



Recherche pour la référence

Détection et caractérisation des maladies à prion bovines

J.-N. Arsac, Afssa, Lyon (France)

Arsac J.-N. (2009). *Detection and characterisation of bovine prion diseases*, cahiers de la Référence, No. 2, CR2-09R01.

<http://www.afssa.fr/cahiersdelareference/numero2/PN5010.htm>



Depuis 1986, date de l'identification de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) au Royaume-Uni, nous avons dû nous adapter aux programmes de dépistage des maladies à prion chez les bovins, notamment suite à l'identification de nouvelles formes atypiques (ESB-L, ESB-H). Pour cela nous avons développé et/ou évalué différents outils pour l'identification et la distinction de l'ESB, l'ESB-L et l'ESB-H.

En particulier, nous avons évalué un nouvel outil moléculaire: le TeSeE®-Wb. Cet outil, en démontrant des performances intéressantes, principalement dues à son anticorps monoclonal Sha31, a rejoint le panel de méthodes utilisé en France pour la détection et la discrimination des différentes encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) bovines.

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST), telles que l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), la tremblante des petits ruminants ou le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob sont des maladies neurodégénératives systématiquement fatales. Ces maladies sont induites par un groupe d'agents infectieux hors du commun, qui présente des propriétés de résistance aux procédés classiques d'inactivation des micro-organismes, leur valant parfois la dénomination d'Agents Transmissibles Non Conventionnels (Harris, 1999).

La nature biochimique des agents impliqués dans les ESST reste encore mal connue, et l'hypothèse la plus répandue suggère leur identité avec une isoforme pathologique d'une protéine habituellement exprimée à la surface de nombreux types cellulaires, principalement les neurones. Baptisée PrP^{sc}, cette isoforme constitue l'unique marqueur moléculaire spécifique des ESST. Elle est généralement identifiable par ses propriétés biochimiques particulières d'insolubilité en présence de détergents et de résistance partielle à la digestion par les protéases (McKinley *et al.*, 1983; Prusiner *et al.*, 1984).

Sous sa forme cellulaire, la protéine prion est soluble en conditions peu dénaturantes alors que la PrP^{sc} est insoluble et s'agrège très rapidement pour former des fibres amyloïdes. De plus, alors que la protéine prion cellulaire est totalement dégradée en présence de protéinase K, la forme pathogène est partiellement résistante. L'effet de l'enzyme sur la PrP^{sc} conduit à la production d'un fragment clivé côté N-terminal. Présent sous différents états de glycosylation (non glycosylé, mono-glycosylé, bi-glycosylé), ce fragment est baptisé PrP^{res} (Meyer *et al.*, 1986).

Ces deux critères différenciant les formes cellulaire et pathologique de la protéine prion sont classiquement utilisés pour l'identification de la PrP^{sc} chez les individus et animaux atteints d'ESST et pour l'étude des maladies à prion. En particulier, l'étude des produits de clivages obtenus après digestion partielle de la PrP^{sc} par les protéases participe à la caractérisation de ces maladies au regard de leur profil de migration. Ce mode d'approche permet notamment d'identifier différents types moléculaires au sein des espèces ovine (Arsac

et al., 2007a; Hill *et al.*, 1998) et bovine (Baron and Calavas, 2005; Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004).

Dans le cadre de ses activités de laboratoire national de référence (LNR) pour le diagnostic des maladies à prion chez les ruminants, le laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes de l'Afssa à Lyon contribue au développement et à l'optimisation des méthodes d'analyse qui sont employées.

Ces dernières années de nombreux changements ont été observés concernant le diagnostic post mortem des ESST chez les bovins. L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), dont l'origine probable est la consommation de farines de viande et d'os contaminées, a été identifiée pour la première fois en 1986 au Royaume-Uni. Par la suite, en juin 1990, le ministère de l'Agriculture français a mis en place un réseau d'épidémiosurveillance clinique de la maladie qui a conduit à l'identification du premier cas français d'ESB en février 1991. Le dépistage de la maladie était alors basé sur l'observation de signes cliniques caractéristiques mais non spécifiques; la confirmation du diagnostic était quant à elle fondée sur l'identification de lésions cérébrales (spongiose, gliose) en des sites anatomiques précis du système nerveux central (SNC) des animaux suspects. Selon ce schéma, en France, les déclarations d'ESB ont été erratiques jusqu'en 1997 avant d'augmenter en 1998 (18 cas) et 1999 (32 cas).

À partir de juin 2000, l'augmentation du nombre de cas diagnostiqués a progressé de façon remarquable (164 cas en 2000) suite à la mise en place d'un programme de dépistage des ESST bovines qui prévoyait de tester 48000 animaux sur l'année 2000 à l'aide de tests biochimiques (immunoblot, ELISA) reposant sur une détection immunologique de la PrP^{res}. Cette augmentation du nombre de cas diagnostiqués s'est poursuivie en 2001 (276 cas en 2001) après le lancement d'un programme de dépistage systématique par tests biochimiques de tous les bovins de plus de 30 mois à l'équarrissage et à l'abattoir (20000 tests par semaine).



Recherche pour la référence

Cahier numéro 2
Décembre 2009

Ces modifications du mode de dépistage ont nécessité une adaptation des moyens de diagnostic pour répondre notamment à l'identification d'isolats précliniques mais aussi à l'identification de deux nouvelles ESST bovines très probablement « spontanées », distinctes de l'ESB d'origine alimentaire connue depuis 1986. Jusqu'en 2004, une unique maladie à prion était reconnue dans l'espèce bovine, les isolats atteints d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine se caractérisaient par une signature biochimique de la PrP^{res} monomorphe (Maded *et al.*, 2000), une distribution des lésions très univoque au niveau du système nerveux central (Simmons *et al.*, 1996) et des résultats de caractérisation sur modèle uniforme (Bruce *et al.*, 1994; Green *et al.*, 2005). Mais en 2004, deux nouveaux types moléculaires d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine ont été identifiés par comparaison à l'ESB d'origine alimentaire. Une ESB dite de type H (High) (Biacabe *et al.*, 2004) présentant principalement un plus haut poids moléculaire de sa PrP^{res} et une ESB dite de type L (Low) ou Bovine Amyloïde Spongiforme Encephalopathy (BASE) (Casalone *et al.*, 2004) montrant une faible proportion de la PrP^{res} bi-glycosylée. Cette suspicion de l'existence de trois formes d'ESST bovines fut récemment levée par les résultats de la transmission expérimentale de ces nouveaux types moléculaires aux modèles murins et à l'espèce hôte bovine, résultats qui ont confirmé l'existence de trois formes d'ESST bovines distinctes (Baron *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2006; Beringue *et al.*, 2007; Beringue *et al.*, 2006; Beringue *et al.*, 2008; Buschmann *et al.*, 2006; Capobianco *et al.*, 2007). En conséquence plusieurs nouveaux outils biochimiques et immunohistochimiques de détection/discrimination/identification de la PrP^{res} ont été développés et/ou optimisés, dont un immunoblot baptisé ultracentrifugation-Wb (Maded *et al.*, 2000), initialement développé par le CEA et dérivant de la méthode référencée dans le manuel de l'OIE. D'autre part, l'Afssa a également suivi et évalué les différents tests commerciaux pour le dépistage ou le diagnostic des ESST bovines, notamment un nouveau test de Western blot commercial: le TeSeE®-Wb (Arsac *et al.*, 2007b).

Concernant l'évaluation du TeSeE®-Wb, le premier objectif fut de déterminer la sensibilité diagnostique et analytique de ce nouvel outil en le comparant à l'ultracentrifugation-Wb. Pour cela 59 cas d'Encéphalopathie spongiforme bovine ont été analysés. Ces isolats collectés en France dans le cadre des différents programmes de surveillance des ESST bovines durant le second semestre de l'année 2003, avaient tous été confirmés comme atteints d'Encéphalopathie spongiforme bovine après des analyses immunohistochimiques et/ou biochimiques. Au regard des résultats obtenus pour les 59 cas d'ESST analysés, le TeSeE®-Wb présente une meilleure sensibilité diagnostique que l'ultracentrifugation-Wb (Tableau 1). Les 52 cas identifiés comme positifs avec l'ultracentrifugation-Wb se sont également révélés positifs avec le test TeSeE®-Wb. *A contrario*, 4 cas d'ESST ont été identifiés comme positifs uniquement avec le TeSeE®-Wb.

Tableau 1: Sensibilité diagnostique du TeSeE®-Wb par comparaison à l'ultracentrifugation-Wb.

Résultats d'analyse pour 59 isolats d'ESST bovines (+: positif, -: négatif). Le TeSeE®-Wb a été réalisé avec l'anticorps monoclonal Sha31 pour l'immunodétection de la PrP^{res}. L'ultracentrifugation-Wb a été réalisé avec l'anticorps monoclonal Saf 84 pour l'immunodétection de la PrP^{res}.

Isolats d'ESST	Ultracentrifugation-Wb (Saf84)	TeSeE®-Wb (Sha31)
n=52	+	+
n=4	-	+
n=3	-	-

La comparaison des sensibilités analytiques a également révélé une différence de performance entre les deux méthodes. De manière générale, 40 fois moins de tissu cérébral sont nécessaires avec le test TeSeE®-Wb pour observer une détectabilité de la PrP^{res} comparable à celle obtenue avec l'ultracentrifugation-Wb (Fig. 1A et Fig. 1B). Cette différence de sensibilité paraît principalement relever d'une différence de sensibilité entre anticorps et non pas d'une différence entre méthodes de purification et de concentration de la PrP^{res}. Ainsi lorsque l'on utilise l'anticorps Sha31 (anticorps du test TeSeE®-Wb) en lieu et place de l'anticorps Saf84 (anticorps de l'ultracentrifugation-Wb utilisé de 1998 à 2004) la méthode d'ultracentrifugation-Wb présente une sensibilité analytique proche de celle du test TeSeE®-Wb. On note cependant, avec l'ultracentrifugation-Wb, une lisibilité des profils électrophorétiques réduite par la présence d'immunomarquages non spécifiques (Figure 1C).

Après avoir évalué les possibilités de mise en évidence du marqueur spécifique des ESST avec le test TeSeE®-Wb nous avons souhaité évaluer ses possibilités de détection, d'identification et de distinction des différentes ESST bovines: ESB, ESB-H et ESB-L. De façon intéressante le TeSeE®-Wb permet de détecter les trois formes de maladie à prion actuellement connues chez les bovins (Fig. 2A). De plus, les caractéristiques moléculaires initialement décrites pour chacun de ces 3 types d'encéphalopathie spongiforme bovine sont retrouvées avec cet outil: un plus haut poids moléculaire pour la PrP^{res} identifiant les isolats ESB-H et une plus faible proportion de la PrP^{res} bi-glycosylée pour les isolats ESB-L par comparaison à l'ESB d'origine alimentaire (Fig. 2A et Fig. 2B).

À la lueur de ces données, et compte tenu du fait que le LNR se doit de disposer des outils les plus performants pour la détection/identification/discrimination des ESST, en 2004 le test TeSeE®-Wb et plus particulièrement l'anticorps Sha31 ont rejoint la liste des outils utilisés pour l'analyse des bovins suspects de maladie à prion. Cependant, il faut rappeler qu'aujourd'hui encore, la méthode la plus sensible pour l'identification de l'agent infectieux responsable des ESST reste l'inoculation expérimentale à l'animal de laboratoire. Mais pour des raisons de délais (plusieurs mois à plusieurs années) et de coût, l'inoculation expérimentale est réservée à l'étude de quelques isolats chaque année.



Recherche pour la référence

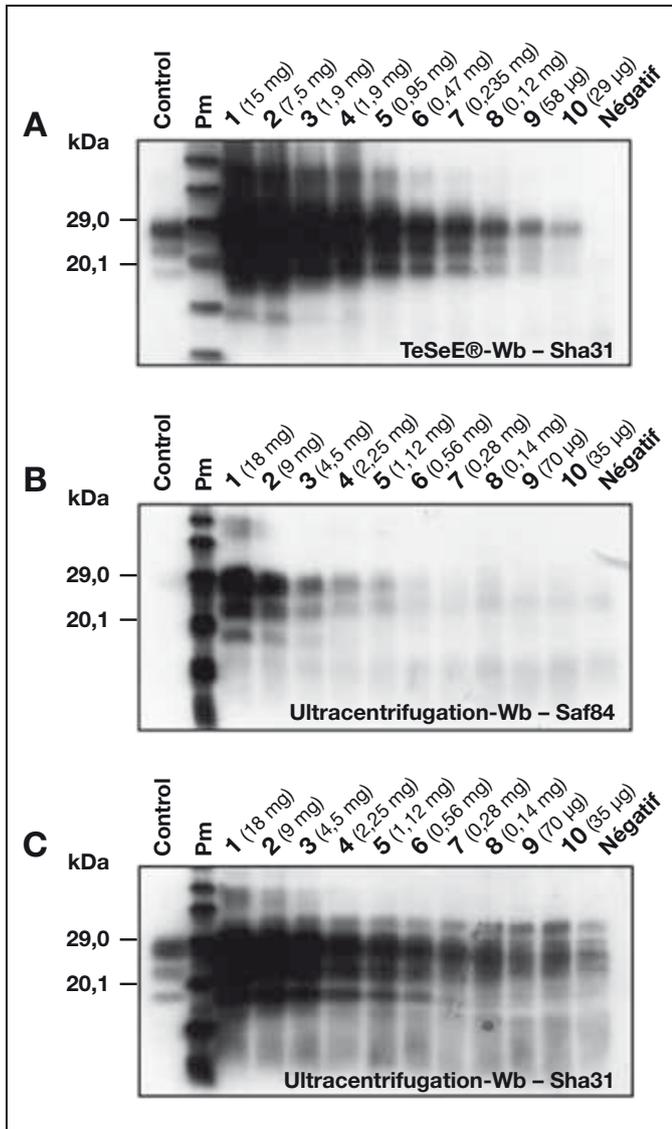


Figure 1: Sensibilité analytique du TeSeE®-Wb par comparaison à l'ultracentrifugation-Wb.

Chaque série représente 10 dilutions indépendantes (dilutions 1:1 au 1:512 pour les pistes 1 à 10) d'un homogénat de cerveau de bovin atteint d'ESB dilué dans un homogénat de cerveau de bovin sain. L'équivalent en tissu cérébral du bovin positif est précisé pour chaque piste compte tenu des différences de méthodes d'extraction/concentration de la PrPres. (A) TeSeE®-Wb réalisé avec l'anticorps monoclonal Sha31 pour l'immunodétection de la PrPres. (B) Ultracentrifugation- Wb réalisé avec l'anticorps monoclonal Saf84 pour l'immunodétection de la PrPres. (C) Ultracentrifugation-Wb réalisé avec l'anticorps monoclonal Sha31 pour l'immunodétection de la PrPres. Un isolat d'ESB a été déposé au titre de témoin d'immunoreactivité (piste Control). Poids moléculaire (piste Pm).

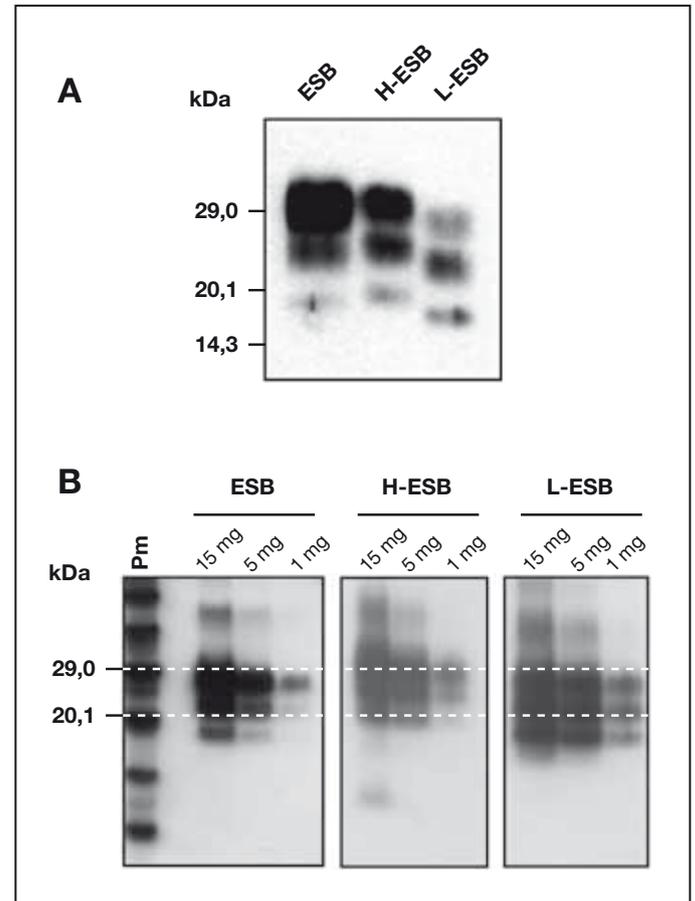


Figure 2: Détection des différentes ESST bovines avec le TeSeE®-Wb.

(A) Profils électrophorétiques de la PrPres pour l'ESB, l'ESB dite de type H et l'ESB dite de type L (ou BASE) obtenus avec le TeSeE®-Wb. (B) Analyse des profils électrophorétiques de la PrPres. Des quantités variables en équivalent de tissu cérébral (15 mg, 5 mg et 1 mg) ont été déposées pour chaque type d'ESST bovine afin de faciliter la lecture comparée des patterns électrophorétiques. L'ESB-H présente un poids moléculaire apparent pour sa forme non-glycosylée de la PrPres plus élevé. L'ESB-L présente une proportion de bande bi-glycosylée inférieure à la proportion en forme mono-glycosylée.



Recherche pour la référence

Références bibliographiques

Arsac J-N, Andréoletti O, Bilheude JM, Lacroux C, Benestad SL, Baron T. 2007a. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*, 13(1) : 58-65.

Arsac JN, Biacabe AG, Nicollo J, Bencsik A, Baron T. 2007b. Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle. *Acta Neuropathol*, 114(5) : 509-516.

Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Morignat E, Bessen RA. 2007. Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and L-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. *Emerg Infect Dis*, 13(12) : 1887-1894.

Baron T, Calavas D. 2005. [Bovine spongiform encephalopathy]. *Pathol Biol (Paris)*, 53(4) : 229-236.

Baron TG, Biacabe AG, Bencsik A, Langeveld JP. 2006. Transmission of new bovine prion to mice. *Emerg Infect Dis*, 12(7) : 1125-1128.

Beringue V, Andreoletti O, Le Dur A, Essalmani R, Vilotte JL, Lacroux C, Reine F, Herzog L, Biacabe AG, Baron T, Caramelli M, Casalone C, Laude H. 2007. A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J Neurosci*, 27(26) : 6965-6971.

Beringue V, Bencsik A, Le Dur A, Reine F, Lai TL, Chenais N, Tilly G, Biacabe AG, Baron T, Vilotte JL, Laude H. 2006. Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog*, 2(10) : e112.

Beringue V, Herzog L, Reine F, Le Dur A, Casalone C, Vilotte JL, Laude H. 2008. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis*, 14(12) : 1898-1901.

Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. 2004. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, 5(1) : 110-115.

Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. 1994. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 343(1306) : 405-411.

Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eiden M, Baron T, Casalone C, Groschup MH. 2006. Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol*, 117(2-4) : 103-116.

Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G, Bruzzone MG, Minati L, Corona C, Acutis P, Gelmetti D, Lombardi G, Groschup MH, Buschmann A, Zanusso G, Monaco S, Caramelli M, Tagliavini F. 2007. Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog*, 3(3) : e31.

Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. 2004. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9) : 3065-3070.

Green R, Horrocks C, Wilkinson A, Hawkins SA, Ryder SJ. 2005. Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions. *J Comp Pathol*, 132(2-3) : 117-131.

Harris DA. 1999. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, 12(3) : 429-444.

Hill AF, Sidle KC, Joiner S, Keyes P, Martin TC, Dawson M, Collinge J. 1998. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neurosci Lett*, 255(3) : 159-162.

Madec JY, Belli P, Calavas D, Baron T. 2000. Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet Rec*, 146(3) : 74-76.

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35(1) : 57-62.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8) : 2310-2314.

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, 38(1) : 127-134.

Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IW, Wells GA. 1996. BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec*, 138(8) : 175-177.