



Les agents transmissibles non conventionnels (prions)

J. Coste
EFS Pyrénées -Méditerranée
CNRS UPR 1142 - IFR122

TACT
Toulouse 08 10 2010

Les Agents Transmissibles Non Conventionnels (prions)

- **Agents Transmissibles Conventionnels**
 - Agents infectieux (virus, bactéries, parasites)
 - Composés de:
 - Matériel génétique (ADN, ARN)
 - Protéines
 - Doués de capacités répliquatives
- **Agents Transmissibles Non Conventionnels**
 - Éléments répliquatifs simples (non viraux)
 - Viroïdes (ARN)
 - **Prions (protéines)**

Plan de la présentation

- **Généralités sur les maladies à prions**
- L'agent infectieux des maladies à prions
- Maladie de la vache folle et variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
- Risque transfusionnel
- Mesures de prévention
- Conclusion et perspectives

Les maladies à prions

- **Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles**
- **Touchent principalement le cerveau (spongiose)**
 - Incubation longue: en moyenne 35 ans (l'homme)
 - Manifestations
 - Troubles de la mémoire, motricité
 - Démence d'évolution fatale
 - Les maladies à prion affectent:
 - Les hommes (MCJ)
 - Les animaux (tremblante du mouton, maladie de la vache folle)

Maladies à Prion chez l'animal

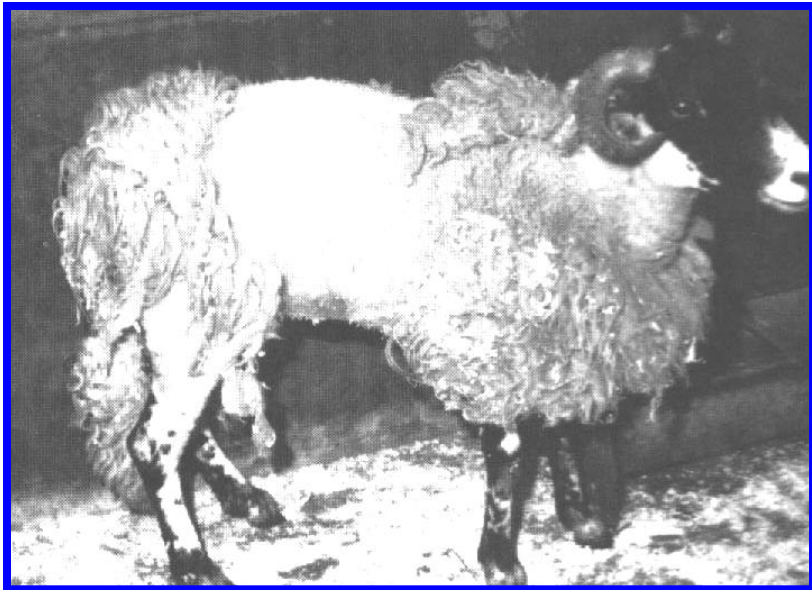
- Affections neurodégénératives d'évolution fatale

Tremblante du mouton « Scrapie »

Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)

Tremblante du mouton

Maladie de la vache folle ou ESB



Chez l'homme, les maladies à prion sont principalement représentées par la maladie de Creutzfeldt-Jakob qui peut avoir trois origines:

- **sporadique**: qui se déclenche sans raison apparente et touche environ 100 personnes par an en France.
- **génétique**: qui touche des familles ayant une mutation dans le gène de la protéine prion (très rare).
- **infectieuse**: résulte de la contamination d'une personne par des instruments (électrodes...) ou des produits contaminés (extraits hormonaux, greffes, alimentation...)

Formes sporadiques

MCJ, les plus nombreuses des maladies à prions (>85%)

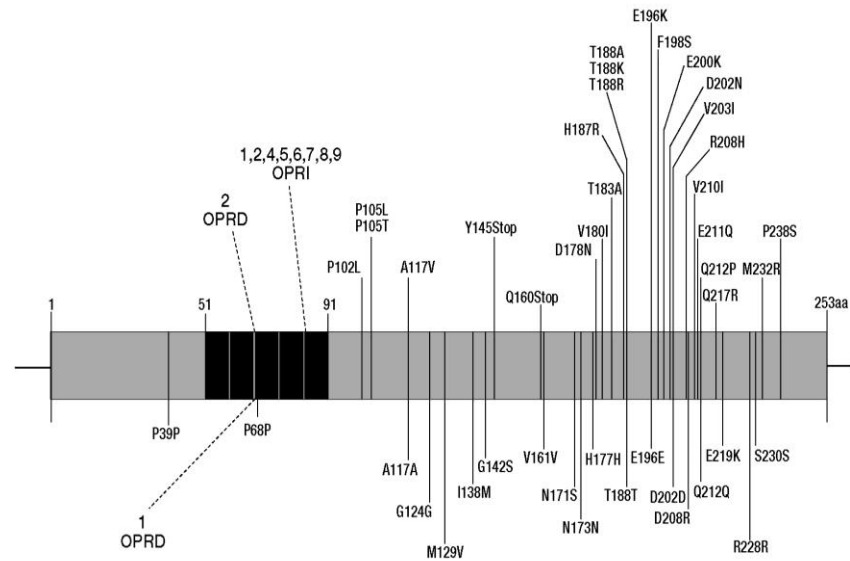
Etiologie inconnue, rare 1,5/million/an, touchent plus souvent les patients après l'âge de 60-70 ans



**Georges
Balanchine**

• Formes génétiques

Autosomique dominante,
liées à des
mutations dans un
gène unique qui code
la protéine du prion
(PrP)



• Formes infectieuses

- Kuru : cannibalisme rituel qui a maintenant disparu
- Formes iatrogènes : greffes, hormones de croissance
- **vMCJ** : touchent des patients jeunes, lié à l'ESB



Plan de la présentation

- Généralités sur les maladies à prion
- L'agent infectieux des maladies à prions
- Maladie de la vache folle et variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
- Risque transfusionnel
- Mesures de prévention
- Conclusion et perspectives

Dans les années 80, plusieurs équipes de recherches ont essayé d'isoler l'agent infectieux des maladies à prion à partir de cerveaux d'animaux atteints de la maladie.

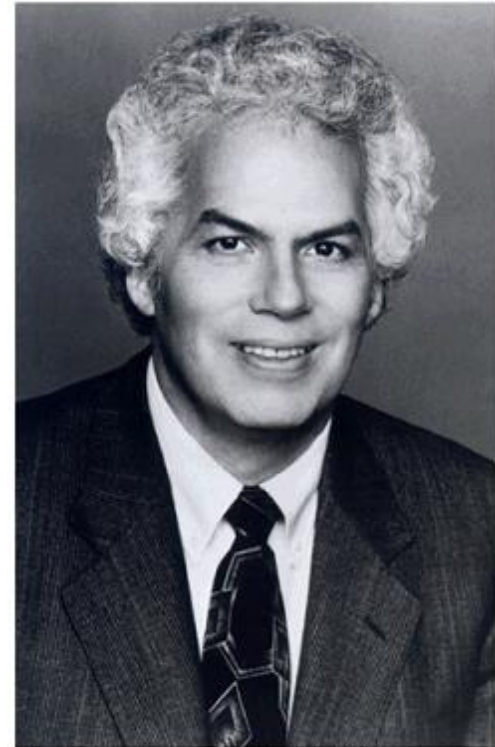
L'agent infectieux purifié semblait être composé essentiellement de protéines, sans trace évidente de matériel génétique comme pour les virus et les bactéries.

Ces résultats ont conduit le Pr. Prusiner à proposer l'hypothèse des

« Prions » : l'agent infectieux serait représenté par une forme pathologique de la protéine du Prion

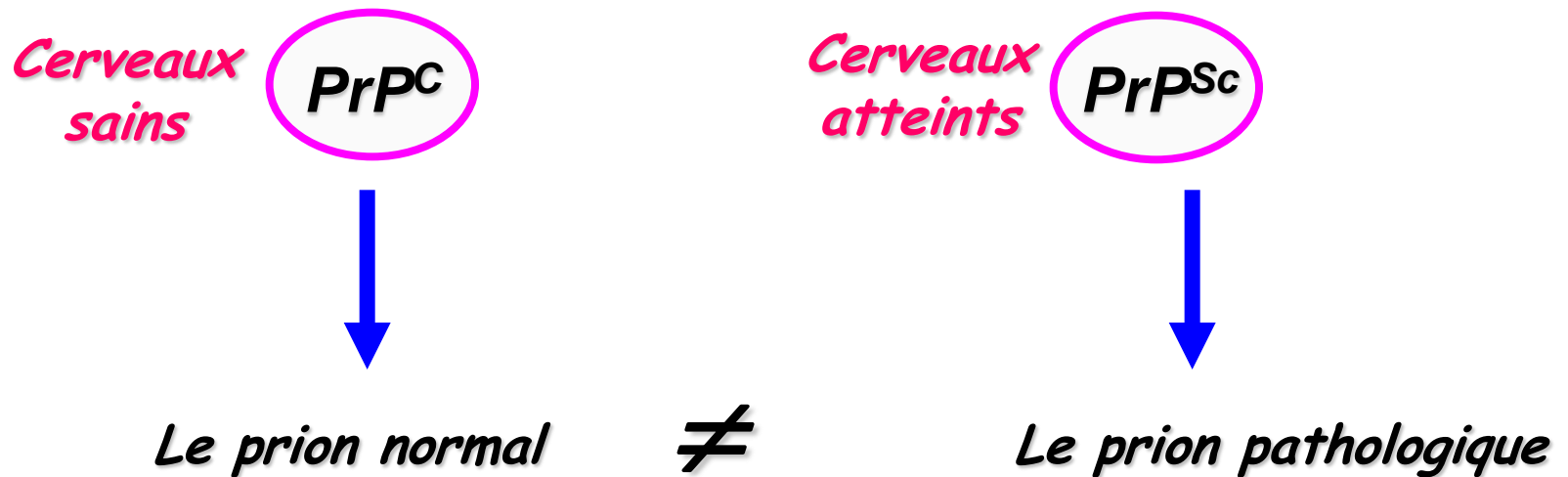
Protéines :

Les protéines sont les constituants majeurs des cellules biologiques avec les lipides et les glucides. Elles sont composées d'acides aminés et jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de la cellule.



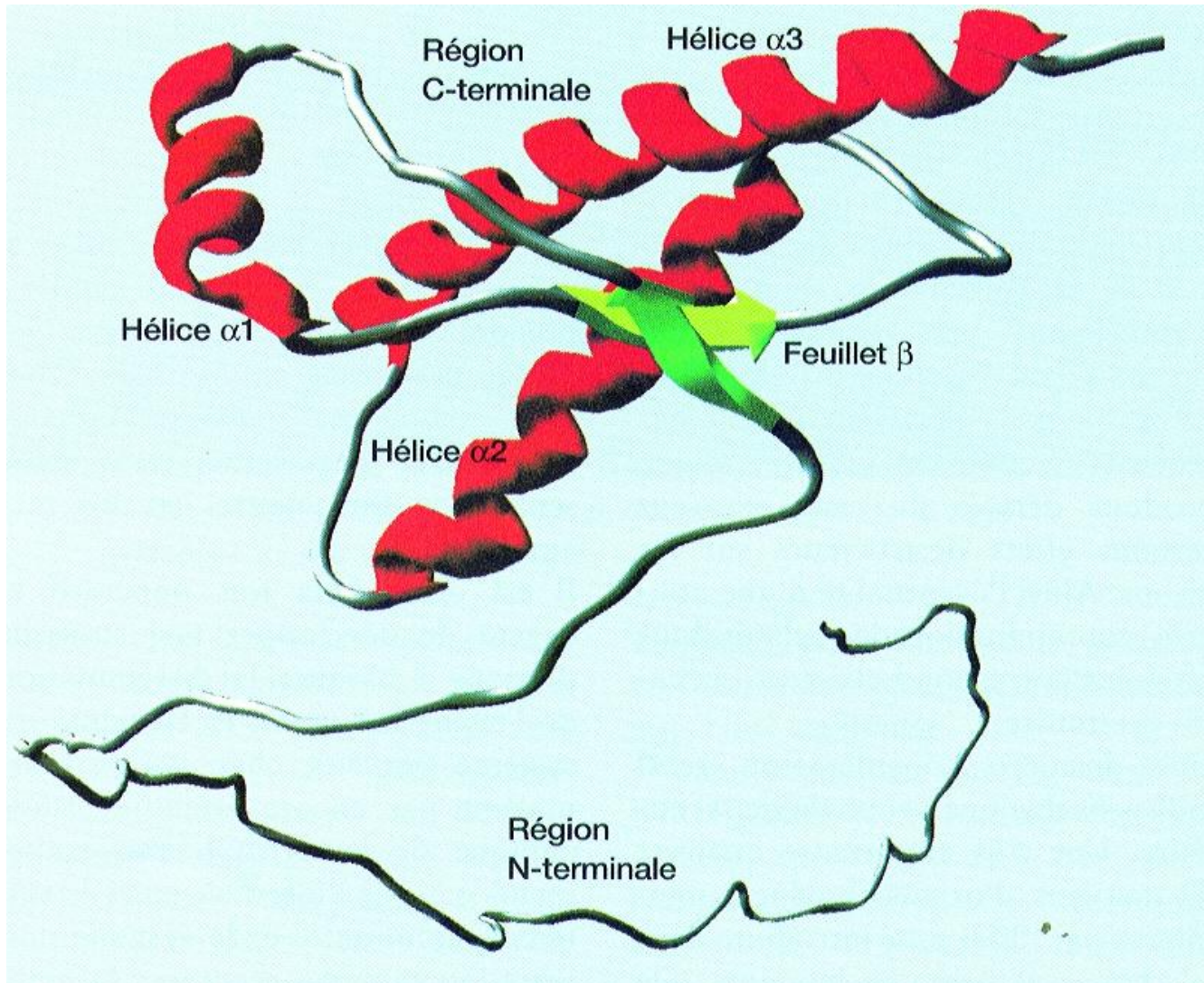
Stanley Prusiner - Prix Nobel 1997

On retrouve, dans les fractions infectieuses, une protéine anormale appelée PrP^{Sc} (pour forme scrapie de la protéine du prion). Cette dernière dérive d'une protéine normale appelée PrP^C (pour forme cellulaire de la protéine du prion).



La différence entre prion normal (PrP^C) et pathologique (PrP^{Sc}) est due à la forme (conformation) de ces deux molécules qui ont la même composition en acides aminés.

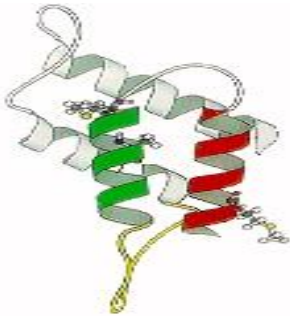
Structure de la PrP^c



La protéine Prion

- ♦ Très conservée parmi les mammifères
- ♦ Rôles à définir
- ♦ Seul marqueur biochimique identifié (pas d'anticorps)

Protéine normale



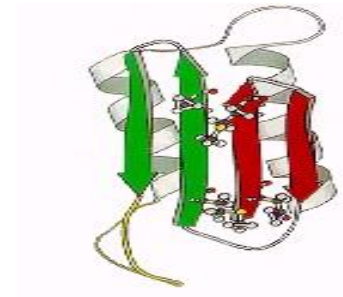
PrP^c

Hélice α = 42 %

Feuillet β = 3 - 5 %

→
Conversion

Protéine pathologique

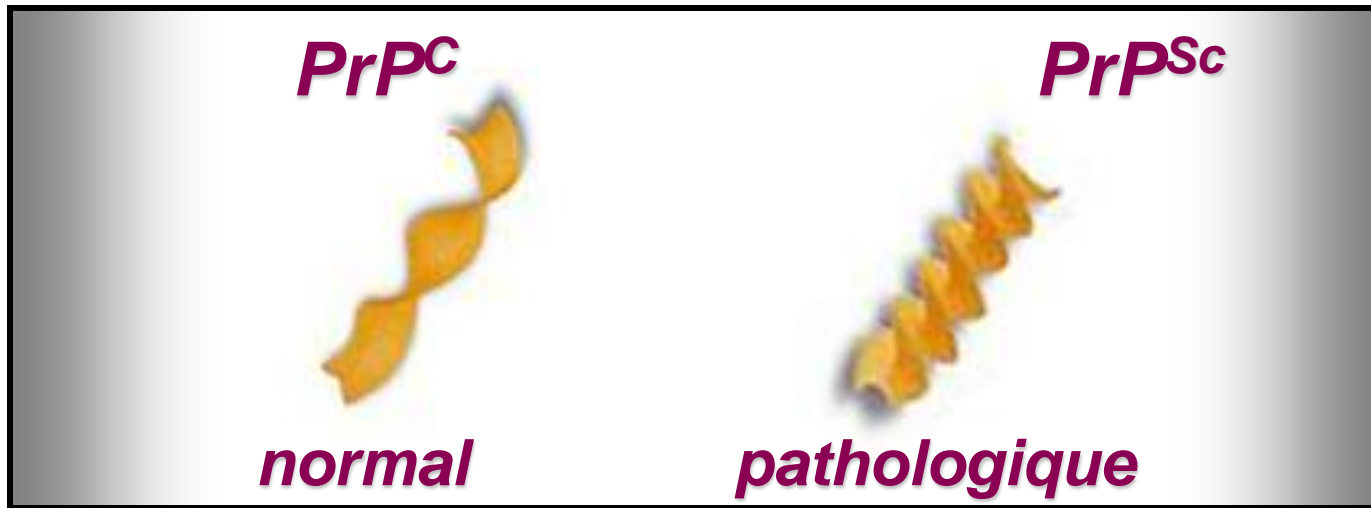


PrP^{Sc}

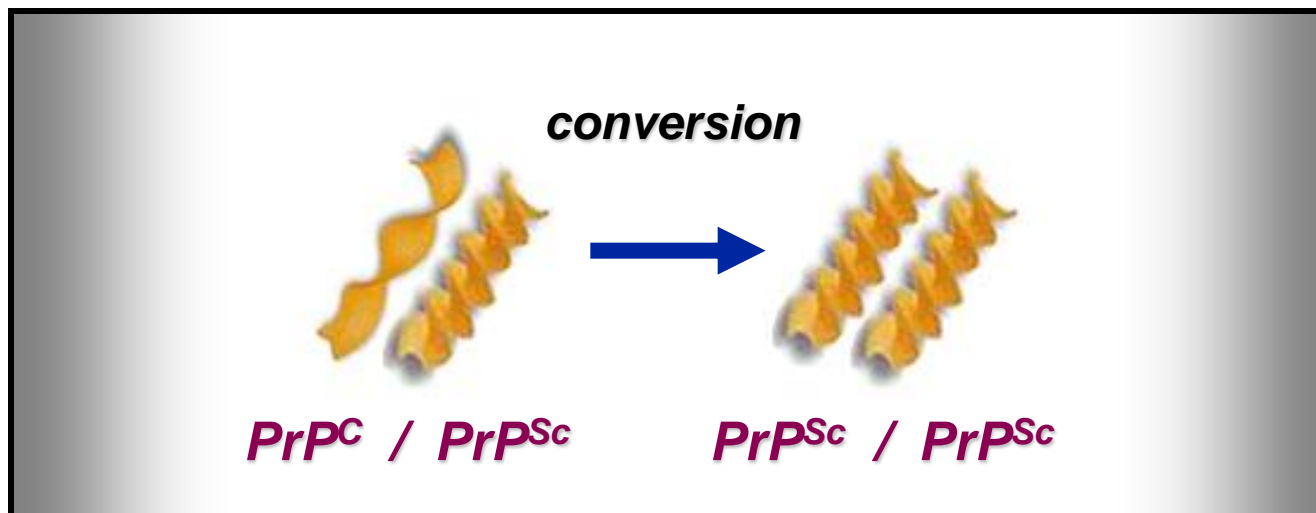
Hélice α = 30 %

Feuillets β = 43 %

On peut comparer la forme des protéines à celle de « pâtes ». Ainsi le prion peut être représenté sous deux formes, comme montré ci-dessous :

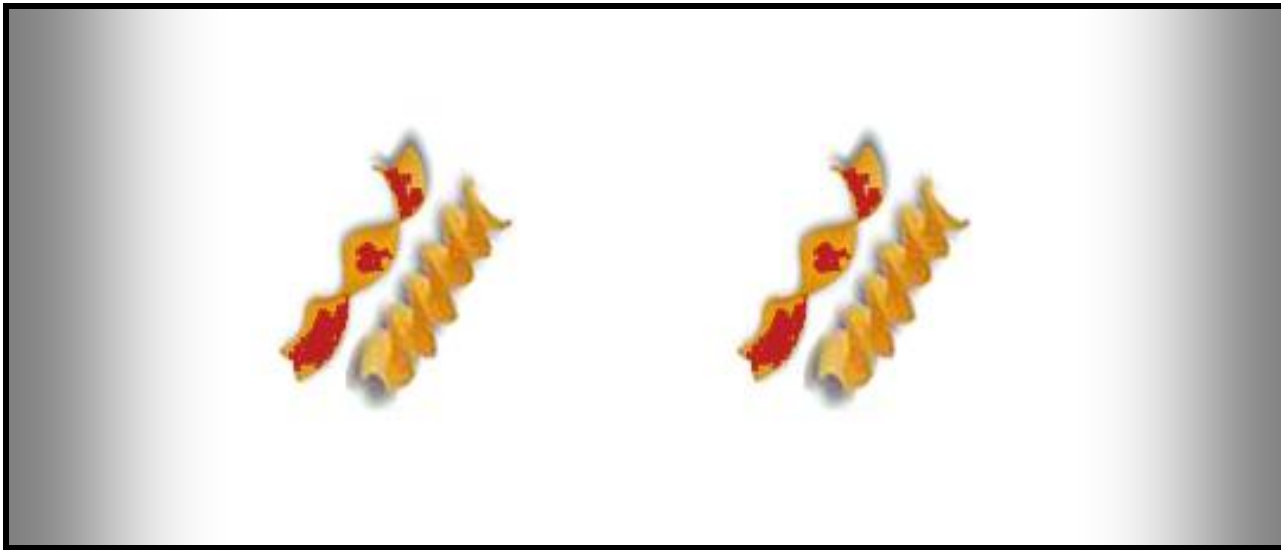


Au cours de la maladie, la conversion pathologique du prion normal en prion anormal peut être illustré de la façon suivante :

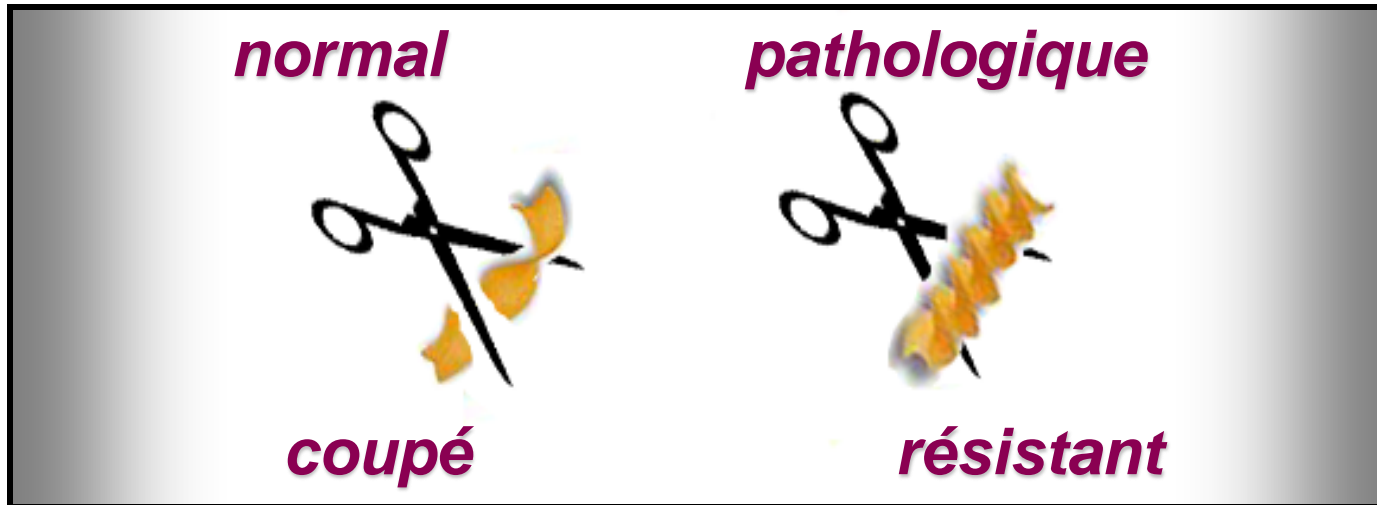


Notion de barrière d'espèce

Les protéines du prion normales
diffèrent légèrement entre les espèces
ce qui diminue l'efficacité de la
conversion pathologique



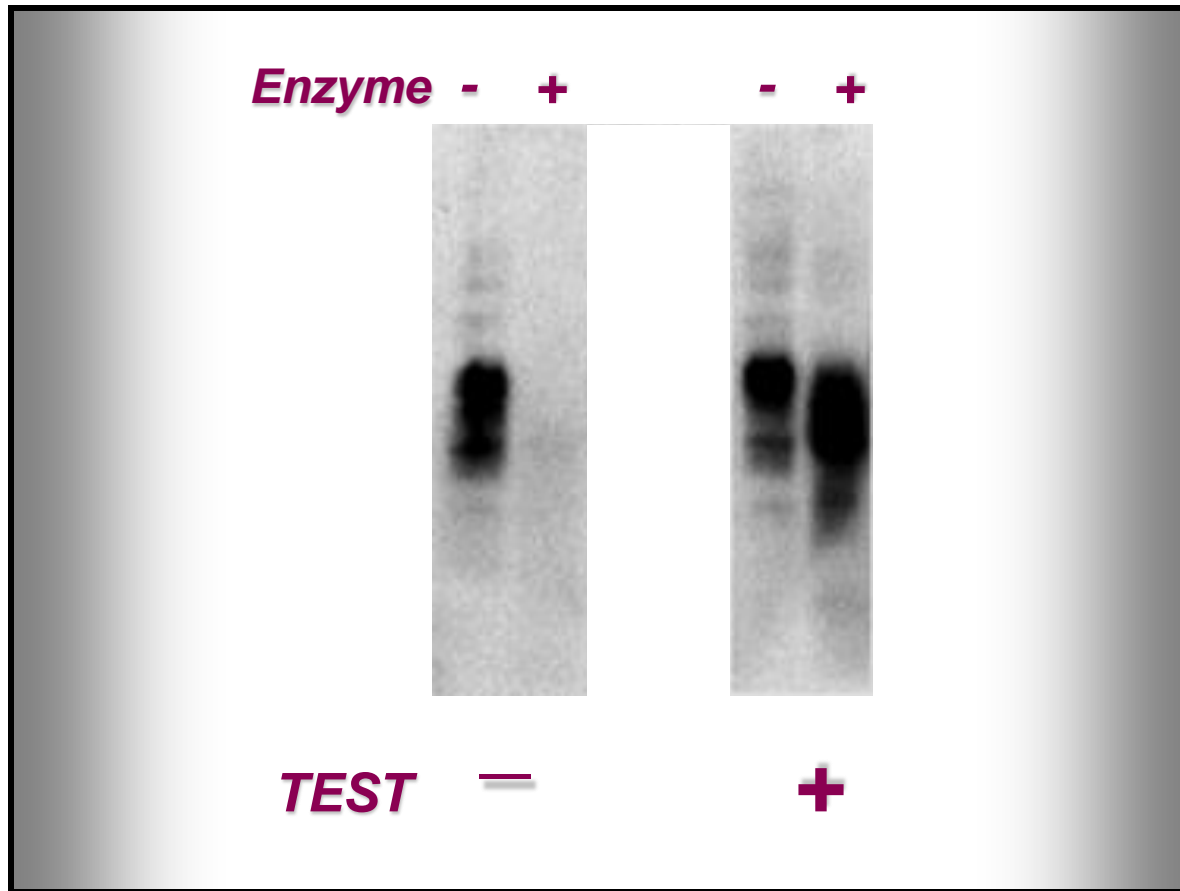
Le prion pathologique possède des caractéristiques qui permettent de le distinguer du prion normal. Ainsi, il est résistant à la coupure par des enzymes (protéases).



Cette propriété est utilisée pour détecter la présence de prion anormal chez un animal atteint, en particulier chez les bovins destinés à la consommation humaine.

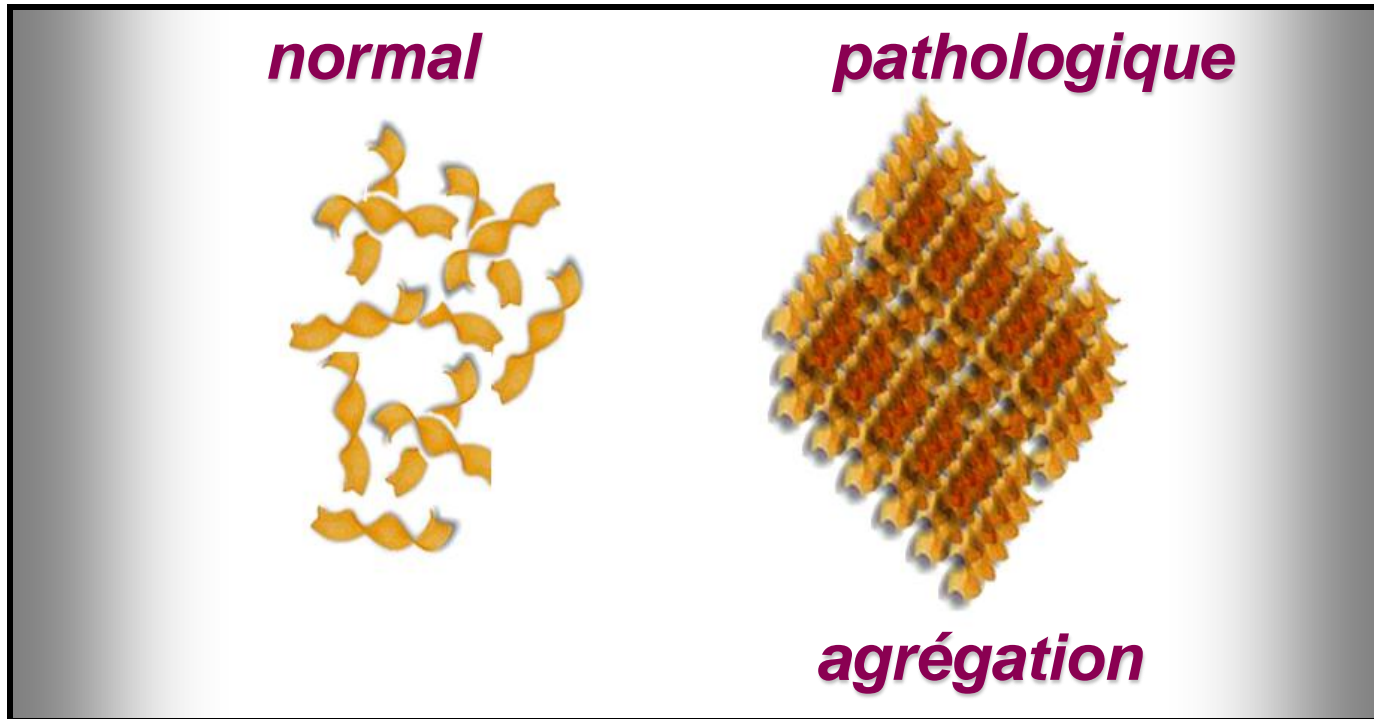
De même, le diagnostic de la maladie chez l'homme repose principalement sur cette propriété de résistance des prions pathologiques aux enzymes.

Illustration des Propriétés de la forme anormale de la protéine du prion



Principe utilisé dans les tests diagnostiques

Une autre propriétés importante du prion pathologique est sa capacité à s'agréger

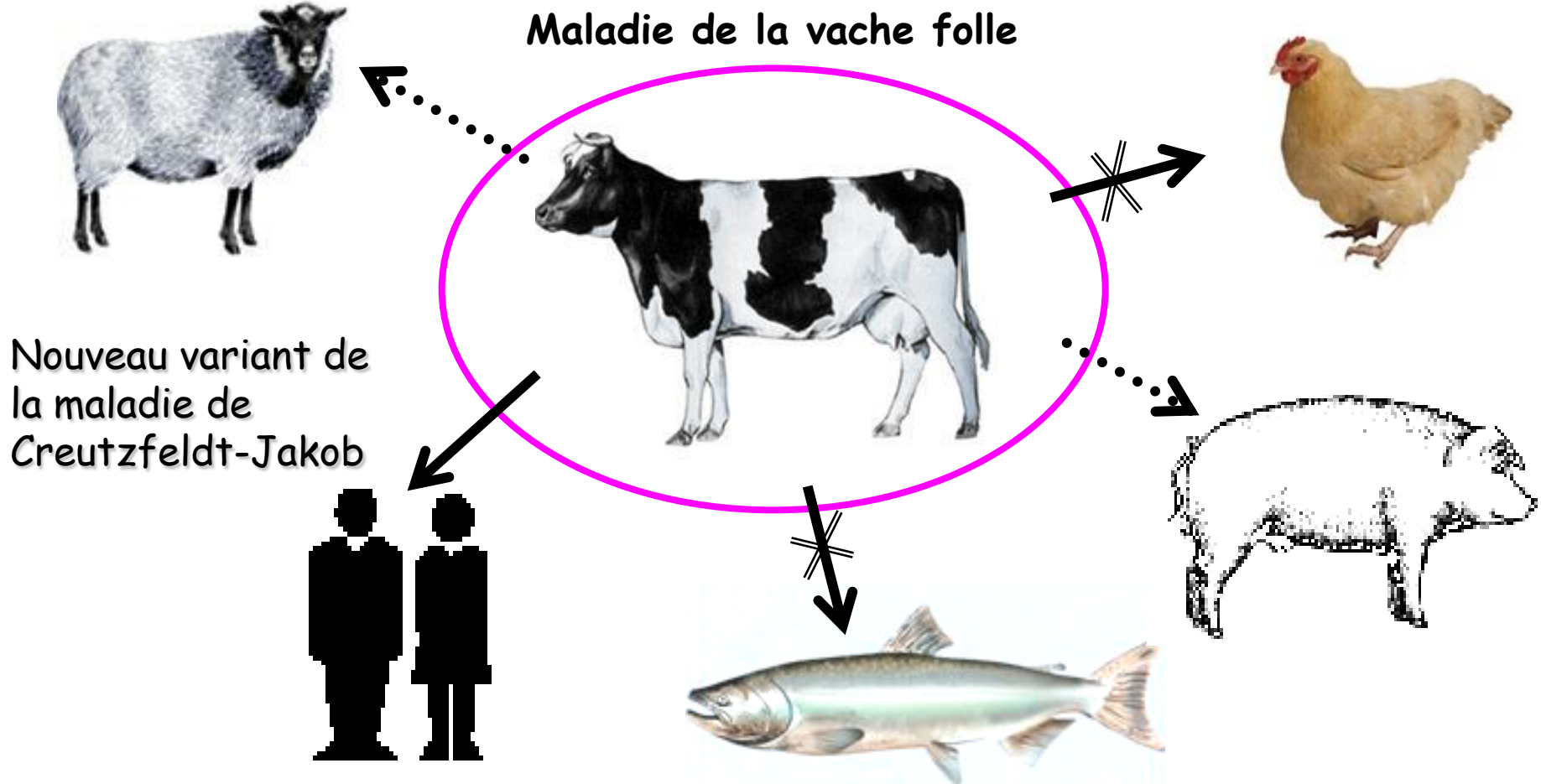


Cette propriété pourrait expliquer la difficulté à éliminer les prions. En effet, les protéines agrégées sont peu affectées par les produits décontaminants classiques (alcool, formol, détergents...) ou par les rayonnements UV. Cette agrégation pourrait également être à l'origine de la mort des neurones dans le cerveau.

Plan de la présentation

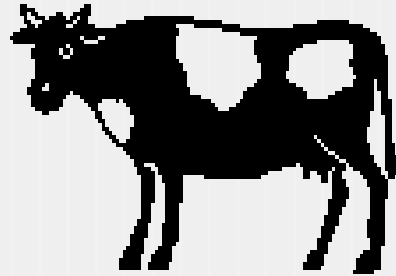
- Généralités sur les maladies à prion
- L'agent infectieux des maladies à prion
- **Maladie de la vache folle et variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob**
- Risque transfusionnel
- Mesures de prévention
- Conclusion et perspectives

La transmission de l'agent de la maladie de la vache folle à l'homme est responsable du «variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob » en Europe (à ce jour on dénombre plus de 169 cas en Angleterre, 25 en France). En laboratoire, la maladie est transmissible au mouton et au porc (uniquement par inoculation intracérébrale). La transmission au poisson ou au poulet n'a pas été obtenue et elle est peu vraisemblable du fait des différences entre les espèces (barrière d'espèce).

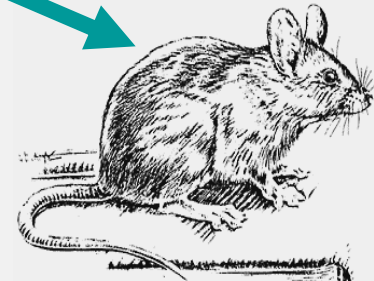


ESB et vMCJ sont dues au même agent

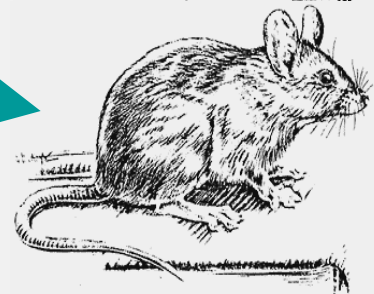
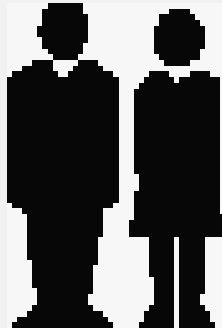
Maladie
de la vache
folle (ESB)



Transmission
expérimentale



Variante de
la maladie de
Creutzfeldt-
Jakob



Caractéristiques générales du variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (v MCJ)

- Age moyen de début : 27 ans (précoce)
- Durée moyenne d'évolution : 13 mois (plus long)
- Symptomatologie psychiatrique initiale
- Polymorphisme Met/Met codon 129
- Généralement EEG et 14-3-3 normaux
- Distribution tissulaire différente: tropisme lymphoïde

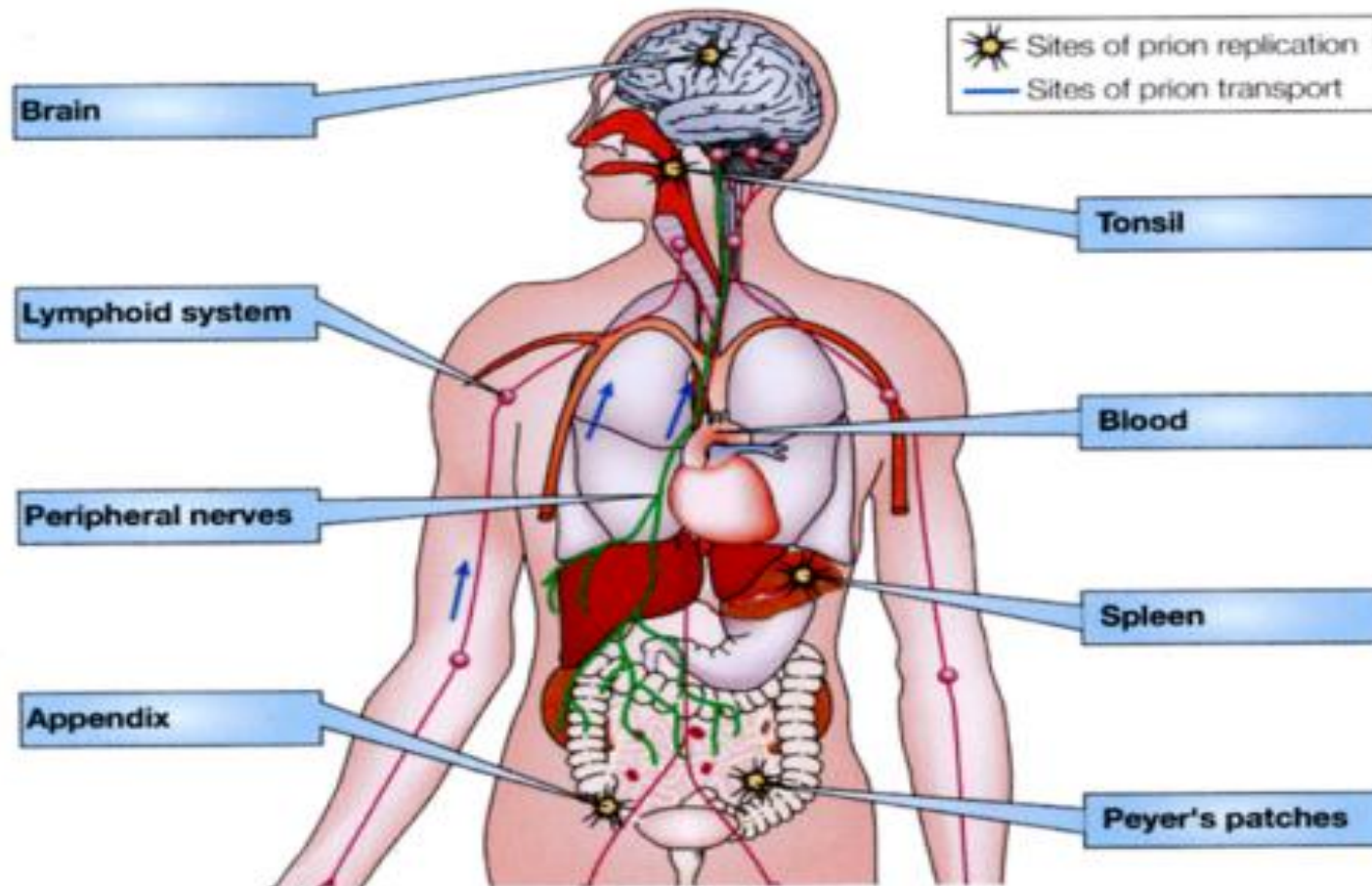


Figure 1 | **Human tissues and body fluids involved in propagation and transport of the prion.** Orally ingested prions are intestinally absorbed, mainly at the Peyer's patches, and transported to the blood and lymphoid fluids¹⁰. After a peripheral replication step in the spleen, appendix, tonsils or other lymphoid tissues, prions are transported to the brain mainly by peripheral nerves⁹. Direct penetration into the brain across the blood-brain barrier is also possible¹¹.

vMCJ

- Franchissement de la barrière d'espèce
 - ESB bovine → vMCJ humaine
- Maladie émergente
- Maladie de l'adulte jeune (moyenne 30 ans)
- Distribution centrale et périphérique du prion dans les tissus lymphoïdes
 - ganglions, rate, appendice, amygdales,
- Circulation sanguine
 - Leucocytes, plasma
- Possibilité d'une transmission par le sang
- Risque de transmission interhumaine

Polymorphisme au Codon M129V gène *PRNP*

- Influence sur le développement des différentes formes de MCJ

	Met/Met (%)	Met/Val (%)	Val/Val (%)
Population française	41	49	10
sMCJ	71	13	16
iMCJ	62	16	22
vMCJ	100		

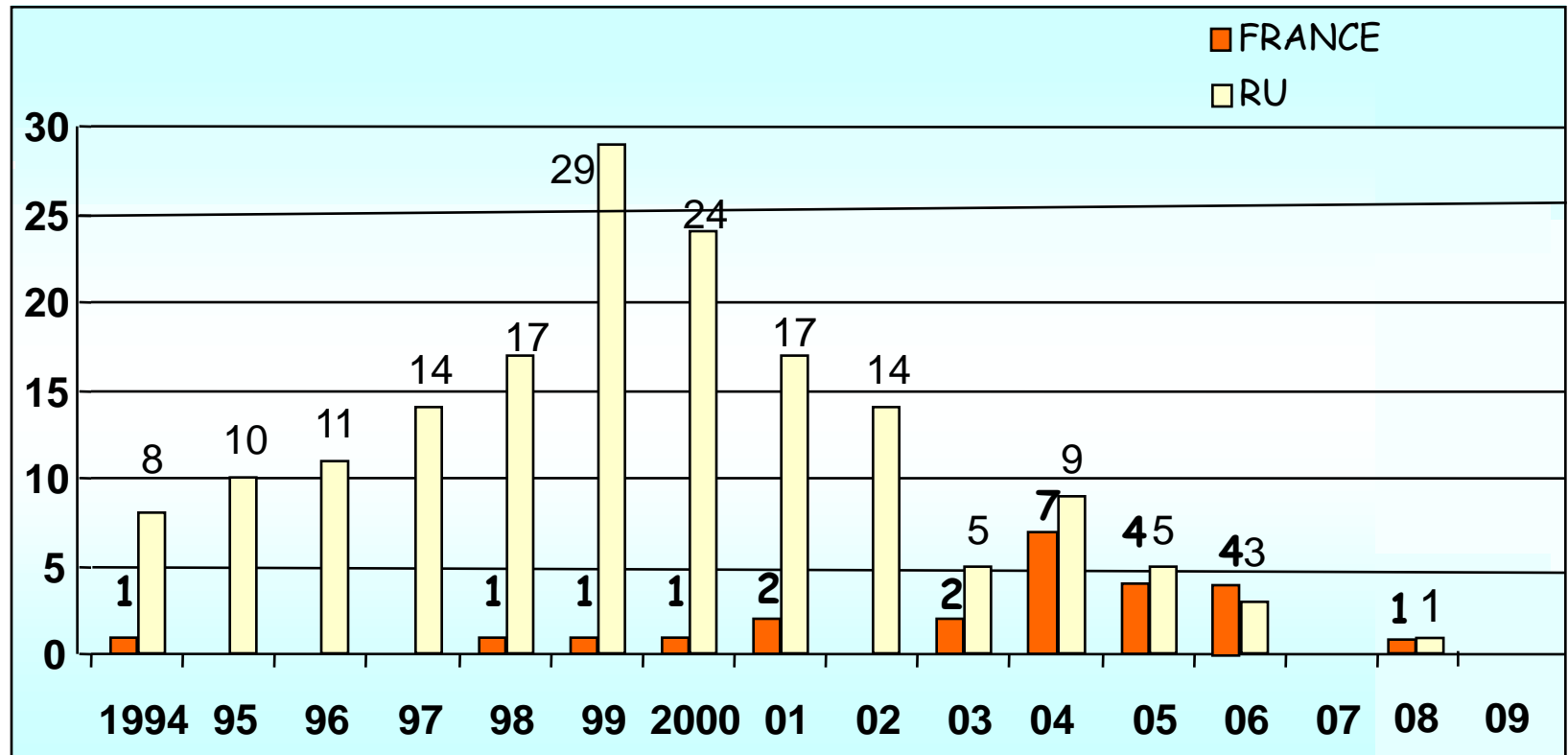
218 cas de vMCJ (octobre 2010)

Pays	Nbre de cas (vivants)	Résidence cumulée au RU > 6 mois entre 1980 et 1996
R.U	171 (4)	174
France	25 (0)	1
République d'Irlande	4 (0)	2
USA	3 (0)	2
Pays-Bas	3 (0)	0
Portugal	2 (0)	0
Espagne	5 (0)	0
Italie	2 (1)	0
Canada	1 (0)	1
Arabie Saoudite	1 (1)	0
Japon	1 (0)	0

vMCJ au RU et en France

1^{er} Juin 2009

• Nombre de cas incidents par an



J-Ph. Brandel (U708)

R. Will (CJD Surveillance Unit)

Projection nombre de porteurs vMCJ asymptomatiques

Royaume Uni

1. Etude rétrospective (Plymouth et Edimbourg)

Recherche de Pr^{PEST} dans 14 674 amygdales et appendices :

- tranche d'âge : 10-30 ans
- opérés entre 1995-1999
- **3 appendices positifs**
 - prévalence 1/4000
 - 237⁺/10⁶ (IC 95% : 49-792)
 - 41 250⁺/60.10⁶ britanniques
- **2/3 : homozygotes Val/Val**

Hilton D et coll. J.Path. 2004;203:733-9

2. En cours

2003-2013 : National Anonymous Tonsil Archive (NATA)
Etude de 100 000 paires d'amygdales

2009-2012 : Etude d'appendices

Plan de la présentation

- Généralités sur les maladies à prion
- L'agent infectieux des maladies à prion
- Maladie de la vache folle et variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
- **Risque transfusionnel**
- Mesures de prévention
- Conclusion et perspectives

Etudes chez l'animal

**Microcèbe (*Microcebus murinus*) : lémurien
originaire de Madagascar.**

- Primate de petite taille.
- Facile à manipuler.
- Absence de zoonose.
- Modèle de la maladie d'Alzheimer.



Etude de transmission chez l'animal - I. Microcèbe

*Bons N., Lehmann S., Mestre -France N., Dormont D., Brown P.
Transfusion, 2002 ; 42 : 513-516*

- 3 Microcèbes inoculés par voie intracrânienne avec l'agent de la BSE:

- 2 avec l'homogénat de cerveau
- 1 avec le *buffy-coat*

→ les 3 Microcèbes développent la maladie

➔ *L'agent de la BSE serait transmissible / sang.*

Etude de transmission chez l'animal - II. Mouton

Hunter N. et coll. J Gen Virol 2002 ; 83 : 2897-2905

1. Infection par voie orale de 6 moutons par l'agent de la BSE :

- prélèvements de sang en phase asymptomatique et en phase clinique

2. Transfusions (voie intra-veineuse) à 24 moutons sains :

- 5 avec sang prélevé en phase clinique
- 14 avec sang prélevé en phase pré-clinique

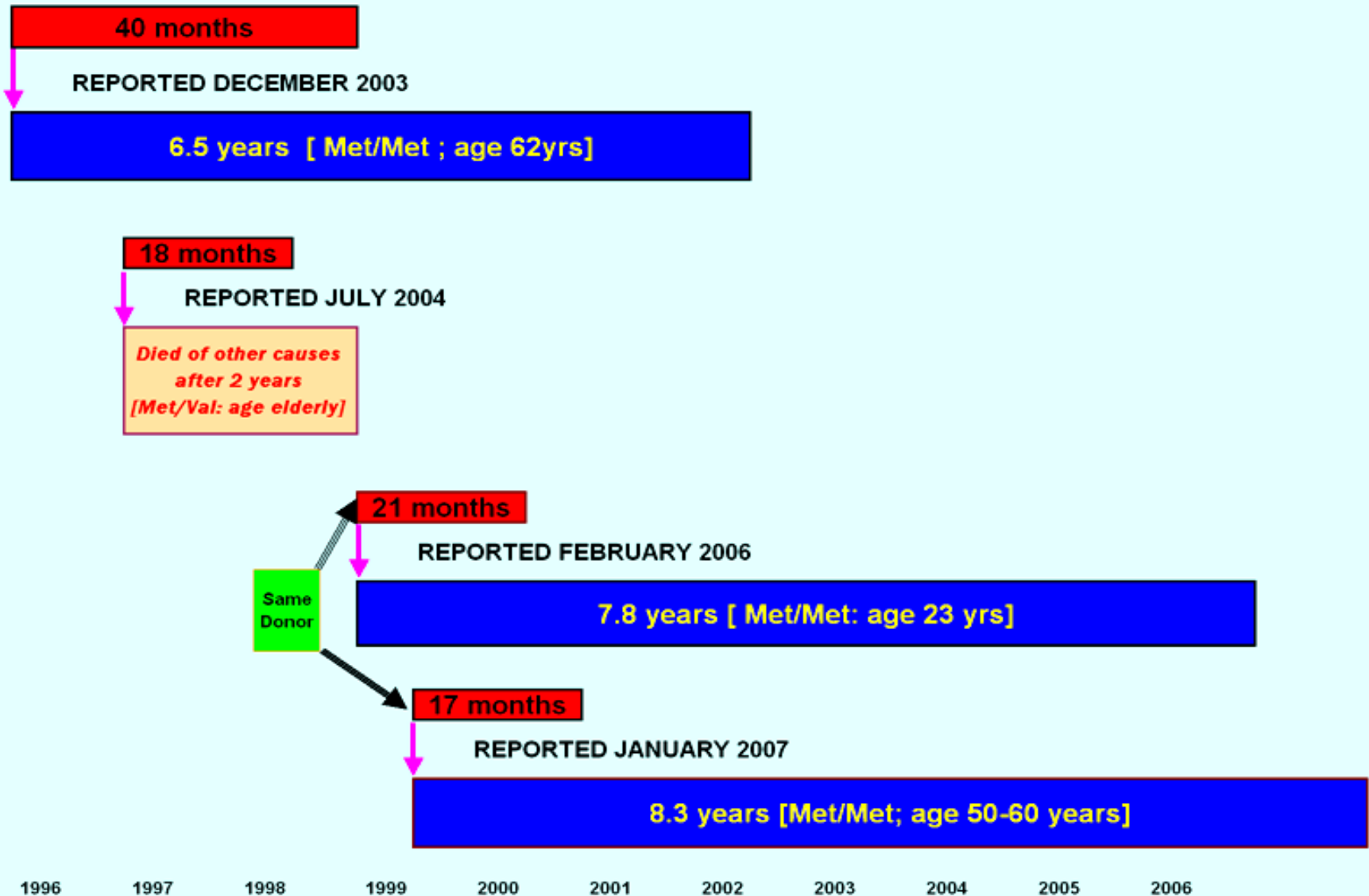
➔ *6 moutons infectés (25 %)*

Surveillance du risque transfusionnel

Royaume Uni

Nbre de cas de vMCJ rapportés	168
Nbre de cas éligibles au don de sang	158
Nbre de cas rapportés ayant donné au moins 1 fois	31
Nbre de cas avec enquêtes abouties	24
Nbre de donneurs vMCJ dont les PSL ont été distribués	18
Nbre de receveurs identifiés ayant reçu des PSL des 18 donneurs	66

Surveillance du risque transfusionnel : RU



Surveillance du risque transfusionnel

✦ France

Nbre de vMCJ rapportés	24
Nbre de donneurs de sang	3
Nbre de receveurs ayant reçu des PSL des 3 donneurs	44
Nbre de receveurs vivants au moment de l'enquête	12*
Nbre de receveurs décédés du vMCJ	0

*transfusés entre 1991-2004
80% CGR déleucocytés

*D.Rebibo L.Hauser
Pôle d'Hémovigilance EFS*

Surveillance du risque de contamination vMCJ par les MDS

✦ Royaume Uni

- Février 2009 : Patient hémophile (†74 ans)

- avait reçu en 1996 un lot de FVIII
 - . plasma d'un donneur prélevé en 1996 ayant développé une MCJ 6 mois post-don
- décédé d'une cause indépendante
- aucun signe évocateur de la vMCJ
- PrP^{EST} détecté dans la rate (post mortem)
- Hétérozygotie Met/Val

→ 1° mise en évidence de la PrP^{EST} chez un patient traité pour hémophilie

Surveillance du risque transfusionnel :

France

- 2 Donneurs de plasma (1993-2004)
 - ◊ Cas 8: 10 unités
 - ◊ Cas 9: 12 unités
- 44 lots en circulation
 - ◊ Alb-FVIII- vWF- FIX- Fibrinogène-Ig
 - rappel de tous les lots
 - information à tous les pays ayant reçus ces lots

Surveillance du risque transfusionnel : France

- Impact du rappel des lots

- MDP Cas 8

- 14.000 - 18.000 patients avaient été traités

- MDP Cas 9

- 14.000 - 16.000 patients avaient été traités

→ # 50.000 patients déjà traités

Plan de la présentation

- Généralités sur les maladies à prion
- L'agent infectieux des maladies à prion
- Maladie de la vache folle et variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
- Risque transfusionnel
- Mesures de prévention
- Conclusion et perspectives

Mesures de prévention

- 1992-1995 : Exclusion du don des sujets à risque de développer une MCJ « classique » (antécédents familiaux, neurochirurgie, traitement par hormones extractives hypophysaires, greffe de dure-mère ou cornée)
- 1994 : Rappel et retrait des MDS issu de pools contenant un don d'un donneur ultérieurement diagnostiqué MCJ
- 1997 : Exclusion du don des sujets ayant été transfusés
- 2000 - 2004 : Amélioration des procédés de préparations des MDS du LFB
- 2001 : Exclusion du don des sujets ayant séjourné dans les Iles Britanniques au moins 1 an entre 1980 et 1996
- 2002 : Leucoréduction de tous les plasmas
- 2003 : réduction du volume plasmatique des PSL cellulaires
- 2003 : information des prescripteurs, des patients et des donneurs sur le site de l'Afssaps
- 2004 : réévaluation des risques de transmission du vMCJ par les produits de santé et les tissus et fluides d'origine humaine

Méthodes de détection

- La protéine prion
 - Seul marqueur biochimique spécifique identifié.
 - Très conservée parmi les mammifères.
 - Rôle à définir.
 - PrP^{res} : résistance à la protéase de la forme pathologique.
 - S'accumule dans le cerveau et les organes lymphoïdes des sujets infectés.
 - Réplication en l'absence d'acide nucléique.

Niveau de PrP^{res} dans le sang infectieux

- Phase symptomatique

- Plasma : 10 DI/ml = 0.1-0.05 pg/ml

- Phase asymptomatique

- Plasma : 1 DI/ml = 0.01- 0.005 pg/ml
- Buffy coat : 10 DI/ml = 10⁶ molécules

- *Brown P. et al. J. Lab. Clin. Invest. 137:5-13*

→ Tests de dépistage : 10⁵ à 10⁶ fois plus sensibles que le Western-Blot.

Méthodes de diagnostic de la PrP^{TSE} (1)

APPROCHES		FIRMES
• CDI: PrP native/dénaturée	ELISA	InPro (Prusiner)
• PK+ Immunoprécipitation (AcM)	ELISA	Prionics-Check LIA
• Ligands:		
✓ Streptomycine/calix-arène	ELISA	BioMérieux
✓ Polyanion + bille	ELISA	Microsens
✓ PSR1 + bille	ELISA	Chiron
✓ Amplification de sonde		Adlyfe
• Concentration + Protection d'épitopes	ELISA	Amorfix
• Epitope overlapping	ELISA	PeopleBio

• Méthodes de diagnostic de la PrP^{TSE} (2)

APPROCHES		EQUIPES R&D
• Amplification		
✓ Protein Misfolding Cyclic	Western-Blot	Université Texas
Amplification (PMCA)		<i>(Cl. Soto)</i>
✓ Quaking Induced Conversion (QuIC)	Western-Blot	National Institute of Health <i>(B. Caughey)</i>

Méthodes de diagnostic de la PrP^{TSE} (1)

APPROCHES		FIRMES
• CDI: PrP native/dénaturée	ELISA	InPro (Pruziner)
• PK+ Immunoprécipitation (AM)	ELISA	Prionics-Check LIA
• Ligands:		
✓ Streptomycine/calix-arène	ELISA	BioMérieux
✓ Polyanion + bille	ELISA	Microsens
✓ PSR1 + bille	ELISA	Chiron
✓ Amplification de sonde		Adlyfe
• Concentration + Protection d'épitopes	ELISA	Amorfix
• Epitope overlapping	ELISA	PeopleBio

Méthodes de diagnostic de la PrP^{TSE} (2)

APPROCHES

EQUIPES R&D

- Amplification

✓ Protein Misfolding Cyclic

Western-Blot

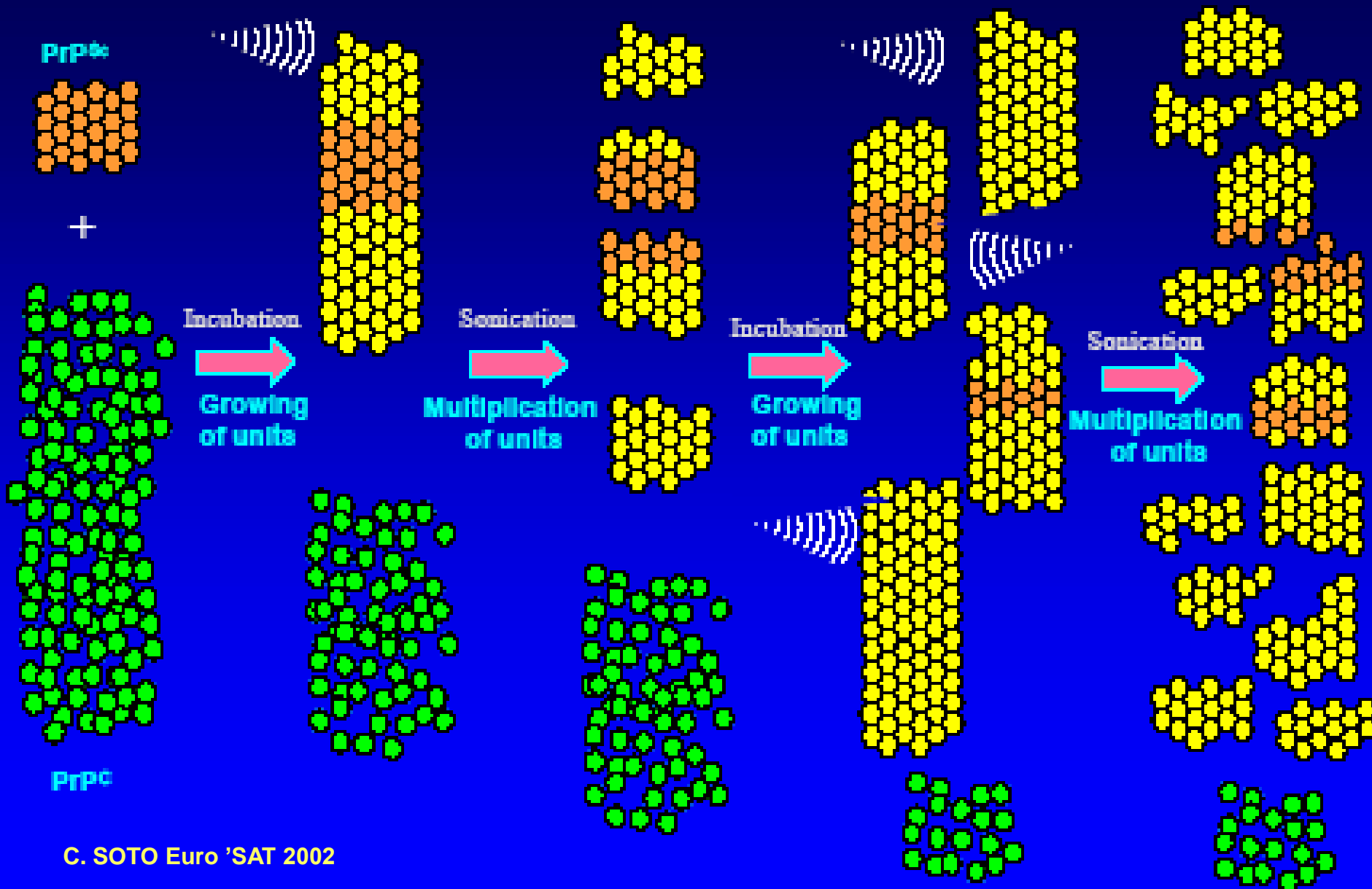
Université
Texas

Amplification (PMCA)

✓ Quaking Induced Conversion (QuIC) Western-Blot

(Cl. Soto)
National
Institute
of Health
(B. Caughey)

PMCA: Protein Misfolding Cyclic Amplification



Développements en cours

I - Qualification Biologique du Don

II - Systèmes de rétention du prion

Infectiosité dans le sang (1)

- Répartition de la charge infectieuse
 - 50 % : Leucocytes
 - 50 % : Plasma
 - ? % : Globules rouges & Plaquettes

Répartition de l'infectiosité dans les PSL

- 1 ml de sang 10 DI
- Don de sang total 450 ml
- Infectiosité dans le sang total 4 500 DI
- Infectiosité après leucoréduction (50 %)
 - dans le sang total 2250 DI
 - dans le plasma (221 ml)
(7DI/ml) 1547 DI
 - dans le CGR (25 ml plasma résiduel) 175 DI
 - CPA (162 ml plasma résiduel) 1 134 DI

Dobra S. et coll 2007

Systemes de rétention du prion

1. Evaluations en cours (RU)

- PRDT /P-Capt de MacoPharma

2. Systemes plus récents (éval.en France)

- Asahi Combination filter for prion and leucoreduction
- Pall Combination filter for prion and leucoreduction

R&D : rétention / inactivation du prion (1)

Projet *Blood Infectivity Removal*

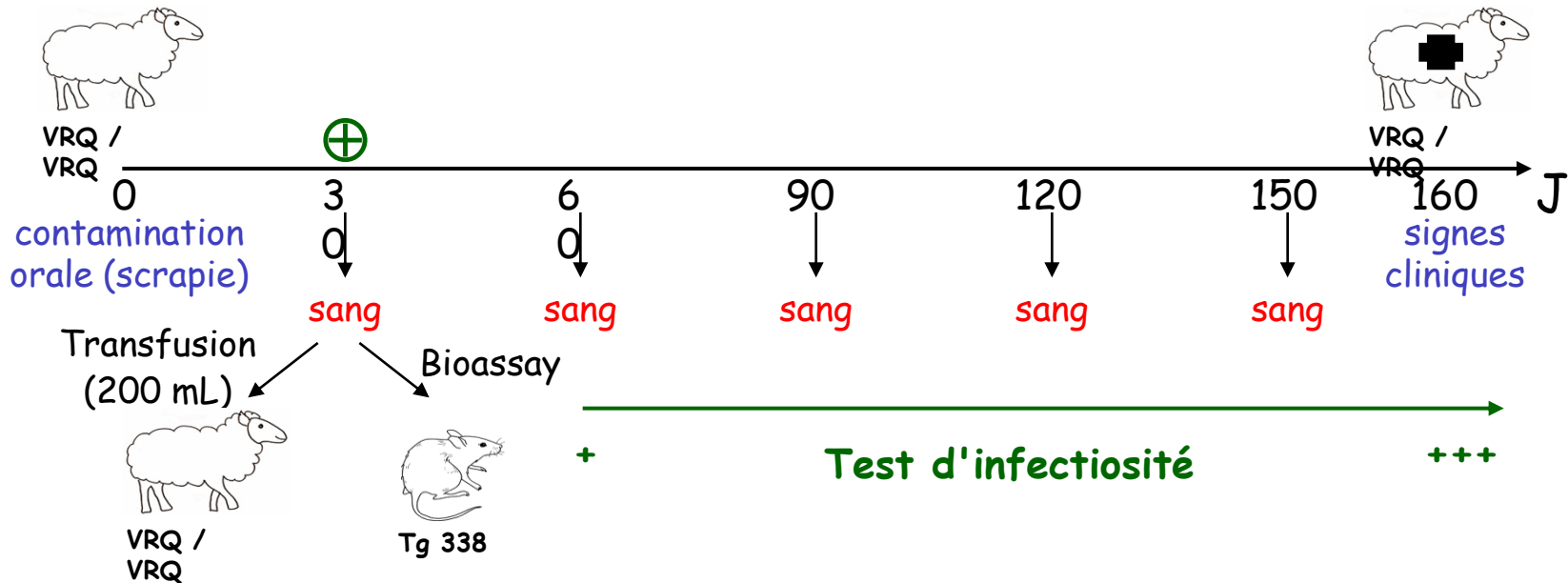
Collaboration EFS / UMR INRA ENVT / CEA

♦ Objectifs

- 1) Évaluation de l'efficacité des procédés de rétention du prion
- 2) Étude de l'infectiosité des différentes fractions du sang

♦ Méthodes

* utilisation du modèle expérimental ovin développé par O. Andréoletti (INRA / ENVT)

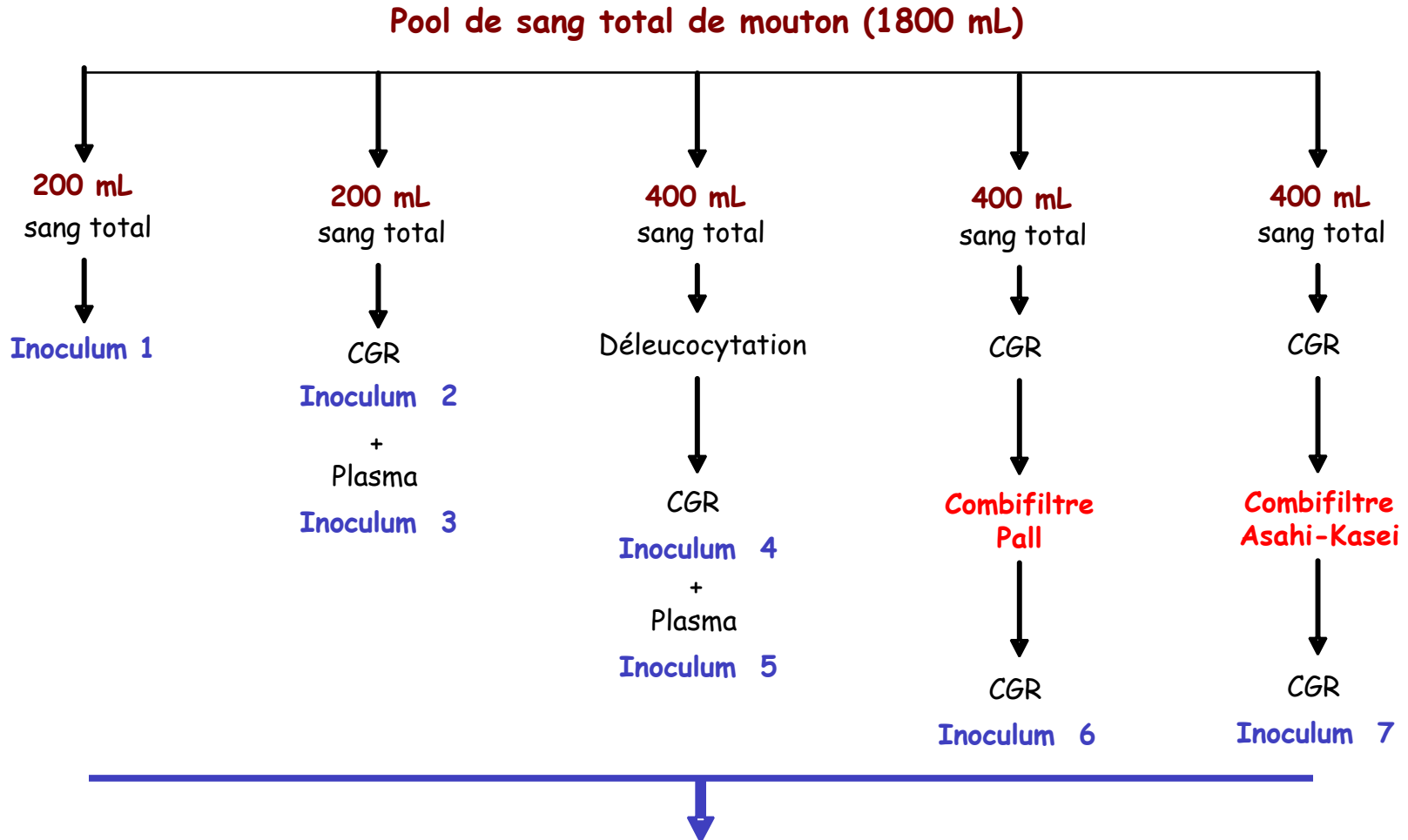


- complètement caractérisé par une gamme étalon
- similitude de taille et de pathologie avec l'homme

R&D : rétention / inactivation du prion (1)

Projet *Blood Infectivity Removal*

✦ Méthodes : préparation des inoculums



Administration de chaque inoculum à des moutons sains et suivi régulier par biopsie + BIOASSAY

Conclusions

- Décroissance de l'épizootie ESB
- Déclin du nombre de cas incidents
- Sujets Met/Val et Val/Val: seconde vague épidémique retardée?
- Taille du réservoir de porteurs vMCJ asymptomatiques?
- Etendue de l'épidémie chez les donneurs de sang et chez les transfusés?
Test diagnostique nécessaire