R.G., Zeidler M., Brown P., Harrington M., Lee K.H., Kenney K.L., Cerebrospinal fluid test or new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1996; 348 : 955.
- (13) Otto M., Witfang J., Schütz E., Zerr I., Otto A., Pfahlberg A., Gefeller O., Uhr M., Giese A., Weber T., Kretzschmar H.A., Poser S., Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ* 1998; 316 : 577-582.
- (14) Bell J.E., Ironside J.W., Neuropathology of spongiform encephalopathy in humans. *Br Med Bull* 1993; 49 : 138-777.
- (15) Parchi P., Castellani R., Capellari S., Ghetti B., Young K., Chen S., Farlow M., Dickson D., Sima A., Trojanowski J., Petersen R., Gambetti P., Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39 : 767-778.
- (16) Collinge J., Sidle K.C.L., Meads J., Ironside J., Hill A.F., Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. 1996. *Nature*; 383 : 685-690.
- (17) Hill A.F., Zeidler M., Ironside J., Collinge J., Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*; 349 : 99-100.
- (18) Korth C., Stierli B., Strit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Krtzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Wütrich, Oesch B., Prion (PrPsc) -specific epitope defined by a monoclonal antibody. 1997 *Nature*; 390 : 74-76.

V - MALADIES À PRIONS :
MÉTHODES
DE DÉCONTAMINATION,
GESTION DU RISQUE
LIÉ AU MATÉRIEL SOUILLÉ
ET CONDUITE À TENIR
AU LABORATOIRE
Jacques-Christian Darbord

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

Le danger de transmission d'agents non conventionnels (ATNC ou Prions), par du matériel médico-chirurgical ou par des produits biologiques en établissements de soins et dans les laboratoires, constitue un risque qu'il est difficile d'évaluer, en raison des lacunes actuelles dans la connaissance exacte de la structure de l'agent infectieux et du mécanisme de l'infection. Les observations de la résistance des ATNC aux méthodes usuelles de désinfection et de stérilisation sont nombreuses et ont conduit les autorités françaises, Directions des Hôpitaux et de la Santé, à publier deux circulaires (n°45 du 12 juillet 1994, puis n°100 du 11 décembre 1995) sur « les précautions à observer en milieu chirurgical et anatomo-pathologique face aux risques de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ». Des éléments intéressants complètent les notions développées et peuvent être retrouvés dans une autre circulaire (n°236 du 2 avril 1996) relative aux modalités de désinfection des endoscopes sur les lieux de soins, bien que la faible infectiosité des sécrétions bronchiques et digestives soit reconnue. L'Organisation Mondiale de la Santé, dans des documents régulièrement publiés donne également des recommandations pour les traitements d'inactivation des Prions (25).

Les mesures prises en France ont été plus sévères et mieux structurées que dans d'autres pays européens, en raison du nombre plus important de pathologies constatées, liées à la prise en compte dès 1991 des accidents iatrogènes de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) de l'hormone de croissance (9), avant la description des cas anglais (11, 24) de contamination par voie alimentaire en mars 1996 (nv-MCJ).

■ I. MALADIES NOSOCOMIALES LIÉES AUX PRIONS

La réalité de transmission nosocomiale de la MCJ a été démontrée en un nombre très limité de cas. L'observation initiale d'une double transmission par des électrodes implantables en neurochirurgie réutilisées chez deux patients jeunes, après une première utilisation chez une personne âgée (2), est attribuée à une suite d'erreurs peu envisageable aujourd'hui : réutilisation de matériel critique et peu onéreux, simple désinfection par trempage dans de l'alcool et exposition des instruments à des vapeurs de formaldéhyde dont l'efficacité, même en référence à des micro-organismes conventionnels peu résistants, n'est pas reconnue. Une transmission par greffe de cornée (5) et surtout celles liées à l'utilisation en neurochirurgie de préparations de dure-mère commercialisées après irradiation, comme méthode de stérilisation, ont conduit les autorités à prendre des dispositions extrêmement strictes de régulation, voire d'interdiction de certains produits ou actes. Par ailleurs, les enquêtes épidémiologiques n'ont jamais réellement démontré une relation significative entre la qualité ou le niveau de procédure de désinfection en stérilisation dans un établissement, et les développements de cas de MCJ chez les patients ayant subi une intervention chirurgicale dans cet établissement. La mise en œuvre d'études rétrospectives est extrêmement difficile, principalement en raison de la rareté des cas dans la population (40 à 60 cas sporadiques ou familiaux par an en France, soit 1 cas pour 1 million d'habitants), et de la longueur de la période d'incubation qui peut être envisagée jusqu'à 40 ans (Kuru). Néanmoins, sur le plan expérimental, des expériences de transmission chez l'animal, par l'intermédiaire d'instruments, ont été faites et montrent que ce danger existe. Ceci fait l'objet d'une bibliographie abondante, souvent contradictoire (4, 10, 13, 18). Il peut être retenu les expériences de transmissions expérimentales par scarification (21), par instillation ou par contact direct sur l'œil de la souris (13), ou par le sang et les dérivés sanguins (3). L'OMS a publié des listes de tissus infectieux (25), ce qui est très utile dans l'évaluation du risque, mais ces listes devront être interprétées en tenant compte du fait que les descriptions sont relatives

Groupe 1 Infectiosité forte	Cerveau, Moelle épinière, <u>Œil</u> (non signalé OMS)
Groupe 2 Infectiosité moyenne	Ganglions lymphatiques, Rate, <u>Amygdales</u> , Iléon, Colon proximal,
Groupe 3a Infectiosité faible	Colon distal, Hypophyse <u>Muqueuse nasale</u>
Groupe 3b Infectiosité minime	LCR, Foie, Poumons, Sang
Groupe 4 Pas d'infectiosité détectée	Muscles (squelette), Cœur, Mamelles, Lait, <u>Sérum</u> , Fèces, Salive

Tableau I. Classification de l'infectiosité des tissus (OMS/Scrapie)

Les éléments soulignés sont ajoutés à la classification OMS, ou sujets à un reclassement selon des travaux récents.

à la tremblante chez le mouton, et que l'extrapolation à la pathogénie humaine ne peut être parfaite. De plus, le mode d'inoculation engendre des variations potentielles importantes.

Les éléments figurant dans le tableau I sont en général admis, avec la réserve qu'il existe actuellement des recherches visant à confirmer les risques de transmission possibles par le sang, dans des conditions très particulières. Ceci constituerait un danger plus important que le classement dans les catégories de l'OMS 3 b (infections minimales par le sang total) ou 4 (pas d'infectiosité par le sérum). Même si cette transmission ne peut être considérée comme un risque majeur dans un Laboratoire de Biologie classique, il n'est pas possible de l'éliminer au stade actuel des connaissances.

■ II. EFFICACITÉ DES MÉTHODES D'INACTIVATION VIS À VIS DES PRIONS

II.1- Méthodes d'études

L'inactivation des Prions par les méthodes usuelles de destruction des particules infectieuses connues est l'un des phénomènes biologiques le plus mal connu, et sans doute plus complexe que les éléments admis actuels ne permettent de l'appréhender. Les particules sont très résistantes, l'observation de prélèvements restant infectieux dans l'environnement pendant de longues durées ayant été décrite (1). La connaissance du phénomène d'inactivation présente une suite de difficultés sans commune mesure avec celles que savent gérer les spécialistes en désinfection ou en stérilisation. S'il est acquis que l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) est apparue dans le cheptel de Grande Bretagne après l'alimentation de bovins par des farines animales insuffisamment chauffées (11) et que ceci démontre la thermostabilité importante des particules infectieuses, il est très difficile d'étudier expérimentalement le phénomène. La structure des particules infectieuses, si elle est assimilée à la seule protéine PrP^{res} très hydrophobe, explique bien la difficulté d'accès des produits inactivants. On peut même modéliser l'action d'une particule virale masquée par la PrP^{res} (23). L'efficacité d'une procédure ne peut être prouvée qu'en exposant une préparation contenant des particules infectieuses au traitement inactivant, puis en inoculant quelques fractions de la préparation ainsi traitée à des animaux de laboratoire, par voie intracérébrale. Il n'y a pas de consensus sur la durée d'incubation validant l'absence de pouvoir infectieux résiduel, donc une stérilisation. Les préparations infectieuses sont complexes et riches en débris cellulaires (farines, macérats, homogénats de cerveaux inoculés) qui ont par eux-mêmes des propriétés neutralisantes. Le volume total de préparation, inoculable aux animaux de laboratoire est également limité à quelques microlitres, ce qui réduit la sensibilité des méthodes de détection. Il peut être ainsi admis qu'une préparation contenant 100 à 500 particules intactes peut ne pas être identifiée comme infectieuse (17). La conscience de ces limites expérimentales est nécessaire, mais leurs conséquences pratiques pour le biologiste sont encore plus difficiles à évaluer, puisqu'elles conduisent à des résultats contradictoires: les conclusions les plus fiables sont-elles celles, optimistes, qui considèrent une méthode comme efficace, ou, à l'opposé celles, plus pessimistes car plus sévères dans leurs protocoles, même si ces derniers ne représentent pas la réalité du risque.

Ainsi, une méthode considérée comme inefficace dans un contexte expérimental mal choisi serait, de ce fait, injustement éliminée, alors qu'elle aurait pu être très intéressante pour des applications particulières. En effet, une méthode de stérilisation dite efficace, même vis à vis de micro-organismes conventionnels, ne l'est qu'à l'intérieur de limites bien définies, répondant à un calcul statistique de probabilité (7). Par exemple, le niveau atteint de stérilité de la Pharmacopée Européenne (NAS) est de 1 produit non stérile par 1 million. Un exemple historique peut être donné: Il était observé, dès 1960, que la stérilisation à l'oxyde d'éthylène est pratiquement totalement inhibée par un dépôt de chlorure de sodium ou de protéines, donc par des traces de sang. Cette observation n'a pas empêché cette technique de se répandre, avec raison, pour les stérilisations industrielles ou hospitalières de dispositifs médicaux propres.

II.2- Résultats

II.2.1- Traitements inefficaces

Un certain nombre de traitements sont reconnus inefficaces dans les conditions normales d'application. Le tableau II présente l'essentiel des connaissances actuelles, avec, en particulier, une attention particulière à prendre pour l'inactivité des aldéhydes qui sont même considérés (25) comme pouvant fournir un effet négatif par protection des particules infectieuses. Notons que l'inefficacité de l'irradiation est un argument important contre la théorie du virus associé aux Prions. Dans cette hypothèse, en effet, les rayonnements ionisants, actifs sur les acides nucléiques, devraient être capables de traverser la protéine PrP^{res}, du fait de

- Détergents.
- Froid - Dessiccation. Chaleur sèche (Poupinel).
- Glutaraldéhyde, **Formaldéhyde (effet négatif)**.
- H2O2, Acide peracétique, Periodate, Permanganate.
- Ether, Ethanol, Acétone, Acides, Phénols, Alcool iodé, Iodophores.
- Gaz-plasma.
- Oxyde d'éthylène.
- Radiations ionisantes.

Tableau II. Traitements dits « inactifs »

leur pouvoir pénétrant, sans être gênés par la propriété hydrophobe. L'irradiation devrait donc inactiver directement une particule virale, ce qui n'a pas été observé jusqu'à des doses supérieures à 80 kGy.

II.2.2- Traitements efficaces

Les autorités françaises et l'OMS proposent trois traitements de référence qui sont à appliquer sélectivement, en tenant compte de limites précisées par des études expérimentales publiées par différents auteurs.

II.2.2.1- Inactivation thermique

De nombreuses références existent sur l'efficacité des hautes températures en vapeur humide sous pression, en autoclave. Les résultats peuvent être différents selon la souche d'agent utilisée (Scrapie, souches bovines, MCJ et nv-MCJ), son origine, en particulier la souche dite 22 A très thermostable (8) et le protocole retenu. La plupart des études sont réalisées sur des particules de taille importante, et en général dans le but de valider une méthode d'inactivation sur des déchets animaux et des farines. Le tableau III représente les principales références. Les travaux les

ANNÉES	AUTEURS	TRAITEMENTS
1983	KIMBERLIN (8)	136°C - 4 min
1986	BROWN (2)	132°C - 60 min
1996	OMS (25)	134°C - 18 min
1995	TAYLOR (20)	101°C à 136°C-15 à 120 min (multiples combinaisons)

Tableau III. Inactivation des ATNC, Chaleur humide à l'autoclave.

plus complets ont été effectués par Taylor sur 15 modélisations de procédures de traitement de déchets, issus d'équarrissages et de fabrications de farines de viandes et d'os contaminés (20). Onze des 15 procédures testées ont conduit à des produits dans lesquels aucune infectiosité ne pouvait être détectée. Cependant, il a été constaté dans ce travail, d'une manière inexplicable et contradictoire avec d'autres travaux, qu'un traitement de 72°C pendant 240 minutes avait été, dans des conditions précises, inactivant ! Ceci valide l'inactivation des préparations infectieuses par la chaleur humide sous pression, bien qu'il reste de nombreuses incertitudes, ainsi que le constate un rapport du Federal Register des États Unis d'Amérique (26), en particulier sur les conditions d'inoculation à la souris et sur la conservation de l'infectiosité des échantillons.

II.2.2.2. L'Hydroxyde de Sodium

Cette inactivation par la soude est la plus discutée. Les références citées (Tableau IV) sont souvent reprises et critiquées et il est peu satisfaisant pour l'esprit d'attribuer un haut pouvoir désinfectant à un produit relativement dilué (1 N) et peu efficace par ailleurs sur les autres agents infectieux (par exemple non sporicide). La facilité d'utilisation et le faible pouvoir de corrosion, en particulier par piqûre, explique sa large utilisation actuelle. Certains auteurs (6, 12, 15) ont étudié l'action couplée de la soude et de la chaleur, qui semblerait ainsi potentialisée (Tableau V). Chacun de ces auteurs attire l'attention du danger d'altération du matériel dans ces conditions qui doivent faire réserver ce traitement à la destruction des déchets en containers clos.

ANNÉES	AUTEURS	TRAITEMENTS
1986	BROWN (2)	0,1 N - 6 min
1988	TATEISHI (14)	2 N - 120 min
1993	TAYLOR (16)	2 N - 120 min
1983	KIMBERLIN (8)	1 N - 60 min
1996	OMS (23)	1 N - 60 min

Tableau IV Inactivation des ATNC, hydroxyde de sodium

ANNÉES	AUTEURS	TRAITEMENTS
1993	ERNST (6)	1 N + 125°C - 60 min
1997	TAYLOR (22)	2 N + 121°C - 30 min
1997	RUTALA - APIC (12)	N + 121°C - 60 min

Tableau V. Inactivation des ATNC, traitement couplé hydroxyde de sodium et chaleur humide à l'autoclave

II.2.2.3. L'Hypochlorite de sodium

Ce produit bénéficie d'une confiance supérieure auprès des différents auteurs (Tableau VI), mais son utilisation est restreinte pour deux raisons : la première, spécifique à la France, est que la concentration retenue par la circulaire n°100 est particulièrement élevée, (6° chlorométriques) soit une dilution au 1/8ème (12,5%) d'un concentré usuel à 48° chlorométriques, alors que les travaux référencés par l'OMS, identifient une inactivation avec une concentration de 2,5 %. La deuxième raison, aggravée par la trop haute concentration en hypochlorite, est la corrosion plus élevée qui fait rejeter, le plus souvent, ce procédé. Une eau de Javel plus diluée, appliquée pendant 15 minutes au lieu d'une heure pourrait être validée, l'Association Américaine APIC recommande, pour certaines applications, l'utilisation d'une concentration de 0,52% d'hypochlorite de sodium pendant 15 minutes (12).

ANNÉES	AUTEURS	TRAITEMENTS
1983	KIMBERLIN (8)	1,4 % -30 min
1983	KINGSBURY (9)	1,3 % -30 min
1986	BROWN (2)	0,5 % - 15 min
1996	OMS (25)	2,5 % - 60 min
1997	RUTALA - APIC (12)	0,5 à 5 % - 15 min

Tableau VI. Inactivation des ATNC, hypochlorite de sodium

III.1- Domaine d'application

Le Ministère de la Santé a donné des directives très strictes par une , circulaire n°100 (DH-DGS) du 11 décembre 1995, ayant pour but de prévenir la transmission iatrogène des Prions. Le texte de référence est complété par des textes plus spécifiques concernant par exemple les biomatériaux, les produits dérivés d'animaux, les produits dérivés du sang, les greffes de tissus et d'organes. Après une mise en œuvre de ces mesures relativement difficile en raison de problèmes pratiques, liés principalement à leur coût, l'ensemble du dispositif est à l'heure actuelle bien en place dans les établissements de soins, notamment pour le traitement des instruments et dispositifs médicaux. Les conséquences ont été une prise de conscience de l'importance de la mise en œuvre de procédures adaptées avec des retombées concernant la qualité en général, bien au-delà des problèmes spécifiques à la MCJ. Les limites évidentes sont l'absence de véritable validation de ces procédures, qui ne doivent pas être considérées comme offrant une sécurité absolue.

III.2- Principes

Il a été tenu compte, dans l'établissement des procédures, du caractère réel ou virtuel du danger de transmission lié au malade ou à l'acte. Le tableau VII précise les 4 niveaux ainsi définis, selon que le patient, ou l'acte lui-même, constitue un risque particulier. L'application de ces distinctions a été facilitée depuis qu'il est fait obligation de déclarer les suspicions de MCJ ou pathologies voisines, selon la circulaire VS/2/96/630/DGS du 10 octobre 1996. Les patients « suspects » sont ainsi définis par leur état clinique, et ceci a conduit à faire la déclaration de suspicion. Il est obligatoire dans ce cas d'incinérer directement le matériel utilisé, ou au moins le conserver en quarantaine. Les patients suspects « à risques élevés » sont identifiés au moyen de questionnaires relatifs à leurs antécédents

	Chirurgie du SNC Actes à risque démontré	Actes à risque virtuel (dont Coelochirurgie et Accouchements)
MALADES ou Suspects (en ophtalmologie (chirurgie))	Incinération	
Suspects, Patients à risque élevé	Procédure I	Procédure II
Patients à risque virtuel	Procédure II	Procédure III

Tableau VII. *Choix des procédures de traitement du matériel pour prévenir la transmission de la MCJ selon la circulaire n100 du 11 décembre 1995*

(neurochirurgie, traitement par hormone de croissance, familles présentant des maladies neurodégénératives). Le cas de la chirurgie ophtalmique est particulier, en raison du risque très élevé de transmission et de la nature même du matériel, souvent impossible à stériliser. Ce dernier doit être détruit sans exception possible en cas de MCJ diagnostiquée ou suspectée. Le Comité de Lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) doit obligatoirement être consulté dans tous les autres cas mettant en jeu les autres patients à risque élevé ou à risque virtuel.

III.3- Procédures

Trois types de traitement sont recommandés :

- Un traitement physique: autoclave 134° pendant 18 minutes
- Deux traitements chimiques :
 - trempage dans la soude 1 N pendant 1 heure à 20°C
 - trempage dans l'eau de Javel 6° Chlorométriques pendant 1 heure à 20°C.

Le tableau VIII donne les combinaisons des traitements recommandés.

Dénomination	Nettoyage	Traitement
Précautions <u>maximales</u> Procédure I	Détergent « alcalin »	Inactivation physique + chimique
Précautions <u>renforcées</u> Procédure II	Détergent « alcalin »	Inactivation physique ou chimique (de préférence physique)
Précautions habituelles Procédure III	Protocole habituel	Inactivation physique ou désinfection de haut niveau

Tableau VIII. *Détail des procédures (Circulaire n °100 DHIDGS du 11 décembre 1995)*

III.4- Recommandations complémentaires

Plusieurs recommandations sont données dans la circulaire n°100, en complément du schéma général décrit ci-dessus. Elles concernent principalement :

- les mesures très spécifiques aux laboratoires d'anatomopathologie, qui sont des recommandations de bonnes pratiques qui s'adressent à toutes les manipulations de tissus ou d'autopsies, quelles que soient l'origine et la cause du décès. Le traitement en laboratoire de préparations anatomopathologiques est reconnu comme constituant un risque identifié pour les opérateurs, la protection de l'environnement étant assurée par l'obligation d'incinération de tout le matériel jetable utilisé, ainsi que des prélèvements.

- les mesures à prendre pour le traitement des systèmes d'endoscopie, qui doivent recevoir un double nettoyage par un détergent alcalin.
- les mesures d'élimination des déchets d'activités de soins qui doivent être obligatoirement incinérés en cas d'identification d'un patient particulièrement à risque, ou si les soins sont liés à des actes à risques démontrés.
- la déclaration des accidents professionnels, qui doit être fait selon les modalités en vigueur dans l'établissement. Le suivi doit être effectué sur une période longue par la Médecine du Travail. Il est conseillé de traiter toute coupure ou piqûre par de l'eau de Javel à 6° chlorométrique (12,5% d'un concentré) pendant 5 à 10 minutes après lavage abondant. Toute projection dans les yeux doit être traitée par un lavage immédiat, abondant et prolongé, par de l'eau ou du sérum physiologique. Aucun traitement à visée préventive ne peut être recommandé en l'état actuel des connaissances.
- la décontamination des plans de travail dans le laboratoire par un linge à usage unique imprégné d'eau de Javel à 6° chlorométrique, suivi d'un rinçage à l'eau et d'un nettoyage.

■ IV. APPLICATIONS PARTICULIÈRES AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE

La prise en compte du risque de transmission des encéphalopathies transmissibles a conduit de nombreux professionnels de santé à revoir, et en général à améliorer les **précautions dites universelles d'asepsie** et d'**hygiène** telles qu'elles sont réglementées par différentes circulaires, dont la première concernait la transmission du SIDA (circulaire n°23 d'août 89). Les textes sur la transmission de maladies virales par le sang, la généralisation de l'usage unique pour les dispositifs médicaux de prélèvement ou d'examen, et le respect des réglementations générales pour l'élimination des déchets biologiques suffiraient certainement, dans le contexte épidémiologique actuel, à limiter le risque de transmission à un niveau extrêmement bas. Il peut être rappelé à ce propos qu'il n'existe pas de contamination aérienne mise en évidence et que le seul risque identifié d'accident par projection pourrait concerner l'œil. La salive, les selles n'ont pas été identifiées comme contaminantes. Néanmoins, quelques principes ou actions simples, extraits de la réglementation générale pourraient être recommandés au laboratoire, pour réduire encore ce risque déjà « virtuel », mais aussi pour tenir compte d'un éventuel accroissement de maladies de type nv-MCJ si la contamination d'origine alimentaire et bovine se révélait importante. Il pourrait ainsi être recommandé :

- d'utiliser systématiquement, pour la stérilisation du matériel réutilisable, des cycles dits « Prions » à l'autoclave (134-138°C - 18 minutes), tout en continuant à privilégier bien sûr l'usage unique chaque fois que cela est possible.

- de réhabiliter l'usage de l'eau de Javel pour la désinfection des surfaces.
- d'utiliser des détergents alcalins de typé « Prions » mis sur le marché, voire des trempages dans la soude 1N pour les pré-traitements avant stérilisation du matériel (sauf s'il est en aluminium).
- de participer au repérage des patients à haut risque, même s'il ne s'agit pas à proprement parler du rôle du responsable d'un laboratoire. Les questions relatives à l'apparition d'une démence, de troubles oculomoteurs, d'antécédents familiaux d'encéphalopathie, de transplantation ou d'antécédents d'intervention en neurochirurgie ou de traitement par hormone de croissance représentent un surcroît de travail modéré, et permettent de compléter efficacement un dossier médical.
- En cas de maladie avérée, ou de patient identifié et déclaré comme suspect, le laboratoire de référence est obligatoirement contacté et constitue un partenaire indispensable pour l'application des bonnes procédures (Hôpital Pitié-Salpêtrière, INSERM U. 360, 75651 Paris Cedex 13, Tél. 01 42 16 22 24).

■ V. CONCLUSION

Tous ces éléments participent à la vigilance accrue et peuvent être considérés comme essentiels à l'amélioration de la qualité dans les laboratoires, au même titre que la lutte contre les transmissions nosocomiales des encéphalites. L'évolution attendue de la connaissance de la structure des particules infectieuses et l'amélioration du diagnostic biologique de ces maladies constitueront la prochaine étape capable de justifier l'ensemble de ces procédures, et de les faire évoluer dans une direction encore mieux maîtrisée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Brown P., Survival of scrapie after 3 years'interment. *Lancet*, 1991; 337 : 269-270.
- (2) Brown P., Rohwer R.G., and Gajdusek D.C., Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease in brain tissue. *J infect Disease*, 1986; 153 : 1145-1148.
- (3) Creange A., Gray F., et al., Pooled plasma derivatives and CJD. *Lancet*, 1996; 347 : 482. (4) Darbord J.C., Note sur les Prions. *Hygiène S*, 1995; 9 : 18-19.
- (5) Duffy P., Wolf J. et al., Possible person to person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Eng J Med*, 1974; 290 : 692-693.
- (6) Ernst D.R., Race R.E., Comparative analysis of scrapie agent inactivation. *J Virol Methods*, 1993; 41 : 193-202.
- (7) Galtier F. La stérilisation. *Coll Pharmascopie*. Ed Arnette Blackwell, Paris, 1996.
- (8) Kimberlin R.H., Walke C.A. and Millson G.C. Disinfection studies with two strains of mouse passaged scrapie agent. *J Neurolog Sci*, 1983; 59 : 355-369.
- (9) Kingsbury D.T., Amyx H.L., and Gibbs C.J., Biophysical properties of the Creutzfeldt-Jakob agent. In : *Virus non conventionnels et affections du système nerveux central*. Court and Cathala (Eds), Masson, Paris, 1983, pp 125-136.
- (10) Paul J. Problèmes de stérilisation liés aux agents dits « Prions » des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles. *Med Mal Infect*, 1996; 26 : 295-298.
- (11) Prusiner S.B. Prion diseases of humans and animals. *Virology*, 1996; 7 : 207 -214.
- (12) Rutala W. Association for professionals in Infections Control, Guideline for selection and use of disinfectant. *Am J Infect Control*, 1996; 24 : 313-336.
- (13) Scott J.R., Foster D., and Fraser H., Conjunctival instillation of Scrapie in mice can produce disease. *Vet Microbiol*, 1993; 34 : 305-309.
- (14) Steelman V .M., Activity of sterilisation processes and disinfectant against Prions. In *Disinfection sterilisation and antisepsis in health care*, 1997; Polyscience Publications Inc, Champlain, N.Y, USA, pp 255-267.
- (15) Taguchi F., Tamai Y, et al, Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Arch Virol*, 1991; 119 : 297-301.
- (16) Tateishi J., Tashima T., Kitamoto T., Inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Ann Neurol*, 1988; 24 : 465-466.
- (17) Taylor D.M., Resistance of scrapie agent to peracetic acid. *Vet microbiol*, 1991; 27 : 19-24.
- (18) Taylor D.M., Inactivation of spongiform encephalopathies agents. *Br Med Journal*, 1993; 49 : 810-821.
- (19) Taylor D.M., Fraser H., et al., Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol*, 1994; 139 : 313-326.
- (20) Taylor D.M., Woodgate S.L., and Atkinson M.J., Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet Rec*, 1995; 137 : 605-610.
- (21) Taylor D.M., Mc Connell I., and Fraser H., Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immuno-competent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol*, 1996; 77 : 1595-1599.
- (22) Taylor D.M., Fernie K., and Mc Connell I., Inactivation of the 22 A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxyde. *Vet Microbiol*, 1997; 58 : 87-91.
- (23) Weissmann C., An unified theory of prion propagation. *Nature*, 1991; 352 : 579-583.
- (24) Will R.G., Ironside J.W., et al., A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom. *Lancet*, 1996; 347 : 921-925.
- (25) Report of a WHO Consultation on Public Health, Issues related to human and animal transmissible spongiform encephalopathies. World Health Organization, 2-3 avril 1996, Geneva.
- (26) Substances Prohibited from use in animal Food or Feed. Proposed Rule Food and Drug Administration, Federal register, January 3, 1997, 21 CFR Part 589.

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | <i>DE LA TRISOMIE 21</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i> | <i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| <i>GAZOMÉTRIE</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | <i>TOME II</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| <i>LIPIDES</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> | <i>B (VHB), DELTA (VDH),</i> |
| <i>TOME I</i> | <i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i> |
| <i>CAS ILLUSTRÉS</i> | <i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| <i>INTESTINAUX</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i> | <i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |
| <i>ET AUTOANTICORPS</i> | |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i> | |
| <i>DE LA THYROÏDE</i> | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.