

BREF SURVOL DES CONNAISSANCES, DES HYPOTHESES ET DES INCERTITUDES SUR LES MALADIES A PRIONS

**Mohammed Moudjou,
Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires
Equipe Infections à prions, INRA 78352, Jouy en Josas, France**

La maladie de la vache folle a constitué une crise qui a fait *trembler* l'Europe en cette fin du vingtième siècle. Si cette maladie a été identifiée chez les bovins au milieu des années 1980, son origine exacte n'est pas encore clairement déterminée. L'année 2002 a vu surgir un certain nombre de nouveautés dans le domaine des maladies à prions. La contamination du muscle squelettique dans un modèle de souris de laboratoire mais non confirmée chez les bovins et les ovins, les premiers cas d'ESB découverts en Pologne et surtout dans le premier pays du moyen orient (Israël), la démonstration du caractère transmissible d'une autre maladie amyloïde (amyloïdose systémique) chez la souris ainsi qu'un autre exemple de prion chez le champignon *Podospora anserina*, le passage possible de l'ESB sous la forme d'une MCJ sporadique chez des souris transgéniques^[7] et enfin la démonstration que la langue puisse être une voie de contamination très efficace chez le hamster^[33] sont autant de faits marquants nous donnant l'occasion de rappeler l'essentiel de l'histoire de ces maladies à prions. La découverte du premier cas en Israël, le deuxième pays non européen après le Japon touché par l'ESB, pose la question de l'éventuelle présence des cas d'ESB dans d'autres pays encore (pays du moyen orient, du Maghreb...). La mise en place de systèmes efficaces de prévention (surveillance clinique, retraits des MRS) combinée à l'utilisation des tests de diagnostic disponibles semblent de plus en plus nécessaires dans la plupart des pays ayant eu des échanges conséquents avec l'Europe, soit en terme d'importation d'animaux soit de farines animales, afin de protéger la population.

Préambule d'une histoire folle

La maladie de la vache folle pourrait être racontée sous la forme d'un conte, un peu cauchemardesque certes, mais un conte quand même (voir aussi l'histoire du Kuru plus bas). Ce n'est nullement dans le but d'effrayer les enfants et les adultes, mais cela montre qu'à vouloir trop miser sur la rentabilité économique, sans se soucier des conséquences, on peut aboutir à des situations dramatiques. Après la première guerre mondiale (vers 1930), les besoins européens en lait et en viande bovine et ovine, étaient tels que l'utilisation des farines animales fut introduite dans l'alimentation de ces ruminants (herbivores). Ces Farines de Viandes et d'Os (FVO), issues de carcasses d'animaux venant d'abattoir ou de centres d'équarrissage, constituaient un apport protéique utile pour nourrir les vaches sélectionnées pour la production laitière. Jusqu'aux années 1970-1980, aucun cas d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) ne fut recensé dans les troupeaux de vaches en Europe nourries

avec ces suppléments de farines animales. Ces farines étaient jusque là préalablement chauffées à 120°C et délipidées par un traitement chimique à l'héxane. A la suite de la crise pétrolière provoquée par la guerre au moyen orient en 1973, le gouvernement Anglais décida, pour pallier ce manque de matière énergétique première, d'abaisser la température de stérilisation des farines animales à 80-90°C et d'éliminer le traitement à l'héxane. A l'époque, on savait déjà que le prion était très résistant même à des températures allant jusqu'à 120°C (les traitements les plus efficaces pour inactiver le prion étant : l'autoclavage à 133°C pendant 20 min sous 3 bars de pression de morceaux de taille inférieure à 50 mm; le traitement à la soude 1N pendant 1 heure à 20°C; l'action de l'eau de Javel à 6° chlorométriques à 20°C durant 1 heure). Il se peut qu'à partir de ce moment, les premières farines mal décontaminées soient entrées dans la chaîne alimentaire des bovins, puisque le premier cas de vache folle est apparu en Angleterre en 1985. Or, on sait que la période silencieuse d'incubation de cette maladie est en moyenne de 4-5 ans chez les bovins. Néanmoins, l'origine exacte de la présence du prion dans ces farines est encore actuellement mal déterminée. Elle pourrait être due au recyclage dans ces farines de matériels ovins ayant la tremblante qui serait alors passée à la vache. On pense aussi que des cas sporadiques de vaches folles non décelés seraient entrés dans la voie de fabrication de ces farines mal inactivées à cause des modifications apportées à leur traitement. Il faut souligner qu'un gramme de cerveau atteint d'ESB suffit pour contaminer un autre bovin par voie orale. On estime alors qu'un animal infecté incorporé dans les farines animales peut contaminer jusqu'à 600 bovins. L'épidémie de la vache folle s'est vue amplifiée par la suite à l'image de ce j'appelle l'effet "Gremlins" (voir Figure 1). Dans cette fiction de Joe Dante, où chacun peut voir des symboles différents, on découvre que lorsqu'une goutte d'eau touche *Mogwai*, le premier inoffensif Gremlins, cela favorise sa multiplication en donnant de très dangereux Gremlins ayant une apparence différente et un comportement destructeur incontrôlable. A leur tour, ces derniers se multiplient d'une façon exponentielle après contact avec d'autres gouttes d'eau, etc, etc. Dans ce parallélisme imagé, le *Mogwai* serait la protéine normale du Prion (PrPc), les dangereux Gremlins seraient la protéine Prion pathologique (PrPsc voir plus bas). Et si la première goutte d'eau ayant déclenché les maladies à prions est encore non clairement identifiée (sporadique, mutation, délétion... ?), la deuxième série de goutte d'eau ayant amplifié le phénomène serait alors l'action/l'intervention de l'Homme (recyclage des prions dans les farines animales mal décontaminées, utilisation d'hypophyses de cadavres atteints de MCJ pour l'extraction de l'hormone de croissance dans les années 80, les pratiques cannibales chez les Fores (voir plus bas), contamination du sol... ?).

Les ESST sont des MRPs: des Maladies du Repliement des Protéines

La maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ), la tremblante du mouton (ou Scrapie) et l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), plus populaire sous le nom de maladie de la vache folle, appartiennent au groupe des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) (voir tableau I et le numéro hors série de la revue *Biofutur* du mois d'Avril 2001). Elles sont transmissibles par différentes voies et caractérisées par des

périodes d'incubation allant de quelques mois à plusieurs années selon l'espèce, la dose, la souche, la voie d'inoculation et le statut génétique de l'espèce réceptrice. Ces maladies ne provoquent pas de réactions inflammatoires classiques mais possèdent toutes des points communs aux plans clinique, biologique et anatomopathologique. Contrairement à d'autres maladies infectieuses transmissibles, la nature de l'agent responsable de ces pathologies dites à prions (d'après Prusiner, Prion: **Proteinaceous Infectiousness Only**), et les mécanismes de leur transmissibilité ne sont pas encore complètement élucidés. Néanmoins, une glycoprotéine présente dans les neurones, mais aussi dans d'autres types cellulaires, est clairement impliquée dans le développement de cette maladie. En effet, une forme anormale appelée PrP^{sc} (PrP pour protéine du prion et sc pour scrapie, mot Anglais pour la tremblante, to scrap = gratter) de la protéine cellulaire (PrP^c) normale s'accumule dans le cerveau des animaux atteints, provoquant des lésions neurodégénératives. La PrP^c est une protéine associée à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) et possède deux sites de glycosylation, d'où sa visualisation en trois bandes après électrophorèse correspondant aux formes mono-, bi- et non glycosylées (voir Figure 3). Elle peut fixer des atomes de Cuivre dans sa partie N-terminale. Il a été établi que les deux formes de la protéine PrP (PrP^c et PrP^{sc}) sont codées par le même gène. Cependant, différentes analyses montrent que ces deux formes de PrP ont des propriétés biochimiques et des conformations tridimensionnelles différentes (voir plus loin et tableau II). Dans l'hypothèse de la protéine PrP^{sc} seule comme agent infectieux (Protein Only Concept: POC), la trans-conformation de la PrP^c normale est induite par la PrP^{sc} anormale [1]. Ces résultats ont fait, et continuent de faire, l'objet de discussions parmi les biologistes [2] puisqu'ils révélaient la possible existence d'une *hérédité structurale*, autrement dit qu'une protéine anormalement structurée puisse directement *instruire* ou *imposer* sa conformation à son équivalent normal (protein-based inheritance). C'est ce qu'on peut appeler les MRP : *Maladies du Repliement des Protéines*.

Outre le prion, il est intéressant de noter qu'il existe d'autres pathologies associées au repliement incorrect de protéines (MRP). La formation de fibres amyloïdes est rencontrée dans la maladie d'Alzheimer (protéine b), l'amyloïdose systémique sénile (transthyréline, transporteur de la thyroxine), l'amyloïdose systémique primaire (chaîne légère d'immunoglobuline) (voir réf. [3]). Toutes ces protéines sont capables d'agrégations fibrillaires en plaques amyloïdes insolubles caractérisées par une répétition de motifs en feuillets bêta.

Les différentes classes d'ESSTs (tableau I et III)

Dessine-moi un mouton qui tremble!

La tremblante du mouton, ou scrapie, est la plus ancienne des ESSTs décrite dans la littérature. Les premiers cas ont été rapportés en Angleterre en 1732. Il s'agit d'une maladie endémique qui touche également la chèvre et le mouflon et qu'on rencontre dans la plupart des pays à l'exception de la Nouvelle Zélande et de l'Australie (depuis 1952). Dans certains troupeaux, elle peut toucher jusqu'à 30% des animaux. En Angleterre, environ 15% des troupeaux sont atteints et il faut souligner qu'il y a 40 millions de moutons dans ce pays. Dans

le reste de l'Europe, on a dénombré en 1999 une cinquantaine de cas en France, 14 en Italie et au Canada, 12 en Hollande, 11 en Grèce et en Chypre et 2 en Allemagne. Pour estimer avec davantage de précision la prévalence de la tremblante en Europe, une campagne de surveillance par tests rapides a été mise en œuvre sur 100 000 ovins dans tous les pays de l'Union Européenne depuis le début de cette année (2002). Les dernières données indiquent que depuis 1996, 321 foyers de tremblante ont été répertoriés sur l'ensemble du territoire Français, avec toutefois une prédominance dans la région Sud qui comprend la plus forte densité d'élevages ovins.

La tremblante naturelle se transmet sur le mode horizontal, probablement à cause de l'ingestion du placenta, et aussi de la contamination du pâturage au sein d'un même troupeau. Elle peut également se transmettre dans certains cas sur le mode vertical, de la brebis à l'agneau. Classiquement, deux formes cliniques de la tremblante ont été décrites. La première est dite *prurigineuse* et se manifeste par des démangeaisons cutanées aboutissant généralement à des lésions et à une disparition de la laine. Les animaux meurent de cachexie (épuisement) au bout de quelques mois après la manifestation de ces symptômes. La deuxième est dite *nerveuse* et se caractérise par une tremblante accompagnée d'une hyperexcitabilité des animaux.

La tremblante du mouton représente un modèle très intéressant pour l'étude des ESSTs car une sensibilité génétique à la maladie a été clairement décrite dans cette espèce. En effet, il existe un polymorphisme génétique dont le plus significatif se situe dans trois positions de la protéine PrP (acides aminés 136, 154, 171). Cette variabilité allélique est liée à la sensibilité ou à la résistance à cette maladie. Les animaux possédant l'allèle ARR (A Alanine, R Arginine) en ces trois positions sont résistants alors que ceux ayant l'allèle VRQ (V Valine, Q Glutamine) sont très sensibles à la tremblante. Il suffit qu'un animal possède un seul allèle ARR (hétérozygote VRQ/ARR) pour qu'il puisse résister assez bien à la maladie. Les mécanismes moléculaires contrôlant cette susceptibilité ne sont pas à l'heure actuelle complètement déchiffrés. Une des approches d'éradication de la tremblante est la sélection génétique de race ayant le génotype de résistance. Des programmes de ce style sont actuellement menés en Grande Bretagne et en France.

Rites cannibales et la maladie du Kuru

La maladie du Kuru, malgré son côté préhistorique, représente un bon exemple illustrant la transmissibilité des maladies à prions. C'est dans les années 1955 qu'une anthropologue, Shirley Lindenbaum, a émis l'hypothèse que la maladie du Kuru puisse être associée à la pratique du cannibalisme. Là encore, l'origine primaire (la première goutte d'eau) des premiers malades du Kuru reste inconnue, mais on peut aisément supposer qu'un premier cas de CJD sporadique ou familial consommé par la population puisse en être le déclencheur. En effet, dans le cadre de rites funéraires de pratiques cannibales, les Fores (peuplade de la Papouasie Nouvelle Guinée) dépeçaient et consommaient certaines parties du défunt. La plupart des parties du corps étaient consommées: les femmes et leurs enfants mangeaient essentiellement le cerveau et certains abats, alors que les hommes se réservaient les parties musculaires, symbole de courage et de force. Avec le recul scientifique, nous comprenons pourquoi cette maladie touchait essentiellement les femmes et les enfants, le cerveau étant l'organe le plus

infectieux alors que le muscle ne l'est pas (voir plus loin). Les symptômes cliniques décrits par le Dr. Gajdusek étaient les suivants: la maladie débutait par des maux de tête et des douleurs dans les membres et les articulations. Ensuite apparaissaient des troubles de l'équilibre (ataxie), des tremblements intentionnels, des troubles de l'élocution, du strabisme (chez les enfants), une agressivité, des pleurs et des rires incontrôlables. Elle se terminait par un état de marasme avec impossibilité de s'alimenter débouchant sur un coma et une mort inéluctable. L'autopsie des cadavres révéla des lésions spongiformes caractéristiques dans le cerveau ainsi que des plaques amyloïdes. Vers la fin des années 60, Gajdusek réussit à transmettre expérimentalement le Kuru au chimpanzé et à d'autres espèces animales, prouvant ainsi la nature infectieuse de la maladie. Il reçut le prix Nobel de médecine en 1976. Cette maladie disparut quasiment avec l'arrêt du cannibalisme.

La maladie de Creutzfeld-Jacob et sa diversité

La maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ ou CJD de l'anglais Creutzfeld-Jacob Disease) a été observée pour la première fois au début du siècle dernier (1920-1921) par deux médecins allemands dont la maladie porte le nom. La MCJ comporte plusieurs formes (voir tableau III):

**une forme sporadique (MCJs) majoritaire.* Elle représente 80% des MCJ et se déclare partout dans le monde entre l'âge de 50-75 ans (âge moyen 65 ans). Elle touche environ 1 personne par million d'habitant. Le terme sporadique cache simplement notre ignorance sur l'origine exacte de cette forme d'ESST. Elle pourrait être due à une conversion spontanée de la PrPc en PrPsc pour des raisons encore indéterminées. Ces cas de MCJ sporadiques pourraient-ils provenir d'une contamination passée inaperçue par l'agent de la tremblante? Depuis l'existence de la tremblante, aucun exemple de transmission de cette maladie à l'homme n'a été montré. Si cela était le cas, le nombre de MCJ sporadiques devrait être plus élevé que celui observé, sauf si on suppose que l'agent de la tremblante passe de façon inefficace directement à l'homme. Cela n'exclue pas l'existence d'une autre source de contamination que nous n'avons pas encore identifiée. En tous cas, toute cette discussion n'est que le fruit d'hypothèses reflétant nos doutes et nos incertitudes sur cette pathologie de fin du millénaire. Cependant, une nouvelle hypothèse basée sur des expériences scientifiques, vient d'être émise par l'équipe de Suzane Lindquist () vers la fin de l'année 2002. Il faut souligner que cette hypothèse n'est pas encore admise par la plupart des scientifiques du domaine du prion. Cette théorie postule que c'est la défaillance dans le système cellulaire de « Contrôle Qualité » de la biosynthèse des protéines qui pourrait être impliquée dans le déclenchement de certaines maladies à prions. Les protéines mal formées lors de leur biosynthèse dans le réticulum endoplasmique, et donc inactives, sont expulsées vers le cytoplasme. Elles sont par la suite marquées par une petite étiquette peptidique, l'Ubiquitine, puis prises en charge par une petite usine cellulaire, le protéasome, un complexe macromoléculaire spécialisé dans l'élimination par protéolyse de ces protéines. L'inhibition temporaire par des drogues de l'activité protéasique du « protéasome », conduit à l'accumulation d'une forme de la protéine PrP ayant des caractéristiques biochimiques de la PrPsc (insolubilité dans les

détergents, résistance à la protéolyse). Plus intrigant encore, si la levée de l'inhibition du protéasome conduit, dans certaines lignées cellulaires, à la reprise normale de la dégradation des protéines mal formées dans le cytoplasme pendant l'inhibition, la nouvelle forme de la PrP réminiscente à la PrPsc, semble échapper à cette reprise. L'hypothèse émise consiste alors à formuler que chez certaines personnes, des perturbations de l'activité du protéasome pour des raisons diverses et variées, telle l'environnement, le stress chimique, des facteurs génétiques, le vieillissement ou autres pourraient résulter en l'apparition des premières formes de PrP anormales. Ces dernières constitueraient les premiers noyaux de propagation de la conformation pathologique de la PrP en s'associant avec les formes normales de la protéine. Pour l'instant, le statut transmissible et infectieux de la nouvelle forme de PrP issue d'une défaillance du système de nettoyage de la cellule des protéines mal structurées n'est pas encore démontré.

**une forme iatrogène (MCJi)* représente 11% des MCJ et est contractée au milieu des années 1980 après interventions chirurgicales avec du matériel contaminé et lors d'actes médicaux (injection d'hormone de croissance purifiée à partir d'hypophyse de cadavres humains ayant probablement une MCJ, greffe de dure mère provenant de cas déjà atteint par la MCJ...). Le scandale de l'hormone de croissance a surtout frappé la France puisqu'elle cumule plus de la moitié des cas recensés dans le monde (environ 80 sur les 140). Récemment, des médecins Hollandais ont signalé que le nombre des cas de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) provoqués par des injections d'hormones de croissance humaine pourrait augmenter puisqu'ils ont fait état d'un temps d'incubation de trente-huit ans. Depuis l'extraction de cette hormone par les méthodes biotechnologiques, le danger lié à son utilisation a été écarté.

**L'insomnie fatale familiale (IFF)* est une des formes familiales de la MCJ. Il s'agit d'une maladie héréditaire très rare où la plupart des familles présentent des mutations au niveau du gène codant pour la protéine PrP. Sur le plan clinique, les patients présentent une insomnie insensible à toute thérapeutique et une disparition des phases de sommeil paradoxal. La mort survient 1 an environ après son déclenchement. Les défunts présentent une atrophie importante du thalamus.

**Le Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)* est une MCJ due à des mutations héréditaires du gène codant pour la protéine PrP. Elle se transmet sur un mode autosomique dominant. Cette maladie est caractérisée par une ataxie cérébelleuse, des troubles de la déglutition et de la parole. Elle évolue vers un état de démence. La durée totale d'incubation de la maladie peut excéder 50 mois. Sur le plan anatomopathologique, la maladie se caractérise par les signes neurologiques habituels des ESSTs associés à la présence de plaques concentriques d'amyloïdes. Cette maladie est transmissible à la souris et au chimpanzé par inoculation intracérébrale d'extraits de cerveau de patient atteint du syndrome de GSS.

*Enfin, une quatrième forme appelée le *nouveau variant de MCJ (nvMCJ)*, dont l'origine est probablement une contamination alimentaire de l'homme par l'agent de la vache folle. Cette nouvelle forme de la

MCJ se caractérise par un plus jeune âge des patients (en moyenne 29 ans), par une période de manifestations des troubles cliniques allongée (en moyenne 13 mois) par rapport à la MCJ sporadique (en moyenne 4 mois), par des signes cliniques différents (symptômes psychiatriques et sensoriels pour le nvMCJ, démence rapide pour la MCJ sporadique). Les enregistrements des ondes électriques sur un électroencéphalogramme (EEG) sont en outre différents. La sensibilité génétique peut aussi être impliquée dans le développement du nvMCJ. La position 129 de la protéine PrP présente un polymorphisme [Méthionine (Met) ou Valine (Val)] dont la distribution dans la population anglaise est de 51% Met/Val, 37% Met/Met et 12% Val/Val. Or, 100% des patients ayant contractés le nvMCJ à l'heure actuelle sont homozygotes en position 129 de la protéine PrP (Met/Met). Cependant chez le Kuru et les MCJ sporadiques et iatrogènes, les autres génotypes sont également touchés. On ne peut exclure à l'heure actuelle que les autres groupes génétiques puissent également contracter le nvMCJ, avec peut-être une période d'incubation plus longue. Malheureusement, ni la période d'incubation ni la dose minimale infectante pour le nvMCJ ne sont précisément connues. Au 1^{er} Septembre 2002, 127 cas de nvMCJ ont été recensés en Angleterre dont plus de 100 sont déjà morts, 6 cas en France, 1 cas en Irlande et à Hong-Kong, 1 cas suspect en Hongrie (en 2001), 2 cas suspects en Italie au début 2002 et 1 cas suspect (une personne d'origine anglaise) aux Etats Unis (Avril 2002) et un cas au Canada (Août 2002). Les patients atteints du nvMCJ sont jeunes. Si on suppose que le risque d'exposition à l'agent de l'ESB était le même pour tout le monde, personne ne s'explique pourquoi les personnes âgées sont peu touchées par le nvMCJ. Pour trouver un début de réponse à cette question il faudra attendre l'évolution des cas dans l'avenir. De plus il est important de souligner la possible existence chez l'homme de porteurs sains, individus qui auraient été infectés sans développer de signes cliniques, comme cela a été clairement démontré dans le cas de contamination entre le hamster et la souris [4,5]. Dans ce dernier cas, le passage de l'agent du hamster à la souris se fait très mal, sans signes cliniques durant la première contamination. Ce n'est qu'à la deuxième vague (2^{ème} passage) que l'on retrouve une infectiosité élevée. Ces données doivent nous inciter à renforcer les mesures de surveillance de tous les cas de MCJ, afin de minimiser au maximum les risques de contaminations secondaires de l'homme à l'homme *via* des instruments chirurgicaux ou lors d'interventions médicales (greffes, neuro-chirurgie, transfusion sanguine...). En effet, l'agent de la tremblante a la capacité de se lier d'une façon efficace à la surface de tiges métalliques en acier inoxydable. Le transfert de ces tiges à des souris receveuses a montré la persistance de l'infectiosité [6].

Un des résultats marquant de la fin de l'année 2002 est la publication d'un travail de l'équipe de John Collinge montrant que l'agent de l'ESB pouvait se propager dans des souris transgéniques exprimant l'allèle Met/Met de la protéine prion humaine comme un nvMCJ ou comme une MCJ sporadique [7]. C'est la première fois que l'on démontre que l'agent de l'ESB pouvait changer de caractéristiques. Ces travaux ouvrent la voie à la suspicion que parmi les personnes atteintes de MCJ sporadique, il se pourrait qu'un certain nombre d'entre elles auraient été en fait contaminé par de l'ESB.

Comment la vache folle est-elle devenue folle?

Si l'encéphalopathie spongiforme bovine a suscité énormément de questions et alerté l'opinion publique, ce n'est pas par sa dénomination humoristique de "maladie de la vache folle", mais plutôt à cause de la capacité de l'agent de l'ESB à franchir la barrière d'espèces et à pouvoir se transmettre à plusieurs animaux y compris l'homme. Il s'agit là de questions de santé humaine et de sécurité alimentaire, étant donné que les produits issus de bovins à destination de la consommation humaine sont nombreux. En Mars 1996, les britanniques, preuves scientifiques à l'appui, ont fortement suspecté l'existence d'une relation entre l'ESB et les cas atypiques des patients jeunes atteints de MCJ étudiés à cette époque. Depuis qu'un lien fut fortement établi entre cette maladie chez les bovins et la consommation de FVO préparées dans les années 1970-1980, ces farines furent interdites pour les bovins en Angleterre en 1988. Cependant, leur exportation a continué d'une façon massive pendant plus d'un an (voir plus loin). C'est en 1986 que le premier cas d'ESB a été officiellement déclaré au Royaume Uni. Le point culminant de la crise fût atteint dans ce pays en 1992 avec près de 37 000 cas. A l'heure actuelle plus de 180 000 bovins ont été touchés au total depuis le début de cette épidémie en Angleterre, dont 70% dans le cheptel des vaches laitières (voir tableau V du nombre de cas d'ESB dans l'UE). La véritable origine des premiers cas de vaches folles reste néanmoins indéterminée. Essayez de répondre à la question comment la vache folle est-elle devenue folle revient à résoudre l'énigme de pourquoi la vache qui rit rit !

Contrairement à la tremblante chez le mouton, aucune preuve de transmission entre bovins d'un même élevage n'a été apportée. De plus, des résultats récents ont montré que les embryons collectés, à partir de vaches donneuses à un stade avancé de la maladie, et transférés selon des protocoles précis, ne seraient pas contaminés par l'ESB [8]. Ces résultats montrent l'extrême complexité du mode de transmission de cette maladie qui varie selon l'espèce.

La période d'incubation de l'agent de l'ESB varie de deux à huit ans. Cette maladie reste néanmoins difficile à diagnostiquer sur le terrain car seuls certains signes peuvent être présents. Elle se manifeste au début par des troubles de comportement : hésitation, nervosité, solitude. Des troubles neurologiques apparaissent par la suite qui se traduisent par une mauvaise locomotion et une démarche chaloupée des membres postérieurs. Une grande sensibilité à la fois au bruit, à la lumière et au toucher est également observée. A la fin de la maladie, les signes neurologiques se traduisent par quelques tremblements, une incoordination des mouvements des membres postérieurs et antérieurs, des chutes fréquentes et une dégradation de l'état général. Cette évolution se manifeste selon les cas sur une période de un à sept mois pour finir vers la mort si l'animal n'a pas été sacrifié auparavant pour sa dangerosité.

Nature du prion, un agent sans «gène»!

Les ESSTs restent parmi les maladies dont on ignore la nature exacte de l'agent responsable. Tout le monde est néanmoins d'accord sur le fait qu'il s'agit d'un Agent Transmissible Non Conventionnel (ATNC). L'agent infectieux ne semble pas contenir d'acides nucléiques (ADN ou ARN) mais il est sensible aux traitements détruisant les protéines. La première théorie sur la nature «protéique seule» de l'agent remonte à 1967 et a été émise par le mathématicien John S. Griffith [9]. Dans le modèle de Griffith, l'existence d'une matrice nucléaire n'est pas nécessaire pour la propagation de la scrapie, mais cela peut être dû à une protéine dont la conformation spatiale est modifiée et qui peut se répliquer par auto-association. Stanley Prusiner réussit à montrer entre 1982 et 1984 que la fraction infectieuse purifiée à partir de cerveau de hamster infecté contient majoritairement une protéine qui, après clonage et caractérisation, se révèle être en fait une protéine de l'hôte. Il s'agit de la protéine du Prion que l'on appelle la PrPc (c pour cellulaire qui sous entend «forme normale»). Prusiner émet alors l'hypothèse que l'agent des ESSTs n'est autre qu'une protéine du soi mais qui a changé de conformation. Dans son modèle, c'est la protéine pathologique PrPsc qui serait responsable par interaction directe avec son homologue normal PrPc de sa transconformation selon deux modes possibles: un mode auto-catalytique ou un mode de nucléation-polymérisation. Cette théorie a bien évidemment suscité de nombreuses réserves au sein du monde scientifique cartésien, puisqu'elle soulève pour la première fois l'hypothèse de l'existence d'un support de l'information de nature protéique et autoreplicable, propriétés qui jusqu'à présent sont le propre des acides nucléiques. L'école défendant la théorie virale ou du virino n'a pas permis de caractériser d'une façon convaincante un acide nucléique dans les fractions acellulaires capables de transmettre la maladie. On note cependant certaines études montrant que la PrPc peut potentiellement interagir avec certaines séquences d'acides nucléiques [10], parfois d'origine virale [11].

La PrPc est codée par un seul gène localisé chez l'homme sur le chromosome 20. Elle est relativement bien conservée dans la plupart des espèces étudiées allant de l'Homme jusqu'au Xénope, en passant par la tortue. Cependant la présence d'une protéine équivalente à de la PrP chez les poissons n'a pu être clairement démontrée que très récemment. Une protéine appelée StPrP pour «similar to PrP» a été identifiée chez le saumon et le poisson lune [34]. Elle présente une séquence similaire (24 à 25% dans la partie C-terminale) à celles des prions humains et bovins. La transmission des infections à prion entre les espèces est en partie contrôlée par les homologies entre le prion «infectant» et la protéine PrP de l'hôte. Il est donc légitime de se poser la question sur les potentialités de cette nouvelle protéine StPrP à être convertible en forme anormale.

Le rôle exact de cette protéine n'est pas bien connu mais on évoque assez souvent son implication dans la transmission synaptique, la régulation du cycle du sommeil, dans le métabolisme du Cuivre et dans la lutte contre le stress oxydatif. Cependant c'est une protéine minoritaire, dispensable à la vie d'un animal puisque les souris

transgéniques dépourvues de la PrPc sont viables sans phénotype délétère. Récemment un rôle de la PrPc dans la transduction de signaux, par sa localisation extramembranaire ancrée par un GPI, a été décrit [12]. On est presque tenté de dire qu'actuellement le seul rôle établi de cette protéine, si on peut appeler cela un rôle, est d'être impliquée dans les maladies à prions. Les animaux dépourvus de la PrPc ne développent jamais la maladie, même après inoculation intracrânienne d'une souche de prion.

La PrPc est une protéine quasiubiquitaire, exprimée dans la plupart des tissus d'un animal, le cerveau étant l'organe le plus riche et le foie le plus pauvre [13]. Nous avons récemment établi que le profil biochimique de la PrPc est caractéristique de chaque organe étudié chez le mouton (voir Figure 2). Le muscle en particulier présente deux bandes de PrPc qui migrent de façon atypique. Le profil électrophorétique de la PrPc dans le poumon s'est également révélé assez particulier. De plus, la taille de la PrPc observée dans le poumon après déglycosylation était plus petite que celle trouvée dans le cerveau ou dans le muscle. Cette étude nous a permis de souligner l'absence de corrélation entre le niveau d'expression de la PrPc dans un tissu donné et l'aptitude de ce tissu à être infecté. En effet, chez le mouton, les amygdales et la rate possèdent moins de PrPc que le muscle squelettique, le cœur ou les poumons alors que chez l'animal atteint de tremblante, la PrPsc s'accumule dans les amygdales et la rate et non dans le muscle ou le cœur. D'autre part, l'existence d'une relation entre la nature biochimique de la PrPc d'un tissu donné et sa capacité à être convertie en PrPsc, ainsi que la nécessité d'autres facteurs cellulaires indispensables à la conversion restent des questions ouvertes.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la PrPc (normale) et la PrPsc (pathologique) possèdent la même composition en amino-acides, les mêmes modifications post-traductionnelles (glycosylation et ancre GPI) ; seules diffèrent leurs caractéristiques biochimiques et leur structure spatiale (tableau II). Si la PrPc est une protéine relativement soluble dans des détergents non ioniques, la PrPsc ne l'est pas. La PrPc est totalement sensible à la protéolyse alors que la PrPsc présente une certaine résistance intrinsèque aux protéases (voir Figure 3), probablement due à sa structure et à son mode d'agencement en agrégats insolubles. D'ailleurs, c'est le seul critère capable de discriminer d'une façon pratique un tissu sain d'un tissu malade (voir plus bas, les tests). La PrPc possède un fort pourcentage dans sa partie C-terminale de sous domaines organisés en ce que l'on appelle hélice alpha (42% d'hélice alpha pour seulement 3% de feuillet bêta) alors que la PrPsc est plus riche en structure appelées feuillet bêta (43% de feuillet bêta pour 30% d'hélice alpha). La structure tridimensionnelle de la PrPc a été déterminée grâce à la RMN. Cependant la conformation spatiale de la PrPsc n'est pas encore complètement déterminée. Des travaux récents ont permis d'obtenir un modèle structural à 7Å de résolution à partir de cristaux bidimensionnels isomorphes observés en microscopie électronique [14]. Dans ce modèle dit "bêta-hélicoïdal", la PrPsc est riche en feuillets bêta parallèles organisés en une hélice.

Il faut rappeler que le phénomène de type Prion n'est pas propre à l'animal. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et sous l'influence de conditions de son milieu, une protéine appelée Ure2p est capable de se transformer en une forme anormale qui se transmettra, à l'image du prion animal, sans intervention de matériel

génétique [15]. Chez un autre champignon filamenteux (*Podospora anserina*), la protéine Het-s est capable d'auto-transconformation induisant un phénomène de type prion indépendant du génome [16]. Dans ces deux situations, une des explications est que la cellule peut ainsi, sans solliciter le génome, réagir très rapidement aux changements brusques d'environnement pour *S. cerevisiae*, ou lors d'une fusion végétative incompatible de deux cellules ayant l'une le caractère Het-s (normale) et l'autre le caractère Het-S (prion). Cette dernière situation mène à la mort cellulaire nommée "incompatibilité hétérokaryonique".

Deux approches complètement différentes ont récemment apporté beaucoup d'eau au moulin de l'hypothèse de la protéine seule dans les maladies à prion. D'une part, une équipe française a montré que des structures amyloïdes de la protéine Het-s de *Podospora anserina* obtenues *in vitro* à partir de la protéine Het-s recombinante sont capables de transmettre le caractère prion à ce champignon, et d'induire *de novo* la formation d'infectiosité transmissible [16]. Les fibrilles amyloïdes de la protéine Het-s constituent alors les bases moléculaires assurant la propagation du prion Het-s chez *P. anserina*. D'autre part, la démonstration du caractère transmissible d'une autre MRP, la maladie de l'amyloïdose systémique, a récemment été publiée [17]. L'administration par voie intraveineuse ou même orale à des souris sensibles à cette maladie d'une faible dose du peptide amyloïde AA, aboutit à l'accélération de la maladie. Ces deux exemples représentent les premiers cas de maladies de repliement des protéines qui sont transmissibles et qui peuvent être apparentées aux maladies à prion. Ces deux modèles sont en faveur du POC (Protein Only Concept).

Principe de Précaution, Diagnostic et Tests : tout pour éviter une épidémie

Afin de minimiser le risque pour l'Homme, le principe de précaution a été mis en place en Europe de façon progressive au rythme de l'évolution des crises et des connaissances depuis 1988. Si l'Angleterre a interdit les farines carnées pour les ruminants en Juillet 1988, elle a néanmoins continué de les exporter d'une façon massive vers le reste du monde (voir plus loin). Le gouvernement Anglais jugeait qu'il était de la responsabilité des pays importateurs de réglementer l'utilisation de ces farines dès lors qu'ils savaient que ces produits étaient interdits pour les ruminants au Royaume Uni !! Dès 1989, les Anglais interdisent la consommation par l'homme d'abats bovins (cerveau, moelle épinière, intestin, rate, thymus). Cependant l'exportation de ces matériaux ne fut interdite vers l'Europe qu'en 1990 et seulement en 1991 vers les pays du tiers monde. La France a arrêté l'importation des farines Anglaises en Juillet 1989 (un an après leur interdiction au RU) et n'a interdit l'utilisation des farines animales pour les bovins qu'en Juillet 1990. Le premier cas Français d'ESB a été déclaré le 2 Mars 1991. L'Union Européenne a décrété l'interdiction de ces farines pour les bovins au niveau communautaire en 1994. La France a décidé dès l'apparition du premier cas d'ESB (1991) d'abattre tout le troupeau où un cas de vache folle est détecté, dans le cadre d'un réseau d'épidémiosurveillance mis en place à cette époque. L'interdiction des farines animales a été étendue pour tous les ruminants en 1994 en France. L'annonce par les Britanniques de la

possible transmission de l'agent de l'ESB à l'homme en Mars 1996 a fait "*trembler*" toute l'Europe, ce qui s'est traduit en France par l'interdiction totale d'utilisation des Matériaux à Risques Spécifiés bovins (les MRS : cerveau, moelle épinière) dans l'alimentation humaine. Cette liste s'est rallongée par la suite et a été appliquée aussi pour les MRS des ovins de plus de 12 mois dans l'union européenne. L'interdiction des FVO pour tous les animaux a été décrétée en France dès le 14 Novembre 2000, puis en Europe peu de temps après. Cette période coïncide avec la découverte des premiers cas d'ESB en Allemagne et en Espagne. Des tests systématiques de dépistage de l'ESB sur les bovins de plus de 30 mois ont été mis en place à l'abattoir à partir du 1 Janvier 2001. Cet âge a été abaissé à 24 mois depuis le 24 Juillet 2001. Un programme de diagnostic de la tremblante est également en cours depuis peu de temps dans les pays de l'union européenne (voir plus loin).

Les tests actuellement disponibles sont tous des tests *post-mortem*, utilisant une zone du cerveau comme matériel de départ, car c'est l'organe qui accumule le plus la PrPsc pathologique. Leur sensibilité a été évaluée par la commission européenne. Dans l'ensemble, ces tests sont basés sur l'utilisation de la propriété de résistance différentielle de la protéine PrPsc (pathologique) à la protéolyse (protéinase K) par rapport à la PrPc (normale) couplée à l'utilisation de techniques immuno-chimiques. Il s'agit soit de la technique ELISA classique, améliorée par un protocole de concentration de la PrPres (résistante à la protéinase K) à partir du cerveau, soit de la technique de l'immunodétection de la PrPres par Western blotting après migration sur un gel d'électrophorèse et transfert sur une membrane (voir Figure 3). La technique ELISA du diagnostic de l'ESB a été mise au point par un laboratoire du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) en France et commercialisée par la société Bio-rad. Une autre entreprise Irlandaise a également développé un test ELISA (Enfer-technologie). La méthode du Western Blotting a été utilisée par des universitaires Suisses qui ont ainsi créé la société Prionics commercialisant ce test. Le test Prionics est un peu plus ancien que le test ELISA de Bio-rad. Il a probablement l'avantage de l'expérience sur le terrain car il est utilisé en Suisse depuis plusieurs années. Si ces trois tests ont montré des scores de 100% en spécificité et sensibilité, le test ELISA développé par le CEA/Bio-rad semble, d'après l'évaluation européenne, être le plus puissant en terme de détection dans un homogénat de cerveau infecté et peu concentré. Il atteint quasiment les performances du test le plus sensible communément admis qui est le titrage par injection intra-crânienne à des souris sensibles. Rappelons que l'idéal serait de disposer d'un anticorps permettant la discrimination entre la PrPc et la PrPsc sans faire appel à l'étape de protéolyse. Ce type de réactifs n'existe pas pour l'instant, même si un candidat de cette catégorie d'anticorps a été publié [18]. Cependant, aucune application n'a suivi pour l'instant. D'autres équipes dans le monde travaillent encore pour l'obtention d'un tel anticorps.

La mise au point de tests *ante-mortem* reste à l'heure actuelle un des défis pour la recherche dans le domaine des maladies à prions. Il faut noter que la dissémination de l'agent du prion est très différente chez le bovin et le mouton ou si on compare les MCJ sporadiques au nvMCJ. Dans le cas de l'ESB et de la MCJ sporadique, la PrPsc est présente essentiellement dans le système nerveux central, alors que dans le cas de la tremblante [19] et

du nvMCJ [20], la PrPsc peut être détectée, par les techniques immunohistochimiques et biochimiques, au niveau des amygdales, de la rate et des ganglions lymphatiques le long de l'intestin grêle. L'utilisation d'une technique particulière, l'électrophorèse capillaire a permis de détecter la PrPsc dans le sang de certains moutons au stade préclinique. Récemment, une équipe Israélienne a trouvé de la PrPres dans les urines de hamster infectés par la tremblante et même dans les urines de vaches atteintes de l'ESB, et cela avant le déclenchement des signes cliniques [21]. Cette dernière voie semble assez prometteuse pour le développement d'un test préclinique non invasif. Ces données s'orientent dans l'ensemble vers un diagnostic qui est toujours centré autour de la détectabilité immunologique de la PrPres dans des tissus ou liquides périphériques. Le problème dans cette approche est qu'il faudrait disposer de moyen de concentration de la PrPsc à partir de ces tissus ou liquides réputés beaucoup moins riches en agent du prion que le cerveau. A la lumière des résultats récemment publiés par différentes équipes, trois possibilités peuvent être envisagées pour remédier à cela. Safar *et al.* [22] ont montré que la PrPsc est capable de précipiter à l'aide de l'acide phosphotungstique. Cette étape permettrait de partir d'un grand volume d'extrait de tissu périphérique et de concentrer l'éventuelle PrPsc présente. Cette technique a été reprise, en la couplant à une augmentation de sensibilité en western blotting, par l'équipe de John Collinge à Londres pour étudier la distribution tissulaire de la PrPres chez les sujets atteints du nvMCJ [20]. D'autre part, le groupe du Professeur Aguzzi a mis en évidence la capacité du plasminogène sérique de fixer spécifiquement la PrPsc présente dans un homogénat de cerveau de plusieurs espèces [23]. Cette propriété pourrait être exploitée dans un test de concentration de la PrPsc à partir d'un extrait de biopsie d'amygdale, de thymus ou de sang. L'autre approche envisageable afin de détecter la PrPsc dans des tissus périphériques est son amplification à l'image d'une réaction de PCR. En effet, Saborio *et al.* [24] de l'institut pharmaceutique Sero de Genève, ont montré qu'il était possible, en ajoutant une très petite quantité de PrPsc dans un extrait de cerveau sain, d'amplifier considérablement le signal par incubation à 37°C couplée à des cycles de sonication (technique nommée PMCA pour *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Dans cette PMCA (conversion *in vitro*), l'amorce est la PrPsc présente même en très faible quantité dans l'extrait, la PrPc de l'homogénat constituant alors le substrat.

La recherche d'autres marqueurs précoces de la maladie à prion fait également l'objet d'intenses efforts. Malheureusement très peu de candidats sont identifiés actuellement. D'anciens travaux ont mentionné l'augmentation de la quantité de certaines protéines comme la protéine 14-3-3 ou la protéine S100 dans le liquide céphalo-rachidien. Cependant ces marqueurs ne semblent pas spécifiques des maladies à prions puisque leur présence est accrue dans d'autres maladies neurodégénératives. En revanche, l'application d'une approche transcriptomique (differential display reverse-transcriptase-PCR ; DDRT-PCR), a récemment permis à un groupe de chercheurs Ecossais [25] d'identifier un marqueur précoce, dont l'expression du transcrit est diminuée jusqu'à 40% dans quatre modèles d'infection à Prions (murin, hamster, bovin et ovin). Ce facteur était le seul ainsi identifié parmi 10000 transcrits analysés entre tissus sains et infectés. Il s'agit d'un facteur de différenciation

erythroïdique (Erythroid Differentiation-Related Factor; EDRF). La diminution de ce marqueur a été détectée dans les cellules de la rate, de la moelle osseuse et les cellules sanguines des tissus infectés. La signification physiologique de ce phénomène n'est pas encore connue mais il est probable que ce soit par un mécanisme indirect, qui peut être relié au fait que l'agent du prion nécessite souvent une répllication par des cellules du système lymphoïde (plaques de Peyer, rate, amygdales). Le fait que ce nouveau marqueur, autre que la PrPsc, soit assez facilement détectable dans des tissus accessibles et à des stades précoces de la maladie le met en première place pour la mise au point de test de diagnostic précoce des ESSTs dans différentes espèces. Les seules restrictions que l'on peut formuler actuellement sont le manque de recul sur le niveau d'expression de ce facteur chez un très grand nombre d'individus d'une espèce donnée, ainsi que la spécificité de ce phénomène par rapport à d'autres maladies neurodégénératives.

En complément de l'approche d'étude du transcriptome, le développement d'une approche protéomique nous semble aussi une voie qu'il faudra développer de plus en plus. Il existe actuellement plusieurs modèles d'animaux sensibles à la maladie et quelques modèles cellulaires infectables [26,27]. La comparaison du protéome de tissus, de populations ou de compartiments cellulaires entre les deux états sain et infecté permettrait de mettre en évidence d'autres facteurs dont l'expression est modulée par l'infection. Cette approche peut aussi être envisagée dans la recherche de facteurs accessoires, autre que la PrP, impliqués d'une façon directe ou indirecte dans la conversion de cette protéine et/ou dans le processus de l'infection.

Quid du danger pour l'Homme?

La nature carnivore de l'homme et son penchant gourmand pour des plats très variés ont fait que la crise de la vache folle a constitué un vrai danger pour la santé humaine [28,29]. N'oublions pas que cette crise ne s'est pas limitée à la seule dimension de santé publique. Elle a tout d'abord énormément touché le cheptel bovin de plusieurs pays et par conséquent c'est un drame pour les agriculteurs qui ont vu des milliers de leurs bêtes abattues. Notons aussi que dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique, près de 70% des produits fabriqués contiennent des extraits d'origine bovine (essentiellement la gélatine). Les mesures de précaution mises en place de façon de plus en plus drastique ont néanmoins permis de limiter l'étendue des dégâts. Le passage de l'agent de l'ESB à l'homme s'est apparemment fait d'une façon efficace car la barrière d'espèces semble faible dans ce cas là. Une des questions encore non résolues actuellement est comment ce passage a pu se faire? S'est-il fait directement de bovin à l'homme par la consommation de matériaux à risques comme le cerveau et la moelle épinière de bovin au pic de notre inconscience et/ou de notre ignorance (les années 80)? Y'a-t-il en plus un risque de l'existence d'un «intermédiaire» entre le bovin et l'homme? On peut penser tout naturellement au mouton, et les efforts se portent actuellement sur la recherche de l'éventuelle présence de l'unique souche de l'ESB parmi les différentes souches de tremblante de mouton. Cet axe de recherche se justifie car nous savons que: i- les ovins ont aussi consommé des quantités non négligeables des mêmes FVO en même temps que les bovins ii-

expérimentalement, l'agent de l'ESB peut passer par voie orale au mouton iii- le risque du passage de l'ESB au mouton par les FVO (ou autres?) est donc réel. Etant donné que la liste des matériaux à risque pour l'homme est assez bien connue, leur élimination de la chaîne alimentaire est évidente. La classification en cinq classes des tissus ovins selon leur infectiosité (classe I haute infectiosité, classe V infectiosité indétectable) est rappelée dans le tableau IV. Il s'agit en premier lieu du cerveau, de la moelle épinière et de la rétine, qui se sont avérées être les parties les plus infectieuses d'un animal. S'en suivent les ganglions lymphatiques, les amygdales, la rate, l'iléon, le colon et le placenta. Les autres tissus sont d'une infectiosité minime ou indétectable (muscle, cœur, reins...). La liste des MRS bovins est plus restreinte (cerveau, moelle épinière, yeux, amygdales, iléon) mais par principe de précaution, la France a ajouté en plus les intestins, la rate et le thymus.

A la suite des derniers rebondissements scientifiques, nous devons néanmoins nous arrêter un peu plus sur la question de l'infectiosité du muscle squelettique. Aucun test d'inoculation de broyât musculaire de bovins ou d'ovins n'a démontré le caractère infectieux de ce tissu. L'équipe de Prusiner a cependant récemment publié, que l'infection de souris par voie intracrânienne avec des souches de tremblante adaptées à la souris conduit à l'accumulation de la PrPsc et à la présence d'une forte infectiosité dans le muscle squelettique des membres postérieurs [30]. Ces résultats représentent une première scientifique car cela n'a jamais été observé auparavant. Cependant, il faut rester très serein, comme la population Française qui était restée remarquablement calme et on s'en réjouit, car ces résultats ne peuvent être aussi facilement transposables à ce qui se passe sur le terrain et dans d'autres espèces. Les autorités Françaises, par la voie des organismes comme l'AFSSA et le CEA, ont immédiatement vérifié ces données en cherchant la présence de l'éventuelle PrPres (par ELISA et western blotting) dans plusieurs tissus musculaires de bovins, de moutons et de souris infectées par l'agent de l'ESB, et la PrPres n'a pas été détectée. Reste à savoir si les méthodes utilisées par l'équipe de Prusiner et les laboratoires de l'AFSSA sont comparables ou pas. En tout cas le test le plus sensible, qui consiste à prélever du muscle de vache infectée d'ESB et à injecter des extraits de ces muscles par voie intracérébrale à des bovins (transmission intra-espèce) s'est révélé négatif cinq ans et demi après inoculation (expériences encore en cours en Grande Bretagne). Cette histoire montre combien il faut rester vigilant face aux certitudes établies sur tel ou tel résultat. Il suffit parfois de trouver le bon modèle et les bons outils pour faire tomber un dogme scientifique.

Il est important d'ajouter que la présence de la PrP anormale a été également retrouvée tout récemment dans plusieurs muscles chez le hamster, un autre modèle de rongeurs pour l'étude des ESST, après infection orale avec l'agent de la tremblante [35]. Pour l'instant, tout ce que l'on peut retenir de ces données c'est que la présence d'une PrPsc dans le muscle squelettique semble se restreindre aux rongeurs de laboratoire. Cela nous pousse néanmoins à rester encore plus vigilants quant à l'identification des cas de bovins ou de moutons atteints d'ESB ou de tremblante afin de les éliminer complètement de la chaîne alimentaire humaine.

L'infectiosité du sang était jusqu'à cette année une question sans réelle réponse. Cependant, les résultats publiés en 2002 par l'équipe de Fiona Houston [31] ont confirmé l'existence d'un risque (allant de 10 à 20%) de

transmission de maladies à prion *via* le sang que ce soit à partir de sang de moutons infectés par de l'ESB ou de moutons atteints de tremblante naturelle. Ces données doivent inciter les pouvoirs publics à prendre des mesures de sécurité importantes pour éviter qu'une contamination par des maladies de type prion puisse se faire par voie de transfusion sanguine chez l'homme.

Actuellement, la mise en place systématique de tests sensibles de détection de la PrPres au niveau des abattoirs sur les bovins de plus 30 mois depuis Janvier 2001, et de plus de 24 mois depuis Juillet 2001, et son étendue vers le diagnostic des ovins (programme lancé en Avril 2002) représentent des mesures importantes permettant la sécurisation de la chaîne alimentaire. Il faut souligner néanmoins qu'un résultat négatif sur un animal obtenu par n'importe quel test disponible actuellement ne peut constituer une preuve absolue que celui-ci est totalement indemne. Cela indique par contre que si l'animal est décelé négatif, la quantité du prion présente dans son cerveau serait extrêmement faible et donc elle le serait encore plus dans les autres parties de l'animal. Dans l'état actuel de nos connaissances et de nos doutes, il est très important de combiner les mesures de retrait de l'ensemble des matériaux à risques spécifiés (MRS) des bovins, et des ovins de plus de 6 mois avec la mise en place des tests, et ainsi éviter une contamination pour l'homme. Imaginons qu'à la suite de la publication du laboratoire de Prusiner on établisse la contamination du muscle des bovins, on aurait été alors bien content d'apprendre que les bovins arrivés à l'abattoir, sans signes cliniques, et testés positifs à partir d'un prélèvement de cerveau soient entièrement éliminés de la chaîne alimentaire (il y a eu quand même 83 cas en 2001 et 74 cas en 2002). Il faut ajouter à cela que des programmes de sélection génétique de moutons résistants à la tremblante (voir chapitre tremblante) seront de plus en plus développés en Europe dans le but d'éradiquer cette maladie. Espérons toutefois que ces moutons résistants à «la scrapie» ne soient pas plus sensibles à autre chose que l'on ignore encore!

Quid de l'ESB dans le reste du Monde?

La liste des pays les plus communément cités comme ayant des cas de vaches folles n'a presque pas varié jusqu'à une date récente. Il s'agit bien sur de l'Angleterre (1^{er} cas en 1986), de l'Irlande (1^{er} cas en 1989), de la suisse, du Portugal (1^{er} cas en 1990) et de la France (1^{er} cas en 1991). Il faut attendre 1997 pour détecter les premiers cas en Belgique, aux Pays Bas et au Luxembourg, 1998 au Liechtenstein, fin 2000 en Allemagne, au Danemark et en Espagne et début 2001 en Italie (Tableau V). La détection des premiers cas dans ces derniers pays coïncidait curieusement avec le déclenchement de la crise Européenne en Novembre 2000, à la suite de laquelle les farines animales furent interdites dans l'alimentation de tous les animaux et les tests de diagnostic systématiques furent instaurés dans les abattoirs (Janvier 2001). Le nombre de bovins atteints dans ces pays ne cesse depuis d'augmenter chaque mois, ce qui pose la question de l'absence de cas avant cette date, ainsi que l'existence d'autres pays où des cas de vache folle n'ont pas encore été détectés ou déclarés. Les pays touchés par

l'ESB entre 2001 et fin Mai 2002 sont: la Slovaquie (9 cas), la République Tchèque (2 cas), l'Autriche (1 cas), la Grèce (1 cas), la Slovénie (2 cas), la Finlande (1 cas). La Pologne est le dernier pays européen ayant contracté son premier cas (5 Mai 2002) de vache folle (2 cas au 1/09/2002). Le pays le plus lointain est le Japon, qui depuis fin 2001 a détecté 5 cas. L'autre pays non européen à être tout récemment victime de ce fléau est Israël, qui a détecté son premier cas d'ESB sur les hauteurs du Golan au début Juin 2002. Certains pays où aucun cas d'ESB national n'a été déclaré ont néanmoins eu des cas importés d'Angleterre. Il s'agit des Iles Falkland (1 cas en 1989), du Canada (1 cas en 1993) et du Sultanat d'Oman (2 cas en 1989). Il faut cependant souligner que le nombre de cas d'ESB détecté a pour la première fois diminué cette année en France et en Suisse. Espérons que cette régression continuera les années à venir, régression qui sera le fruit de plusieurs années de lutte à plusieurs niveaux contre cette épidémie.

Le 20 mai 2003, le gouvernement canadien a annoncé son premier cas d'encéphalopathie spongiforme bovine, révélé chez une vache âgée de huit ans. Cet animal faisait partie d'un troupeau de 150 têtes établi depuis trois ans dans le nord de l'Alberta. C'est le premier cas d'ESB enregistré dans tout le continent américain.

Si l'origine principale de l'apparition de l'ESB chez les bovins Anglais était la consommation de FVO mal décontaminées vers les années 80, ce phénomène aurait du se produire dans tous les pays qui ont importé ces FVO. La France a par exemple doublé son importation des FVO Anglaises entre 1988 (7220 tonnes) et 1989 (15600 tonnes). Rappelons que le premier cas Français d'ESB est apparu en 1991. Pour la même période, Les Pays Bas sont passés de 1826 tonnes à 6099 tonnes de FVO importées du RU. Plus loin de chez nous, Israël est passé de 92 tonnes à 2718 tonnes (1^{er} cas en 2002), l'Arabie Saoudite de 5 tonnes à 3462 tonnes entre 1988 et 1989, et l'Indonésie a importé 20339 tonnes en 1992 au lieu de 2020 tonnes de FVO en 1991. Ces augmentations donnent un peu le vertige et nous n'avons toujours pas d'explication sur l'absence de cas d'ESB dans ces pays (sauf tout récemment en Israël). Un système de surveillance actif devrait être mis en place de façon sérieuse dans la plupart des pays qui ont importé soit des farines Anglaises, soit des animaux de différents pays Européens. Le Maroc avait lancé un programme d'importation de 5000 vaches laitières d'Europe et du Canada, mais cet objectif a été largement dépassé. En moyenne, près de 25000 génisses sont annuellement incorporées dans le cheptel laitier et ce depuis 1988, dont une grande partie rentre dans la chaîne alimentaire à cause du besoin croissant en viande et dérivés bovins [32]. Le risque de développement d'ESB en Afrique du Nord et au Moyen Orient par exemple n'est pas bien connu. J'espère en tout cas qu'un système de surveillance actif, au moins au plan clinique, est assuré par les services vétérinaires. Les tests dits rapides sont actuellement disponibles sur le marché pour que ces pays puissent vérifier les cas suspects détectés (animaux accidentés).

La tremblante du mouton est connue au Maroc depuis très longtemps. D'après certains témoignages, les gens la connaissent assez bien puisque apparemment lorsqu'un mouton commence à trembler ou à perdre sa toison, l'animal est sacrifié puis consommé à l'exception de la tête. Il est intéressant de noter que par une sorte d'intuition intrinsèque, la population avait déjà soupçonné que le mal touchait probablement le cerveau.

La crise de la vache folle représente une leçon à méditer pour la plupart des pays en voie de développement. Elle représente une sorte de voyage vers le futur qui donne un aperçu du monde qu'ils pourraient construire si l'intérêt économique aveugle prime toujours sur l'intérêt en termes de santé publique. Une volonté trop tenace de faire des économies nuit, par un effet boomerang, à l'économie. Rappelons à ce titre que la crise de la vache folle a entraîné l'abattage de plus de 4,5 millions de bovins et a coûté plus de 7 milliards d'Euros (environ 45 milliards de Francs)...

La fin du deuxième millénaire a vu surgir deux grandes crises qui ont touché deux choses très chères à l'être humain depuis la nuit des temps : « *le sexe et la bouffe* ». Si le SIDA a été d'une ampleur dramatique, la maladie de la vache folle l'était heureusement moins au niveau humain (même si chaque vie est une valeur inestimable). La crise de la vache folle a néanmoins révélé une question biologique intrigante que la communauté scientifique essaie de comprendre.

Remerciements : Je remercie chaleureusement le Dr. Isabelle Schwartz et Marianne Cluzeaud pour leurs commentaires. Un grand merci pour Nath M-B pour ses conseils sur la rédaction de ce manuscrit.

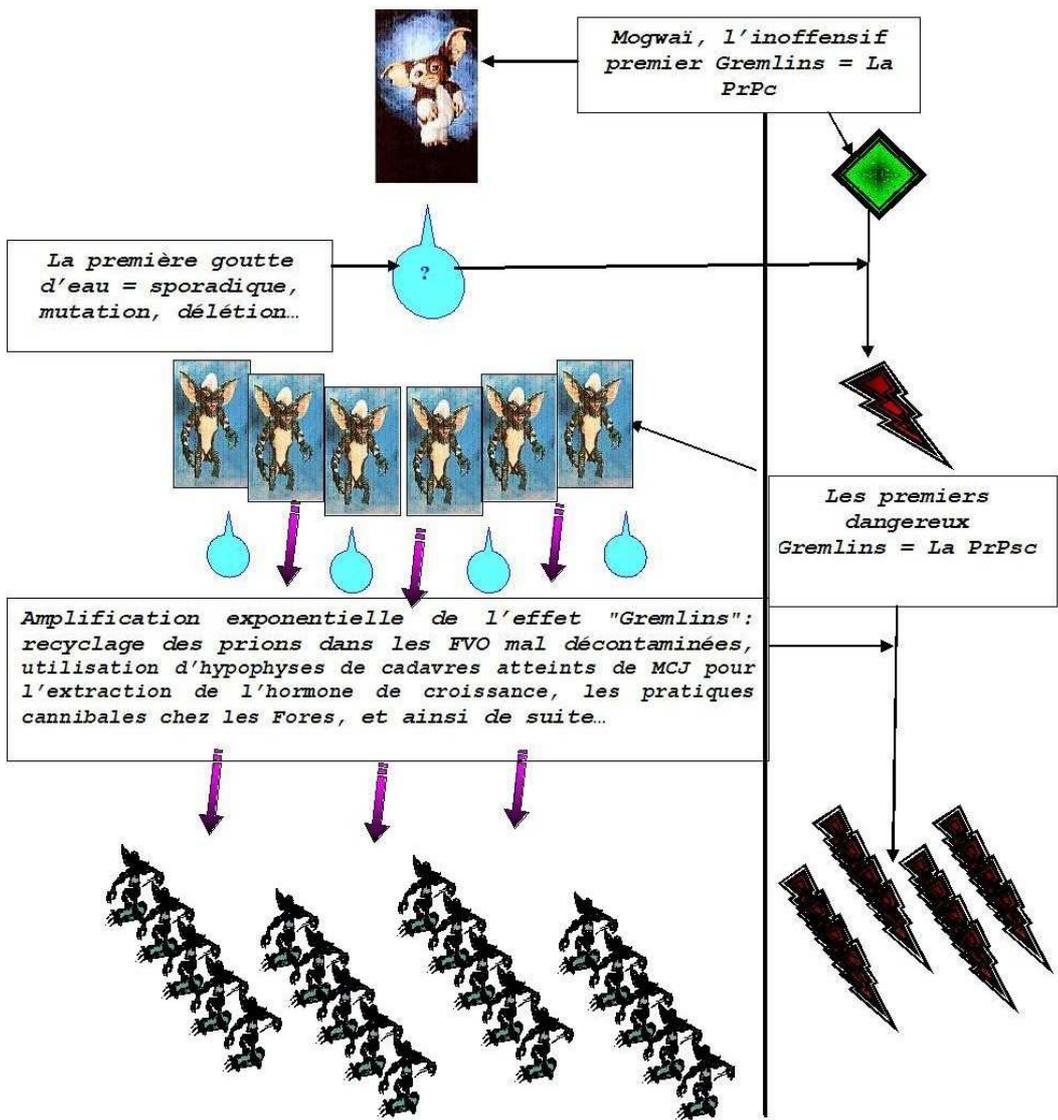
Références

1. Prusiner S B. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 13363-13383.
2. Dormont D. Les prions. *Virologie* 2000 ; 4 : 5-9.
3. Yon-Khan J. Le prion. *Regards sur la Biochimie* 1996 ; 3 : 12
4. Hill AF, Joiner S, Linehan J, *et al.* Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 10248-10253.
5. Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 2001 ; 75 : 10106-10112.
6. Flechsig E, Hegyi E, Enari M *et al.* Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Molecular Medicine* 2001 ; 7 : 679-684.
7. Asante EA, Linehan, JM, Desbruslais M, *et al.* ; BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J* ; 2002, 21, 6358-6366.
8. Wrathall AE, Brown KF, Sayers AR, *et al.* Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec.* 2002 ; 150 : 365-78.
9. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967 ; 215 : 764-766.
10. Nandi PK, Sizaret P-Y. Murine recombinant prion protein induces ordered aggregation of linear nucleic acids to condensed globular structures. *Arch Virol* 2001 ; 146 : 327-345.
11. Gabus C, Derrington E, Leblanc P *et al.* The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 19301-19309.
12. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, *et al.* Signal transduction through prion protein *Science* 2000 ; 289 : 1925-1928.
13. Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardière C. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 2017-2024.
14. Wille H, Michelitsch MD, Guénebaud V, *et al.* Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 3563-3568.
15. Thual C, Bousset L, Komar AA *et al.* Stability, folding, dimerization, and assembly properties of the yeast prion Ure2p. *Biochemistry.* 2001; 40 : 1764-1773.
16. Maddelein ML, Dos Reis S, Duvezin-Caubet S, *et al.* Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious.; *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 7402-7407.
17. Lundmark K, Westermarck GT, Nyström S *et al.* Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 6979-6984.
18. Korth C, Stierli B, Streit P *et al.* Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 1997 ; 390 :74-77.
19. Andréoletti O, Berthon P, Marc D *et al.* Early accumulation of Prp^{sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 2000 ; 81 : 3115-3126.

20. Wadsworth J D F, Joiner S, Hill A F, *et al.* Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant CJD using a highly sensitive immunoblotting assay. *The Lancet* 2001 ; 358 : 171-180.
21. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, *et al.* A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 31479-31482.
22. Safar J, Wille H, Itri *et al.* Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nature Medecine* 1998 ; 410 :1157-65.
23. Maissen M, Roeckl C, Glatzel M, Wilferd G, Aguzzi A. Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. *The Lancet* 2001 ; 357 : 2026-2028.
24. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001 ; 411 : 810-813.
25. Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nature Medecine* 2001 ; 7 : 361-364.
26. Vilette D, Andréoletti O, Archer F *et al.* Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2001; 98 : 4055-4059.
27. Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R *et al.* Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J Virol* 2001 ; 75 : 5977-4984.
28. Bons N, Brugère-Picoux J. Le prion à la ville et au champ. *La Recherche* 2000 ; 332 : 46-51.
29. Deslys J-P, Picot A. La vache folle : les risques pour l'homme. Paris : Dominos Flammarion 2001, 127p.
30. Bosque P J, Ryou C, Telling G, *et al.* Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 3812-3817.
31. Hunter N, Foster J, Chong A, *et al.*, Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* 2002 ; 83, 2897-2905
32. Sraïri MT, Baqasse M. Devenir, performances de production et de reproduction de génisses laitières frissonnes pie noires importées au Maroc. *Livestock Research for Rural Development* 2000 ; 12 (3).
33. Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol.* 2003 ; 77 : 583-591.
34. Oidtmann O, Dietrich S, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Letters* 2003 ; 538: 96-100.
35. Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, Krüger D, Beekes M. Widespread PrPsc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Reports* 2003 ; 5: 530-533.

Figures et Tables :

Figure 1 : Le modèle "Gremlins" des maladies à Prions et de leur amplification (voir texte)



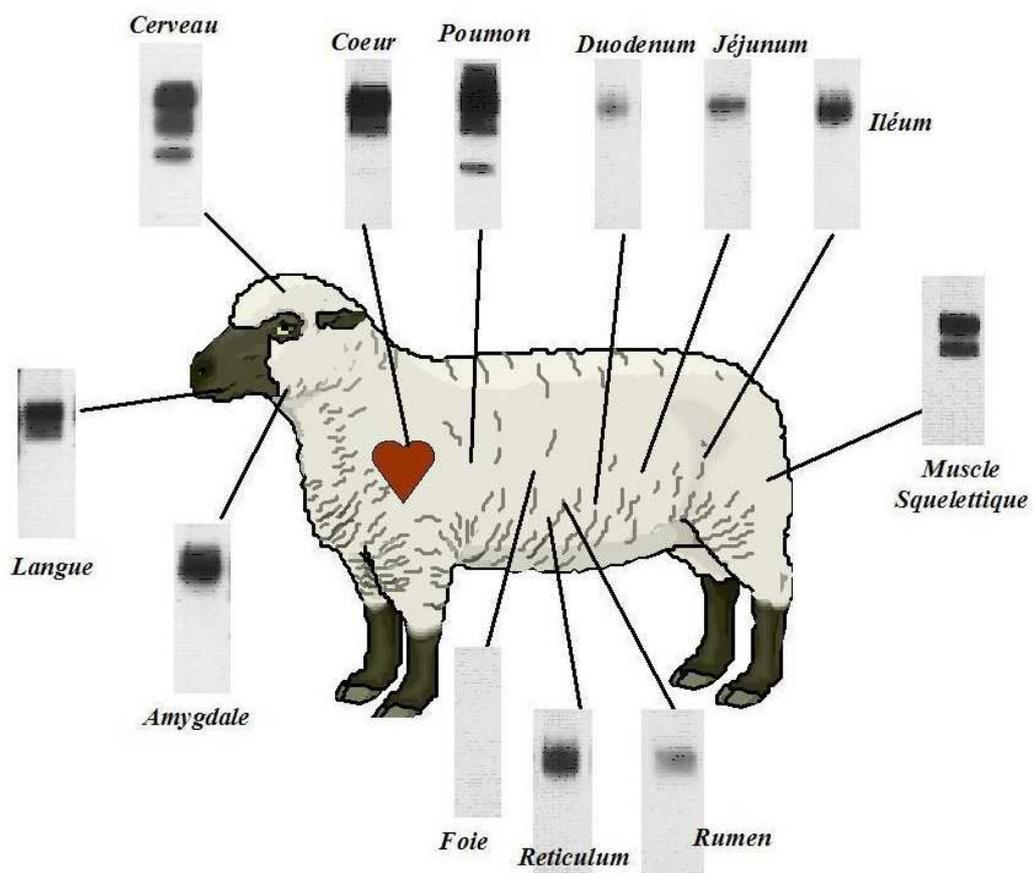


Figure 2 : Distribution qualitative de la protéine Prion cellulaire normale (PrPc) dans différents tissus de mouton sain. La PrPc présente un profil électrophorétique spécifique à chaque tissu étudié. Noter la présence du doublet de PrPc caractéristique du muscle squelettique.

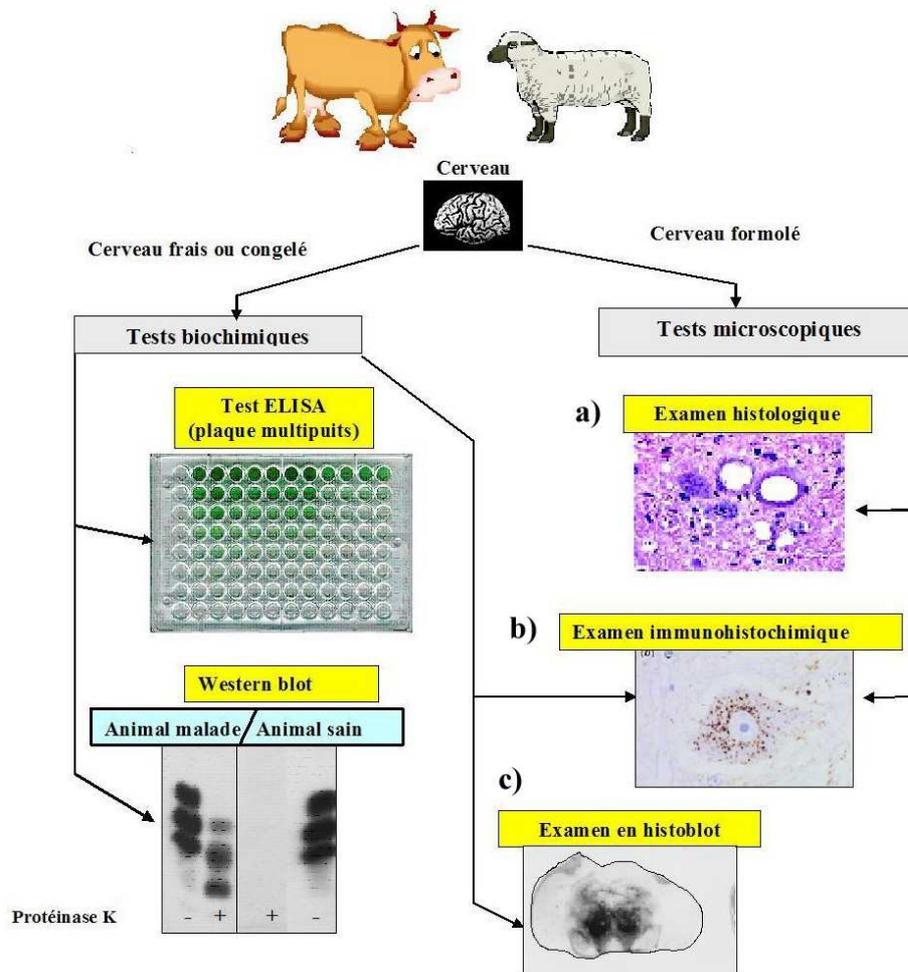


Figure 3 : Les trois principales méthodes de diagnostic des maladies à prion chez les animaux sont les suivantes : détection biochimique, examen histologique et observation immunohistochimique. L'examen histologique consiste à réaliser des coupes de cerveau d'un animal donné et à rechercher la présence de vacuoles caractéristiques de la spongiose associée à la maladie. Les deux autres méthodes font appel à des techniques permettant la détection de la PrPres, forme résistante à la protéolyse de la PrPsc, présente dans le cerveau atteint. La détection de la PrPres se fait grâce à l'utilisation d'anticorps anti-PrP. La visualisation du signal peut se faire soit par un test ELISA, soit par Western blot (pour plus de détail voir l'article de La Bonnardière, Biofutur n° hors série Avril 2001) soit en combinant un traitement biochimique et une observation microscopique (immunohistochimique) ou macroscopique (histoblot). La technique de l'histoblot est utilisée essentiellement à des fins de recherche. Elle est réalisée en transférant par simple contact une coupe fine de cerveau (de souris ou de hamster) sur une membrane de nitrocellulose. L'emprunte protéique de la coupe ainsi obtenue sur le filtre est traitée par la suite comme pour un western blot. Seul les tests biochimiques pratiques, dits tests rapides, sont actuellement commercialisés. Il s'agit du test ELISA développé par le CEA et commercialisé par Biorad et du test du Western blot mis sur le marché par la société Prionics.

Sources des figures a, b et c :

a- INRA

b- Andréoletti *et al.*, 2000. *J. Gen. Virol.* **81**, 3115-3126.

c- Glatzel M and Aguzzi A. 2000. *J. Gen. Virol.* **81**, 2813-2821.

TABLEAU I : Les encéphalopathies spongiformes transmissibles animales actuellement répertoriées

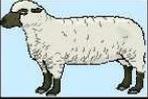
<i>Animal hôte</i>	<i>Maladie</i>	<i>Date de la première description</i>
 ← Guépard	Encéphalopathie Spongiforme	1992
 ← Puma		
 ← Mouflon	Encéphalopathie Spongiforme Féline (ESF)	1990
 ← Chat		
 ← Nyala		
 ← Gemsbok	Encéphalopathie Spongiforme	1986
 ← Elan du cap		1987
 ← Oryx d'arabie		1989
 ← Vache		1985
 ← Cerf mulet des rocheuses	Maladie du dépérissement chronique (Chronic Wasting Disease, CWD)	1967
 ← Wapiti		
 ← Vison	Encéphalopathie transmissible du vison	1947
 ← Chèvre	Tremblante	?
 ← Mouton	Tremblante (scrapie)	Environ 1730

TABLEAU II : Caractéristiques de chacune des formes de la protéine Prion PrP

	<i>PrPc (normale, cellulaire)</i>	<i>PrPsc (pathologique, anormale, scrapie)</i>
Localisation	<ul style="list-style-type: none"> -La plupart des tissus étudiés -Membranaire -Une forme soluble dans le liquide séminal 	<ul style="list-style-type: none"> -Accumulation sous forme d'agrégats dans certains tissus (cerveau, rate, amygdales, systèmes lymphoïdes...)
Sensibilité-stabilité	<ul style="list-style-type: none"> -Sensible aux protéases -Temps de demi vie de quelques heures (3-6 heures) -Fixe des molécules de Cuivre 	<ul style="list-style-type: none"> -Résistante aux protéases -Temps de demi vie en jours (~2 jours) -Ne semble pas fixer de Cuivre
Structure tertiaire	<ul style="list-style-type: none"> -Riche en hélices alpha 	<ul style="list-style-type: none"> -Riche en feuillets bêta
Solubilité	<ul style="list-style-type: none"> -Soluble en détergents non ionique -Associée aux radeaux lipidiques membranaires (rafts) -Solubilisée avec la phospholipase C (enzyme d'hydrolyse de l'ancre GPI) 	<ul style="list-style-type: none"> -Insoluble, sédimentable -Formation d'agrégats, plaques amyloïdes -Précipite à l'acide phosphotungstique -Non solubilisée après traitement à la phospholipase C -Se fixe (directement ou indirectement ?) au plasminogène

Tableau III : Les différentes ESSTs humaines

<p>Maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ)</p>	<p>*MCJ Sporadique : origine indéterminée ; conversion spontanée de la PrPc en PrPsc ; mutations somatiques (non héréditaires) du gène Prnp.</p> <p>*MCJ Familiale : mutations héréditaires du gène Prnp.</p> <p>*MCJ Iatrogène : contaminations dues à des actes médicaux ou chirurgicaux : transplantation de cornées ; greffe de dure mère (mninges) ; contamination d'électrodes d'enregistrement neurologique ; injection d'hormone de croissance humaine extraite d'hypophyses de cadavres atteints de MCJ.</p> <p>*Nouveau Variant de MCJ (nvMJC) : contamination due probablement à la consommation de matériel bovin atteint d'ESB.</p>
<p>Insomnie Fatale familiale (FFI)</p>	<p>Mutations héréditaires du gène Prnp (mutations D178N, M129).</p>
<p>Insomnie Fatale Sporadique (FSI)</p>	<p>Mutations non héréditaires, ou conversion spontanée de la PrPc en PrPsc.</p>
<p>Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)</p>	<p>Mutations héréditaires du gène Prnp.</p>
<p>Kuru</p>	<p>Transmission par consommation d'organes de cadavres lors de rites de cannibalisme mortuaire chez les Fores de Papouasie Nouvelle-Guinée.</p>

TABLEAU IV : Niveaux d'infectiosité détectés selon les différentes catégories de tissus vis-à-vis de la tremblante (d'après l'OMS)

<i>Organes et tissus concernés</i>	<i>Niveaux d'infectiosité détectés</i>
Catégorie I: Infectiosité élevée	Cerveau, moelle épinière
Catégorie II: Infectiosité faible	Rate, amygdales, ganglions lymphatiques, iléon, colon proximal
Catégorie III: Infectiosité très faible	Nerf sciatique, hypophyse, surrénales, colon distal, muqueuse nasale
Catégorie IV: Infectiosité minimum	Liquide céphalo-rachidien, thymus, moelle osseuse, foie, poumons, pancréas
Catégorie V: Infectiosité non détectable	Muscles, cœur, glandes mammaires, colostrum, lait, caillot sanguin, sérum, fèces, reins, thyroïde, glandes salivaires, salive, ovaires, utérus, testicules, vésicules séminales

Selon les dernières données scientifiques [Réf. 31], l'infectiosité du sang doit être réévaluée.

TABLEAU V : Nombre de cas d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en Europe au mois de décembre 2002 (d'après l'OIE)

PAYS	à 1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	TOTAL
Royaume Uni	446	2514	7228	14407	25359	37280	35090	24438	14562	8149	4393	3235	2301	1443	1202	755	182802
Allemagne	0	0	0	0	0	1(a)	0	3(a)	0	0	2(a)	0	0	7	125	99	212
Autriche	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Belgique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	9	46	33	98
Danemark	0	0	0	0	0	1(a)	0	0	0	0	0	0	0	1	6	2	10
Espagne	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	82	80	164
Finlande	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
France	0	0	0	0	5	0	1	4	3	12	6	18	31(b)	162	277	235	754
Grèce	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Irlande	0	0	15(b)	14(b)	17(b)	18(b)	16	19(b)	16(b)	74	80	83	95	149	246	313	1155
Italie	0	0	0	0	0	0	0	2(a)	0	0	0	0	0	0	50	21	73
Luxembourg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
Pays-Bas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	20	23	51
Portugal	0	0	0	1(a)	1(a)	1(a)	3(a)	12	15	31	30	127	159	150(b)	113	60	703
Suisse	0	0	0	2	8	15	29	64	68	45	38	14	50	33	42	12	420

(a) cas importés

(b) comprends des cas importés