HAL
open science

Nouveaux développements moléculaires et technologiques pour le diagnostic des maladies à prions du vivant du patient

Isabelle Quadrio

To cite this version:

Isabelle Quadrio. Nouveaux développements moléculaires et technologiques pour le diagnostic des maladies à prions du vivant du patient. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00363243

HAL Id: tel-00363243

https://theses.hal.science/tel-00363243v1

Submitted on 20 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° 292-2008 Année 2008

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité NEUROSCIENCES MEDICALES

présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2008
par

Mlle Isabelle QUADRIO

Nouveaux développements moléculaires et technologiques pour le diagnostic des maladies à prions du vivant du patient

Directeur de thèse : Hervé PERRON
Co-Directeur : Armand PERRET-LIAUDET

JURY

Rapporteurs : Thierry BARON
Jean-Michel VERDIER
Examinateurs : Jacques BIENVENU
Pierre KROLAK SALMON
Jean-Marie SEIGNEURIN

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE
Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES
Composantes

UFR de Physique	Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur G. CLERC
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

A M. le **Docteur Hervé Perron**, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Par ton intermédiaire, j'ai découvert un petit bout du monde de l'industrie… Malgré les « aléas » de la stratégie d'entreprise, grâce à ta ténacité, ce projet a pu tout de même aboutir et je t'en remercie sincèrement. Je souhaite que l'on puisse continuer à collaborer sur d'autres projets.

A M. le **Docteur Armand Perret-Liaudet**. Tu as été à l'initiative de ce projet et nous voilà enfin arrivés à la concrétisation de ces années de travail, qui paraissaient sans fin ! Malgré des moments un peu chaotiques et des baisses de régime, l'objectif nous semblait tellement lointain et un peu inaccessible, et finalement… Je te remercie particulièrement pour la confiance et le soutien que tu m'as toujours accordé, ainsi qu'une grande liberté dans mon travail. Et parce que tes qualités ne se limitent pas à ton enthousiasme pour les nouveaux projets (!), reçois ici le témoignage de ma plus sincère amitié.

A M. le **Docteur Thierry Baron** et M. le **Professeur Jean-Michel Verdier**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Les discussions que j'ai pu avoir avec vous ont toujours été très enrichissantes, je souhaite vivement que cela continue. Merci d'avoir si aimablement accepté de juger ce travail. Recevez ici le témoignage de ma profonde considération.

A M. le **Professeur Jacques Bienvenu**, M. le **Professeur Jean-Marie Seigneurin** et M. le Docteur **Pierre Krolak-Salmon,** pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez croire à ma plus grande estime.

Un mot particulier à M. le **Professeur Daniel Hartmann**, pour avoir accepté la collaboration et la thématique dans votre laboratoire « Biomatériaux et remodelage matriciel ». Le lien n'était pas évident, merci de l'avoir fait !

A l'équipe du service de Neurobiologie : Françoise, Elisabeth, Corinne, Sylvie et bien sûr particulièrement Séverine, sans qui une bonne partie de ce travail n'aurait tout simplement pas été possible : un grand merci ! Je voudrais remercier aussi tout ceux qui ont été de passage, car vous m'avez tous supportée (dans tous les sens du terme) et avez assisté aux moments de doute, comme aux moments de joie. Merci de votre soutien constant, de votre gentillesse et de votre attention à mon égard. Un petit mot particulier pour Jérémie et surtout Aline… l'échéance approche… tenez bon, ça vaut le coup ! Merci aussi aux internes et aux étudiants du service, qui font partie intégrante de sa richesse humaine, et on sait que ça compte !

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements au Pr Bernard Renaud, pour m'avoir toujours encouragée à finaliser ce travail, surtout grâce à une de ses phrases préférées : « c'est pour quand déjà, cette thèse ? ». Je te souhaite un prompt rétablissement et un rapide retour parmi nous!

Une petite pensée aussi pour Catherine L qui a partagé au plus près les affres de la rédaction, colocation de bureau oblige… Je sais que je n'ai pas été tous les jours très disponible, et sans doute pas facile… et maintenant, on va pouvoir le décorer, ce bureau !!!

A toute l'équipe du PTPP : Régine bien sûr, et les « 4 réfs » Catherine, Anne-Marie, Nadia et Marina (ne cherchez pas d'ordre…), et aussi Arlette, « parenthèse » pour moi si particulière mais qui en valait vraiment la peine. Depuis la préparation jusqu'à l'ouverture du Plateau, on a vécu de grands moments, de nombreuses crises de rires, des blagues, et aussi pas mal de stress et de fatigue, jusqu'à la grande devise…« Anticipation, Organisation, Optimisation »… Qui aurait imaginé, avant tout ça, que le « mix » marcherait aussi bien ??? J'espère avoir été digne de votre confiance, et suis très fière d'avoir partagé cette aventure avec vous.

A tous mes collègues du CR de Biochimie du CBPE, et notamment le Pr Robert Rousson pour m'avoir toujours encouragée pour la réalisation de cette thèse. Merci de votre bonne humeur à tous, de l'hospitalité du « bar » du 4è et aussi parce qu'on en a tellement parlé, de cette thèse, et qu'enfin la voilà !

A mes parents et mes frères, cette fois, je crois bien que c'est la fin des études…

A tous mes proches et à tous mes amis

Liste des publications présentées dans ce travail

Favereaux, A. **Quadrio, I.** Perret-Liaudet, A. Vital, C. Ouallet, J. C. Brochet, B. Biacabe, A. G. Petry, K. G. Kopp, N. Vital, A.

Prion protein accumulation involving the peripheral nervous system in a sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease

Neuropathol Appl Neurobiol, 2003, Dec; 29(6):602-5.

Favereaux, A. **Quadrio, I**. Vital, C. Perret-Liaudet, A. Anne, O. Laplanche, J. L. Petry, K. G. Vital, A.

Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

Arch Neurol, 2004 May; 61(5):747-50

Isabelle Quadrio, Séverine Ugnon-Café, Maryline Dupin, Guillaume Esposito, Nathalie Streichenberger, Pierre Krolak-Salmon, Anne Vital, Jean-François Pellissier, Armand Perret-Liaudet and Hervé Perron.

Rapid diagnosis of human prion disease using streptomycin in tonsil and brain tissues.

Laboratory Investigation, in press

Table des matières

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 6

1. NATURE DE L'AGENT PATHOGENE **7**

1.1 DU VIRUS LENT AU CONCEPT DE LA PROTEINE INFECTIEUSE 7

1.2 LA PROTEINE PRION 8

1.2.1 Le gène PRNP *8*

1.2.2 Structure et propriétés de la PrPc *9*

1.2.3 La protéine prion pathologique (PrPsc) *11*

1.2.4 Phénomènes de souche et de barrière d'espèce *11*

1.3 LOCALISATION DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE 13

1.3.1 Répartition tissulaire *13*

1.3.2 Les liquides biologiques *14*

2. LES EST HUMAINES **16**

2.1 LES FORMES SPORADIQUES 16

2.2 LES FORMES GENETIQUES 17

2.3 LES FORMES ACQUISES 19

2.3.1 Le kuru *19*

2.3.2 Les formes iatrogènes de MCJ *19*

2.3.3 Le variant de la MCJ (vMCJ) *20*

3. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MALADIES A PRIONS **21**

3.1 DEMARCHE DIAGNOSTIQUE 21

3.2 DIAGNOSTIC PRE-MORTEM : LES CRITERES PARACLINIQUES ET BIOLOGIQUES 22

3.2.1 L'électroencéphalogramme (EEG) *22*

3.2.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM) *23*

3.3 DIAGNOSTIC PRE-MORTEM : LES MARQUEURS BIOLOGIQUES 24

3.3.1 Les protéines 14.3.3 ..... *24*

3.3.2 Les protéines Tau totales et les formes phosphorylées *28*

3.3.3 Les autres marqueurs biologiques du LCR *30*

3.3.4 Anomalies génétiques et polymorphisme du codon 129 ..... *31*

3.4 LE DIAGNOSTIC DE CERTITUDE : MISE EN EVIDENCE DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE DANS LE TISSU CEREBRAL 32

3.4.1 L'examen neuropathologique : histologie et immunohistochimie (IHC) *32*

3.4.2 Le diagnostic immuno-biochimique *33*

3.4.3 Application de la détection immuno-biochimique au typage moléculaire de la PrPres *34*

3.5 STRATEGIES D'AMELIORATION POUR DETECTER LA PROTEINE PRION HORS TISSU CEREBRAL 37

3.5.1 Interactions avec des ligands spécifiques *37*

3.5.2 Alternatives au traitement par la protéinase K *38*

3.5.3 Amplification in vitro de la PrPsc *40*
3.5.4 Amplification du signal *42*
3.5.5 Détection dans les tissus périphériques et les liquides biologiques *43*

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 45

PREMIERE PARTIE 47
PERFORMANCE DIAGNOSTIQUE DE LA PROTEINE 14.3.3 DANS LE LCR : 47
BILAN DE L'EXPERIENCE DE NOTRE LABORATOIRE (1997 – 2008) ET INTERET DE L'ASSOCIATION DE L'ALDOLASE ET LA NEOPTERINE 47

1. PATIENTS ET METHODOLOGIE **48**

1.1 COHORTE DES PATIENTS RETENUS POUR L'ETUDE 48
1.2 METHODES D'ANALYSES DES DIFFERENTS PARAMETRES BIOLOGIQUES ETUDIES 48
1.3 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES 50

2. RESULTATS **50**

2.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA POPULATION ETUDIEE 50
2.2 BILAN BIOCHIMIQUE DU LCR NON SPECIFIQUE DES EST 51
2.3 PROTEINE 14.3.3 : CRITERES ANALYTIQUES EN FONCTION DES GROUPES DE POPULATION 52
2.3.1 Spécificité et sensibilité pour la population globale *52*
2.3.2 Spécificité et sensibilité pour le sous-groupe MCJ sporadique *54*
2.3.3 Sensibilité pour les autres sous-groupes d'EST *56*
2.3.4 Evolution de la sensibilité et de la spécificité lors de ponctions répétées *56*
2.4 BILAN DE L'APPORT DES DOSAGES D'ALDOLASE ET DE LA NEOPTERINE 58
2.4.1 Apport de la néoptérine sur la spécificité de la protéine 14.3.3 ..... *59*
2.4.2 Apport de l'aldolase sur la sensibilité de la protéine 14.3.3 ..... *62*

3. DISCUSSION **64**

4. CONCLUSION **68**

DEUXIEME PARTIE 69
DETECTION DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE DANS LES NERFS PERIPHERIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE MCJ SPORADIQUE 69

TROISIEME PARTIE 80
VALIDATION D'UN OUTIL ORIGINAL DE PRECIPITATION DE LA PRPSC POUR L'AMELIORATION DIAGNOSTIQUE DU VIVANT DU PATIENT 80

RESULTATS ET DISCUSSIONS 104

1. EVALUATION DES MARQUEURS BIOLOGIQUES UTILISES POUR LE DIAGNOSTIC DU VIVANT DU PATIENT **105**

1.1 SENSIBILITE DE LA PROTEINE 14.3.3 EN DEBUT D'EVOLUTION CLINIQUE 105
1.2 SPECIFICITE DE LA RECHERCHE DE LA PROTEINE 14.3.3 EN DEBUT D'EVOLUTION CLINIQUE 108
1.3 APPORT DE LA SECONDE PONCTION DE LCR SUR LA SENSIBILITE ET LA SPECIFICITE 110
1.4 APPORTS DE L'ALDOLASE ET DE LA NEOPTERINE 111
1.5 CONCLUSION 112

2. DETECTION DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE DANS LES NERFS PERIPHERIQUES **114**

2.1 MISE EN EVIDENCE DE LA RESISTANCE PARTIELLE A LA PK D'UNE FORME DE PRP PRESENTE DANS LE NERF PERONIER D'UN CAS SMCJ 114
2.2 MISE EN EVIDENCE DE LA PRPRES DANS LE NERF PERIPHERIQUE SUPERFICIEL D'UN CAS SMCJ 115
2.3 DISCUSSION 115
2.4 CONCLUSION 120

3. UTILISATION DE LA STREPTOMYCINE POUR LE DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DES MALADIES A PRIONS HUMAINES **122**

3.1 PRECIPITATION DE LA PRPRES HUMAINE PAR LA STREPTOMYCINE 122
3.2 UTILISATION DE LA STREPTOMYCINE DANS D'AUTRES TISSUS QUE LE SNC 123
3.3 DISCUSSION 124
3.4 CONCLUSION 126

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 127

ANNEXES 131

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 190

Liste des figures

FIGURE 1 : PRINCIPALES ANOMALIES PATHOGENES PORTEES PAR LE GENE PRNP. 9
FIGURE 2 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA PRPC (A) ET MODELE PROPOSE POUR LA PRPSC (B)..... 10
FIGURE 3 : TYPAGE MOLECULAIRE DE LA PRPRES PAR WESTERN BLOT (ANTICORPS 3F4). 35
FIGURE 4 : REPARTITION DE LA PROTEINORACHIE (A) ET DE LA NUMERATION LEUCOCYTAIRE (B) DANS LE LCR ENTRE LE GROUPE ATTEINT D'EST ET LE GROUPE TEMOIN..... 52
FIGURE 5 : REPARTITION DES DOSAGES D'ALDOLASE (A) ET DE NEOPTERINE (B ET C) ENTRE LE GROUPE ATTEINT D'EST ET LE GROUPE TEMOIN (C : AGRANDISSEMENT DE LA ZONE 0 – 25 NM POUR LA NEOPTERINE)..... 59
FIGURE 6 : COURBES ROC POUR L'ALDOLASE. 62
FIGURE 7: REPARTITION DE L'ALDOLASE EN FONCTION DE LA COMBINAISON DU POLYMORPHISME DU CODON 129 ET DU TYPE DE PRPRES (A) OU DU TYPE DE LA PRPRES UNIQUEMENT (B) 63

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET NEUROPATHOLOGIQUES DES FORMES GENETIQUES D'EST LES PLUS FREQUENTES. 18
TABLEAU 2 : COMPARAISON DES SENSIBILITES OBSERVEES POUR LA PROTEINE 14.3.3 DANS DIFFERENTES ETUDES REGROUPANT DES CAS SPORADIQUES DE MCJ (MISE EN EVIDENCE PAR WESTERN-BLOT). 26
TABLEAU 3 : REPARTITION DU POLYMORPHISME DU CODON 129 DANS DIFFERENTES POPULATIONS..... 32
TABLEAU 4 : CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES ET PHENOTYPES CLINICO-PATHOLOGIQUES DES CAS SPORADIQUES DE MCJ SELON PARCHI ET AL (PARCHI *ET AL* 1996)..... 36
TABLEAU 5 : DONNEES BIOLOGIQUES DISPONIBLES POUR LES CAS RETENUS DANS L'ETUDE. 50
TABLEAU 6 : RESULTATS DE LA MISE EN EVIDENCE DE LA PROTEINE 14.3.3 SUR LA PREMIERE PONCTION DE LCR POUR L'ENSEMBLE DE LA POPULATION ETUDIEE. 53
TABLEAU 7 : SENSIBILITE DE LA MISE EN EVIDENCE DE LA PROTEINE 14.3.3 DANS LE LCR POUR LES PATIENTS SMCJ EN FONCTION DU TYPAGE MOLECULAIRE DE LA PRPRES ET DU POLYMORPHISME DU CODON 129. 55
TABLEAU 8 : CINETIQUE DE LA MISE EN EVIDENCE DE LA PROTEINE 14.3.3 LORS DE PONCTIONS REPETEES AU COURS DE L'EVOLUTION DE LA MALADIE..... 57
TABLEAU 9 : VARIATION DES EFFECTIFS ET DES CRITERES ANALYTIQUES DE LA PROTEINE 14.3.3 APRES LA PREMIERE PONCTION EN FONCTION DU SEUIL DE NEOPTERINE..... 61

Liste des abréviations

AVC :	accident vasculaire cérébral
EEG :	électroencéphalogramme
ESB :	encéphalopathie spongiforme bovine
EST :	encéphalopathie spongiforme transmissible
FN :	faux négatifs
FP :	faux positifs
gMCJ:	MCJ génétique
GSS :	Gerstamnn-Sträussler-Scheinker
IFF :	insomnie familiale fatale
IHC :	immunohistochimie
IRM :	imagerie par résonance magnétique
kDa :	kilo Dalton
LCR :	liquide céphalo-rachidien
M :	méthionine
MCJ :	maladie de Creutzfeldt-Jakob
PCR :	polymerase chain reaction
PK :	protéinase K
PRNP :	gène de la protéine prion
PrP :	protéine prion
PrPc :	protéine prion cellulaire
PrPres :	protéine prion résistante à l'action de la PK
PrPsc :	protéine prion pathologique
ROC :	receiver operating characteristic
sMCJ :	MCJ sporadique ;
SNC :	système nerveux central
SNP :	système nerveux périphérique
V:	valine
vMCJ :	variant de la MCJ
VN :	vrais négatifs
VP :	vrais positifs
VPN :	valeur prédictive négative
VPP :	valeur prédictive positive

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST), ou maladies à prions, sont des maladies neurodégénératives rares d'issues fatales, touchant à la fois l'homme et l'animal. Chez l'animal, elles comprennent principalement la tremblante du mouton (« scrapie ») et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Elles regroupent chez l'homme la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insomnie familiale fatale (IFF) et le kuru. On les classe habituellement en trois groupes étiologiques : les formes sporadiques, génétiques et acquises. Toutes ont en commun d'être transmissibles entre individus ou aux animaux de laboratoire, de présenter une longue période d'incubation asymptomatique, d'être caractérisées par des atteintes neuropathologiques et par l'accumulation d'une protéine anormale principalement dans le système nerveux central.

1. NATURE DE L'AGENT PATHOGENE

1.1 Du virus lent au concept de la protéine infectieuse

Plusieurs hypothèses successives ont été évoquées au cours du temps pour expliquer la nature de l'agent infectieux responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST).

La transmissibilité de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) a été proposée suite à l'étude de la maladie du Kuru parmi les membres de la tribu des Fore en Papouasie Nouvelle Guinée dès les années 1950 (Gajdusek & Zigas, 1957). Cette hypothèse a été confirmée par des études de transmission intracérébrale à des chimpanzés dès 1966 (Gajdusek et al, 1966). Les similitudes neuropathologiques existantes entre le Kuru et la tremblante des petits ruminants ont amené à penser qu'elles étaient peut être dues au même agent pathogène. Du fait de l'incubation particulièrement longue, l'hypothèse d'un « virus lent » a été proposée. Cependant, les estimations sur la taille de l'agent infectieux (environ 20kDa) et l'inefficacité des traitements habituels de destruction des acides nucléiques (rayonnements ionisants, UV) mettaient en doute cette hypothèse (Alper et al, 1967; Alper et al, 1966) . L'absence d'observation de particules virales ainsi que les propriétés de résistance très particulières aux agents classiques de décontamination ont induit la notion d'agent transmissible non conventionnel (ATNC) pour caractériser l'agent infectieux. Pour répondre à la fois aux critères de résistance et de taille, le concept de « virino » a été proposé. Il s'agit d'une enveloppe protéique entourant un petit fragment d'acide nucléique (Kimberlin, 1982).

Récemment, il a été mis en évidence dans des cultures de cellule infectées par une souche de tremblante des particules « virus like » de petite taille (25 nm) pouvant contenter cette hypothèse (Manuelidis et al, 2007).

Au début des années 1980, des tentatives de purification de l'agent infectieux et les études de transmission de la tremblante du mouton au hamster aboutissent à l'isolement de fractions contenant essentiellement des protéines (Bolton et al, 1982; Prusiner et al, 1981). Cette fraction, qui s'accumule de façon proportionnelle au titre infectieux, est alors nommée prion pour « protéine infectieuse » et correspond pour l'auteur à l'agent pathogène (Prusiner, 1982). C'est l'hypothèse de la « protein only ». Seuls les procédés qui dénaturent les protéines semblent efficaces pour réduire le titre infectieux, ceux capables de détruire les acides nucléiques sont en revanche sans effet (Prusiner, 1998). Par la suite, le prion est identifié comme étant une protéine de l'hôte, présente non seulement dans le cerveau des animaux malades, mais aussi chez les animaux sains (Chesebro et al, 1985). Cette protéine prion, ou PrP, codée par un gène unique, est présente sous deux conformations alternatives : la forme cellulaire normale ou PrPc et la forme pathologique ou PrPsc (Basler et al, 1986). Les animaux dépourvus de PrPc, souris knock-out pour le gène *prnp,* codant pour la protéine prion de souris, ne sont pas sensibles à l'infection contrairement aux animaux sauvages (Bueler et al, 1993). La PrP apparaît clairement comme un élément central et incontournable des EST. La reproduction du caractère infectieux *in vitro* semble une étape déterminante pour valider l'hypothèse de la protéine infectieuse. Si l'amplification *in vitro* de PrPsc de différentes espèces a d'ors et déjà été réalisée à l'heure actuelle, l'origine biologique des composants nécessaires à l'initiation des processus rend la démonstration incomplète (Castilla et al, 2005a; Kocisko et al, 1994).

1.2 La protéine prion

1.2.1 Le gène *PRNP*

Le gène *PRNP* est situé chez l'homme sur le bras court du chromosome 20 (Oesch et al, 1985). Sa séquence est très conservée entre les mammifères, jusqu'à 80% d'homologie, et ce notamment entre le bovin et l'homme (Lopez Garcia et al, 2000). Elle comporte deux exons, mais l'ensemble de la partie codante se situe dans le deuxième. Il n'existe qu'une seule copie dans le génome humain.

Plus de quarante anomalies peuvent être à l'origine d'une forme génétique chez l'homme. La symptomatologie varie en fonction de l'anomalie, entraînant par exemple une MCJ s'il s'agit d'une mutation E200K, V210I, V203I, un syndrome de GSS en cas de mutations P102L, P105L ou d'insertions répétées de séquences d'octapeptides (Figure 1) (Glatzel et al, 2005). La transmission est autosomique mais semble inconstante, quelles ques soient les mutations. Très souvent, il n'y a pas d'histoire familiale initiale mais la transmission est ensuite réelle (Dagvadorj et al, 2002; Kovacs et al, 2005b).

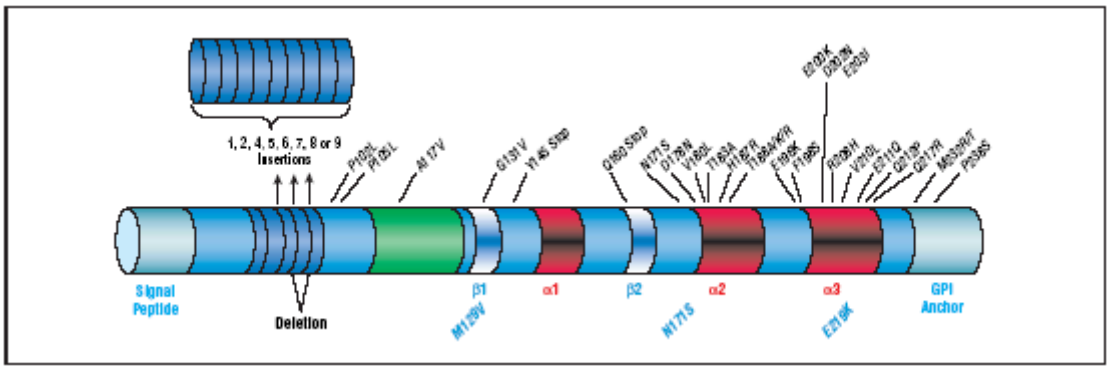


Figure 1 : Principales anomalies pathogènes portées par le gène PRNP.

Les principaux polymorphismes sont signalés en bleu, les mutations en noir, en vert la région très conservée et en rouge les hélices alpha. D'après Glatzel *et al* 2005

Le polymorphisme méthionine (M) / valine (V) porté par le codon 129 est un élément critique pour le développement et l'expression des EST. La population caucasienne est majoritairement MV (50% MV, 39% MM et 11% VV), alors que le génotype MM est surreprésenté dans les populations atteintes de MCJ : 66% MM, 17% MV et 17% VV (Alperovitch et al, 1999; Collins et al, 2006).

1.2.2 Structure et propriétés de la PrPc

La PrPc est une glycoprotéine de 254 acides aminés chez l'homme. Elle est ubiquitaire et exprimée majoritairement au niveau du système nerveux central au niveau des neurones et des connexions cellulaires, mais aussi des muscle squelettiques, les reins, le cœur, les organes lymphoïdes secondaires, les cellules sanguines (leucocytes et plaquettes essentiellement) (Harris, 1999; Martins et al, 2002). Elle comprend un peptide signal N-terminal (positions 1 - 23), clivé lors de la biosynthèse et un peptide C-terminal (positions 231 – 254) remplacé lors de la maturation par un groupe phosphatidylinositol (GPI) en position 230. Il lui permet un ancrage sur la face externe des membranes cellulaires. On trouve aussi du côté N-terminal une

séquence contenant une répétition d'octapeptides suivie d'un domaine hydrophobe. Un pont disulfure peut se former entre les cystéines en position 179 et 214. Deux sites de glycosylation sont présents sur les asparagines en position 181 et 197. La protéine peut donc exister sous forme non glycosylée, monoglycosylée ou diglycosylée (Cervia et al, 2006).

Sa demi-vie est de cinq heures, son internalisation est réalisée dans des endocytes puis clivée au niveau des acides aminés 112 ou 113 (Linden et al, 2008). La concentration extra cellulaire en cuivre semble jouer un rôle majeur dans l'internalisation de la PrP. Sur des cultures de neurones, une augmentation de cette concentration entraînant une diminution de l'expression de la PrPc à la surface membranaire (Toni et al, 2005). L'étude par résonance magnétique nucléaire indique que la PrPc est de type globulaire, avec trois hélices α dont deux sont liées par le pont disulfure, deux petits feuillets β et un segment N-terminal flexible (Baldwin et al, 1995) (Figure 2A).

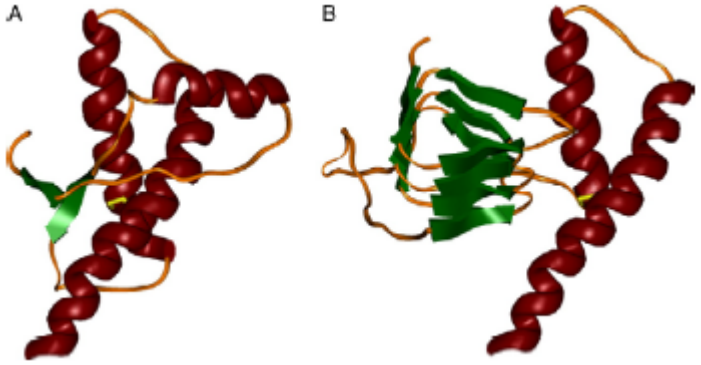


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la PrPc (A) et modèle proposé pour la PrPsc (B). D'après Cervia *et al* 2006.

Les fonctions de la PrPc sont paradoxalement encore peu connues, bien qu'il semble acquis qu'elle intervienne dans de très nombreux processus.

La génération de souris transgéniques n'exprimant pas la PrP a montré que les souris se développaient normalement en l'absence de la protéine (Bueler et al, 1992). Ces résultats sont surprenants eu égard à la conservation de la protéine entre les espèces laissant envisager une fonction majeure liée à son expression. L'idée d'une redondance de la fonction de la PrP a été avancée pour expliquer ce phénomène. D'autres souris knock-out pour le gène *PRNP* ont montré l'implication de la PrP dans la régulation du sommeil et le cycle circadien, dans

l'homéostasie du cuivre ainsi que dans les processus d'apprentissages (Brown et al, 1997; Criado et al, 2005; Tobler et al, 1996). Cette liaison au cuivre lui conférerait une activité anti-oxydante et induirait des modifications dans sa structure N-terminale (Leclerc et al, 2006; Milhavet & Lehmann, 2002). Sa localisation membranaire implique de probable fonctions de transduction du signal et d'adhésion cellulaire. Son rôle semble prépondérant dans la différenciation neuronale, la neuroprotection et la survie neuronale via des fonctions anti-apoptose (Watts & Westaway, 2007).

1.2.3 La protéine prion pathologique (PrPsc)

Cette protéine a été isolée initialement dans des extraits de cerveau de moutons atteints de tremblante. Sa structure primaire est strictement identique à celle de la PrPc. En revanche, elle présente des caractéristiques physicochimiques différentes notamment une insolubilité en milieu détergent ainsi qu'une résistance partielle à l'action protéolytique de la Protéinase K (PK) (Meyer et al, 1986). Ces propriétés semblent directement liées aux modifications des structures secondaires et tertiaires, et plus particulièrement à l'augmentation de la proportion de feuillets β-plissés. La PrPsc acquièrerait ainsi des propriétés amyloïdes, une tendance naturelle à former des agrégats et des fibrilles et une grande stabilité thermodynamique. Après digestion partielle par la PK, la forme résistante de la PrPsc, ou PrPres, présente une plus grande proportion de feuillets β-plissés (Pan et al, 1993). Une représentation tridimensionnelle est proposée Figure 2B.

La conversion de la PrPc en PrPsc est un évènement central dans la théorie de la « protein only ». Plusieurs modèles de conversion de la PrPc en PrPsc ont été proposés, basés sur la formation initiale d'un hétérodimère [PrPc – PrPsc] se répliquant ensuite de proche en proche (Caughey & Baron, 2006). Néanmoins, l'évènement déclencheur de ce phénomène reste une question cruciale et à l'heure actuelle mal expliquée de cette hypothèse.

1.2.4 Phénomènes de souche et de barrière d'espèce

L'existence de différents phénotypes cliniques laisse supposer qu'il existe des variants de l'agent pathogène. Par analogie avec les autres maladies transmissibles, la notion de « souches » a été introduite. Mais contrairement à la définition classique d'une souche microbiologique, elle ne peut dans le contexte des EST être définie par un variant génétique

de l'agent pathogène. Il a donc été proposé de relier la notion de souche à la diversité des conformations et / ou des types d'agrégations de la PrPsc (Bartz et al, 2000; Safar et al, 1998; Telling et al, 1996). A partir d'études de transmission chez l'animal, la caractérisation de la souche est fonction de la durée d'incubation de la maladie, du profil lésionnel (intensité et localisation anatomique) et des manifestations cliniques (Bruce, 2003). La notion de souche est donc définie comme un ensemble de caractéristiques induites par un extrait infectieux chez le rongeur. Ces caractéristiques sont stables et reproductibles au sein d'une même espèce après plusieurs passages. La transmission chez les rongeurs constitue la méthode de référence de typage des souches. C'est avec cette méthodologie, entre autres, que les liens entre vMCJ et ESB ont été établis (Bruce et al, 1997).

Les différentes souches présentent aussi des caractéristiques biochimiques spécifiques : mobilité électrophorétique et ratio de glycosylation des trois formes de PrPres, résistance aux agents dénaturants, affinité pour les ions métalliques… (Parchi et al, 1996; Safar et al, 1998; Wadsworth et al, 1999).

La transmission d'une souche d'une espèce à une autre est conditionnée par la barrière d'espèce. Cette barrière d'espèce est définie par une transmission incomplète avec un délai d'incubation supérieur à celui de la maladie originelle et qui varie d'un individu à l'autre lors de la première inoculation inter-espèce. Puis ces caractères se stabilisent au cours des passages successifs, témoignant d'une adaptation de la souche à l'hôte (Bruce, 2003). Dans la mesure où la transmission est malgré tout effective, le terme plus général de « barrière de transmission » a été proposé pour définir plus exactement le phénomène d'adaptation d'une souche à un hôte d'une autre espèce (Hill & Collinge, 2003a).

La barrière d'espèce est largement conditionnée par plusieurs facteurs, dont l'homologie de la structure primaire de la PrP entre l'hôte et le receveur, le nombre de glycosylation et la structure tridimensionnelle de ces protéines (Castilla et al, 2005a; Lawson et al, 2005; Lawson et al, 2004; Priola et al, 2001; Priola & Lawson, 2001). La stratégie principale dans l'étude des souches, pour s'affranchir de cette barrière, a été le développement de souris génétiquement modifiées pour exprimer la PrP d'une autre espèce (Baron, 2002; Hill & Collinge, 2003b; Scott et al, 2005; Telling et al, 1994).

Une étude récente sur un modèle animal original, le campagnol (*Clethrionomys glareolus*), a précisé le rôle de l'homologie des PrP donneur / receveur dans la résistance à la transmission. En effet, la PrP humaine présente le même degré d'homologie global pour la PrP du campagnol et pour celle de la souris utilisée dans l'étude. Pourtant, le campagnol est très sensible aux souches humaines testées (sporadiques et génétiques) et ne semble donc pas présenter de barrière d'espèce vis-à-vis de ces souches humaines, contrairement aux souris (Nonno et al, 2006). Une des hypothèses expliquant la facilitation de la transmission pourrait être la présence homologue d'une méthionine au codon 109 sur la séquence de l'homme et sur celle du campagnol, mais absente chez la souris. Du fait de cette absence de barrière d'espèces, ce modèle est très prometteur car non soumis aux limites liées aux modifications génétiques des souris.

1.3 Localisation de la protéine prion pathologique

1.3.1 Répartition tissulaire

Les EST sont des maladies qui touchent le système nerveux central. Néanmoins, de nombreuses études ont montré la présence de PrPsc ou le caractère infectieux de très nombreux autres tissus. Chez l'animal et pour des maladies naturelles ou expérimentales, l'accumulation de PrPsc a notamment été mise en évidence dans le tissu musculaire, la langue, les nerfs périphériques, la peau (Andreoletti et al, 2004; Bosque et al, 2002; McBride et al, 2001; Mulcahy et al, 2004; Thomzig et al, 2004; Thomzig et al, 2007). La distribution de la PrPsc a été étudiée sur un modèle de primate non humain après administration de souches humaines (formes variant (vMCJ), sporadique (sMCJ) et iatrogénique (iMCJ) de la MCJ). Les auteurs ont retrouvé des traces de PrPsc au niveau des organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions) surtout dans le cas de l'inoculation d'extrait de vMCJ, mais aussi au niveau des plaques de Peyer, du pancréas, des muscles, des nerfs périphériques pour tous les types d'inoculas (Herzog et al, 2005). La quantité présente au niveau périphérique est très dépendante du type d'inoculation et de la dose, mais est constamment plus faible qu'au niveau central. Elle peut être estimée entre 0.02% et 10% selon les tissus (Herzog et al, 2004).

Pour les EST humaines, la PrPsc est détectable aussi dans de très nombreux tissus hors système nerveux central. Dans le cas des patients atteints de vMCJ, la présence de PrPsc a été objectivée dans les tissus lymphoïdes tels que la rate, les amygdales, les ganglions

lymphoïdes, l'appendice, mais aussi le système nerveux périphérique, les yeux, le rectum (Haik et al, 2003; Hill et al, 1999; Hilton et al, 2004; Wadsworth et al, 2001). Dans les formes sporadiques, la trop faible sensibilité des techniques initialement publiées ne permettait pas de détecter de PrPsc. Dans les études récentes, cette détection a été possible dans différents tissus tels que la rate, les muscles squelettiques, la rétine et le nerf optique, l'épithélium olfactif, les nerfs périphériques (Favereaux et al, 2004; Glatzel et al, 2003; Head et al, 2003; Tabaton et al, 2004; Zanusso et al, 2003). Dans une étude sur un petit nombre de cas, la PrPsc a aussi été mise en évidence au niveau des nerfs périphériques d'un cas iatrogène consécutif à une greffe de dure-mère (Ishida et al, 2005).

1.3.2 Les liquides biologiques

Très peu d'études ont été réalisées concernant la détection de PrPsc dans le liquide céphalorachidien. Par une technique de microscopie confocale, un signal spécifique a été détecté dans le LCR pour environ 20 % des patients atteints de sMCJ et pour aucun des témoins (Bieschke et al, 2000). Dans une autre étude, sur une faible cohorte de 18 patients atteints de MCJ et 12 patients contrôles, il n'a pas été mis en évidence de différence de profil par Western Blot entre les deux populations (Wong et al, 2001). La conformation des protéines présentes dans les deux types de populations étudiées semble très similaire et toutes deux sont très sensibles à la PK. Dans le LCR de moutons atteints de tremblante, une faible différence de sensibilité de la PrP vis-à-vis de la PK a été observée (Picard-Hagen et al, 2006). Cependant, le profil obtenu n'est pas caractéristique de la PrPres et ne diffère pas de celui des animaux sains. Récemment, une équipe est parvenue à mettre en évidence de la PrPsc dans le LCR de hamsters cliniquement atteints grâce à une technique d'amplification très poussée (Atarashi et al, 2007). La sensibilité des techniques actuelles apparaît alors comme insuffisante pour permettre la détection de la PrPsc dans ce type de liquide.

La présence de PrPsc a été pour la première fois rapportée dans les urines de patients atteints de MCJ en 2001. Il s'agissait d'échantillons de patients atteints de forme génétique de MCJ ainsi que des animaux atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et d'EST expérimentales (Shaked et al, 2001). La protéine retrouvée présente un profil électrophorétique particulier, à une seule bande située au niveau de la forme non glycosylée du témoin cérébral. La spécificité de cette détection a ensuite été remise en question par deux études. Dans la première, la protéine précédemment identifiée n'est pas retrouvée dans les

échantillons urinaires de patients atteints de MCJ, par contre une protéine membranaire bactérienne de même masse moléculaire apparente est caractérisée à la fois dans les échantillons négatifs et positifs (Furukawa et al, 2004). Dans la seconde, les auteurs ont mis en évidence une chaîne légère d'immunoglobulines uniquement dans les urines des hamsters malades (Serban et al, 2004). La sécrétion de prion dans les urines semble étroitement liée à l'état inflammatoire rénal. En effet, dans un modèle de souris exprimant une néphrite glomérulaire, l'inoculation d'urines sécrétée par ces mêmes souris après inoculation d'une souche de tremblante du mouton, a induit le développement de la maladie chez les receveuses et a favorisé la sécrétion de prion dans leurs urines (Seeger et al, 2005). Néanmoins, une étude récente confirme ce caractère infectieux des urines de hamster cliniquement malades après inoculation intracérébrale mais indépendamment du statut inflammatoire (Gregori et al, 2008). Le caractère infectieux de l'urine de hamsters atteints de scrapie a aussi été démontré après inoculation intrapéritonéale (IP) et administration orale (dilution de l'urine dans l'eau de boisson des animaux) (Kariv-Inbal et al, 2006). En deuxième passage, l'inoculation d'homogénat de cerveau d'animaux asymptomatiques ayant reçu par voie IP ou orale de l'urine contaminée a entraîné tardivement le développement de la maladie (245 jours post infection versus 85 jours habituellement). La dose infectieuse présente dans ces urines serait donc bien plus faible que dans le tissu cérébral. De plus, la PrPsc a été mise en évidence dans 80% des urines de hamsters inoculés IP par une souche de scrapie (263K) grâce à une technique d'amplification très sensible (Gonzalez-Romero et al, 2008). Ces urines se sont avérées être infectieuses pour les hamsters. La dose infectieuse est évaluée par les auteurs à environ 10 milliards de fois moindre que le tissu cérébral (10^{10}) correspondant environ à 0,5 – 5 fg de PrPsc par millilitre d'urine, ce qui représenterait selon la méthode de calcul dans cette étude seulement 10 fois moins que la dose infectieuse dans le sang.

Plusieurs études chez l'animal ont montré le caractère infectieux du sang ou de ses composants après inoculation par voies intracérébrale, intrapéritonéale ou intraveineuse d'échantillons d'origine humaines ou animales (MCJ, ESB, tremblante) (Zou et al, 2008). La fraction du sang la plus infectieuse correspondrait aux leucocytes, même si le plasma semble tout de même présenter un très faible risque (Brown, 2007).

Jusqu'en 2004, la présence de PrPsc dans le sang des patients atteints d'EST, et donc le risque de contamination par voie sanguine, n'était considérée que comme théorique (AFSSAPS, 2003). La description début 2004 du premier cas de vMCJ possiblement lié à une

transfusion d'un concentré globulaire non déleukocyté d'un donneur en phase pré clinique de vMCJ a entraîné une réévaluation de ce risque (Llewelyn et al, 2004). Si, pour cette première notification, le lien transfusionnel pouvait être discuté, la survenue de trois autres cas conforte cette hypothèse (Hewitt et al, 2006b; HPA, 2007; Peden et al, 2004). Il est à noter que le deuxième cas rapporté concerne un patient hétérozygote MV pour le codon 129 et décédé sans signes neurologiques. Il avait cependant des antécédents de transfusion à partir d'un donneur en phase d'incubation du vMCJ. La PrPsc n'a été mise en évidence que dans la rate et un ganglion cervical de ce patient et présente les mêmes caractéristiques que celle des cas de vMCJ. Il s'agit du premier cas préclinique hétérozygote pour le vMCJ (Peden et al, 2004). On estime que 66 patients ont reçus au Royaume Uni des produits dérivés du sang de 18 donneurs ayant développé ultérieurement un vMCJ (Hewitt et al, 2006a). La question du caractère infectieux dans les autres formes de MCJ que le vMCJ reste posée.

A noter que chez les cervidés, outre le sang par voie intraveineuse, la salive par voie orale s'est avérée être infectieuse (Mathiason et al, 2006).

2. LES EST HUMAINES

2.1 Les formes sporadiques

Il s'agit de la forme de MCJ la plus fréquente. Selon les données d'un réseau international de surveillance de la MCJ regroupant différents pays européens (France, Italie, Pays Bas, Allemagne, Royaume Uni, Slovaquie, Autriche, Espagne, Suisse) ainsi que le Canada et l'Australie, elle représente en moyenne 84% de la totalité des MCJ (Ladogana et al, 2005). Cette proportion est homogène entre les différents pays participant à ce réseau, à l'exception du Royaume-Uni pour lequel du fait du grand nombre de forme acquises liées à l'ESB cette proportion est de l'ordre de 72%. Selon cette même étude, la mortalité en France, calculée sur 10 ans, s'élève à 1,34 cas par million d'habitants et par an. Elle semble relativement homogène entre les différents pays participant à ce réseau.

Cette forme touche aussi bien les hommes que les femmes avec un âge moyen de survenue d'environ 68 ans. La forme sporadique classique de la MCJ présente une démence d'évolution rapidement progressive associée à des myoclonies ou d'autres mouvements anormaux et aboutit inexorablement au décès en moins d'une année dans 90% des cas, le plus

souvent en quelques mois. Un grand nombre de signes non spécifiques peuvent être associés à ces signes neurologiques : troubles comportementaux, troubles psychiatriques, signes pyramidaux et extrapyramidaux, ataxie, fatigue... (Collins et al, 2006; Johnson, 2005; Wadsworth & Collinge, 2007). De nombreux variants cliniques de la forme classique sont décrits. La plus fréquente est la forme dite ataxique, elle représente 10 à 15% des cas et se caractérise par des signes inauguraux cérébelleux (Hill et al, 2003; Parchi et al, 1999b). Le variant d'Heidenhain (environ 7% des cas) est lui caractérisé par une atteinte oculaire précédant l'apparition de la démence (Kropp et al, 1999). Récemment, plusieurs cas présentant initialement des troubles de type épilepsie ont aussi été rapportés (Cohen et al, 2004; Neufeld et al, 2003).

Par ailleurs, une forme sporadique très rare d'insomnie fatale (IFs) a été décrite dans un très petit nombre de cas. La symptomatologie est identique à celle de l'insomnie familiale fatale (IFF) associant notamment des troubles importants de la vigilance, des insomnies, des modifications du comportement mais sans aucune anomalie génétique sur le gène *PRNP*. Tous sont homozygotes méthionine pour le codon 129 (Capellari et al, 2008; Montagna et al, 2003; Parchi et al, 1999a).

Il est à noter que les différentes formes cliniques sporadiques de MCJ sont associées à des caractéristiques biochimiques et neuropathologiques distinctes permettant d'établir une classification des cas. Différentes équipes en proposent, combinant la symptomatologie clinique, le polymorphisme du codon 129, le type de protéine prion pathologique ainsi que les lésions neuropathologiques (Hill et al, 2003; Parchi et al, 1999b). Cependant, ces classifications n'étant pas entièrement satisfaisantes, des améliorations ou de profondes modifications ont aussi été proposées (Cali et al, 2006; Schoch et al, 2006; Uro-Coste et al, 2008). La diversité clinique, biochimique et neuropathologique des formes sporadiques attestent de la complexité diagnostique de cette maladie (Cf 3.4.3)

2.2 Les formes génétiques

En France, sur la période 1993 – 2002, ces formes représentent environ 9 % des cas d'EST (Ladogana et al, 2005). Cette proportion est variable selon les différents pays, allant de 1,2 % en Suisse à 17 % en Italie et plus de 25 % en Israël. Elle se transmet sur le mode autosomique dominant, bien que dans presque la moitié des cas, il n'y ait pas d'antécédents

familiaux connus. La pénétrance est très variable à la fois selon le type de mutations et le lieu de résidence : pour la mutation E200K, par exemple, elle est évaluée à 89% en Israel et 59 % en Italie (Kovacs et al, 2005b).

Historiquement, les formes génétiques étaient classées selon les symptômes cliniques initiaux et consistaient en trois catégories : le syndrome de Gerstman – Straussler – Sheinker (GSS), l'Insomnie Familiale Fatale (IFF) et la MCJ familiale. De nombreuses anomalies génétiques ont été répertoriées, certaines sont typiquement associées à des phénotypes cliniques, d'autres sont responsables de phénotypes cliniques très variables. Depuis l'essor des analyses génétiques, il devient plus difficile de relier une anomalie à un phénotype clinique spécifique, surtout pour les anomalies les plus rares. Du fait de cette variabilité phénotypique et de la ressemblance avec d'autres formes de démences, il apparaît possible qu'un grand nombre de cas ne soient pas détectés (Mead, 2006). Les principales caractéristiques cliniques et neuropathologiques des formes les plus fréquentes sont résumées dans le Tableau 1.

	Age de Survenue (ans)	**Durée d'évolution (mois)**	**Principales caractéristiques cliniques et neuropathologiques**
GSS	51,6	40	Ataxie cerebelleuse, syndrome pyramidal, démence tardive. Plaques amyloides
IFF	51,2	12,4	Insomnie, troubles dysautonomiques et moteurs, altérations cognitives tardives. Atteinte thalamique prédominante, faible intensité
MCJ (E200K)	60,4	5	Troubles cognitifs, ataxie, syndrome cérébelleux (70%), myoclonies (60%). Marquage synaptique

Tableau 1 : Principales caractéristiques cliniques et neuropathologiques des formes génétiques d'EST les plus fréquentes.

D'après (Kovacs et al, 2005b; Kovacs et al, 2002).

2.3 Les formes acquises

2.3.1 Le kuru

La maladie du kuru a été découverte au milieu des années 1950 en Papouasie Nouvelle Guinée. À la suite de l'interdiction des rites cannibales à la fin des années 1950 par les autorités, cette maladie a aujourd'hui presque disparu. Aucun cas n'a été recensé parmi la population née après 1960 et les 11 cas actuels sont nés avant 1950. La période d'incubation moyenne est de 12 ans, mais elle peut atteindre plus de 50 ans, et est très influencée par le polymorphisme du codon 129. La symptomatologie classique débute par une ataxie et des tremblements, et dans un certain nombre de cas il n'y a pas de démence (Collinge et al, 2006; Collins et al, 2004).

2.3.2 Les formes iatrogènes de MCJ

Les formes de MCJ survenues suite à des actions thérapeutiques représentent environ 1% des cas de MCJ. Deux causes principales sont à l'origine de ces contaminations : les greffes de dure-mère (196 cas au total recensés en 2006, très majoritairement au Japon) et les injections intramusculaires (IM) d'hormone de croissance (GH) extractives (194 cas au total recensés en 2006, dont 103 en France). D'autres cas beaucoup plus rares sont reliés à des greffes de cornées ou à l'implantation d'électrodes de neurochirurgie (Brown et al, 2006).

La majorité des transmissions iatrogènes en France s'est effectuée à travers l'utilisation de lots de dérivés d'hormones hypophysaires contaminés d'origine humaine utilisés avant la mise au point des hormones recombinantes (Brandel et al, 2003). Le site de contamination est déterminant pour la symptomatologie et la durée d'incubation. Les durées d'incubation sont plus courtes, de l'ordre de 16 mois lors des introductions cérébrales (électrodes), avec une présentation clinique de démence inaugurales. Quant à elles, les transmissions périphériques dans les cas de GH présentent des signes inauguraux cérébelleux et des durées d'incubations plus longues, pouvant aller jusqu'à 30 ans (11 ans en moyenne) (Brown et al, 2006). Dans ces derniers cas, comme pour le Kuru, l'homozygotie au codon 129 est un facteur favorisant la survenue de la maladie, l'hétérozygotie étant liée à un allongement de la survie (Alperovitch, 2004).

2.3.3 Le variant de la MCJ (vMCJ)

Il s'agit d'une forme récente de MCJ décrite pour la première fois en 1996 par deux équipes, au Royaume-Uni et en France (Chazot et al, 1996; Will et al, 1996). Cette forme présente des caractéristiques étiologiques, cliniques, neuropathologiques et biochimiques différentes des autres MCJ. Dès la notification des premiers cas, un lien causal avec l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) a été évoqué (Will et al, 1996). Des résultats expérimentaux ont rapidement étayé cette hypothèse : des similitudes entre les lésions neuropathologiques et le type de PrPres ont été démontrées entre l'ESB et le vMCJ (Bruce et al, 1997; Collinge et al, 1996; Hill et al, 1997). Des études de transmission orale de la souche de l'ESB chez le chimpanzé ont montré que les lésions neuropathologiques induites et le type de PrPres étaient identiques à ceux retrouvés dans les cas de vMCJ (Herzog et al, 2004; Lasmezas et al, 2005). L'hypothèse de la contamination alimentaire par l'ESB comme origine du variant de la MCJ est aujourd'hui largement admise. On dénombre au 1er septembre 2008 au Royaume-Uni 164 cas confirmés et 41 autres cas répartis entre l'Europe, l'Amérique du Nord et le Moyen Orient, dont 23 cas en France (EUROCJD/NEUROCJD; INVS; NCJDSU).

Sur le plan épidémiologique, cette forme touche des sujets plus jeunes, âgés de 26 ans en moyenne avec une durée d'évolution plus longue (moyenne de 14 mois) que pour la forme sporadique (Knight, 2006). L'étude de l'ensemble des cas montre une clinique relativement homogène et distincte de la forme sporadique. La symptomatologie débute par des troubles psychiatriques et du comportement avec dépression, anxiété, repli social, troubles de la mémoire associé à des douleurs persistantes. La survenue de troubles neurologiques de type ataxie et mouvements anormaux se produit dans les 2 mois en général (Knight, 2006; Spencer et al, 2002) .

Tous les cas confirmés sont actuellement homozygotes MM. Cependant, par analogie avec les autres formes acquises, il parait certain que des cas porteurs des génotypes MV et VV peuvent apparaître, avec un phénotype plus ou moins conservé et un délai d'apparition plus long. L'inoculation d'extrait de cerveau de vMCJ à des souris homozygotes VV est en effet moins efficiente au premier passage que pour les souris homozygotes MM (50% d'animaux malades contre 100% respectivement). La PrPres présente un type moléculaire distinct chez les souris VV de celle de la souche inoculée, conservée chez les souris MM (Wadsworth et al, 2004). Cet effet est aussi constaté chez des souris hétérozygotes MV

(Bishop et al, 2006). L'effet « protecteur » de l'allèle valine est donc très important pour l'expression clinique du vMCJ telle que décrite à l'heure actuelle.

Récemment, une nouvelle forme de MCJ chez une femme de 39 ans a été rapportée au Royaume-Uni (Mead et al, 2007). La symptomatologie est atypique vis-à-vis de la forme vMCJ avec une prédominance initiale de signes oculaires et des troubles de la mémoire, suivie d'une aggravation des troubles cognitifs, d'une ataxie et d'une agressivité. La patiente est décèdée 14 mois après le début des troubles. Son génotype est hétérozygote MV pour le codon 129. Au plan neuropathologique, les marquages sont atypiques pour une forme sporadique car beaucoup plus étendus et sévères. Le type moléculaire de la PrPres retrouvé chez cette patiente présente des similitudes avec celui caractéristique du vMCJ, notamment par son ratio de glycosylation, qui est jusqu'alors retrouvé uniquement dans la forme vMCJ. Cependant, cette PrPres présente une sensibilité différente de celle du vMCJ à la protéinase K en présence de zinc. La combinaison des différents critères ne permet donc pas de classer ce cas en vMCJ mais il ne correspond pas non plus à un cas sporadique classique. S'ils avaient été disponibles, l'étude des tissus lymphoïdes ainsi que de plus nombreuses zones cérébrales aurait été intéressante pour mieux caractériser ce cas. Deux autres cas de MCJ sporadiques homozygotes VV atypiques sur le plan moléculaire (présence de PrPres de type vMCJ) et/ou clinique (âge jeune et troubles psychiatriques dominants) ont été décrits dans la littérature (Head et al, 2001; Hillier et al, 2001). Ces différents cas montrent la diversité des formes sporadiques et pointent l'interconnexion des critères entre les différentes formes de MCJ, rendant complexe l'élaboration d'une classification simple et unique.

3. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES MALADIES A PRIONS

3.1 Démarche diagnostique

Les critères de diagnostic actuels des EST ont été établis par le réseau européen de surveillance des maladies à prion Euro - Neuro CJD en 2003 (Annexe 1) et sont adaptés des recommandations de l'OMS éditée en 1998 (WHO, 1998). Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence de la protéine prion pathologique sur tissu cérébral par technique immunohistochimique et par technique de Western Blot. Du vivant du patient, il s'agit d'un diagnostic de probabilité faisant intervenir des critères cliniques, paracliniques (EEG et IRM)

et biologiques (protéines 14.3.3). La combinaison de ces différents critères ne permet de classer les cas de MCJ, du vivant du patient, qu'en « possible » ou « probable ».

3.2 Diagnostic pré-mortem : les critères paracliniques et biologiques

3.2.1 L'électroencéphalogramme (EEG)

La présence d'ondes périodiques ou de complexes d'ondes lentes enregistrés par EEG est reconnue depuis les années 1950 comme étant caractéristiques de la MCJ, et ces caractéristiques ont été intégrées dans les critères actuels de diagnostic de la MCJ (Annexe 1). Une des difficultés de l'analyse des tracés réside dans l'interprétation de l'enregistrement de l'EEG qui dépend de l'expérience du neuroradiologue. Différentes études ont eu pour but de standardiser l'analyse de ces tracés et ont abouti à la définition de critères standard d'interprétation pour la MCJ (Steinhoff et al, 1996).

Les caractéristiques du tracé EEG évoluent en fonction de l'avancement de la maladie et du type de MCJ. Etablies sur de petites cohortes de patients, la spécificité et la sensibilité sont de 86% et 67% respectivement (Steinhoff et al, 1996). Dans une autre étude portant sur une cohorte de 150 patients atteints de MCJ d'étiologie non précisée, les critères analytiques s'élèvent à 91% pour la spécificité et 64% pour la sensibilité. Des ondes périodiques de mêmes types peuvent toutefois être observées au cours de la maladie d'Alzheimer et de la démence à corps de Lewy (Steinhoff et al, 2004).

Dans une étude récente analysant 2451 cas confirmés de MCJ, recueillis dans le cadre du réseau européen de surveillance (Euro – Neuro CJD), la sensibilité de l'EEG n'est plus que de 58,4%. De plus, elle varie fortement en fonction des différentes formes de MCJ et apparaît aussi fortement dépendante du polymorphisme du codon 129 pour les formes sporadiques. En effet, en cas de présence de l'allèle méthionine, on retrouve environ 73% de tracés considérés comme typique de la MCJ chez les homozygotes MM, pour environ 40 % chez les patients hétérozygotes MV et seulement 22% chez les homozygotes VV (Collins et al, 2006).

Dans les formes génétiques, l'EEG varie fortement en fonction de la mutation portée par le gène PRNP : environ 70% des patients porteurs de la mutation E200K présentent des

EEG typiques alors que les tracés sont très rarement caractéristiques chez les porteurs de mutations D178N (IFF) (Kovacs et al, 2005b). Pour les formes iatrogènes liées aux greffes de dure-mère contaminées, la sensibilité est comparable à celle observée dans les formes sporadiques, de l'ordre de 60%, contrairement aux cas liés à la GH où l'EEG n'est pas indicatif (Brandel et al, 2001; Noguchi-Shinohara et al, 2007). Il n'est pas non plus indicatif dans le cas des formes vMCJ (Wieser et al, 2006).

3.2.2 L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

En 1988, une corrélation entre des particularités observées à l'IRM et les lésions neuropathologiques spécifiques de la MCJ a été établie pour la première fois (Gertz et al, 1988). L'IRM est alors apparue comme un outil particulièrement intéressant pour le diagnostic in vivo, et notamment la distinction des formes sporadiques et variants de la MCJ. Dans les cas de vMCJ, l'IRM présente une hyper intensité symétrique bilatérale au niveau du thalamus postérieur. Cette caractéristique est appelée « signe du pulvinar » (Zeidler et al, 2000). Sur une série de 27 cas de vMCJ, ce signe est retrouvé avec une spécificité de 94% et une sensibilité de 81% (Collie et al, 2003; Wadsworth & Collinge, 2007).

Même si actuellement les critères internationaux n'intègrent l'imagerie que pour la définition des cas « possibles » de vMCJ (Annexe 1), elle est néanmoins une technique qui s'avère sensible aussi dans les cas sporadiques. On y observe une hyper intensité au niveau de la tête du noyau caudé et du putamen dans environ 70% des cas (Schroter et al, 2000). L'analyse combinée par technique FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) et par diffusion pondérée (DWI) a permis d'améliorer la sensibilité à environ 92% (Shiga et al, 2004). Contrairement à l'EEG, une étude récente montre elle aussi l'importance du polymorphisme du codon 129 dans la sensibilité de l'IRM, mais pour les génotypes inverses. Les auteurs rapportent en effet une hyper intensité des ganglions basaux dans 84% des cas MV2 pour seulement 61% et 42 % des cas MM1, selon le radiologue qui analyse le cliché. Un changement significatif est observé au niveau thalamique pour 86% des cas MV2 et 12.5% seulement des cas MM1 en diffusion pondérée (Krasnianski et al, 2008). La sensibilité de l'IRM est donc dépendante de la technique utilisée, de l'observateur et du polymorphisme du codon 129.

3.3 Diagnostic pré-mortem : les marqueurs biologiques

Les marqueurs biologiques utilisés pour le diagnostic du vivant du patient sont analysés dans le LCR. Les tests actuels ne permettant pas la détection de la protéine prion pathologique dans ce liquide, les différents marqueurs étudiés sont non spécifiques de la MCJ. Seule la recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR fait partie des critères de diagnostic internationaux (HAS, 2007a; WHO, 1998). En cas de positivité, les cas de MCJ définis comme « possibles » deviennent alors « probables » (Annexe 1).

3.3.1 Les protéines 14.3.3

Les protéines 14.3.3 forment une famille de protéines acides. Sept isoformes de protéines 14.3.3 ont été décrites (β, γ, ε, ζ, η, σ, τ), codées par différents gènes partageant une forte homologie de séquence. Parmi ces isoformes, cinq sont plus particulièrement retrouvées dans les neurones (β, γ, ε, ζ, η) (Green, 2002b). Leur poids moléculaire apparent est d'environ 30 kDa pour un pI compris entre 4 et 5. Il peut exister des dimères entre les différentes isoformes (Otto et al, 2008). Ces protéines sont présentes dans un grand nombre de tissus (cerveau, foie, cœur, testicules…). On les retrouve dans le cytoplasme mais aussi les membranes cellulaires. Ces protéines sont des ligands pour un grand nombre d'autres protéines, leur conférant ainsi des fonctions de régulations et de modulation de l'activité cellulaire. Les protéines 14.3.3 sont ainsi impliquées dans des processus de régulation du cycle cellulaire, de transduction du signal, de neurotransmission. Elles jouent aussi un rôle très important dans la protection de la cellule contre l'apoptose par régulation des kinases et des phosphatases (Aitken, 2006; Fu et al, 2000).

La mise en évidence des protéines 14.3.3 dans le LCR est probablement essentiellement reliée à un phénomène de lyse neuronale. On les retrouve presque systématiquement au cours d'encéphalite herpétique, d'ischémie cérébrale, de lymphome malin non Hodgkinien et moins fréquemment lors de paranéoplasies, d'encéphalopathies métaboliques, dans les encéphalites d'Hashimoto ou les autres démences dégénératives et n'est donc pas spécifique de la MCJ (Bahl et al, 2008; Hsich et al, 1996; Van Everbroeck et al, 2005a).

Dans la MCJ, on retrouve plus particulièrement quatre des sept isoformes dans le LCR : β, γ, ε, et η. L'isoforme η étant aussi présente dans le LCR de patients atteints de maladie

d'Alzheimer, la détection spécifique des isoformes β, γ, ε pourrait être intéressante dans le cadre du diagnostic différentiel vis-à-vis des autres démences dégénératives (Wiltfang et al, 1999). Une étude plus récente a montré que l'isoforme retrouvée dans le LCR la plus spécifique de la MCJ semble être finalement l'isoforme γ (Van Everbroeck et al, 2005b).

De nombreuses études ont évalué la spécificité et la sensibilité des techniques de détection des protéines 14.3.3 dans le LCR par Western-Blot dans le cadre du diagnostic de la MCJ. On remarque alors que ces critères sont très dépendants des différentes formes cliniques de MCJ et là encore, comme dans le cas de l'EEG et de l'IRM, du polymorphisme du codon 129 et du type de PrPres.

Du fait de la localisation cellulaire précédemment décrite, la présence de la protéine 14.3.3 dans le LCR n'est pas spécifique de la MCJ. La spécificité de la recherche vis-à-vis de la MCJ dépend de la population étudiée. Différentes études l'évaluent entre 78% et 84% (Bahl et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2006). Elle passe cependant de 88% dans une population testée comprenant des patients souffrant de différentes démences, des cas d'encéphalites virales et d'ischémie cérébrale à 96% si on se limite à la population uniquement atteinte de démence (Hsich et al, 1996). D'autres études comprenant des patients atteints de démence rapidement évolutive l'évaluent entre 89% et 93% (Burkhard et al, 2001; Zerr & Poser, 2002).

Concernant la sensibilité dans les cas sporadiques, pour la première fois en 2004, une équipe a analysé les résultats de recherche de protéines 14.3.3 en tenant compte de ces différents critères. Il a été montré qu'il existe une hétérogénéité importante de sensibilité selon les sous groupes : 87% pour l'ensemble des cas sporadiques, 100 % pour les VV1 (3 cas seulement) ou les MV1, mais seulement 57% pour les cas MV2 (Castellani et al, 2004). Deux études plus récentes sur un très grand nombre de cas sporadiques (1457 cas pour Sanchez-Juan *et al* et 1521 cas pour Collins *et al*) font ce même constat d'hétérogénéité parmi cette forme de MCJ. Pour Sanchez-Juan *et al* la sensibilité la plus faible est observée pour le groupe MV2 alors que pour Collins *et al* il s'agit du groupe MM2. Dans les deux cas, l'association du type 2 de la PrPres avec un allèle méthionine est corrélé avec la plus faible sensibilité de la recherche de protéines 14.3.3. Si on observe la sensibilité globale pour l'ensemble des cas sporadiques, les deux études obtiennent des résultats comparables avec

85% et 88% respectivement (Collins et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2006). Les résultats de ces différentes études sont synthétisés dans le Tableau 2.

Si on ne tient compte que du polymorphisme du codon 129 (résultats disponibles pour 743 cas), on observe cette fois une sensibilité significativement plus faible pour les hétérozygotes MV (77%) contrairement aux homozygotes MM (89%) et VV (94%) pour qui la sensibilité reste très élevée (Collins et al, 2006).

Etude	**sMCJ (N non EST)**	**Spéci-ficité %**	**Sensibilité globale %**	**Sensibilité par sous types**					
				MM1 % (N)	MM2 %(N)	MV1 %(N)	MV2 %(N)	VV1 %(N)	VV2 % (N)
Collins et al 2006	1521 (0)	/	88	91 (444)	61 (31)	86 (37)	71 (73)	90 (14)	95 (100)
Sanchez-Juan et al 2006	1457 (1117)	84,5	85	92 (140)	78 (9)	91 (11)	65 (31)	100 (6)	90 (30)
Castellani et al 2004	90 (0)	/	87	94 (48)	70 (10)	100 (3)	57 (7)	100 (3)	84 (19)

Tableau 2 : comparaison des sensibilités observées pour la protéine 14.3.3 dans différentes études regroupant des cas sporadiques de MCJ (mise en évidence par Western-Blot).

Les données concernant le codon 129 ne sont généralement pas disponibles pour l'ensemble des cas étudiés, ce qui explique la diminution de la cohorte lors de l'analyse de la sensibilité par sous type.

N non EST : nombre de cas non EST retenus dans chaque étude. D'après Collins Brain 2006, Sanchez-Juan Neurol 2006, Castellani Neurol 2004.

Pour les autres formes de MCJ, la sensibilité est très variable et généralement plus faible que pour les cas sporadiques. Pour l'ensemble des formes génétiques, la sensibilité globale est de l'ordre de 78% (139 cas) (Sanchez-Juan et al, 2006). Etant donné le faible nombre de cas génétiques (10 % de l'ensemble des cas de MCJ en moyenne pour les pays du groupe EuroCJD), la difficulté consiste à disposer, dans les études, de suffisamment de cas pour que les données soient statistiquement significatives. Une étude colligeant l'ensemble des cas génétiques des partenaires du réseau européen EuroCJD entre 1993 et 2002 permet d'exploiter les résultats de recherche de protéine 14.3.3 pour 259 cas (Kovacs et al, 2005b). On retrouve une sensibilité globale d'environ 76%, comparable à celle de l'étude précédente. Cette sensibilité est variable selon l'anomalie génétique et s'échelonne de moins de 20% pour

les IFF (35 cas) à environ 50% pour les GSS (16 cas), pour atteindre 85% pour les insertions et 90% pour les mutations E200K (105 cas) et jusqu'à 98% pour les mutations V210I (50 cas).

Dans les formes iatrogènes, la sensibilité s'élève à 77%. Là encore, la sensibilité dépend de l'origine de la contamination : la recherche de protéine 14.3.3 est positive dans 85 à 88% des cas après greffe de dure-mère, mais seulement 70% pour les formes liées à l'administration d'hormone de croissance contaminée (Brown et al, 2000; Noguchi-Shinohara et al, 2007). Dans le vMCJ, la sensibilité est elle aussi relativement faible, comprise entre 40% et 45% selon les études (Sanchez-Juan et al, 2006; Zerr & Poser, 2002).

Il faut souligner que dans certains cas, la recherche s'avère négative lorsque la ponction lombaire est réalisée trop précocement dans l'évolution de la maladie puis devient positive. Ce phénomène a été documenté aussi bien pour les formes sporadiques que pour les formes iatrogènes liées à l'hormone de croissance. Dans ces formes iatrogènes, la sensibilité passe de 20% si la ponction a lieu dans les 3 premiers mois d'évolution de la maladie, à 55% si la ponction a lieu entre le 3ème et le 6ème mois puis 100% entre le 6ème et le 12ème mois (étude sur 20 patients). Parmi les patients qui avaient une recherche négative à la première ponction, la sensibilité passe de 55% à 75% avec un deuxième prélèvement (Brandel et al, 2001). Dans les formes sporadiques, la sensibilité augmente de 87% à 91%, et plus particulièrement pour les patients hétérozygotes MV pour le codon 129, la sensibilité augmente significativement de 60% à 89% (Giraud et al, 2002; Sanchez-Juan et al, 2007). Cette évolution est conforme à la sensibilité calculée en fonction du moment de la ponction dans l'évolution de la maladie : de 88% en début d'évolution à 91% si la ponction est réalisée dans les derniers mois (Collins et al, 2006).

En dehors des techniques de Western-Blot utilisées en routine pour le diagnostic de la MCJ, différentes techniques ELISA ont été développés pour permettre un dosage quantitatif des protéines 14.3.3. Généralement, ces techniques détectent spécifiquement l'isoforme γ de la protéine 14.3.3 avec une sensibilité comparable à celle du Western-Blot : 58 % de sensibilité dans les vMCJ et 89 % à 95% pour les formes sporadiques (Green et al, 2002; Peoc'h et al, 2001). La quantification reste cependant peu fiable car les standards utilisés pour la calibration de ces tests ne sont pas l'isoforme purifiée γ, mais consistent en un mélange de différentes isoformes extraites de tissu cérébral humain ou animal (singe) (Peoc'h et al, 2001).

Si on évalue la sensibilité de ces techniques en fonction des sous types de formes sporadiques, on retrouve la variabilité observée avec les techniques d'immunoblot : sensibilité plus faibles dans les formes d'évolution les plus lentes 75 % pour le sous type MM2 (Gmitterova et al, 2008).

3.3.2 Les protéines Tau totales et les formes phosphorylées

La protéine Tau est une protéine neuronale, principalement axonale, associée aux microtubules. On retrouve dans le cerveau six isoformes différentes de la protéine, comprenant de 352 à 441 acides aminés, pour un poids moléculaire apparent compris entre 45 et 65kDa. Ces isoformes diffèrent par la présence de trois ou quatre régions répétées sur la partie C-terminale et la présence d'un ou deux insert sur la partie N-terminale (Buee et al, 2000). Les protéines Tau se lient à différentes autres protéines pour permettre la connexion des microtubules avec d'autres composés du cytosquelette. Les rôles principaux des protéines Tau sont de stabiliser les microtubules, d'empêcher leur polymérisation et de préserver l'intégrité de l'axone (Otto et al, 2008). Soixante dix neuf sites de phosphorylation ont été décrits, ayant pour conséquence l'existence de nombreuses formes phosphorylées. Dans le cadre du diagnostic biologique des démences, les phosphorylations les plus étudiées à l'heure actuelle sont celles situés en position 181, 199, 231, 235, 404 (Green, 2002a). Les dosages des protéines Tau totales et des formes phosphorylées sont effectués par méthodes immunométriques avec des kits commerciaux ELISA. Les protéines Tau totale et phosphorylée en position 181 font parties des critères diagnostiques internationaux de la maladie d'Alzheimer (Dubois et al, 2007).

Dans la MCJ sporadique, plusieurs études s'accordent sur le fait que la concentration des protéines Tau totales est très élevée et supérieure à celle mesurée dans les autres démences, à l'exception peut être des démences vasculaires (Boesenberg-Grosse et al, 2006; Otto et al, 2002; Sanchez-Juan et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2007). Dans toutes ces études, le seuil considérant le dosage comme positif pour la MCJ est celui déterminé initialement par Otto *et al* en 2002 et est de 1300 pg/ml. Les concentrations mesurées entre 300 et 800 pg/ml ne permettent pas la discrimination des différentes démences (Otto et al, 2002). Si on analyse la sensibilité du dosage en tenant compte du sous-type de PrPsc et du polymorphisme du codon 129, elle s'avère être la plus élevée pour les formes MM1 (de 98% à 100%) et la plus faible pour les formes MV2 (de 43% à 88%), avec une amélioration au cours de l'évolution

de la maladie lors de ponctions répétées (de 43% à 88%) (Otto et al, 2002; Sanchez-Juan et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2007). De même, au cours de ces ponctions répétées, la concentration des protéines Tau totale augmente. Même si le seuil de 1300 pg/ml n'est pas atteint pour la totalité des patients, la concentration est généralement supérieure à 800 pg/ml pour la MCJ, y compris pour les formes MV2 (Otto et al, 2002).

Dans les autres formes de MCJ, la concentration en protéine Tau totale est en moyenne plus faible que pour les formes sporadiques ; le seuil de 1300 pg/ml n'est atteint que pour 24% des formes v-CJD et 53% des formes iatrogènes (Sanchez-Juan et al, 2006). Dans une cohorte évaluant uniquement la forme vMCJ, et donc proposant des contrôles plus spécifiquement appariés en âge et signes cliniques, le seuil de positivité proposé est de 500 pg/ml (Green et al, 2001). Avec ce seuil, la sensibilité atteint alors 80% pour Green *et al* et 86% pour Sanchez-Juan *et al*.

Etant donné les recoupements de concentrations des protéines Tau totales avec les autres types de démences, et notamment la MA, l'utilisation du rapport protéine Tau phosphorylée en position 181 par rapport à la protéine Tau totale semble être plus pertinent. En effet, les concentrations de la protéine Tau phosphorylée en position 181 (P-Tau 181) sont significativement plus basses dans la MCJ que dans la maladie d'Alzheimer. Sur une petite cohorte (20 MCJ et 71 MA), les auteurs calculent un rapport inférieur à 0,05 dans la MCJ, alors qu'il est supérieur à 1,25 dans la MA, y compris pour ces formes débutantes (mild cognitive impairment) (Riemenschneider et al, 2003). Dans une étude incluant 13 cas de MCJ et 57 cas de MA, les rapports calculés sont en moyenne de 1,14 (0,18-3,21) pour la MCJ et 18.4 pour la MA (4,4 à 145) (Satoh et al, 2006). Le calcul de ce rapport en utilisant la protéine Tau phosphorylée en position 231 (à la place de la P-Tau 181) est concordant avec les résultats décrits précédemment (Buerger et al, 2006). Une étude très récente étudie le rapport inverse (Tau totale / P-Tau 181) sur une toute petite cohorte (12 MCJ, 26 MA) et fixe un seuil à 60 pour différencier les MCJ des MA (Skinningsrud et al, 2008). L'interprétation combinée de la concentration de protéine Tau totale et de ce rapport semble donc bien être informative, mais des études sur de plus grandes cohortes de patients bien caractérisés paraissent indispensables pour mieux définir ces seuils.

Il faut noter que les concentrations moyennes en P-Tau 181 sont plus élevées dans les cas vMCJ que dans les cas sporadiques : 114 pg/ml contre 61 pg/ml respectivement ; alors

que les concentrations moyenne de Tau totales sont inversées entre ces deux populations (962 pg/ml et 5120 pg/ml respectivement). Là encore, les rapports P-Tau 181 / Tau totale permettent de les différencier de leur groupe contrôle respectif. Le seuil semble être inférieur à 0.12 pour les vMCJ contre 0.28 pour le groupe contrôle et 0.012 pour les formes sporadiques contre 0.13 pour les contrôles (Goodall et al, 2006)

.

Même si ces marqueurs sont plus spécifiquement décrits dans le cadre du diagnostic de la maladie d'Alzheimer, ils présentent tout un même un intérêt dans le cadre de la MCJ, à condition d'être combinés. Il existe cependant des zones de recouvrement entre MCJ et MA qui les rendent difficile à interpréter dans un diagnostic différentiel. Le dosage ELISA est toutefois très facile à mettre en œuvre, même s'il reste très cher pour des performances analytiques comparables à celles de la mise en évidence de la protéine 14.3.3 par Western Blot.

3.3.3 Les autres marqueurs biologiques du LCR

D'autres marqueurs biologiques ont été étudiés dans le LCR, dont principalement l'isoforme neuronale spécifique de l'énolase (NSE) et la protéine S100β. Tous deux sont dosés par des kits commerciaux quantificatifs.

La NSE est un enzyme de 78 kDa impliquée dans la glycolyse. On la retrouve dans le LCR de nombreuses pathologies : les traumatismes crâniens, les ischémies cérébrales, les tumeurs cérébrales, les hémorragies méningées… Le seuil de positivité vis-à-vis de la MCJ est déterminé à 35 ng/ml (Zerr et al, 1995). La spécificité est évaluée entre 83% et 95% et la sensibilité est assez faible : de 24% pour les vMCJ à 73% - 82 % pour les formes sporadiques (Aksamit et al, 2001; Bahl et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2007).

La protéine S100β est une protéine cytosolique, dimérique, riche en acides aminés acides et qui fixe le calcium. On la retrouve dans les cellules gliales (Otto et al, 1997). En dehors de la MCJ, la protéine S100 β est utilisée comme marqueur tumoral, comme marqueur pronostique après une ischémie cérébrale ou des traumatismes crâniens (Otto et al, 2008). Dans la MCJ, la spécificité est de l'ordre de 75% et la sensibilité est généralement de l'ordre de 82 % (Sanchez-Juan et al, 2006). On remarque que pour les formes sporadiques, au cours

de ponctions répétées lors de l'évolution elle varie entre 73% à 94% au cours du temps (Sanchez-Juan et al, 2007).

Parmi les différents marqueurs proposés dans le LCR, la protéine 14.3.3 reste le plus spécifique et le plus sensible pour le diagnostic de la MCJ du vivant du patient.

3.3.4 Anomalies génétiques et polymorphisme du codon 129

Plus de quarante anomalies portées par le gène PRNP ont été répertoriées comme étant responsables de différentes formes génétiques d'EST, dont plus de trente mutations. Les plus fréquentes sont les mutations E200K, D178N, P102L et l'insertion de séquences répétées d'octapeptides OPRI (Mead, 2006). Lorsqu'une de ces anomalies est associée aux critères diagnostic neuropathologique et biochimique de certitude, cela affirme le diagnostic de certitude d'une forme génétique (Annexe 1).

Le polymorphisme méthionine / valine du codon 129 est un facteur de susceptibilité vis-à-vis des EST. L'étude des différentes populations montre que l'homozygotie MM est surreprésentée dans la population atteinte de MCJ, quelle que soit l'étiologie, par rapport à la population témoin. L'hétérozygotie semble donc être un facteur protecteur. L'étude des populations atteintes de formes acquises, formes iatrogènes liée à la GH contaminée ou maladie du Kuru, montre que les premiers individus touchés sont homozygotes MM ou VV (Alperovitch, 2004; Collinge et al, 2006). L'expression clinique de la maladie semble directement liée à ce polymorphisme. Chez la souris exprimant la PrP humaine, l'inoculation de la souche vMCJ induit l'expression d'une forme clinique compatible avec le vMCJ si le polymorphisme des lignées de souris est homozygote MM. En revanche, si la lignée est homozygote VV, le phénotype observé n'est plus compatible avec le vMCJ (Wadsworth et al, 2004).

Il faut noter qu'il existe une composante géographique dans la répartition de ce polymorphisme. En effet, la population japonaise par exemple est très majoritairement porteuse du génotype MM (Doh-ura et al, 1991). La fréquence du polymorphisme de différentes populations est résumée dans le Tableau 3.

	MM (%)	MV (%)	VV (%)
Population Fore atteinte du Kuru	53	27	20
Population contrôle de PNG	32	43	24
Population contrôle (France)	41	49	10
MCJ Sporadique classique	69	14	17
Variant MCJ	100	0	0
MCJ iatrogène par GH en France	62	16	22
Population contrôle Japon	92	8	0

Tableau 3 : répartition du polymorphisme du codon 129 dans différentes populations.

M : méthionine, V : Valine, PNG : Papouasie Nouvelle Guinée, GH : growth hormon. D'après Collins et al 2004, Brandel et al 2003, Doh-ura et al 1991.

3.4 Le diagnostic de certitude : mise en évidence de la protéine prion pathologique dans le tissu cérébral

3.4.1 L'examen neuropathologique : histologie et immunohistochimie (IHC)

Il repose historiquement sur la triade histologique spongiose, gliose astrocytaire et perte neuronale. La mise en évidence en 1981 de fibrilles anormales, les « fibrilles associée à la scrapie » (SAF), à partir de coupes de cerveaux de souris inoculées par une souche de tremblante ovine (139A) a permis l'essor d'une nouvelle méthodologie diagnostique pour les EST (Merz et al, 1981). Associée aux critères histologiques, la recherche par détection immunohistochimique (IHC) de la protéine prion pathologique sur différentes coupes de tissus améliore fortement la sensibilité et la spécificité du diagnostic (Budka et al, 1995).

Cette recherche est effectuée sur des coupes de tissu fixé puis inclus en paraffine. Actuellement, aucun anticorps spécifique de la forme pathologique n'est validé en routine pour le diagnostic. Pour diminuer la réactivité de la forme cellulaire de la protéine prion et parallèlement augmenter celle de la forme pathologique vis-à-vis des anticorps, différents prétraitements sont combinés, selon l'anticorps utilisé, comme l'acide formique, la protéinase K (PK), le thiocyanate de guanidine, l'autoclavage en chaleur humide (Kovacs et al, 2002; Van Everbroeck et al, 1999). Un protocole basé sur une oxydation forte des tissus par des oxydes de manganèse à température ambiante suivie d'un traitement par un détergent a été évalué sur cerveau animal et proposé comme alternative aux précédents protocoles, jugés plus complexes (Bencsik et al, 2005). Un traitement intermédiaire supplémentaire par la

streptomycine (entre le prétraitement et l'incubation de l'anticorps primaire) a été récemment testé sur des tissus animaux. Pour une concentration en streptomycine de 8,75 mM, ce protocole permet d'augmenter sensiblement l'intensité du signal sans majoration du bruit de fond (Bencsik et al, 2006).

L'IHC permet aussi et surtout d'analyser la distribution anatomique et cellulaire de la PrPsc, le type de cellules impliquées ainsi que le type de dépôts de PrP. En effet, il existe différents types de dépôts de protéine prion : synaptiques diffus, périvacuolaire, périneuronal et en plaques (Kovacs et al, 2005a). Il faut noter dans les cas de vMCJ la présence prépondérante de « plaques florides » caractéristiques de l'accumulation de la PrPsc (Ironside et al, 2002). Ces caractéristiques neuropathologiques, associées au type moléculaire de PrPsc analysée par Western-Blot, au polymorphisme du codon 129 et à la symptomatologie clinique, permettent de classer les différentes formes d'EST et de caractériser les souches de protéines prions (Hill et al, 2003; Parchi et al, 1999b).

Une autre technique développée plus récemment permet d'étudier très précisément la distribution de la PrPsc. Il s'agit du PET Blot ou « Paraffin-Embedded Tissue Blot » (Schulz-Schaeffer et al, 2000). Cette technique est réalisée, comme l'IHC, à partir de tissus fixés et paraffinés et combine les avantages de l'IHC, du Western Blot et de l'histoblot. Les coupes fines sont déposées sur une membrane de nitrocellulose. Après plusieurs traitements pour éliminer la paraffine et réhydrater la membrane, une étape de digestion par une forte concentration de PK est réalisée, éliminant un grand nombre de protéines dont la PrPc. La distribution anatomique précise de la PrPres résiduelle est ensuite détectée par immuno - révélation directement sur la membrane. Cette technique s'avère être plus sensible que l'IHC et permet donc une détection précoce de la PrPres dans différents tissus (Ligios et al, 2007; Ritchie et al, 2004). Elle semble être un bon outil complémentaire des méthodes de typage des souches chez l'animal (Lezmi et al, 2006).

3.4.2 Le diagnostic immuno-biochimique

Le principe des techniques classiques repose sur la séparation de la forme normale cellulaire et de la forme pathologique de protéine prion. Plusieurs stratégies sont envisageables pour cela et peuvent être combinées.

Le plus souvent, on utilise la différence de sensibilité vis-à-vis de la protéinase K des deux isoformes de PrP. La forme cellulaire étant sensible à l'action de la PK, elle est entièrement dégradée sous l'action de cette dernière, contrairement à la forme pathologique dont il subsiste une fraction nommée PrPres (Meyer et al, 1986). Une seconde propriété couramment utilisée est l'insolubilité de la forme pathologique en milieu détergent, la forme cellulaire restant soluble. La combinaison de ces deux propriétés permet la formation de fibrilles appelées « Scrapie Associated Fibrils », ou SAF constituées de la forme pathologique. Ces SAF peuvent être détectées directement par des techniques de microscopie électronique à transmission, même si cette analyse est techniquement trop lourde pour être utilisée en routine aujourd'hui (Merz et al, 1981). A partir d'un homogénat tissulaire, la préparation des SAF suivie d'une détection immunologique par un anticorps spécifique anti-prion permet la mise en évidence de la PrPres par Western Blot ou par une détection immunométrique de type ELISA (Collinge et al, 1996; Grassi et al, 2000; Parchi et al, 1995).

Du fait du faible niveau d'accumulation de la PrPres dans certaines régions cérébrales, différents protocoles ont été proposés pour améliorer la sensibilité de ces techniques. On trouve ainsi des techniques proposant une précipitation de la PrPsc dont notamment une ultracentrifugation en milieu détergent (Brown et al, 1986), l'utilisation d'isopropanol (Grassi et al, 2000), ou encore la formation de complexes à l'aide de polyanions de type polyoxométalates (Lee et al, 2005b). L'ajout de chélateur du type EDTA dans l'homogénat, après traitement PK, peut aussi s'avérer efficace pour améliorer la sensibilité du Western Blot. En effet, sur une étude de quantification du signal de Western Blot, l'utilisation de ces chélateurs permet de l'augmenter d'environ 2,2 fois (Kuczius et al, 2007). En conclusion, l'amélioration de la sensibilité a permis essentiellement d'atteindre un niveau suffisant pour détecter de faibles quantités de PrPsc dans les tissus périphériques. Ces techniques seront revues dans le chapitre 3.5.5.

3.4.3 Application de la détection immuno-biochimique au typage moléculaire de la PrPres

Un intérêt tout particulier de la mise en évidence par Western Blot réside dans sa capacité à différencier les souches selon leur profil moléculaire. En effet, après digestion par la PK et analyse par Western Blot, la PrPres se présente sous la forme de trois bandes correspondant aux trois états possibles de glycosylation de la PrPres (non glycosylée, monoglycosylée et biglycosylée), dont les ratios relatifs semblent spécifiques de chaque

souche. A partir de l'étude d'un petit nombre de cas sporadiques de MCJ (19 cas), deux sites privilégiés de clivage par la PK ont été identifiés en position 82 (glycine) et 97 (sérine) de la PrPsc (Parchi et al, 1996). Il a alors été constaté que le poids moléculaire apparent de la forme non glycosylée de la PrPres est d'environ 21 kDa dans le cas de la PrPres de type 1 et d'environ 19 kDa dans le cas de la PrPres de type 2. La caractérisation du ratio relatif des différentes formes de PrPres ainsi que le type de PrPres non glycosylée constituent le typage moléculaire de la PrPres (Figure 3).

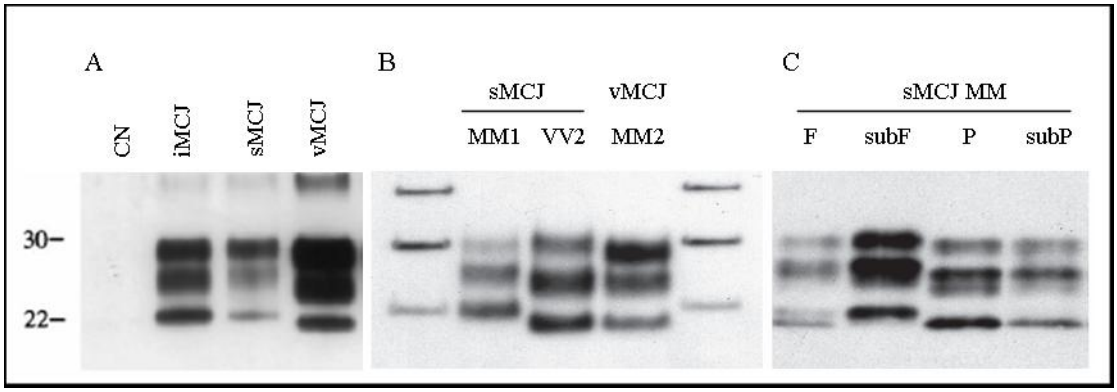


Figure 3 : Typage moléculaire de la PrPres par Western Blot (Anticorps 3F4).

D'après (Ironside et al, 2005; Lasmezas et al, 2001)

A : Profil de la PrPres dans différentes formes de MCJ. CN : contrôle non MCJ, iMCJ : MCJ iatrogène (Hormone de croissance), sMCJ : MCJ sporadique, vMCJ : MCJ variant.

B : Profil de la PrPres dans différentes formes sporadiques de MCJ comparée à celui retrouvé pour le vMCJ. M : méthionine , V : valine, correspond au polymorphisme du codon 129. 1 et 2 : type 1 et 2 de la PrPres. Marqueurs de poids moléculaire : 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa respectivement de haut en bas.

C : Coexistence de différents types de PrPres dans un cas sporadique de MCJ homozygote méthionine pour le codon 129 du gène PRNP. F : cortex frontal, présence de la PrPres de types 1 et 2 ; subF : cortex préfrontal, PrPres de type 1 ; P : cortex pariétal, PrPres de type 2 ; subP : cortex subpariétal, PrPres de type 2.

Ces données biochimiques de typage, combinées avec des critères génétiques (polymorphisme du codon 129 du gène *PRNP*) et neuropathologiques ont permis d'élaborer des classifications, régulièrement actualisées, qui semblent mieux correspondre à la diversité de la MCJ que la classification historique basée sur des critères uniquement cliniques (Collinge et al, 1996; Hill et al, 2003; Parchi et al, 1996; Parchi et al, 1999b). La classification la plus utilisée est celle de Parchi *et al*, dont les principales caractéristiques sont reprises dans le Tableau 4.

.

Phénotype (codon 129/type de PrPsc)	Proportion des cas (%)	Durée de la maladie (mois)	Caractéristiques cliniques	Caractéristiques neuropathologiques
MM1 ou MV1	70	3,9	Démence progressive rapide, myoclonies, EEG typique, détérioration visuelle	Prépondérance dans le cortex occipital et marquage synaptique ; dans 1/3 des cas, vacuoles confluentes et marquage périvacuolaire
VV2	16	6,5	Ataxie au début, démence tardive, pas d'EEG typique dans la plupart des cas	Prépondérance subcorticale et dans les noyaux cérébraux, spongiose limitée aux couches profondes ; marquage périneuronal et dépôts focaux
MV2	9	17,1	Ataxie et démence progressive, pas d'EEG typique, évolution longue dans certains cas	Similaire à VV2 avec présence de plaques amyloïdes type kuru dans le cervelet, dépôts focaux
MM2-thalamique	2	15,6	Insomnie et hyperactivité psychomotrice, ataxie, détérioration cognitive, pas d'EEG typique	Atrophie au niveau du thalamus et de l'olive inférieure ; spongiose absente ou focale ; la PrPsc est détectée en plus faible quantité que dans les autres variants
MM2-cortical	2	15,7	Démence progressive, pas d'EEG typique	Larges vacuoles confluentes avec marquage périvacuolaire dans tout le cortex. Cervelet peu touché
VV1	1	15,3	Démence progressive, pas d'EEG typique	Atteinte sévère du cortex et du striatum ; pas de vacuoles confluentes et marquage de type synaptique

Tableau 4 : Caractéristiques moléculaires et phénotypes clinico-pathologiques des cas sporadiques de MCJ selon Parchi et al (Parchi *et al* 1996).

Il est à noter que de nombreuses études ont montré la coexistence chez un même patient de plusieurs types de PrPsc, soit dans la même zone anatomique, soit dans des zones cérébrales différentes. Ce phénomène est rapporté à la fois pour des patients homozygotes ou hétérozygotes pour le codon 129 et dans les formes sporadiques, et étonnamment aussi dans le vMCJ (Head et al, 2004a; Notari et al, 2007; Polymenidou et al, 2005; Puoti et al, 1999; Schoch et al, 2006; Yull et al, 2006).

De nombreux facteurs peuvent influencer le typage moléculaire, dont notamment la concentration en ions cuivre, la présence d'EDTA, le pH de l'homogénat tissulaire. Il a été en effet observé un changement du site de clivage de la PK pour la protéine en fonction de la concentration en ions métalliques dans l'échantillon (Wadsworth et al, 1999). Il est probable que, selon les conditions de concentration d'EDTA, la conformation de la PrPsc varie, les sites de clivages deviennent identiques entre les différentes souches de PrPsc et les différences de migration électrophorétique entre les types de PrPres peuvent même alors s'annuler (Notari et al, 2004). Ces variations de migration électrophorétique sont aussi observées si le pH de l'échantillon varie, car cela entraîne entre autre une modification de l'affinité de la PrP pour les ions métalliques (Zanusso et al, 2001). Le résultat du typage moléculaire apparaît donc comme extrêmement sensible aux conditions opératoires. La tendance actuelle s'oriente vers la proposition de classifications qui tiennent plus particulièrement compte de cette variabilité des capacités de digestion de la PK (Notari et al, 2007; Uro-Coste et al, 2008). Néanmoins, les résultats obtenus par sept laboratoires différents sur un même panel d'échantillons anonymes dans des conditions opératoires identiques ont montré que dans ces circonstances, le typage moléculaire est bien comparable d'un laboratoire à un autre (Parchi et al, 2008).

Malgré les difficultés de standardisation expérimentale et l'absence de consensus entre les équipes pour la classification des cas, le typage moléculaire apparaît comme une technique alternative et complémentaire aux études de transmissions animales pour la caractérisation des souches.

3.5 Stratégies d'amélioration pour détecter la protéine prion hors tissu cérébral

Actuellement, les techniques proposées permettent uniquement la détection de la PrPsc dans les amygdales de patients en cas de suspicion de vMCJ (Hill et al, 1999).

3.5.1 Interactions avec des ligands spécifiques

La découverte d'interactions entre la PrPsc et différents ligands a entraîné le développement de tests basés sur une extraction / purification sélective avant une détection par des techniques plus classiques. Il s'agit notamment du plasminogène, d'aptamers d'acides

nucléiques, de l'apolipoprotéine B ou encore de polymères anioniques (Fischer et al, 2000; Lane et al, 2003; Safar et al, 2006; Sayer et al, 2004).

Une autre piste proposée concerne l'amélioration de la précipitation de la PrPsc à partir d'un homogénat tissulaire par l'utilisation de streptomycine (Moussa et al, 2006). Cette molécule, grâce à ses groupements ammonium et guanidine, interagit via des liaisons électrostatiques avec différents acides aminés d'une même ou de plusieurs molécule de PrP. Après traitement PK, il se forme des agrégats multimériques de complexes [PrPres – Streptomycine] qu'il est possible de séparer sélectivement des autres composants du milieu par une simple centrifugation. La formation de ces complexes n'altère en rien la réactivité des sites antigéniques vis-à-vis des anticorps monoclonaux anti-prion, permettant la détection par un Western Blot. Dans une étude réalisée à partir de PrPsc extraite de cerveau de hamster surchargée dans différents liquides biologiques, cette technique a permis un gain de sensibilité important par rapport aux contrôles sans streptomycine (Dong et al, 2007). La précipitation par la streptomycine n'est cependant pas sélective de la forme pathologique, même si elle semble avoir plus d'affinité pour la PrPsc que pour la PrPc. L'étape de traitement PK est donc nécessaire pour discriminer les isoformes de PrP en Western Blot. Dans une étude sur des homogénats de cerveau et de rate de souris, cette technique semblerait toutefois détecter la PrPres à des dilutions jusqu'à mille fois plus faibles que par une méthode d'ultracentrifugation classique (Leclere et al, 2008). Le profil obtenu n'est cependant pas caractéristique de la PrPres pour ces dilutions.

3.5.2 Alternatives au traitement par la protéinase K

La difficulté principale du traitement par la PK est la juste détermination de la quantité nécessaire à la destruction de l'ensemble de la forme cellulaire tout en conservant la plus grande fraction possible de la forme pathologique. En effet, le concept de résistance de la PrPsc est une propriété qui s'avère être finalement relative, une partie de la PrPsc étant sensible à l'action de la PK (Gambetti et al, 2008; Pastrana et al, 2006; Safar et al, 1998). L'étude de la sédimentation sur gradient de sucrose en présence de détergents a montré que la PrPsc de la tremblante du mouton se répartit en différentes fractions dont les moins denses contiennent des agrégats de petite taille (moins de 20 molécules de PrP, soit une masse d'environ 600 kDa). Ces oligomères, contrairement aux polymères de grosse taille beaucoup plus denses, sont sensibles à l'action de la PK (Pastrana et al, 2006; Tzaban et al, 2002). Ces

données suggèrent qu'il existe des agrégats de PrPsc de taille hétérogène et que la structure quaternaire influence la sensibilité à l'action de la PK. Sous certaines conditions et probablement de façon variable selon la souche de PrPsc, le traitement PK peut alors diminuer fortement la sensibilité de la détection, voire même entraîner des résultats faussement négatifs. Pour s'affranchir de cet écueil, différentes équipes soit proposent d'utiliser d'autres modes de dégradation de la PrPc, soit développent des outils ou des techniques spécifiques de la PrPsc.

Une première option concerne un traitement par de la guanidine suivi d'une extraction par un mélange phénol / chloroforme, sans traitement PK (Bastian et al, 2005). L'étape d'immunorévélation fait intervenir un anticorps non spécifique de la forme pathologique. Pour différencier les patients atteints de MCJ des témoins, les auteurs mettent en avant la différence des profils de migration obtenus entre les cas positifs et les cas négatifs par technique Western Blot. Ils relèvent en effet la présence de plusieurs bandes de faible poids moléculaire apparent (inférieur à 27 kDa) ainsi qu'une bande majoritaire à 27 kDa. Dans les cas négatifs, la bande majoritaire se situe à 38 kDa et les bandes inférieures à 27 kDa sont absentes.

Une équipe a récemment remplacé l'étape PK par une étape de traitement par la thermolysine (Owen et al, 2007). La thermolysine est une protéase thermostable dont le site de clivage se situe dans des zones riches en acides aminés hydrophobes, tels que la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la valine, l'alanine ou la méthionine. Pour la PrP, les premiers acides aminés impliqués du côté N-terminal sont la méthionine en position 112 et la valine en 115. Dans sa conformation pathologique, et contrairement à la forme cellulaire, ces acides aminés ne sont pas accessibles rendant alors l'action de la thermolysine impossible. La PrPsc après traitement par la thermolysine conserve donc la totalité de sa structure, contrairement au traitement PK qui entraîne l'élimination d'une séquence N-terminale. Sur une souche de PrPsc murine (RML), le traitement par 100 µg/ml de thermolysine 1h00 à 70°C permet la dégradation complète de la PrPc et conserve la fraction de PrPsc sensible à la PK (Cronier et al, 2008).

Dans des conditions dénaturantes, une équipe a montré qu'il existe une différence de réactivité entre les deux formes de PrP vis-à-vis d'un anticorps monoclonal (Safar et al, 1998). Cette propriété est à la base d'un test immunométrique dépendant de la conformation

ou CDI. Dans une étude comparant les différents tests disponibles avec des échantillons identiques, la sensibilité du CDI s'avère être équivalente à celle du Western Blot pour des homogénats de cerveau. En revanche, pour des échantillons dilués dans du plasma, une version optimisée du test s'avère être cette fois 50 à 100 fois plus élevée (Minor et al, 2004).

Une autre possibilité pour s'affranchir de l'étape de traitement par la PK consiste en la reconnaissance spécifique de la conformation de la forme pathologique par l'anticorps utilisé dans le test diagnostic. Parmi la diversité des anticorps monoclonaux disponibles, peu d'entre eux sont dits « conformationnels ». Il s'agit notamment du 15B3 (Korth et al, 1997), d'un anticorps dirigé contre un motif très accessible de la PrPsc (Tyr-Tyr-Arg) (Paramithiotis et al, 2003), du V5B2 spécifique d'un fragment C-terminal de la PrPsc (Curin Serbec et al, 2004) et du P1:1 dirigé contre une séquence d'acides aminés centrale 106-126 (Jones et al, 2008). Ces anticorps présentent toutefois une affinité qui s'avère moins bonne à l'usage qu'espéré lors de leur production. Par ailleurs, certains anticorps non spécifiques de la PrPsc semblent finalement être capables de la précipiter assez sélectivement (Morel et al, 2004).

3.5.3 Amplification *in vitro* de la PrPsc

Une méthode originale d'amplification *in vitro* de la PrPsc a été proposée sur un modèle proche de la PCR pour les acides nucléiques. Le principe repose sur l'amplification cyclique et exponentielle de la PrPsc aux dépends de la forme cellulaire présente dans l'échantillon. Cette technique est baptisée PMCA pour « Protein Misfolding Cyclic Amplification » (Saborio et al, 2001). Lors de l'incubation d'un très large excès de PrPc en présence de faible quantité de PrPsc, il se produit une transformation de la forme cellulaire en forme pathologique, cette dernière lui imposant sa conformation. Les agrégats ainsi formés sont ensuite dissociés par des ultrasons entraînant la dissémination dans l'échantillon de petits noyaux de PrPsc néoformée. De proche en proche, ce phénomène se renouvelle au cours des cycles successifs incubation / dissociation aboutissant à la fin du processus à la disparition quasi-totale de la PrPc. Cette PrPsc néoformée présente les mêmes propriétés biochimiques et structurales que la souche initiale amplifiée, y compris son caractère infectieux (Castilla et al, 2005a). Il ne peut cependant être totalement exclu, pour cette expérience, que d'infimes traces de PrPsc initiales ne soient responsables de la transmission de la maladie.

Lors des premiers essais, l'amplification s'est avérée très dépendante du nombre de cycles et des conditions opératoires : température, pH, présence de cofacteurs cellulaires, ratio PrPc/PrPsc, taille des agrégats… et atteignait une augmentation de l'ordre de 10 à 50 fois (Piening et al, 2005; Saborio et al, 2001; Supattapone, 2004). Ces conditions opératoires délicates doivent aussi être adaptées aux différentes espèces étudiées. Appliquée au tissu cérébral, cette technique a permis la mise en évidence de PrPres chez des animaux pré-symptomatiques quatre semaines avant les techniques classiques (Soto et al, 2005). Par ailleurs, cette étude montre pour la première fois qu'il est possible d'appliquer la PMCA à des échantillons d'origine humaine avec de l'homogénat de cerveau de la même espèce comme source de PrPc. Depuis, l'amplification de PrPsc de vMCJ par PMCA a été possible en utilisant comme substrat de la PrPc de souris transgéniques humaines, surtout si elles sont homozygotes MM pour le codon 129 du gène *PRNP* ou encore d'origine plaquettaire humaine (Jones et al, 2007). La barrière d'espèce apparaît comme un point critique dans le processus d'amplification *in vitro*. Mais deux études très récentes sont parvenues à dépasser ce principe. La première après modification des proportions habituelles entre PrPc et PrPsc a montré qu'il est possible d'amplifier une souche de PrPsc de hamster (263K) avec comme substrat de la PrPc murine. De plus, cette PrPsc néoformée d'origine de hamster est infectieuse pour les souris (Castilla et al, 2008). Dans la deuxième étude, une souche de prions de souris (RML) a été amplifiée avec comme substrat de la PrPc de souris transgénique exprimant la PrP des cervidés (Tg(CerPrP)). L'inoculation de cet extrait est infectieux pour ces souris, avec des caractéristiques comparable à celles obtenues habituellement après adaptation de la souche RML par des passages successifs (Green et al, 2008).

Suite aux premiers essais, l'optimisation et surtout l'automatisation de la technique ont permis de multiplier le nombre de cycles réalisables, jusqu'à atteindre une augmentation de sensibilité évaluée à 10 millions de fois (Castilla et al, 2005b).

Une des difficultés d'utilisation de la PMCA en diagnostic de routine concerne l'origine biologique de la PrPc nécessaire à l'amplification de la PrPsc de l'échantillon. Un moyen de s'affranchir de ce problème serait l'utilisation de PrPc recombinante. Cette étape a été récemment franchie, l'utilisation de PrP recombinante de hamster ayant été utilisée comme substrat avec succès pour amplifier de la PrPsc d'homogénats de cerveau de hamster inoculés par une souche de scrapie (Atarashi et al, 2007). Cette adaptation de la PMCA, dénommée rPrP-PMCA, présente aussi l'avantage d'être plus rapide (72h environ, contre 3

semaines en moyenne). Une récente simplification, dénommée QUIC – PMCA, a été apportée par le remplacement de la sonication par des agitations régulières du milieu réactionnel et des augmentations de température (Atarashi et al, 2008).

Cependant, lors d'un autre cycle de PMCA réalisé à partir d'un mélange de PrPc purifiée en présence d'une quantité déterminée d'ARN poly-Adénylés mais dépourvu de PrPsc, il a été possible de générer une forme de PrPsc d'environ 28 kDa, qui s'est avérée être infectieuse chez l'animal (Deleault et al, 2007). En absence de ces ARN, la seule présence de PrPc purifiée n'a pas permis de reproduire cette nouvelle forme infectieuse. En revanche, lorsque les cycles de PMCA sont réalisés avec comme source de PrPc un homogénat de tissu cérébral, et non de la PrPc purifiée, aucune forme de PrPsc n'est détectable (Castilla et al, 2008).

Dans le contexte du diagnostic humain, l'intérêt de la PMCA réside dans ses capacités à pouvoir détecter des quantités extrêmement faibles de PrPsc dans différents tissus ou liquides biologiques. Néanmoins, en regard des récentes évolutions techniques, la question de l'origine exacte de la PrPsc détectée doit être résolue.

3.5.4 Amplification du signal

Une première stratégie originale est basée sur la combinaison d'un test immunométrique de type sandwich avec un couple d'anticorps associé à une amplification de l'antigène (PrPsc) et du signal. Ce test, dénommé Am – A – FACTT, se déroule en trois étapes. Il est d'abord réalisé une amplification de la PrPsc par une technique dérivée de la PMCA, puis une étape de capture spécifique des agrégats de PrPsc grâce à un sandwich d'un même anticorps monoclonal utilisé à la fois en capture et en révélation, et enfin un système d'amplification du signal par fluorescence (Chang et al, 2007). Ce test a permis la détection chez des souris, avant la survenue des signes cliniques (au 35ème jour post infection après inoculation par voie intra péritonéale), de PrPsc dans le cerveau de souris (100%) ainsi que dans le sang de 50% des animaux.

Une seconde stratégie d'amplification du signal consiste à mettre en œuvre une technique d'immuno-PCR. Cette technique associe la spécificité de la détection par un anticorps monoclonal à la sensibilité élevée du principe de PCR quantitative (Sano et al,

1992). Le déroulement du test est identique à celui d'un test type ELISA excepté pour l'anticorps de révélation qui est couplé à un oligonucléotide amplifié au cours des cycles de PCR et révélé par fluorescence. L'adaptation de cette technique à la détection de la PrPsc a permis d'augmenter la sensibilité d'environ dix fois par rapport à l'ELISA de référence de l'étude, portant la limite de détection à 750 pg/ml (Gofflot et al, 2005; Gofflot et al, 2004). Après avoir optimisé différents paramètres, une autre équipe a réussi à améliorer la sensibilité de cette technique pour atteindre une limite de détection de l'ordre de 70-700 fg / ml, qui s'avère être de 10^5 à 10^6 fois supérieure à celle de l'ELISA de référence de l'étude (Barletta et al, 2005).

3.5.5 Détection dans les tissus périphériques et les liquides biologiques

Concernant les tissus périphériques, différents protocoles ont été proposés pour atteindre un niveau de sensibilité suffisant vis-à-vis de la détection de la PrPsc. Il s'agit notamment d'une centrifugation à 21000g à +4°C (Lee et al, 2000), une précipitation des tissus à l'acide phosphotungstique (Head et al, 2004b; Wadsworth et al, 2001) ou d'un cryobroyage suivi d'une ultracentrifugation en milieu détergent (Favereaux et al, 2004).

A l'heure actuelle, les techniques utilisées pour la détection de la PrPsc dans le tissus cérébral ou les tissus périphériques manquent de sensibilité ou ne sont pas applicables tels quels au diagnostic de routine dans les liquides biologiques et notamment le sang. La complexité du milieu et la très faible quantité de PrPsc rendent la mise au point difficile. Néanmoins, le développement des techniques d'amplification de la PrPsc type PMCA ainsi que la combinaison de plusieurs principes pour augmenter la sensibilité à chaque étape du test semblent prometteurs.

La technique la plus ancienne proposée pour la recherche dans le sang a été appliquée chez des moutons atteints de tremblante. Il s'agit d'une méthode d'électrophorèse capillaire avec détection en fluorescence précédée d'une étape de concentration. Elle a permis la détection de très faible quantité de PrPsc dans le sang de moutons atteints de tremblante (Schmerr et al, 1999). Cette technique s'avère cependant peu robuste et peu discriminante sur des grandes séries (Everest et al, 2007). Chez le hamster, le gain de sensibilité obtenu par l'automatisation de la PMCA a permis la détection de PrPsc dans le sang d'animaux symptomatiques infectés par une souche de tremblante, puis dans le sang d'animaux pré-

symptomatiques (Castilla et al, 2005b; Saa et al, 2006). Cette technique a aussi été employée pour la détection de PrPsc dans les urines de hamster symptomatiques (Gonzalez-Romero et al, 2008). Une technique de PMCA modifiée a été mise en œuvre avec succès pour la détection de la PrPsc à partir d'échantillons de LCR de hamster atteints de scrapie, en utilisant comme substrat de la PrP recombinante (Atarashi et al, 2007; Atarashi et al, 2008).

Une autre technique proposée pour les liquides biologiques est le test conformationnel CDI qui a permis de détecter de la PrPsc dans certaines fractions lipidiques de patients atteints de MCJ sporadiques (Safar et al, 2007). Très récemment, ce test a permis de détecter la PrPsc dans les fèces de souris inoculées par voie orale avec une souche murine (Safar et al, 2008). La détection d'agrégats de PrPsc grâce à un sandwich d'anticorps reconnaissant le même épitope combiné a plusieurs étapes d'amplification (Am – A – FACTT) a montré une sensibilité proche de celle nécessaire à la détection dans le sang (Chang et al, 2007).

Enfin, chez l'homme, un prototype de test immunométrique intégrant une étape de concentration par la streptomycine a été proposé pour la détection de la PrPsc dans les liquides biologiques humains. Les premières évaluations sur plasmas humains ont permis la détection d'un signal différentiel pour 9 patients sur 10 atteints de MCJ, vis-à-vis de témoins non porteurs d'EST (donneurs de sang) (Perron et al, 2005).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont des maladies neurodégénératives d'issue toujours fatale. Le diagnostic de certitude est basé sur la détection de la forme pathologique de la protéine prion dans le tissu cérébral. Le diagnostic pré-mortem repose sur un faisceau d'arguments cliniques, paracliniques et biologiques. La mise en évidence de la protéine 14.3.3 dans le liquide céphalo-rachidien est un marqueur reconnu de cette stratégie diagnostique.

L'objectif de ce travail est de développer des outils susceptibles de parvenir à détecter la PrPsc dans les tissus périphériques afin d'affirmer le diagnostic d'EST du vivant du patient.

La première partie de notre travail consiste principalement à faire le bilan sur l'utilisation de la protéine 14.3.3 dans le LCR dans le cadre du diagnostic de probabilité depuis son introduction en 1997 dans notre laboratoire. En complément, nous faisons la première évaluation sur l'introduction dans notre laboratoire de marqueurs supplémentaires susceptibles d'améliorer soit la sensibilité soit la spécificité du diagnostic en complément de la protéine 14.3.3. Notons que pour ces derniers marqueurs (i.e aldolase et néoptérine), il n'y a aucune évaluation disponible dans la littérature.

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à chercher la présence de la PrPsc dans un tissu périphérique accessible et susceptible d'être prélevé lors d'une biopsie. Notre choix s'est porté sur les nerfs périphériques. Dans ce but, la technique de routine du laboratoire utilisée pour la détection de la PrPsc cérébrale a été modifiée, particulièrement l'étape d'homogénéisation tissulaire, et adaptée aux particularités de ce tissu.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons abordé la question de l'amélioration de la sensibilité des techniques, particulièrement en cas de faible quantité de tissus disponibles. Nous avons alors validé l'efficacité de la précipitation de la PrPres par un ligand original, la streptomycine, sur du tissu cérébral puis démontré sa capacité à être utilisée sur le tissu lymphoïde.

PREMIERE PARTIE

PERFORMANCE DIAGNOSTIQUE DE LA PROTEINE 14.3.3 DANS LE LCR :

BILAN DE L'EXPERIENCE DE NOTRE LABORATOIRE (1997 – 2008) ET INTERET DE L'ASSOCIATION DE L'ALDOLASE ET LA NEOPTERINE

1. PATIENTS ET METHODOLOGIE

1.1 Cohorte des patients retenus pour l'étude

Tous les cas retenus ont fait l'objet d'un diagnostic de certitude conformément aux critères de diagnostic du réseau européen de surveillance des maladies à prions EURO – NEURO CJD de 2003 (Annexe 1). Nous avons repris l'ensemble des 325 cas de patients ayant bénéficié d'une autopsie pour confirmation du diagnostic sur tissu cérébral entre juin 1997 et le 30 septembre 2008. Pour la majorité des cas, l'autopsie a été réalisée à Lyon ; cependant un cinquième de ces autopsies a été réalisé à Marseille alors que un peu de moins de 10 % à Besançon. De manière ponctuelle, nous retrouvons Saint Etienne (3 cas), Clermont-Ferrand (3 cas) et Lille (2 cas). Pour 320 cas, l'analyse biochimique de la PrPsc a été réalisée dans notre laboratoire de Biologie de l'Hôpital Neurologique de Lyon, devenu Service de Neurobiologie en mars 2007. Parmi eux, seuls ceux qui avaient bénéficié d'une recherche de protéine 14.3.3 dans notre laboratoire ont été retenus. Dans tous les autres cas, positifs ou négatifs, l'absence d'analyse des marqueurs LCR réalisée à Lyon a été le critère d'exclusion du dossier pour cette étude.

Au total, on retient pour l'étude 197 patients, dont 123 cas dits « positifs » lorsque l'EST est confirmée et 74 cas dits « négatifs » lorsque l'EST est infirmée par l'analyse du tissu cérébral.

1.2 Méthodes d'analyses des différents paramètres biologiques étudiés

La recherche de la PrPres par technique biochimique (western blot) a été réalisée dans le cadre du diagnostic au laboratoire de Neurobiologie depuis juin 1999, date d'ouverture du laboratoire P3 dédié aux maladies à prions, jusqu'en septembre 2008. Cette analyse moléculaire a été effectuée sur tissu cérébral recueilli soit après autopsie dans au moins trois zones différentes, classiquement le cortex préfrontal, le striatum (noyau caudé) et le cortex cérébelleux soit lors de biopsies frontales. En fonction de la présentation clinique, d'autres zones cérébrales ont pu être expertisées. Les tissus ont été congelés à -80°C avant analyse. La technique utilisée pour extraire la PrPres comporte une étape d'ultracentrifugation en milieu détergent (Brown et al, 1986; Madec et al, 1998) détaillée en annexe 2.

Les analyses neuropathologiques ont été réalisées principalement au laboratoire de neuropathologie de l'Hôpital P. Wertheimer (Pr. Kopp) puis dans le service d'Anatomie Cyto

Pathologique du Groupement Hospitalier Est (Pr Thivollet-Bejui); quelques cas ont été caractérisés à Marseille (Pr Pellissier), Strasbourg et Besançon (Pr. Mohr et Dr. Viennet), Saint Etienne (Pr. Mosnier), Clermont-Ferrand (Pr. Khemeny) et Lille (Dr. Maurage).

Pour l'ensemble des patients, le LCR a été prélevé dans un contexte de diagnostic différentiel des EST. Les dosages ont été réalisés au fur et à mesure de l'arrivée des prélèvements au laboratoire, dans un contexte de routine. A côté de la protéine 14.3.3, nous avons introduit de manière prospective et en systématique les dosages de la néoptérine, ceci dès 1997, et de l'aldolase en 1999. Ainsi, le bilan standard de diagnostic pour les EST réalisé dans notre laboratoire de Neurobiologie comporte trois marqueurs : la protéine 14.3.3, la néoptérine et l'aldolase. La recherche de protéine 14.3.3 est réalisée par Western Blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'ensemble des isoformes de la protéine suivi d'une révélation colorimétrique (Annexe 3). En cela, notre technique diffère de la plupart des autres partenaires français du Réseau National de Surveillance de la MCJ qui utilisent une révélation par chimiluminescence. La néoptérine est dosée par fluorescence après séparation par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Annexe 4). L'activité enzymatique de l'aldolase totale est dosée avec un kit commercial automatisé (Randox) par réaction enzymatique et détection UV (Annexe 5). Pour certains patients, des analyses répétées de LCR ont été réalisées et prises en compte. Parmi les autres critères disponibles pour ces patients, la protéinorachie ainsi que le nombre de leucocytes quand ils étaient connus ont été relevés.

Le polymorphisme du codon 129 est réalisé par une technique de PCR – RFLP au laboratoire de Neurobiologie ; l'analyse génétique de la partie codante du gène PRNP est réalisée par dHPLC (chromatographie liquide haute performance en conditions dénaturante) à Paris à l'Hôpital Lariboisière , Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire (Pr Laplanche).

Le nombre des données disponibles par étiologie est résumé dans le Tableau 5.

	EST confirmée	EST exclue
Nombre de cas testés post-mortem sur la période 06/97 – 09/2008	175	145
Cas retenus pour l'étude	123	74
Protéine 14.3.3	123/123	74/74
Aldolase UI/L	95/123	63/74
Néoptérine nM	112/123	73/74
Protéinorachie g/L	113/123	72/74
Leucocytes / mm3	61/123	25/74
Polymorphisme du codon 129	120/123	31/74

Tableau 5 : Données biologiques disponibles pour les cas retenus dans l'étude.

1.3 Analyse statistique des données

Les statistiques descriptives, d'analyses de normalité (test de Kolmogorov – Smirnov) ainsi que les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) et les tests non paramétriques (Test U de Mann-Whitney) ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS, version 12 (The Apache Software foundation). Un risque à 5 % ($p<0.05$) a été considéré comme significatif.

2. RESULTATS

2.1 Caractéristiques générales de la population étudiée

L'ensemble des caractéristiques de la cohorte est détaillé en annexe 6, les données relatives à chaque patient sont détaillées en annexe 7.

Il existe une différence significative de moyenne d'âge des deux populations étudiées (test de Mann et Whitney, $U = 3370$, $p= 0.007$). Cela s'explique par le fait que de nombreuses autopsies ont été motivées par une suspicion de vMCJ, impliquant des patients plus jeunes que la moyenne d'âge des cas sporadiques. Notre population d'EST est, au contraire, principalement composée de patients atteints de cas sporadiques. Pour cela, l'analyse de la sensibilité dans les cas sporadiques sera étudiée en fonction d'une population témoin appariée en âge (témoins de plus de 40 ans).

Parmi les 123 cas retenus comme « positifs », on dénombre 89 cas sporadiques, 20 cas génétiques, 6 cas iatrogènes et 6 cas vMCJ. Dans les formes génétiques, on retrouve 12 mutations E200K, 4 mutations D178N réparties en deux MCJ et deux IFF, 2 mutations V210I, 1 mutation V203I et 1 cas de mutation entraînant une forme GSS. On dénombre 66 hommes (53,7 %) pour 57 femmes (46,3 %). Les 74 cas confirmés « négatifs » vis-à-vis du diagnostic d'EST regroupent principalement des pathologies neurodégénératives (33 cas) et des encéphalites infectieuses, inflammatoires ou ischémiques (20 cas). L'analyse neuropathologique n'a pas permis de déterminer un autre diagnostic dans les 21 autres cas. Dans cette population, on dénombre 35 hommes (47,3 %) pour 39 femmes (52,7 %).

Concernant le polymorphisme du codon 129, les patients atteints d'EST sont majoritairement MM (60 %) alors que la population contrôle est majoritairement MV (64,5 %). Cette surreprésentation MM est aussi présente dans le groupe des cas sporadiques MCJ (58,7 %). L'analyse moléculaire de la PrPres montre un majorité forte de type 1 : 68,6 % des cas toutes étiologies confondues, et 71,3 % des cas sporadiques.

2.2 Bilan biochimique du LCR non spécifique des EST

La Figure 4 présente la répartition du dosage de la protéinorachie ainsi que la numération leucocytaire pour les deux groupes de la population étudiée.

Le test de Kolmogorov – Smirnov indique que la protéinorachie et la numération leucocytaire suivent une répartition selon la loi Normale ($p > 0,05$), mais selon le test de Levene les variances sont inégales (test de Levene, $p < 0.001$). Nous avons donc utilisé le test non paramétrique U de Mann – Whitney.

Il n'y a pas de différence significative entre les deux populations pour la protéinorachie (test U, $p=0,088$). Pour ce paramètre, il est à noter que selon les recommandations de l'HAS, une protéinorachie supérieure à 1 g/L entraîne un risque de faux positif et il est recommandé de répéter le test (HAS, 2007a). Malgré cela, la tendance dégagée entre les deux groupes est dans le sens d'une protéinorachie plus élevée pour le groupe témoins que pour le groupe atteint d'EST (Figure 4a).

A contrario, le test U de Mann Whitney montre qu'il existe une différence significative pour la numération leucocytaire (p=0,04) (Figure 4b). Dans la population témoin, la numération leucocytaire présente une moyenne plus élevée que dans le groupe atteint d'EST.

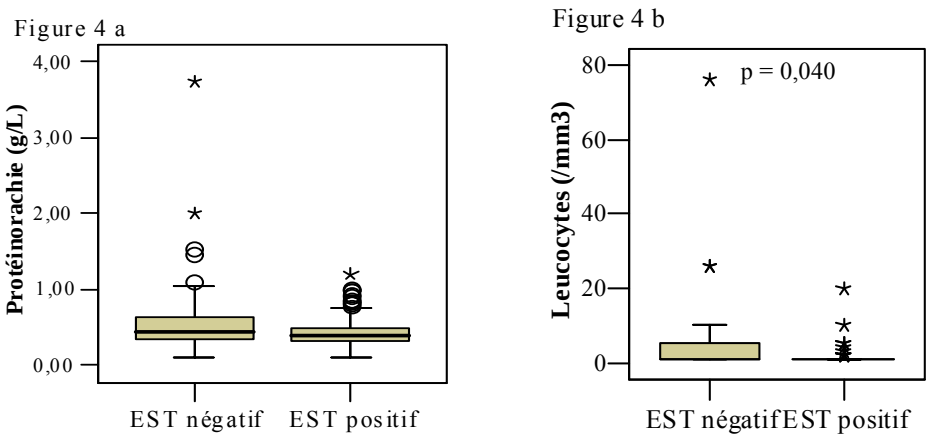


Figure 4 : Répartition de la protéinorachie (a) et de la numération leucocytaire (b) dans le LCR entre le groupe atteint d'EST et le groupe témoin.

2.3 Protéine 14.3.3 : critères analytiques en fonction des groupes de population

2.3.1 Spécificité et sensibilité pour la population globale

La spécificité représente l'incidence des résultats négatifs dans la population non malade. On la calcule donc de la façon suivante : nombre de vrais négatifs (VN) par rapport à la totalité des non malades, c'est-à-dire la somme des VN et des faux positifs (FP). La sensibilité représente l'incidence des résultats positifs dans la population atteinte de la maladie. Elle est donc calculée par le rapport du nombre de vrais positifs (VP) en fonction de l'ensemble des malades, c'est-à-dire la somme des VP et des faux négatifs (FN).

La valeur prédictive positive (VPP) d'un test correspond au risque d'attribuer un résultat positif à un patient sain. La valeur prédictive négative (VPN) correspond au risque d'attribuer un résultat négatif à un patient malade. Le calcul de ces deux grandeurs se fait de la façon suivante : VPP = VP / (VP + FP), VPN = VN / (VN + FN).

L'efficacité d'un test correspond au pourcentage de résultats correctement attribués par rapport à l'ensemble des dosages réalisés. On la calcule de la façon suivante : e = (VP + VN) / Effectif total (%).

La mise en évidence de la protéine 14.3.3 est réalisée par une technique de Western Blot semi quantitative avec laquelle on obtient trois catégories de résultats : négatif, positif ou douteux lorsqu'un signal très faible, proche du seuil de détection est observé. Du fait du caractère non quantitatif de la technique, ces résultats douteux sont difficiles à interpréter. Pour l'analyse statistique, trois stratégies sont choisies : exclure les résultats douteux, les considérer comme négatifs ou encore les considérer comme positifs. **Nous avons utilisé les résultats obtenus en cas de suspicion de MCJ lors de la première ponction lombaire, pour laquelle soit un diagnostic possible, probable ou encore une suspicion pouvait être posé.**

Les résultats obtenus après analyse de la première ponction de LCR pour l'ensemble de notre cohorte sont résumés dans le Tableau 6.

	EST négatif	**EST positif**	**Total**
Résultats bruts obtenus			
P14.3.3 négative	35 (VN)	18 (FN)	53
P14.3.3 positive	24 (FP)	92 (VP)	116
P14.3.3 douteuse	15	13	28
Douteux comme négatifs			
P14.3.3 négative	50 (VN)	31 (FN)	81
P14.3.3 positive	24 (FP)	92 (VP)	116
Douteux comme positifs			
P14.3.3 négative	35 (VN)	18 (FN)	53
P14.3.3 positive	39 (FP)	105 (VP)	144
Total	74	123	197

Tableau 6 : Résultats de la mise en évidence de la protéine 14.3.3 sur la première ponction de LCR pour l'ensemble de la population étudiée.

Si on calcule la sensibilité et la spécificité en excluant les résultats douteux, on obtient respectivement 79,3 % et 45,3 %. L'effectif global est alors sensiblement diminué par la perte de 28 cas, soit 14,2 % de l'effectif total. Du fait de la diminution importante de l'effectif total avec cette approche, nous ne l'utiliserons pas pour la suite de notre étude.

A titre d'information, si on considère les cas douteux comme négatifs, l'effectif recalculé pour chaque groupe est le suivant : 50 VN, 31 FN, 24 FP et 92 VP. La sensibilité est alors de 74,8 % et la spécificité de 67,6 %. La VPP est alors de 79,3 % et la VPN de 61,7 %.

Si on considère les cas douteux comme positifs, les nouveaux effectifs sont les suivants : 35 VN, 18 FN, 39 FP, 105 VP. La sensibilité et la spécificité sont alors respectivement de 85,4 % et 47,3 %. La VPP est de 72,9 % pour une VPN à 66%.

Ces résultats sont présentés dans le tableau en annexe 8.

2.3.2 Spécificité et sensibilité pour le sous-groupe MCJ sporadique

Le sous-groupe le plus important parmi les cas positifs d'EST est représenté par la forme sporadique de MCJ (89 cas pour 123 cas positifs). Dans ce groupe, on dénombre 75 résultats positifs, 7 résultats négatifs et 7 résultats douteux. Ces résultats sont résumés dans le tableau de l'annexe 8. En appliquant les deux stratégies retenues précédemment, et tout d'abord en considérant les résultats douteux comme négatifs, la sensibilité est de 84,3 % pour une spécificité de 67,6 % (inchangée). En ne considérant comme groupe témoin pour les cas sMCJ uniquement les témoins de plus de 40 ans, alors 9 cas sont exclus (2 cas douteux, 2 cas négatifs et 5 cas positifs). La spécificité est alors de 70,7 % (46/65). Si on considère les douteux comme positifs, la sensibilité est alors de 92 % pour une spécificité inchangée de 47,3 %. Si on utilise dans le groupe témoin uniquement les patients EST négatifs de plus de 40 ans, la spécificité est alors de 50,7 % (33/65).

A l'intérieur du groupe sMCJ, il est possible de reclasser les cas en fonction du type de PrPres et du polymorphisme du codon 129 (classification de Parchi *et al*). Le Tableau 7 illustre les résultats de recherche de protéine 14.3.3 par sous-type de cas sporadique, en considérant les douteux comme négatifs ou comme positifs. On observe une variation de la sensibilité en fonction du sous-type : elle est globalement plus faible pour les hétérozygotes

pour le polymorphisme du codon 129, et plus particulièrement dans les cas MV2, indépendamment du classement des résultats douteux. Dans les cas MM1, les plus représentés, au contraire, la sensibilité est excellente (95,8 %).

	MM1	**MM1/2**	**MM2**	**MV1**	**MV1/2**	**MV2**	**VV1**	**VV2**
Effectif (%)	48 (56)	1 (1,2)	2 (2,3)	10 (11,6)	4 (4,6)	7 (8,1)	4 (4,6)	10 (11,6)
P14.3.3								
Douteux	2			2	1	2		
Négative			1	2	2	2		
Positive	46	1	1	6	1	3	4	10
Douteux → négatif								
Négative	2		1	4	3	4		
Positive	46	1	1	6	1	3	4	10
Sensibilité	95,8 %	100 %	50 %	60 %	25 %	42,9 %	100 %	100 %
Spécificité	70,7 % (46/65)							
Douteux → positif								
Négative				2	2	2		
Positive	48	1	2	8	2	5	4	10
Sensibilité	100 %	100 %	100 %	80 %	100%	71,4 %	100 %	100 %
Spécificité	50,7 % (33/65)							
Collins *et al*	91 %	80%	61 %	86 %	67 %	71 %	90 %	95 %
Sanchez-Juan *et al*	92 % 129/140		78 % 7/9	91 % 10/11		65 % 20/31	100 % 6/6	90 % 27/30
Castellani *et al*	94 % 45/48		70 % 7/10	100 % 3/3		57 % 4/7	100 % 3/3	84 % 16/19
Gmitterova *et al*	100 % 20/20		75 % 3/4	89 % 8/9		89 % 16/18	100 % 5/5	100 % 14/14

Tableau 7 : Sensibilité de la mise en évidence de la protéine 14.3.3 dans le LCR pour les patients sMCJ en fonction du typage moléculaire de la PrPres et du polymorphisme du codon 129.

D'après Colins *et al* 2006, Sanchez-Juan *et al* 2006, Castellani *et al* 2004, Gmitterova *et al* 2008. Les effectifs par sous-types de sMCJ ne sont pas détaillés par Collins *et al*.

2.3.3 Sensibilité pour les autres sous-groupes d'EST

Dans les formes acquises, la mise en évidence de la protéine 14.3.3 est négative dans 4 cas, douteuse dans 5 cas et positive pour 5 cas. La sensibilité est alors de 35,7 % si les douteux sont considérés comme négatifs et de 71,4 % si les douteux sont considérés comme positifs. Dans le cas particulier du vMCJ, on relève 2 cas négatifs, 3 cas douteux et 1 seul cas positif. La sensibilité est alors de 16,6 % (1 cas sur 6) si les douteux sont considérés comme négatifs ou 66,6 % si les douteux sont considérés comme positifs (4 cas sur 6). En utilisant la première stratégie, pour les cas liés à l'hormone de croissance, la sensibilité est de 33,3 % (2 cas sur 6) ou de 66,6 % dans la seconde stratégie (4 cas sur 6). Pour les deux cas de greffe de dure-mère, la mise en évidence de la protéine 14.3.3 a été positive. Les effectifs sont cependant trop faibles pour être généralisable à l'ensemble de ce sous-groupe iatrogène.

Dans les formes génétiques, la recherche de protéine 14.3.3 est positive dans 12 cas, négative dans 7 cas et douteuse dans 1 cas. La sensibilité est alors de 60 % (12 cas sur 20) ou de 65 % (13 cas sur 20) selon si le résultat douteux est considéré comme négatif ou positif. La mutation majoritairement représentée est la mutation E200K (12 cas sur 20). On relève pour ce groupe 8 résultats positifs, 3 cas négatifs et 1 cas douteux pour la protéine 14.3.3. En fonction des deux stratégies précédemment utilisées, la sensibilité est de 66,6 % (8 cas sur 12) ou de 75 % (9 cas sur 12) si le résultat douteux est considéré comme négatif ou positif respectivement. Les effectifs des autres mutations sont trop faibles pour que les résultats soient significatifs de ces sous-groupes de population. La positivité de la protéine 14.3.3 ne semble cependant pas être la règle.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau de l'annexe 8.

2.3.4 Evolution de la sensibilité et de la spécificité lors de ponctions répétées

Pour 45 patients, dont 28 cas EST positifs sur 123 et 17 cas EST négatifs sur 74, la ponction a été répétée au cours de l'évolution de la maladie.

Parmi les patients non EST, 7 résultats douteux, 4 résultats négatifs et 6 résultats positifs ont été contrôlés. Les résultats de la seconde ponction sont les suivants : 1 résultat douteux, 7 résultats négatifs et 9 résultats positifs. Pour les patients atteints d'EST, les 28 prélèvements contrôlés comprenaient 7 résultats douteux, 12 résultats négatifs et 9 résultats

positifs. Les résultats de la seconde ponction sont les suivants : 19 cas positifs, 7 cas négatifs et 2 cas douteux. Aucun des 9 cas contrôlés avec une protéine 14.3.3 positive sur le premier prélèvement n'a changé de catégorie. Pour les 7 cas sMCJ ayant un résultat négatifs lors de la première ponction, 3 sont restés négatifs, 3 sont devenus positifs et 1 est devenu douteux sur du deuxième prélèvement. Les 3 cas sMCJ qui avaient un résultat de recherche de protéine 14.3.3 douteuse à la première ponction ont vu la recherche devenir positive.

L'évolution des résultats obtenus entre les deux prélèvements est présentée, par groupe étiologique, dans le Tableau 8.

	Résultats de P1433 de la 1ère ponction	**Résultats de P1433 de la 2ème ponction**		
Etiologie	Ponction 1	douteux	négative	positive
Douteux				
GH	1			1
gMCJ	1			1
sMCJ	3			3
vMCJ	2	1		1
EST Neg	7	1	1	5
Total douteux ponction 1	14	2	1	11
Négative				
GH	1		1	
gMCJ	3		2	1
sMCJ	7	1	3	3
vMCJ	1		1	
EST Neg	4		4	
Total négative ponction 1	16	1	11	4
Positive				
DM	1			1
gMCJ	3			3
sMCJ	5			5
EST Neg	6		2	4
Total positive ponction 1	15	0	2	13
Total effectif ponction 2	45	3	14	28

Tableau 8 : Cinétique de la mise en évidence de la protéine 14.3.3 lors de ponctions répétées au cours de l'évolution de la maladie.

Dans cette population de 45 cas, au vu des résultats de la première ponction, la sensibilité est de 32,1 % (9/28) et la spécificité est de 23,5 % (4/17). Après la seconde ponction, la sensibilité s'améliore nettement à 67,8 % (19/28) et la spécificité s'élève à 41,2 % (7/17).

Calculées pour l'ensemble de la population, la sensibilité et la spécificité s'élèvent suite à ce contrôle à 82,9 % (vs 74,8 % si une seule ponction) et 63,5 % (vs 67,6 % si une seule ponction) respectivement si les douteux sont considérés comme négatifs et 89,4 % (vs 85,4 %) et 51,4 % (47,3 %) si les douteux sont considérés comme positifs.

En détaillant par étiologie dans les EST, la sensibilité pour les formes sporadiques s'élève à 91 % (81/89) contre 84,3 % si une seule ponction est réalisée et 96,6 % (86/89) contre 92 % si une seule ponction est réalisée, si les douteux sont classés respectivement comme négatifs ou comme positifs. Dans le groupe contrôle non atteint de plus de 40 ans, 14 des premiers résultats ont été contrôlés sur un second prélèvement : on recense cette fois au total 8 résultats douteux, 36 résultats négatifs et 21 résultats positifs. La spécificité est alors de 67,6 % (44/65) ou de 55,4 % si les douteux sont considérés comme négatifs ou positifs respectivement.

Dans le cas des vMCJ, 3 ont été contrôlés, 1 est restée douteuse, 1 est restée négative et une douteuse est devenue positive. La sensibilité varie alors uniquement dans l'hypothèse où le douteux est considéré comme négatif avec 33,3 % (2/6).

L'ensemble des résultats statistiques calculés est résumé dans le tableau de l'annexe 8.

2.4 Bilan de l'apport des dosages d'aldolase et de la néoptérine

La Figure 5 présente la répartition des dosages d'aldolase et de néoptérine dans le LCR pour les deux groupes de la population étudiée.

Le test de Kolmogorov – Smirnov indique que les dosages d'activité enzymatique d'aldolase et de la concentration en néoptérine ne suivent pas une répartition selon la loi

Normale (p< 0,001). Nous avons donc utilisé le test U de Mann – Whitney pour tester l'hypothèse d'une différence entre les deux populations étudiées.

Pour les deux marqueurs, on observe une différence significative de la moyenne entre les deux populations (p<0.001). On observe dans la population EST positive des concentrations de néoptérine plus faibles que dans la population EST négative et des activités enzymatiques d'aldolase plus élevés que dans la population EST négative.

Malgré la différence significative, il existe un net chevauchement des valeurs entre les deux populations, limitant l'intérêt de doser chacun des marqueurs isolément.

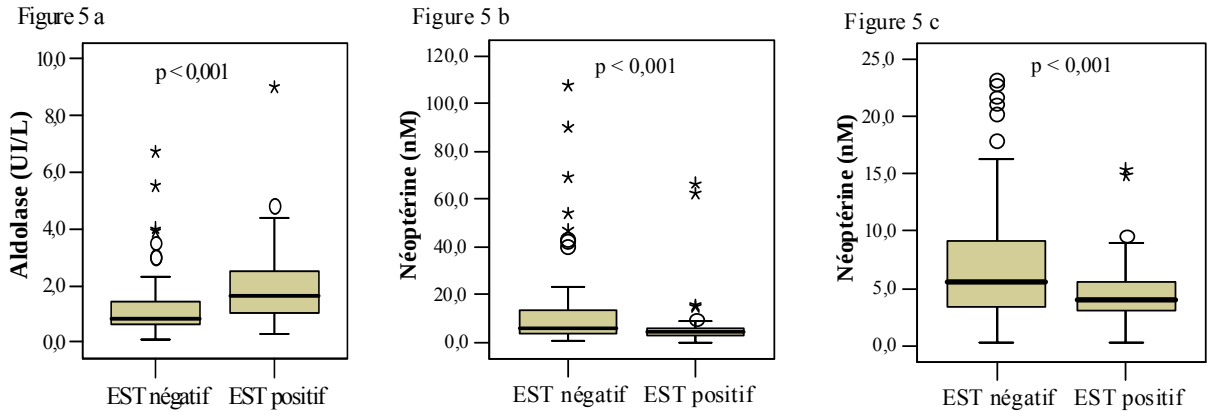


Figure 5 : Répartition des dosages d'aldolase (a) et de néoptérine (b et c) entre le groupe atteint d'EST et le groupe témoin (c : agrandissement de la zone 0 – 25 nM pour la néoptérine)

2.4.1 Apport de la néoptérine sur la spécificité de la protéine 14.3.3

Dans l'effectif total étudié, on recense 185 patients associant à la fois un résultat de néoptérine et une recherche de protéine 14.3.3. Ils sont répartis en 112 cas EST positifs et 73 cas EST négatifs.

La spécificité de la recherche de la protéine 14.3.3 dans la population générale n'est que de 47,3 %. Or, il existe une différence significative du dosage de néoptérine entre les deux populations, les résultats sont plus élevés dans la population exempte d'EST. Nous faisons l'hypothèse que si ce dosage de néoptérine était supérieur à un certain seuil, il permettrait d'exclure le diagnostic d'EST lorsque le résultat de protéine 14.3.3 est positif. Le

résultat de protéine 14.3.3 pourrait alors être assimilé à un résultat négatif. Trois seuils de néoptérine ont été étudiés dans cette hypothèse : 20 nM, 15 nM et 10 nM. Les résultats douteux de protéine 14.3.3 sont considérés comme positifs.

Pour le seuil de néoptérine supérieure ou égal à 20 nM, 13 patients ont une recherche de protéine 14.3.3 positive dont 11 patients non EST et 2 patients dans le groupe des EST. Les nouveaux effectifs recalculés sont présentés dans le Tableau 9. La sensibilité passe alors de 84,8 % (95 cas pour 112 au total) à 83,1 % pour une spécificité qui augmente nettement de 46,6 % (34/73) à 61,6 %. La VPN est alors à 70,3 % et la VPP à 76,9 %. L'efficacité du test est alors de 74,6 % (contre 69,7 % sans tenir compte de la néoptérine).

Pour un seuil de néoptérine à 15 nM, un patient EST positif et deux patients non EST supplémentaires changent de catégorie. La sensibilité est alors de 82,1 % pour une spécificité de 64,4 %. La VPN est de 70,2 % pour une VPP à 78 %. L'efficacité est alors de 75,1 %.

Pour un seuil de néoptérine à 10 nM, un patient atteint d'EST et cinq patients non EST supplémentaires changent de catégorie par rapport au seuil à 15 nM. La sensibilité est alors de 81,3 % et la spécificité est de 71,2 %. La VPN est de 71,2 % pour une VPP à 81,3 %. L'efficacité est alors de 77,3 %.

	EST négatif	EST positif	Sensibilité	Spécificité	VPN	VPP	Efficacité
P14.3.3 négative	34 (VN)	17 (FN)	84,8 %	46,6 %	66,6 %	70,9 %	69,7 %
P14.3.3 positive	39 (FP)	95 (VP)	(95/112)	(34/73)	(34/51)	(95/134)	(129/185)
Seuil néoptérine > 20 nM							
P14.3.3 négative	34 +11 = 45 (VN)	17 + 2 = 19 (FN)	83,1 %	61,6 %	70,3 %	76,9 %	74,6 %
P14.3.3 positive	39 – 11 = 28 (FP)	95 – 2 = 93 (VP)	(93/112)	(45/73)	(45/64)	(93/121)	(138/185)
Seuil néoptérine > 15 nM							
P14.3.3 négative	34 + 13 = 47 (VN)	17 + 3 = 20 (FN)	82, 1 %	64,4 %	70,2 %	78 %	75,1 %
P14.3.3 positive	39 – 13 = 26 (FP)	95 – 3 = 92 (VP)	(92/112)	(47/73)	(47/67)	(92/118)	(139/185)
Seuil néoptérine > 10 nM							
P14.3.3 négative	34 + 18 = 52 (VN)	17 + 4 = 21 (FN)	81,3 %	71,2 %	71,2 %	81,3 %	77,3 %
P14.3.3 positive	39 – 18 = 21 (FP)	95 – 4 = 91 (VP)	(91/112)	(52/73)	(52/73)	(91/112)	(143/185)

Tableau 9 : Variation des effectifs et des critères analytiques de la protéine 14.3.3 après la première ponction en fonction du seuil de néoptérine.

Les résultats de P14.3.3 douteux sont considérés comme positifs.

2.4.2 Apport de l'aldolase sur la sensibilité de la protéine 14.3.3

D'après le test U de Mann-Whitney, il existe une différence significative du dosage de l'aldolase entre les deux populations. Néanmoins, le chevauchement des valeurs demeure important.

La réalisation de courbes ROC permet d'étudier les valeurs seuils discriminants les patients positifs des patients négatifs, pour une spécificité et une sensibilité données. La valeur usuelle de l'activité enzymatique de l'aldolase est inférieure à 0,40 UI/L dans le LCR pour une population sans atteinte neurologique.

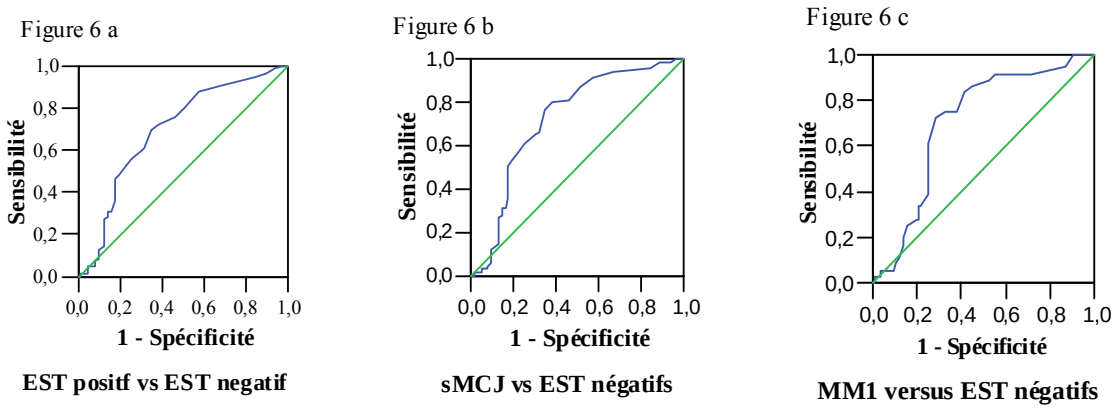


Figure 6 : Courbes ROC pour l'aldolase.

Figure 6a : ensemble des patients EST, figure 6b : patients sMCJ, figure 6c : patients sporadiques MM1

Quand on compare l'ensemble des patients EST positifs à l'ensemble des négatifs (Figure 6a), une spécificité comparable à celle de la protéine 14.3.3, soit 47 % environ, est obtenue pour un seuil d'aldolase de 0,80 UI/L. La sensibilité est alors d'environ 85 %. Il n'y a pas d'amélioration par rapport à la recherche de protéine 14.3.3 (sensibilité de 85,4 %).

Pour les cas sMCJ (Figure 6b), une spécificité d'environ 50 % est atteinte pour un seuil de 0,85 UI/L, on a alors une sensibilité de 87 %. Cette dernière est alors moins élevée que pour la protéine 14.3.3 dans cette population (92 %). Une sensibilité à 92 % est obtenue pour l'aldolase au seuil de 0,75 UI/L. La spécificité n'est plus alors que de 43 % environ. Il n'y a donc pas d'amélioration par rapport à la protéine 14.3.3.

Pour le sous-type de sMCJ MM1 (Figure 6c), une sensibilité de 96 % est atteinte pour un seuil de 0,55 UI/L. la spécificité est alors très faible, à seulement 13 %.

Dans les sous-types de sMCJ, on n'observe pas de différences significatives des moyennes selon le polymorphisme du codon 129 (Figure 7a). Néanmoins, la tendance pour les patients hétérozygotes au codon 129 semble être une activité enzymatique globalement plus faible que chez les patients homozygotes, comme pour la protéine 14.3.3. Il n'y a pas non plus de différence significative selon le type de PrPres, sauf pour le type 2b où la moyenne est plus faible que pour les types 1 et 2a (Figure 7b).

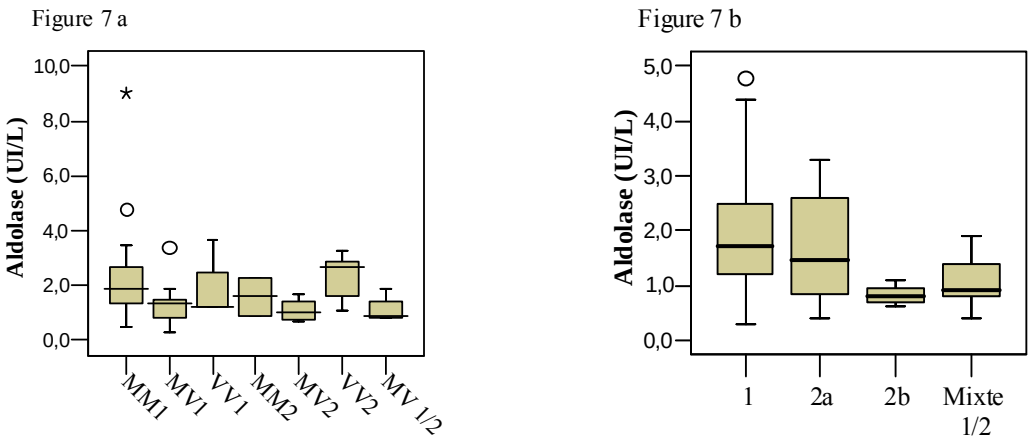


Figure 7: répartition de l'aldolase en fonction de la combinaison du polymorphisme du codon 129 et du type de PrPres (a) ou du type de la PrPres uniquement (b)

3. DISCUSSION

La sensibilité d'un dosage correspond au risque pour le clinicien de ne pas classer comme malade un patient réellement atteint de la maladie recherchée. La spécificité est au contraire le risque de classer comme malade un sujet sain. En pratique quotidienne, le clinicien se pose la question de l'interprétation d'un résultat négatif ou positif, ce qui revient la plupart du temps à parler de VPP : quel est le risque pour un résultat positif de considérer comme malade un patient sain, et de VPN : quel est le risque pour un résultat négatif d'exclure la maladie chez un patient malade.

Un des inconvénients de la recherche de la protéine 14.3.3 par Western Blot est le caractère semi quantitatif de la technique utilisée et par conséquent l'existence d'une catégorie de résultats « douteux », intermédiaires entre le « positif » et le « négatif ». Une autre difficulté dans l'interprétation de cette recherche réside dans la non spécificité de la protéine 14.3.3 vis-à-vis des EST, de nombreuses autres causes pouvant être responsables de sa présence dans le LCR (Bahl et al, 2008; Hsich et al, 1996).

Pour exploiter les résultats de notre étude et décrire les performances analytiques de la recherche de protéine 14.3.3 dans le cadre du diagnostic d'EST du vivant du patient, nous pourrions considérer les douteux soit comme positifs, soit comme négatifs ou encore être un critère d'exclusion des patients de la cohorte étudiée. Dans la mesure où tous les patients inclus dans notre étude ont été caractérisés de façon définitive sur le plan du diagnostic de certitude vis-à-vis des EST, l'exclusion de ces cas diminuait de façon significative (14,2 %) notre cohorte. Nous avons donc décidé de les considérer soit comme négatifs, soit comme positifs.

En choisissant de les classer comme négatifs, la spécificité de la recherche de la protéine 14.3.3 est de 67,6 % pour une sensibilité de 74,8 % pour l'ensemble des étiologies d'EST. Cette sensibilité est très variable selon l'étiologie d'EST puisqu'elle varie de seulement 16,6 % dans les cas vMCJ à 84,3 % pour les formes sMCJ. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Sanchez-Juan *et al* qui a choisi ce mode de classification des résultats douteux (Sanchez-Juan et al, 2006). Ces données sont notamment comparables pour les cas sporadiques qui constituent notre plus important sous-groupe (85 %). Pour les

formes génétiques, la sensibilité globale tend à s'approcher des formes sporadiques, même si elle s'avère être variable en fonction de l'anomalie génétique et la plus élevée, 66,6 %, dans la mutation la plus fréquente (E200K). Dans ce choix de classification, la VPN est de seulement 61,7 %, ce qui signifie que de nombreux cas positifs ne sont pas détectés. La VPP est de 79,3 % et représente le risque que le résultat positif soit attribué à un patient malade. Comme elle est assez faible, cela peut déclencher pour le clinicien la demande d'autopsie pour confirmation du diagnostic.

Dans notre pratique courante, le résultat douteux n'est pas considéré comme négatif mais au contraire il alerte le clinicien sur une éventuelle EST débutante. Du fait du caractère particulier lié au problème de santé publique des EST, on préfère considérer ce résultat douteux comme plutôt positif jusqu'à ce qu'il soit confirmé ou infirmé. Il est alors interprété en fonction des autres évènements intercurrents lors du prélèvement de LCR qui pourraient être responsable d'un phénomène de libération de protéine 14.3.3 non spécifiquement relié à une EST.

La spécificité dans la stratégie où les résultats douteux sont considérés comme positifs ne s'élève qu'à 47,3 %, ce qui est très faible et très sensiblement inférieur à la première option (67,6 %). Cela reflète sans doute un biais dans la sélection des cas non EST de notre étude. Pour pouvoir classer correctement les résultats de protéine 14.3.3, nous avons choisi de n'inclure que les cas confirmés positifs ou négatifs sur tissu cérébral. Hors, sur la totalité de dans notre cohorte témoin, seuls 35 cas présentaient une recherche de protéine 14.3.3 initialement négative. Lors de la répétition de la ponction pour suivre la cinétique de la présence de la protéine 14.3.3, 6 cas sur les 7 douteux sont retrouvés douteux ou positifs et sur les 6 cas positifs ayant bénéficiés d'un deuxième prélèvement, 4 restent positifs. Ces résultats douteux ou positifs associés à des signes cliniques laissant un doute sur le diagnostic d'EST ont certainement motivé la réalisation de l'autopsie par les cliniciens pour obtenir un diagnostic de certitude. L'analyse du tissu cérébral obtenu lors des autopsies a montré pour la plupart de ces patients qu'ils souffraient de pathologies inflammatoires, infectieuses ou ischémiques, causes qui ont été reliées à la positivité de la recherche de la protéine 14.3.3 (Hsich et al, 1996; Sanchez-Juan et al, 2006). Notre cohorte de témoins négatifs n'est donc pas représentative des diagnostics définitifs de l'ensemble des cas de suspicion d'EST reçus au laboratoire. Il serait donc intéressant d'évaluer la spécificité de la recherche de protéine

14.3.3 vis-à-vis de l'ensemble des LCR analysés au laboratoire pour lesquels le diagnostic définitif d'EST a été exclu.

Dans cette stratégie où les résultats douteux sont considérés comme positifs, la sensibilité est meilleure puisqu'elle s'élève à 85,4 % dans l'ensemble de la cohorte. Là encore, il existe des variations significatives entre les étiologies : de 92 % pour les sMCJ à 66,6 % pour les formes acquises. La sensibilité de la recherche doit donc bien être spécifiée en fonction de l'étiologie envisagée. La VPP est de 72,9 % pour une VPN à 66% ce qui n'est pas très différent de l'hypothèse précédente. Là encore, la faible VPN déclenche pour le clinicien la demande de confirmation diagnostic sur autopsie. Les résultats douteux ont donc été considérés comme positifs pour la suite de l'exploitation des critères analytiques.

Pour les formes sMCJ, la répétition des ponctions améliore nettement la sensibilité, puis qu'elle atteint 96,6 %. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Gmitterova et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2007). La spécificité reste malgré tout faible (55,4 %). Toutefois, on remarque que la sensibilité est variable selon le sous-type de sMCJ. Elle est notamment la plus faible pour les cas MV2, alors qu'elle s'avère être très élevée pour les cas de présentation clinique plus classique MM1 (95,8 % ou 100 % selon le classement des résultats douteux). Ces résultats sont cohérents avec les observations des autres études (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Gmitterova et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2006).

La difficulté dans l'évaluation non seulement de la spécificité, mais aussi de la sensibilité, réside dans le fait que le diagnostic de certitude après autopsie n'est que trop peu souvent réalisé. Le résultat négatif de la recherche de protéine 14.3.3 entraîne généralement une levée de la suspicion d'EST. La confirmation diagnostique après autopsie n'est en définitive que très rarement réalisée dans ce cas, ce qui entraîne une sous-estimation des cas les moins fréquents, qui sont aussi ceux pour lesquels la sensibilité est faible par rapport aux formes les plus représentées. A *contrario*, un résultat positif déclenchera plus souvent l'autopsie, y compris dans le but d'infirmer la suspicion d'EST. On aura alors tendance à surestimer les résultats positifs non reliés à une EST et donc à diminuer la spécificité quand on utilise comme témoins la cohorte confirmée sur autopsie.

L'aldolase est une enzyme de la voie de la glycolyse qui catalyse les réactions entre le fructose 1-6 biphosphate et le glycéraldéhyde phosphate. Elle existe sous trois isoformes,

l'isoforme C étant plus spécifiquement présente dans le tissu cérébral (Thompson et al, 1982). Dans notre étude, l'activité enzymatique de l'aldolase est significativement différente entre les deux populations testées avec néanmoins un chevauchement important. La sensibilité et la spécificité du dosage isolé ne sont pas meilleures que pour la recherche de protéine 14.3.3. L'activité enzymatique de l'aldolase semble tout comme la protéine 14.3.3 être influencée par le polymorphisme du codon 129 et le type de PrPres. Toutefois, couplée à la recherche de protéine 14.3.3 dans notre étude, la mesure de l'activité de l'aldolase ne permet pas d'augmenter la sensibilité ni la spécificité de façon significative. Le choix de doser l'activité enzymatique de l'aldolase dans notre série a été guidé par le fait qu'elle avait été proposée comme un excellent marqueur de lyse neuronale du fait de sa forte présence dans les neurones et les astrocytes (Thompson et al, 1982). De plus, l'existence d'une technique automatisée fait d'elle un marqueur de lyse neuronale dont le résultat était disponible immédiatement, en même temps que la protéinorachie. Un inconvénient réside dans le fait qu'il s'agit d'une technique de mesure de l'activité enzymatique globale de l'ensemble des différentes isoformes, ce qui nous a poussé à l'utiliser dans l'objectif d'un gain global de sensibilité. Un autre inconvénient de ce marqueur est sa mauvaise stabilité de conservation à +4°C ou après congélation à -20°C mais aussi à -80°C (données non présentées). De plus, dans le LCR, une augmentation de l'activité enzymatique de l'isoforme C a été récemment décrite dans les cas sévères de traumatismes crâniens et d'accidents vasculaires cérébraux (Linke et al, 2006). Sa spécificité vis-à-vis des EST ne sera donc pas forcément meilleure que celle de l'activité totale de l'aldolase. Cela limite l'intérêt du développement du marqueur aldolase C.

En revanche, pour améliorer la spécificité du marqueur protéine 14.3.3, le dosage de la néoptérine semble être pertinent. La néoptérine est produite par les macrophages après stimulation par l'interféron γ sécrété par les lymphocytes T, elle représente donc un marqueur de l'activation immunitaire (Huber et al, 1984). Son dosage dans le LCR permet d'évaluer une activation immunitaire intrathécale et sa concentration reflète le degré d'activation des macrophages (Abdulle et al, 2002). Ce dosage est notamment proposé comme marqueur de suivi des complications neurologiques dans les infections liées au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Abdulle et al, 2008; Gisslen et al, 2007). Cette activation immunitaire n'est pas présente dans les EST, la concentration en néoptérine est donc basse dans ce contexte, même s'il est impossible d'exclure la possibilité d'infections combinées en cas de valeur élevée.

En faisant varier la concentration seuil de néoptérine à 10 nM, 15 nM ou 20 nM et en recalculant la sensibilité et la spécificité en fonction des nouveaux effectifs, cette dernière est très sensiblement améliorée. Le meilleur seuil pour la spécificité se situe à 10 nM (spécificité à 71,2 %, contre 46,6 % sans tenir compte de la néoptérine) mais il entraîne une baisse de sensibilité de 3,5 points à 81,3 %. En effet, dans cette stratégie, quatre cas du groupe EST sont exclus par ce seuil et présentent des taux élevés de néoptérine entre 15 nM et 65 nM. Le meilleur compromis pour ne pas perdre trop de patients réellement atteints d'EST semble être un seuil à 20 nM qui permet d'obtenir une sensibilité de 83,1 % pour une spécificité de 61,6 % et une efficacité globale du test de 74,6%.

La néoptérine ne doit donc pas être interprétée seule comme critère d'exclusion, car dans certaines circonstances, l'association d'une EST et d'une autre pathologie présentant une activation macrophagique est bien sûr possible. Interprété en fonction de l'ensemble du contexte clinico-biologique, ce marqueur est très utile dans l'interprétation d'un résultat de protéine 14.3.3 positif.

4. CONCLUSION

La sensibilité de la protéine 14.3.3 dépend du type d'EST et du sous-type de sMCJ. En considérant les résultats douteux comme positifs, la sensibilité augmente, plus de patients sont détectés mais la spécificité diminue. La sensibilité et la spécificité augmentent lorsque la ponction est répétée au cours de l'évolution de la pathologie, et la recherche de protéine 14.3.3 devient plus souvent positive que lors de la première ponction. Dans tous les cas, la spécificité reste faible, et nécessite l'association d'un autre marqueur pour améliorer le diagnostic. Le dosage de la néoptérine dans le LCR permet d'augmenter nettement cette spécificité. Pour un seuil à 20 nM, seuls deux cas positifs sont écartés pour onze cas négatifs exclus. Elle s'avère donc être un bon outil complémentaire dans l'interprétation d'un résultat positif. Cependant, et malgré les réserves relatives à la cohorte de témoins négatifs choisis, la spécificité reste faible, autour de 60 % dans ce cas. La recherche d'un marqueur plus spécifique, tel que la PrPsc à priori, dans les liquides biologiques ou les tissus périphériques serait un moyen d'améliorer le diagnostic.

DEUXIEME PARTIE

DETECTION DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE DANS LES NERFS PERIPHERIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE MCJ SPORADIQUE

Article 1 :

Favereaux, A. **Quadrio, I.** Perret-Liaudet, A. Vital, C. Ouallet, J. C. Brochet, B. Biacabe, A. G. Petry, K. G. Kopp, N. Vital, A.

Prion protein accumulation involving the peripheral nervous system in a sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease

Neuropathol Appl Neurobiol, 2003, Dec; 29(6):602-5.

Résumé de l'article :

La présence de protéine prion dans le tissu nerveux périphérique a été démontrée notamment lors de la transmission expérimentale de la tremblante des petits ruminants. Chez l'homme, cette accumulation n'a été objectivée que dans un cas de syndrome de Gerstmann – Sträussler – Scheinker et un cas sporadique de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). Dans un cas sporadique de MCJ homozygote valine pour le codon 129, nous avons étudié la répartition de la protéine prion pathologique au niveau de différentes zones du tissu cérébral, de la moelle cervicale, des nerfs sciatique et péronier. Ce cas sporadique était une forme d'évolution rapide, le décès intervenant cinq mois après les troubles initiaux. La recherche de protéine 14.3.3 était positive. La protéine prion pathologique résistante (PrPres) à la protéinase K (PK) de type 1 a été mise en évidence dans les différentes zones cérébrales, avec une plus faible intensité au niveau du cortex cérébelleux, ainsi que dans la moelle épinière. Concernant le nerf sciatique et péronier, une forme de protéine prion présentant une sensibilité à la PK différente de la forme cérébrale a été mise en évidence. Cette forme n'a pas été objectivée dans les tissus contrôles. La question principale est de savoir si ces dépôts de PrP sensible à la PK sont liés à un phénotype particulier ou non. Le rôle de cette forme particulière de protéine prion dans la physiopathologie de la maladie pourrait être exploré.

Neuropathology and Applied Neurobiology (2003), **29**, 602–605 doi: 10.1046/j.1365-2990.2003.0495.x

Scientific correspondence

Prion protein accumulation involving the peripheral nervous system in a sporadic case of Creutzfeldt–Jakob disease

Clinical symptoms of peripheral nerve damage have been reported in some patients with either sporadic [2] or hereditary Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) [1,8]. Dysesthesiae and pain in the limbs are also prominent presenting symptoms in the new variant of CJD [10]. Whereas immunohistochemistry permitted consistent demonstration of prion protein (PrP) deposits in the posterior roots in experimental scrapie [4], such deposits were observed only in one Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS) and in one out of nine CJD patients [5]. We report PrP accumulation in the spinal cord and peripheral nervous system (PNS) in a valine homozygous type 1 (VV1) case of sporadic CJD (sCJD).

This 57-year-old woman presented with rapid progression of cognitive impairment, loss of coordination and involuntary movements over 2 months. At clinical examination, the patient was akinetic and unable to stand. She had temporal and spatial disorientation, ideomotor apraxia and akinetic mutism. She presented slight dysmetria in the four limbs with brisk deep tendon reflexes and a bilateral Babinski sign. Clinical tests showed 14-3-3 positive cerebrospinal fluid and an absence of periodic sharp wave complexes on electroencephalography (EEG). No mutations were found in protein prion gene, but the patient was homozygous for valine at codon 129. Magnetic resonance imaging showed signal increase in the left putamen and insular cortex. No brain atrophy was visible. Over the following 3 months, the cognitive functions worsened. She died 5 months after the onset of symptoms.

Autopsy was limited to the brain, spinal cord, sciatic and peroneal nerves. The brain weighted 1170 g. Small fragments of frontal, occipital and cerebellar cortex, spinal cord and peripheral nerves were frozen for Western blot analysis. After fixation in 10% formalin, tissue samples were taken from the frontal, temporal and occipital cerebral cortex, hippocampus, caudate nucleus, putamen, globus pallidus, thalamus, substantia nigra, medulla oblongata, pons, as well as cervical, thoracic and lumbar spinal cord, cauda equina, sciatic and peroneal nerves. Histopathologic examination revealed marked microvacuolar spongiosis in the cerebral cortex, with neuronal loss and astrocytic gliosis. Moderate spongiosis was also present in the molecular layer of hippocampus. The caudate and putamen exhibited marked spongiform change, but this feature was mild in the thalamus. Substantia nigra, cerebellum, pons and medulla oblongata appeared unmodified, as well as spinal cord, sciatic and peroneal nerves. Prion protein immunostaining was performed with 3F4 and 12F10 monoclonal antibodies (1 : 2000) after proteinase K (PK) digestion (20°C, 10 min) and guanidine thiocyanate treatment (4 M, 4°C, 2 h); counterstaining was conducted with Mayer's haemalun. Very faint PrP granular deposits were present in the cerebral cortex but not in the cerebellum. Fine granular staining was found in the spinal cord grey matter, more marked in the posterior horns (Figure 1). This PrP immunoreactivity was seen all along the spinal cord from cervical to lumbar level. Linear deposits were seen in the posterior roots and along nerve fibres of both sciatic and peroneal nerves (Figure 2**A**); both myelinated and unmyelinated nerve fibres appeared to be involved (Figure 2**A** insert). No PrP deposits were seen in control peroneal nerves from autopsy cases without neurological disease (Figure 2**B**).

Frozen specimens of frontal, occipital and cerebellar cortex, as well as spinal cord were homogenized at 10% (w/vol) in a 5% glucose solution. Peripheral nerve homogenates were obtained by impact grinding method in a liquid nitrogen bath resulting in a fine powder of tissue. Homogenates were forced through a 0.5-mm diameter needle before being treated at 37°C for 1 h with 50 μg of PK per 100 mg of tissue. After addition of N-lauroyl sarkosyl (at 10% final concentration), samples were incubated for 15 min at room temperature and then centrifuged at 436 000**g** for 2.5 h on a 10% sucrose cushion. Pellets were finally resuspended in 100 μl of denaturing buffer (SDS 4%, beta mercaptoethanol 2%, glycine 192 mM, Tris 25 mM, sucrose 5%), heated for 10 min at

 © 2003 Blackwell Publishing Ltd

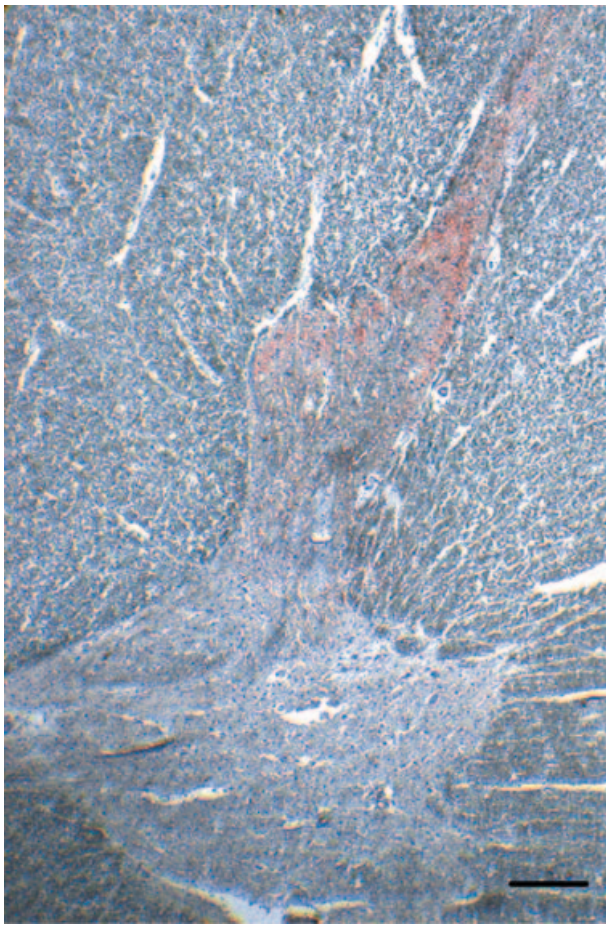


Figure 1. Prion protein immunostaining showing fine granular deposits in the posterior horn of the spinal cord. Scale bar, 0.5 mm.

100°C and centrifuged at 13 000**g** for 10 min at 20°C. After discarding the pellet, supernatant aliquots (equivalent tissue weight range: 0.1–10 mg) were run on SDS-PAGE. Proteins were fractionated on 15% polyacrylamide gels, transferred to PVDF membranes and PrP^{res} was probed with 3F4 anti-PrP antibody (1 : 4000). The signal was revealed after enhanced chemoluminescence. PrP^{res} was detected in frontal, occipital and cerebellar cortex as well as in spinal cord. Lowest amounts of PrP^{res} were detected in cerebellar cortex (Figure 3, lane 3). In all these tested areas, the electrophoretic mobility and the ratio of the three glycosylated PrP^{res} isoforms were consistent with those of PrP^{res} type 1 according to Parchi *et al.* classification [9]. Proteinase K-sensitive PrP accumulation was detected in sciatic and peroneal nerves (Figure 3, lanes 6 and 7, respectively).

There is increasing evidence that the spinal cord and PNS are involved in the pathogenesis of some forms of transmissible spongiform encephalopathies. Prion protein immunoreactivity was reported in the spinal cord from patients with sporadic and growth hormone-associated CJD [3,5], from those with the new variant CJD [6], and from cases of GSS associated with a missense mutation (Pro to Leu) at codon 102 of the PrP gene [5,11]. In our sporadic case, PrP immunoreactivity was seen all along the spinal cord and was more marked in the posterior horns. We confirmed the presence of PrP^{res} in the spinal cord by Western blot analysis. We also observed by immunohistochemistry PrP deposits in posterior roots, sciatic and peroneal nerves. Although PK-sensitive, this PrP accumulated in PNS might be related to the disease as it was not found in control nerves. The pathological significance of protease-sensitive PrP accumulation has previously been pointed out by Ma *et al.* [7]. In a cultured cells and transgenic mice study, the authors found that a form of PrP which accumulated in the cytosol caused cytotoxicity in cell lines and rapidly lethal neurodegeneration in mice. This disease-specific PrP did not acquire protease resistance and could be the result of retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Thus, one could speculate that the PrP deposits found in the PNS specimens from our sCJD case might correspond to such a process.

Another interesting point is that our case fulfils the criteria corresponding to VV1 sCJD in Parchi *et al.* classification [9]. This is a distinct rare variant with a typical phenotype [12]. Our patient presented dementia, and no typical periodic sharp wave complexes on EEG. Histopathological examination showed marked microvacuolar spongiosis in the cerebral cortex and striatum with sparing of brainstem nuclei and cerebellum. Immunohistochemistry revealed very faint synaptic PrP staining in the cerebral cortex. As dementia occurred early, sensory symptoms of peripheral neuropathy may have been missed. Evidence of PrP accumulation in the posterior roots and peripheral nerves raises the question whether this finding is related to the VV1 sCJD uncommon subtype or not. In this respect, similar investigations have to be performed in other sCJD phenotypes.

Acknowledgements

This study is supported by GIS ‘Infections à Prions’ and ‘Réseau National Maladie de Creutzfeldt-Jakob’.

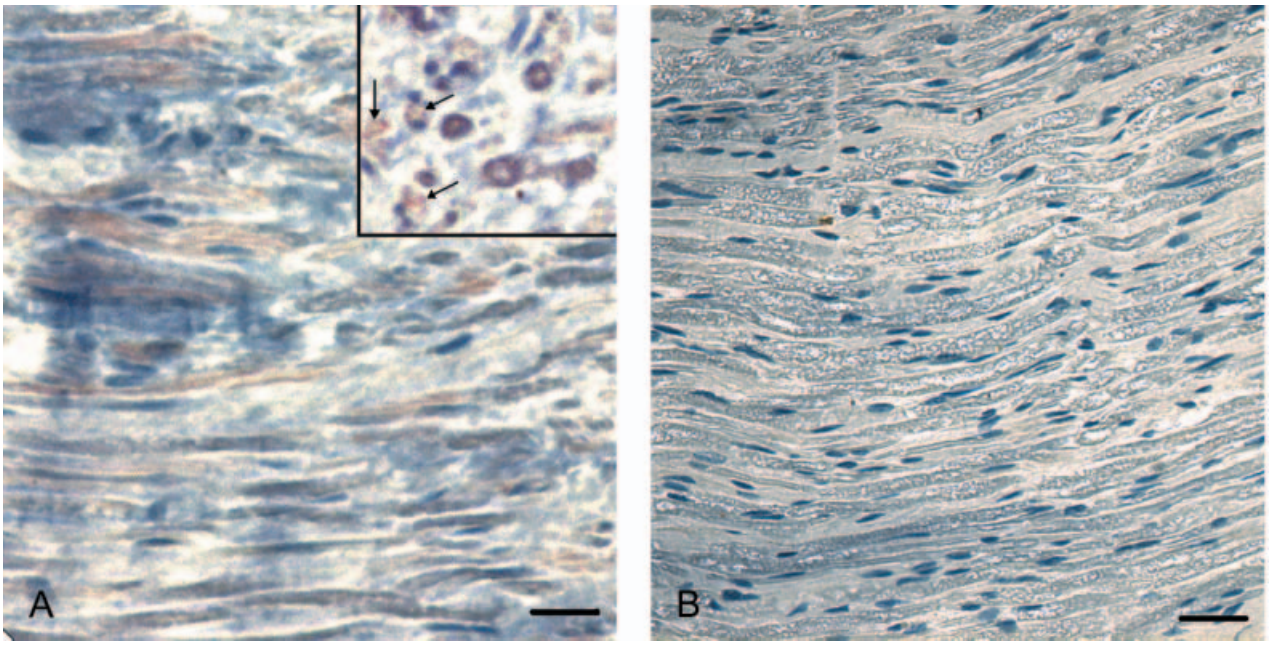


Figure 2. (**A**) Prion protein (PrP) immunostaining of the sciatic nerve: linear deposits are seen along nerve fibres. Insert: transverse section showing deposits in myelinated fibres; unmyelinated fibres are also labelled (arrows). (**B**) Control nerve: no PrP immunostaining is visible. Scale bar (**A**), 40 μm; (**B**), 60 μm.

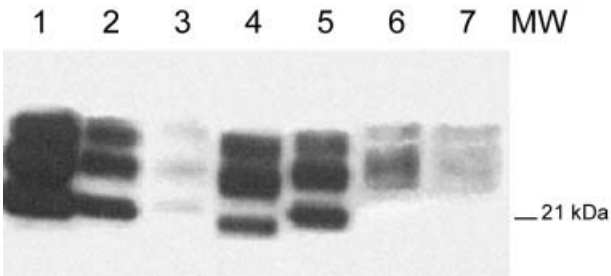


Figure 3. Western blot analysis of Prion protein (PrP) in homogenates of frontal (1), occipital (2) and cerebellar (3) cortex, spinal cord (5), sciatic (6) and peroneal (7) nerves. Type 1 PrP^{res} with molecular weight (MW) of unglycosylated band at 21 kDa is detected in all tested areas except peripheral nerves, where protease K-sensitive PrP is found; type 2 sporadic Creutzfeldt–Jakob disease (4) is used as positive control.

A. Favereaux*
I. Quadrio§
A. Perret-Liaudet§
C. Vital*†
J. C. Ouallet*‡
B. Brochet*‡
A. G. Biacabe§
K. G. Petry*
N. Kopp§
A. Vital*†

**EA 2966, †Neuropathology and ‡Neurology Departments, Victor Segalen University-Bordeaux 2, France, and §Centre de Diagnostic, de Traitement et de Prévention des Maladies à Prions, Neurology and Neurosurgery Hospital, Lyon, France*

References

1 Antoine JC, Laplanche JL, Mosnier JF, Beaudry P, Chatelain J, Michel D. Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology* 1996; **46**: 1123–7

2 Esiri MM, Gordon WI, Collinge J, Patten JS. Peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 1997; **48**: 784

3 Goodbrand IA, Ironside JW, Nicolson D, Bell JE. Prion protein accumulation in the spinal cords of patients with sporadic and growth hormone associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1995; **183**: 127–30

4 Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Hardt M, Hainfellner JA, Budka H. Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol* 1999; **98**: 453–7

5 Hainfellner JA, Budka H. Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* 1999; **98**: 458–60

6 Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG. Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 2000; **37**: 1–9
7 Ma J, Wollmann R, Lindquist S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 2002; **298**: 1781–5
8 Neufeld MY, Josiphov J, Korczyn AD. Demyelinating peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Muscle Nerve* 1992; **15**: 1234–9
9 Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; **46**: 224–33
10 Will RG, Zeidler M, Stewart GE, McLeod MA, Ironside JW, Cousens SN, McKenzie J, Estibeiro K, Green AJ, Knight RS. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000; **47**: 575–82
11 Yamada M, Tomimitsu H, Yokota T, Tomi H, Sunohara N, Mukoyama M, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Okeda R, Matsushita M, Mizusawa H. Involvement of the spinal posterior horn in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (PrP P102L). *Neurology* 1999; **52**: 260–5
12 Worrall B, Herman S, Capellari S, Lynch T, Chin S, Gambetti P, Parchi P. Type 1 protease resistant prion protein and valine homozygosity at codon 129 of *PRNP* identify a subtype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; **67**: 671–4

Received 28 January 2003
Accepted after revision 11 June 2003

Article 2 :

Favereaux, A. **Quadrio, I**. Vital, C. Perret-Liaudet, A. Anne, O. Laplanche, J. L. Petry, K. G. Vital, A.

Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Arch Neurol, 2004 May; 61(5):747-50

Résumé de l'article:

Le rôle du système nerveux périphérique apparaît comme ayant un rôle de plus en plus important dans la physiopathologie des maladies à prions, y compris pour les formes sporadiques. Nous avons recherché chez trois patients atteints de formes sporadiques de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) la protéine prion pathologique (PrPsc) dans le tissu cérébral, la moelle épinière, les ganglions dorsaux, le nerf sciatique et le nerf péronier. Dans tous les cas, nous avons montré l'accumulation de cette protéine dans le tissu cérébral et la corne postérieure de la moelle par immunohistochimie et Western Blot. La PrPsc résistante à l'action de la Protéinase K (PrPres) est de type 1 pour tous les patients, le polymorphisme du codon 129 est homozygote méthionine pour les 2 cas où il était disponible. Pour un des cas, un ganglion de la chaîne dorsale et le nerf péronier présentaient eux aussi une accumulation de cette protéine. Ainsi, nous avons démontré que la PrPres s'accumule dans les nerfs périphériques des cas sporadiques de MCJ. La présence de PrPres pour un seul des trois cas testés pose la question de l'hétérogénéité de l'invasion de ces tissus ou de la sensibilité insuffisante de la détection. Augmenter à la fois la sensibilité de notre technique et la taille de la cohorte est nécessaire pour répondre à ces questions et avant de proposer la biopsie de nerf comme outil diagnostic de la MCJ du vivant du patient.

OBSERVATION

Pathologic Prion Protein Spreading in the Peripheral Nervous System of a Patient With Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease

Alexandre Favereaux, PhD; Isabelle Quadrio, MD; Claude Vital, MD; Armand Perret-Liaudet, MD; Olivier Anne, MD; Jean-Louis Laplanche, MD; Klaus G. Petry, PhD; Anne Vital, MD, PhD

Background: Involvement of the peripheral nervous system in the pathogenesis of prion diseases is becoming increasingly evident. However, pathologic protease-resistant prion protein deposition in the peripheral nerves of patients with Creutzfeldt-Jakob disease has never been demonstrated, to our knowledge.

Objective: To determine whether mutated prion protein accumulation could be shown in the peripheral nervous system of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Design: Autopsy study.

Patients: Three patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Interventions: Study of the brain, spinal cord, and sciatic and superficial peroneal nerves by immunohistochemistry and Western blot analysis.

Main Outcome Measure: Demonstration of protease-resistant prion protein accumulation.

Results: In all cases, protease-resistant prion protein accumulation was found in the brain and posterior horns of the spinal cord. In 1 case, protease-resistant prion protein deposits were also evidenced in the dorsal root ganglia and the superficial peroneal nerve.

Conclusions: Protease-resistant prion protein may be found in the peripheral nervous system of some patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. However, a larger series is required to assess the incidence of peripheral nervous system involvement and to discuss the diagnostic usefulness of peripheral nerve biopsy in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

Arch Neurol. 2004;61:747-750

From Equipe d'Accueil 2966 (Drs Favereaux, C. Vital, Anne, Petry, and A. Vital) and Departments of Neuropathology (Drs C. Vital and A. Vital) and Neurology (Dr Anne), Victor Segalen University, Bordeaux, France; Centre de Diagnostic, de Traitement et de Prévention des Maladies à Prions, Neurology and Neurosurgery Hospital, Lyon, France (Drs Quadrio and Perret-Liaudet); and Biochemistry Department, Centre de Recherche Claude Bernard, Lariboisière Hospital, Paris, France (Dr Laplanche).

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a neurodegenerative disorder in which host cellular prion protein (PrPc) is conformationally changed into protease-resistant isoform (PrPsc).[1] Neuropathologic features are mainly severe neuronal loss and reactive astrocytosis with spongiform change in the cortical and subcortical gray matter. Among the different types of human CJD, sporadic cases account for about 85%.[2] Clinical symptoms of peripheral nerve damage have been reported in some patients with either sporadic[3,4] or hereditary[5,6] CJD. Immunohistochemistry showed prion protein (PrP) accumulation involving the posterior roots in experimental scrapie[7] and in one patient with sporadic CJD.[8] However, pathologic PrPsc deposition in the peripheral nervous system (PNS) of humans has never been confirmed by Western blot analysis, a method that is essential to distinguish PrPsc from PrPc. The aim of this study was to determine whether mutated PrP accumulation could be demonstrated in the PNS of patients with sporadic CJD.

METHODS

CASE MATERIAL

Three autopsy cases of sporadic CJD were studied. Three cases without neurologic disease were taken as negative controls. Clinical and histologic data concerning the sporadic CJD cases are summarized in **Table 1**.

HISTOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Histologic studies and immunohistochemistry were performed on 10% formalin–fixed, paraffin-embedded specimens from frontal, occipital, and cerebellar cortex; spinal cord; dorsal root ganglia; and sciatic and superficial peroneal nerves. Hematoxylin-eosin staining was performed to evaluate spongiosis and neuronal loss. Astrocytic gliosis was studied by anti–glial fibrillary acidic protein immunohisto-

Downloaded from www.archneurol.com at HOPITAL CARDIOLOGIQUE-I 894, on October 15, 2008
©2004 American Medical Association. All rights reserved.

Table 1. Clinical and Histologic Data

Patient No./ Sex/Age, y	14-3-3 Protein	Codon 129	Spongiform Alteration*				
			Cerebral Cortex	Striatum	Cerebellar Cortex	Spinal Cord	Sciatic and Superficial Peroneal Nerve
1/F/82	+	Met/met	++	++	+	–	–
2/M/68	–	NA	+++	+++	+	–	–
3/M/84	+	Met/met	++	+	+	–	–

Abbreviations: MEt, methionine; NA, not available.
*Graded from marked (+++) to absent (–).

Table 2. Results of Immunohistochemistry (IHC) and Western Blot (WB)*

Patient No.	Cerebral Cortex		Cerebellar Cortex		Spinal Cord		Dorsal Root Ganglia		Sciatic Nerve		Superficial Peroneal Nerve	
	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB	IHC	WB
1	+	Sc	++	Sc	++	Sc	+	Sc	–	C	+	Sc
2	+++	Sc	+++	Sc	++	Sc	–	C	–	C	–	C
3	++	Sc	+++	Sc	++	Sc	–	C	–	C	–	C

*Positivity of prion protein immunohistochemistry was graded from marked (+++) to absent (–). Western blot permitted distinction between cellular (C) and scrapie (Sc) isoforms of prion protein.

chemistry. Prion protein labeling was carried out with 3F4 and 12F10 monoclonal antibodies (1:2000) after protease K digestion (20°C, 10 minutes) and guanidine thiocyanate treatment (4M, 4°C, 2 hours); counterstaining was done with Mayer hemalum. To avoid misinterpretation, controls for each anatomic site were performed.

WESTERN BLOT ANALYSIS

Frozen specimens of frontal, occipital, and cerebellar cortex, as well as spinal cord and dorsal root ganglia, were homogenized at 10% (wt/vol) in a 5% glucose solution. Peripheral nerve homogenates were obtained by impact grinding method in a liquid nitrogen bath resulting in a fine powder of tissue. Homogenates were forced through a 0.5-mm-diameter needle before protease K treatment. Protease K digestion and Western blot process were performed as previously described.[9]

RESULTS

Histopathologic examination of the 3 sporadic CJD cases showed marked spongiosis in the brain, whereas the spinal cord, dorsal root ganglia, and peripheral nerves appeared unmodified. In the 3 cases, neuronal loss was marked in the cerebral cortex, mild in the cerebellum, and absent in the spinal cord and the dorsal root ganglia. Gliosis was marked in the cerebral cortex, mild in the cerebellum and the spinal cord, and absent in the dorsal root ganglia.

Results of PrP immunohistochemistry and Western blot analyses are summarized in **Table 2**. In the 3 sporadic CJD cases, PrP immunohistochemistry showed granular deposits in the cerebral cortex as well as in the molecular and granular layers of the cerebellum. In the 3 cases, a fine granular staining was found in the spinal cord gray matter from cervical to lumbar level. This PrP accumulation was more marked in the posterior horns (**Figure 1**A). In the 3 control cases, specimens from the same anatomic sites exhibited no PrP labeling. In case 1, examination of the dorsal root ganglia showed positive PrP immunostaining, distinct from lipofuscin accumulation, along nerve fibers (Figure 1B). Prion protein–positive linear deposits were also present along nerve fibers in the posterior roots and the superficial peroneal nerve (Figure 1C). On transverse sections, these PrP deposits appeared to be likely located in the Schwann cells of both myelinated and unmyelinated fibers (Figure 1C, inset). In this case, no PrP labeling was found on the sciatic nerve.

The PrP immunohistochemistry was negative in the PNS specimens from control cases (Figure 1D), confirming that the PrP labeling observed in case 1 was not a background staining.

In all sporadic CJD cases, Western blot analysis demonstrated that the PrP immunoreactivity observed on the brain and spinal cord paraffin sections was related to protease K–resistant PrP (PrPsc) accumulation (Table 2 and **Figure 2**). Brain and spinal cord specimens from control cases contained physiologic protease K–sensitive PrP (PrPc) (Table 2). In case 1, Western blot analysis confirmed that the PrP immunostaining observed in the spinal ganglia and the superficial peroneal nerve corresponded to PrPsc deposits (**Figure 3**), whereas PNS specimens from cases 2 and 3, as well as controls, contained PrPc (Figure 3). In accordance with immunohistochemistry findings, PrPc was detected in the sciatic nerve in case 1. For all the patients with sporadic CJD and in all tested areas, the electrophoretic mobility and the ratio of the 3 glycosylated PrPsc isoforms were consistent with PrPsc type 1 according to classification by Parchi et al.[10]

COMMENT

Involvement of both central nervous system and PNS in the pathogenesis of transmissible spongiform encepha-

Downloaded from www.archneurol.com at HOPITAL CARDIOLOGIQUE-I 894, on October 15, 2008
©2004 American Medical Association. All rights reserved.

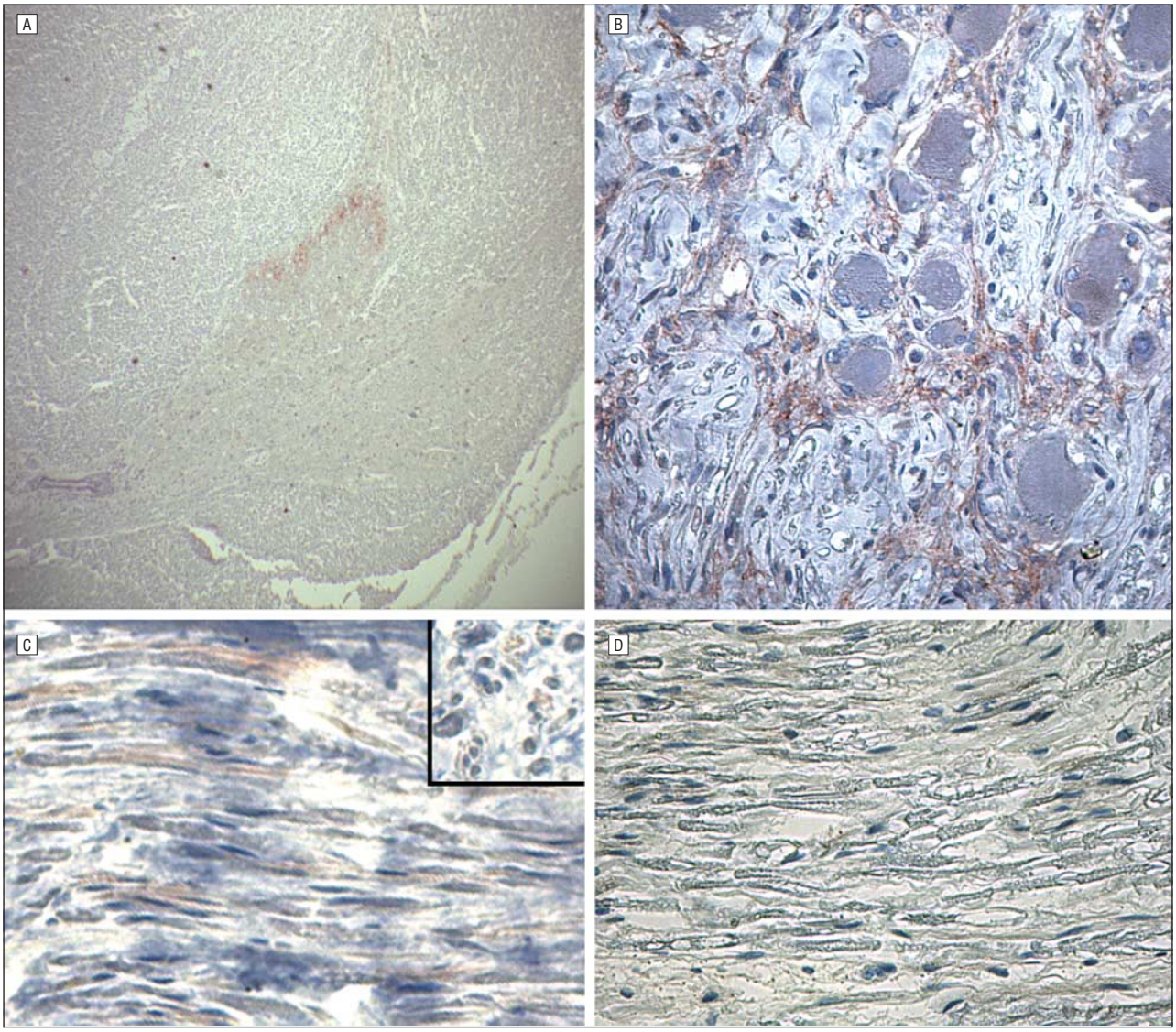


Figure 1. A-C, Prion protein immunostaining in patient 1. A, Spinal cord showing fine granular deposits in the posterior horn (immunoperoxidase, original magnification ×20). B, Dorsal root ganglion exhibiting linear prion protein deposits along nerve fibers (lipofuscin deposits are visible in some neuron cytoplasms) (immunoperoxidase, original magnification ×200). C, Superficial peroneal nerve demonstrating prion protein linear deposits along nerve fibers. Inset, Transverse section showing deposits likely located in the Schwann cells of myelinated and unmyelinated fibers (immunoperoxidase, original magnification ×200 [inset, ×400]). D, Absence of prion protein immunolabeling in the superficial peroneal nerve from a control subject (immunoperoxidase, original magnification ×200).

lopathies is becoming increasingly evident. Deposits of PrP have been shown, by immunohistochemistry, in the spinal cord from patients with either sporadic or growth hormone–associated CJD.[8,11] Such PrP immunolabeling was also seen in 2 cases of Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) syndrome associated with a missense mutation (proline to leucine) at codon 102 of the *PrP* gene[8,12] and in new-variant CJD.[13] Deposits of PrP in the posterior roots were reported in only 1 patient with GSS syndrome and 1 with CJD.[8] A recent study demonstrated, by immunohistochemistry and Western blot analysis, PrPsc deposits in the olfactory cilia and central olfactory pathway in 9 patients with sporadic CJD.[14] Several experimental studies have also demonstrated involvement of the PNS in the pathogenesis of prion diseases. Tissue-specific expression of PrPc in transgenic mice showed that PrPc-positive peripheral nerves are necessary and sufficient for successful infection of the brain after oral or intraperitoneal infection with scrapie.[15] Glatzel and Aguzzi[16] demonstrated that transgenic mice overexpressing PrPc undergo rapid PrPsc neuroinvasion on intranerve inoculation of prions. A transgenic mouse and

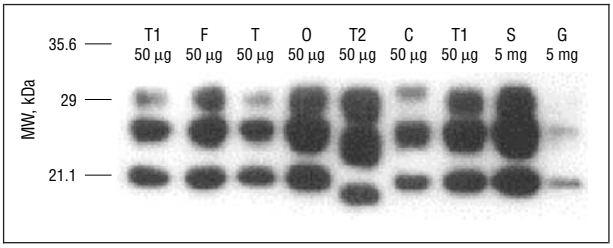


Figure 2. Western blot analysis of prion protein in homogenates of frontal (F), temporal (T), occipital cortex (O), cerebellum (C), spinal cord (S), and dorsal root ganglia (G) from patient 1. Type 1 (T1) and type 2 (T2) sporadic Creutzfeldt-Jakob disease were used as positive controls. In all tested areas, type 1 protease-resistant prion protein was found. MW indicates molecular weight.

Downloaded from www.archneurol.com at HOPITAL CARDIOLOGIQUE-I 894, on October 15, 2008
©2004 American Medical Association. All rights reserved.

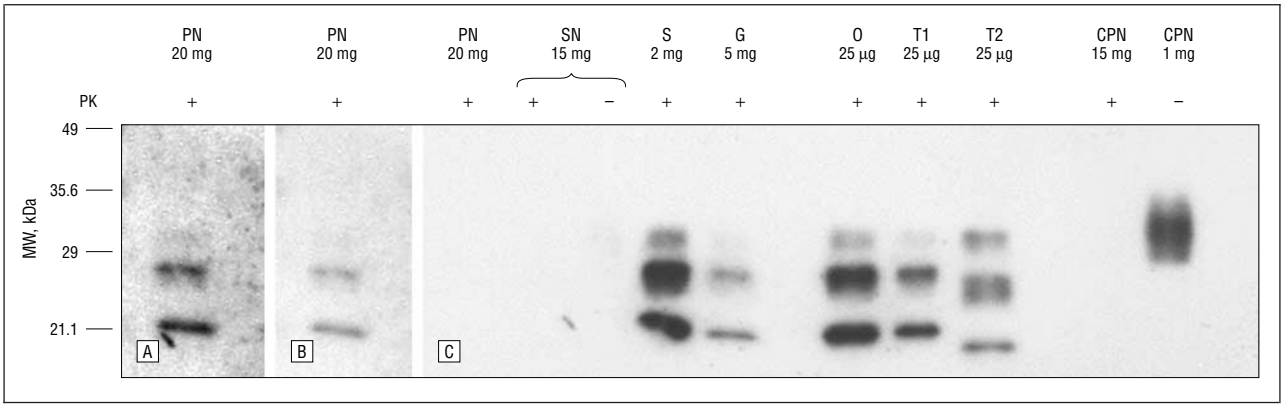


Figure 3. Western blot analysis of prion protein by high-sensitivity–enhanced chemiluminescent method and exposure for 43 minutes (A), 17 minutes (B), or 3 minutes (C) in superficial peroneal nerve (PN), sciatic nerve (SN), spinal cord (S), dorsal root ganglia (G), and occipital cortex (O) from patient 1. Frontal cortex of type 1 (T1) and type 2 (T2) sporadic Creutzfeldt-Jakob disease were used as positive controls. Superficial peroneal nerve (CPN) from a patient without neurologic disease was used as a negative control. MW indicates molecular weight; PK, protease K.

culture cell study established that PrPc could be expressed by Schwann cells in vivo and that PrPsc could be replicated in Schwann cell line.[17]

In our study, we found evidence, for the first time in the literature to our knowledge, of PrPsc deposits in the dorsal root ganglia and the superficial peroneal nerve from 1 of 3 patients with sporadic CJD. Immunohistochemistry permitted us to localize PrPsc accumulation likely to Schwann cells of both myelinated and unmyelinated nerve fibers. A suggested explanation for the discrepancy between the consistent immunolabeling observed in experimental models and the less frequent positivity in human prion disease is centripetal (experimental scrapie) vs centrifugal (sporadic and genetic human prion diseases) spreading of PrPsc, resulting in different patterns and amounts of PrPsc accumulation in the PNS. Thus, the absence of PrPsc detection in the sciatic nerve of patient 1 and in all PNS specimens from patients 2 and 3 might be related to the very small amounts of PrPsc accumulated in these tissues and to a lack of sensitivity of our methods. The use of protein misfolding cyclic amplification procedure[18] in Western blot analysis of PNS specimens might be helpful in such cases. Although our series is not large enough to draw firm conclusions, the specificity of PrPsc testing in the PNS appears to be fair, because our 3 control cases showed negative results. Nevertheless, the sensitivity of our techniques needs to be improved, because 1 positive CJD case of 3 is still insufficient to suggest peripheral nerve biopsy as a useful tool in the diagnosis of CJD.

Accepted for publication December 3, 2003.

Author contributions: *Study concept and design* (Drs Favereaux, Perret-Liaudet, Petry, and A. Vital); *acquisition of data* (Drs Favereaux, Quadrio, Perret-Liaudet, Anne, Laplanche, and A. Vital); *analysis and interpretation of data* (Drs Favereaux, Quadrio, C. Vital, Perret-Liaudet, and A. Vital); *drafting of the manuscript* (Drs Favereaux and A. Vital); *critical revision of the manuscript for important intellectual content* (Drs Quadrio, C. Vital, Perret-Liaudet, Anne, Laplanche, Petry, and A. Vital); *obtained funding* (Dr Petry); *administrative, technical, and material support* (Drs C. Vital, Perret-Liaudet, Laplanche, Petry, and A. Vital); *study supervision* (Dr A. Vital).

Corresponding author: Alexandre Favereaux, PhD, Laboratoire de neurobiologie des affections de la myeline EA 2966, 146, rue Léo Saignat, BP 42, 33076 Bordeaux CEDEX, France (e-mail: alexandre.favereaux@neuropath.u-bordeaux2.fr).

REFERENCES

1. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:2310-2314.
2. Haywood AM. Transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med*. 1997; 337:1821-1828.
3. Esiri MM, Gordon WI, Collinge J, Patten JS. Peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease [comment]. *Neurology*. 1997;48:784.
4. Niewiadomska M, Kulczycki J, Wochnik-Dyjas D, et al. Impairment of the peripheral nervous system in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol*. 2002;59: 1430-1436.
5. Neufeld MY, Josiphov J, Korczyn AD. Demyelinating peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Muscle Nerve*. 1992;15:1234-1239.
6. Antoine JC, Laplanche JL, Mosnier JF, et al. Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology*. 1996;46:1123-1127.
7. Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Beaudry P, Chatelain J, Michel D. Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999;98:453-457.
8. Hainfellner JA, Budka H. Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999;98:458-460.
9. Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, et al. The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med*. 2003;9:1121-1123.
10. Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*. 1999;46:224-233.
11. Goodbrand IA, Ironside JW, Nicolson D, Bell JE. Prion protein accumulation in the spinal cords of patients with sporadic and growth hormone associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*. 1995;183:127-130.
12. Yamada M, Tomimitsu H, Yokota T, et al. Involvement of the spinal posterior horn in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (PrP P102L). *Neurology*. 1999; 52:260-265.
13. Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG. Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology*. 2000;37:1-9.
14. Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2003;348:711-719.
15. Race R, Oldstone M, Chesebro B. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*. 2000;74:828-833.
16. Glatzel M, Aguzzi A. PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol*. 2000;81:2813-2821.
17. Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, et al. PrP expression and replication by Schwann cells. *J Virol*. 2002;76:2434-2439.
18. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 2001;411:810-813.

Downloaded from www.archneurol.com at HOPITAL CARDIOLOGIQUE-I 894, on October 15, 2008
©2004 American Medical Association. All rights reserved.

TROISIEME PARTIE

VALIDATION D'UN OUTIL ORIGINAL DE PRECIPITATION DE LA PrPsc POUR L'AMELIORATION DIAGNOSTIQUE DU VIVANT DU PATIENT

Article 3 :

Isabelle Quadrio, Séverine Ugnon-Café, Maryline Dupin, Guillaume Esposito, Nathalie Streichenberger, Pierre Krolak-Salmon, Anne Vital, Jean-François Pellissier, Armand Perret-Liaudet and Hervé Perron.

Rapid diagnosis of human prion disease using streptomycin in tonsil and brain tissues.
Laboratory Investigation, in press

Résumé de l'article :

L'utilisation de la streptomycine dans les techniques de détection de la protéine prion pathologique (PrPsc) est un nouvel outil intéressant dans le champ du diagnostic biologique des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Son utilisation dans une technique de Western Blot a permis de détecter la PrPsc dans une étude de transmission expérimentale de la tremblante des petits ruminants à différentes souris. Notre objectif principal était d'évaluer la pertinence de l'utilisation de la streptomycine dans le cadre du diagnostic des EST humaines. Nous avons tout d'abord confirmé ses capacités de précipitation vis-à-vis de la PrPsc humaine. Puis nous avons comparé une technique utilisant la streptomycine à trois autres techniques bien documentées. La sensibilité analytique est équivalente à celle de la précipitation à l'acide phosphotungstique pour 5 mg de tissu initial. Nous avons ensuite validé cette technique sur un panel de 98 patients atteints de différentes formes d'EST et 52 patients porteurs de démences mais dont l'EST avait été exclue. Nous avons obtenu une sensibilité et une spécificité de la détection sur tissu cérébral de 100%. Enfin, nous avons testé ce protocole sur une petite série de cinq amygdales obtenues par biopsie. Pour les amygdales, le profil caractéristique de la PrPsc résistante à l'action de la PK a été clairement mis en évidence chez les deux patients atteints de variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), alors que les trois autres cas non vMCJ ne présentent pas de profil spécifique. Nous avons montré dans cette étude l'efficacité de la streptomycine pour la détection de la PrPres dans différents tissus. Son utilisation dans un test diagnostic adapté aux liquides biologiques ou aux tissus périphériques peut désormais être envisagée.

Rapid Diagnosis Of Human Prion Disease Using Streptomycin In Tonsil And Brain Tissues

Isabelle Quadrio[1], Séverine Ugnon-Café[1], Maryline Dupin[2], Guillaume Esposito[1], Nathalie Streichenberger[1], Pierre Krolak-Salmon[1], Anne Vital[3], Jean-François Pellissier[4], Armand Perret-Liaudet[1] and Hervé Perron[2*£] .

1. Service de Neurobiologie – Groupement Hospitalier Est – Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

2. BioMérieux Advanced Technology Unit, R&D Neurological diseases BioMérieux SA

3. Laboratoire de Neuropathologie – Université Victor Ségalen-Bordeaux 2, Bordeaux, France

4. Faculté de Médecine de Marseille – Marseille, France

* : Present address :

Geneuro, 14 Chemin des Aulx, 1228, Plan-Les Ouates, Geneva, Switzerland.

£: Corresponding Author

Running title: Streptomycin for rapid Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnosis

ABSTRACT

The use of streptomycin in the pathological prion protein (PrP^{sc}) detection procedures represents a new and attractive way for diagnostic purpose. With this agent, Western-Blot readily detected PrP^{sc} in 263K scrapie hamster and C57Bl/6 wild type mice challenged with C506M3 scrapie strain. Our aim was to evaluate this new procedure in the field of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) diagnosis. We first had confirmed the ability of streptomycin to precipitate PrP^{res} from human brain of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) patient. Secondly, we compared the detection of PrP^{res} with streptomycin against three others protocols using other precipitations. Then we assessed PrP^{res} detection with streptomycin in brain tissue in 98 brain samples tissues from various aetiologies of human TSEs and 52 brain samples from other dementia. Finally, we applied this protocol for tonsils examination of five patients suspected of variant CJD (v-CJD). Sensitivity and specificity obtained with the streptomycin protocol were both 100% on brain tissue. For tonsil tissues, PrP^{res} was clearly identified in the two post-mortem confirmed v-CJD cases whereas no characteristic three band pattern was seen in the three confirmed non v-CJD samples. In this study, streptomycin demonstrated its efficiency to detect PrP^{res} both in central nervous system and in lymphoid tissue without practical difficulty and with rapid preparation. Due to its ability to act as a good agent for PrP^{sc} examination in different tissues, recovery of PrP^{sc} in biological fluids using streptomycin should open further perspectives of applications in CJD diagnostics. Streptomycin effects in vivo might thus also be questioned.

Abbreviations:

Alzheimer Disease	AD
Bovine Spongiform Encephalopathy	BSE
Centrifugation step concentration protocol	LC
Creutzfeldt-Jakob disease	CJD
Fatal Familial Insomnia	FFI
Fronto-temporal dementia	FTD

Gerstmann-Straüssler-Scheinker disease	GSS
Lewy Body Dementia	LBD
Native prion protein	PrP^{c}
Parkinson Disease	PD
Proteinase K	PK
Pathological prion protein	PrP^{sc}
Pathological prion protein resistant to the proteinase K	PrP^{res}
Ultracentrifugation protocol	UC
Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease	s-CJD
Sodium PhosphoTungstic Acid	NaPTa
Transmissible spongiform encephalopathy	TSE
Variant Creutzfeldt-Jakob disease	v-CJD
Western-Blot	WB

Key words: diagnosis, prion disease, streptomycin, tonsil, Western-Blot

The normal or native prion protein, designated as PrP^{c} for the cellular prion protein, is a widely occurring protein, whose sequence is well conserved in mammals (1). Conformational changes in PrP^{c} lead to propagation of the pathogenic protein "PrP^{sc}" that is proteinase K resistant, at least for its core fragment which is referred as "resistant PrP" (PrP^{res}). The PrP^{sc} accumulation in animals is associated with a wide range of diseases classified as "transmissible spongiform encephalopathies" (TSE). TSEs cover a series of transmissible neurodegenerative diseases, including scrapie in sheep, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle, Chronic Wasting Disease in deer and elk, and Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in human (2). As represented by Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) disease and Fatal Familial Insomnia (FFI) in humans, TSE forms may also have genetic origins linked to mutations in the PrP gene that affect thermodynamics of the encoded protein in a spontaneous way favouring beta-sheet transconformation of PrP^{c} to PrP^{sc}. Consequently, a significant probability to evolve towards pathogenic propagation during the lifetime exists in individuals affected by such genetic mutations in their inherited genotype (3, 4). Coincidently with the BSE epidemics outbreak and the confirmed transmission by food products, a new form of human CJD appeared with original histopathological and biochemical characteristics of PrP^{sc}, which was named "New-variant Creutzfeldt-Jakob disease" (v-CJD) (5, 6). It is now admitted that v-CJD originates from the bovine BSE epidemics by passage to humans through alimentation (7, 8)

The slow development and appearance of symptoms in cattle infected with BSE, with average incubation periods over 4 - 6 years has greatly hindered the development of epidemic models as well as the reality of a passage to humans, itself hindered by an even longer period of incubation, which may last for decades (9). Indeed, the antigenic PrP^{sc} load is generally thought to increase progressively after infection, in lymphoid and peripheral nervous tissue and to attain the brain where its aggregation determines the fatal neuropathological issue of TSEs (10). Thus, apart from the brain in which PrP^{sc} accumulation is a dead-end, PrP^{sc} concentration is expected to be low in other tissues or in biological samples such as blood (11).

Today, v-CJD epidemics in humans has only clinically emerged in most susceptible individuals, i.e. with homozygotic methionine genotype in PrP 129 (MET-MET) codon – known to be associated with short incubation period- and with a window-period of alimentary contamination during childhood, when factors such as intestinal barrier functionality reveal critical (12). Recently a novel PrP^{sc} type in a patient exhibiting prion protein gene 129VV polymorphism was reported as atypical because of certain clinical and molecular PrP^{sc} features overlapping with those of v-CJD (13). Nonetheless, recent studies providing evidence of "asymptomatic infected carriers" in the UK population, as well as the fourth case of "highly probable" transfusional cases already reported today are in favour of a possible "underground propagation" of PrP^{sc} within the human population (14-18). Though its reality may be considered as evidenced, its extent and its evolution in the exposed populations, within such long delays of asymptomatic incubation and with possible lifelong asymptomatic carrier cases, is still very difficult to estimate.

Therefore, diagnostic tests for the detection of PrP^{sc} infection at onset are required for an efficient control of this disease. In a research strategy for the definition of test principles suitable for the early detection of infection by PrP^{sc} in humans, we have been interested in screening molecules for their ability to either capture, concentrate and/or precipitate PrP^{sc}.

After having screened numerous molecules and devices for such properties, one of the selected molecules, streptomycin, is a well-known antibiotic and revealed capable of aggregating PrP^{sc} molecules from different tissue origins with different stages of aggregation (19). Streptomycin is now used to increase sensitivity of PrP^{sc} immunodetection using its properties to aggregate and flocculate PrP^{sc} molecules in different tissues of animals challenged for experimental TSE (20). Moreover successful precipitation of human brain PrP^{sc} with this agent was reported in feasibility studies compared with animal samples (19, 20). These properties were also used in immunohistochemistry, giving specific and sensitive immonoreactive PrP^{sc} deposits in both natural and experimental scrapie and BSE diagnosis (21, 22).

In order to ascertain the reliability and specificity of sample treatment with streptomycin for developing diagnostic detection of PrP^{sc} in humans, we have designed a study using streptomycin followed by a reference Western-Blot Immunodetection on well-characterized reference human brain material from various forms of TSE in parallel with equivalent brain material from confirmed non TSE patients. The protocol was also applied for tonsil tissue from v-CJD patients, in parallel with equivalent material from non TSE patients. We thus present here the results obtained firstly on a cohort of 150 patients from which necropsic human brain tissue was expertised for final TSE diagnosis confirmation by immunohistological and biochemical procedures. They represent 98 TSE cases and 52 non-TSE controls. Secondly, we present the results obtained on a small cohort of five patients from whom tonsil tissue was assessed for v-CJD diagnostic; two of them were further confirmed as v-CJD after post mortem brain examination.

MATERIALS AND METHODS

Patient's cohort

For brain tissue, samples were obtained after necropsy of 150 patients suspected of CJD in anatomopathology laboratories of Lyon, Bordeaux and Marseille. TSE disease was confirmed in 98 patients (neuropathological lesions, immunohistochemistry and immunodetection of PrP^{res} by Western-Blot) (23). For positive TSE patients, prion protein (*PRNP*) gene mutation analysis (24), codon 129 polymorphism of the PRNP gene (25), PrP^{res} molecular typing (26) and aetiology are reported in table 1. Prion disease was rejected in the remaining 52 patients. The final diagnosis of non TSE patients was further completed: 19 Alzheimer Disease (AD), 4 Lewy Body Dementia (LBD), 4 Parkinson Disease (PD), 2 Fronto-Temporal Dementia (FTD) and 23 others types of pathologies. For tonsil tissue, samples were obtained after tonsillectomy for diagnostic purpose of suspected v-CJD in five patients. Two patients were classified v-CJD after confirmed diagnostics carried out on brain necropsic tissues whereas the three others were confirmed negatives for v-CJD diagnosis.

Common pre treatment of samples used in comparative study

In order to compare WB protocols on brain tissue, only available aliquots samples stored at -80℃ from the same brain area (prefrontal cortex) were used. In first series, 500 mg of prefrontal cortex were homogenised with distilled water at 20%. Homogenates were forced through a 0.5 mm diameter needle and divided in four aliquots for the different concentration protocols tested. In second series, with the same protocol, we prepared another homogenate from 20 mg of prefrontal cortex and divided it in four aliquots. The precipitation of PrP^{sc} was thus compared with different techniques using a small amount (5 mg) of brain tissue.

Streptomycin protocol (Streptomycin)

Analytical comparison of four protocols with determination of dilution limit was performed on 25 µl of the 20% homogenate (corresponding to 5 mg equivalent brain tissue) 2 fold diluted in phosphate buffer saline (PBS) 2X (pH = 7.2, DOC 1%, NP 40 1%).

For the cohort examination, 5 mg of prefrontal cortex were directly homogenised in PBS (pH = 7.2) DOC 0.5%, NP 40 0.5% representing a final 10 % brain homogenate. For tonsil tissues, 10% homogenates were simply made in 5% glucose. Tissues were all treated with proteinase K (80 µg/ml) for 30 minutes at 37℃ and streptomycin (200mg/ml) was added for 1 hour at 37℃ as previously described (19). Thus, after having made 10% homogenates from 5 mg of TSE brain, we used a 0.14 M final concentration of streptomycin in PK incubation medium. Samples were then submitted to centrifugation for 15 minutes at 17000g. A second centrifugation was made when a slightly milky zone was observed above the pellet. Pellets were resuspended in 4% SDS denaturating buffer (Tris HCl pH=6.8 125 mM, glycerol 20%) and boiled 10 minutes at 100℃. Then, they wer e further processed as indicated below for WB analysis.

Ultracentrifugation protocol (UC)

For the analytical comparison of the four protocols, 500 µl or 25 µl of the 20% homogenate (corresponding to 100 mg or 5 mg equivalent brain tissue respectively) were 2 folds diluted in 10% glucose.

In our laboratory, this protocol is currently performed since 1998 with 100 mg of prefrontal cortex as previously described (27) with slight modifications; prior to ultracentrifugation in Sarkosyl, homogenates were digested by proteinase K (25µg/ml) for 1 hour at 37℃ before stopping digestion by PMSF 1mM.

Sodium PhosphoTungstic Acid protocol (NaPTa)

For the analytical comparison of the four protocols, 250 µl or 25 µl of the 20% homogenate (corresponding to 50 mg or 5 mg equivalent brain tissue respectively) were 2 folds diluted in

PBS buffer 2X without Ca^{++} and Mg^{++} (pH= 7.2). The protocol was strictly performed as previously described with 500 µl or 50 µl of 10% homogenate (50 mg or 5 mg) of prefrontal cortex (28).

Centrifugation step concentration protocol (LC)

For the analytical comparison of the four protocols, 40 µl or 25 µl of the 20% homogenate (corresponding to 8 mg or 5 mg equivalent brain tissue respectively) were 2 folds diluted in Tris Buffer Saline (TBS) 2X (pH= 8). The protocol corresponding to the "Sample preparation II" described by Lee D.C. and co-workers (29) was performed as previously described with 8 mg or 5 mg of prefrontal cortex.

Western-Blot (WB) immunodetection

Each sample was analyzed on 12% Nu-PAGE gels. Gels were then electroblotted on to PVDF membranes and blocked with 5% (W/V) milk powder in PBS for 1 hour. Immunodetection of PrP^{res} was observed using 1/10000 3F4 purified anti PrP monoclonal antibody (Proteogenics, USA) for 1 hour at room temperature and revealed by chemiluminescence substrate West Dura (Pierce, USA).

RESULTS

Analytical features (fig 1, fig 2, fig 3, fig 4)

As shown in Figure 1, PrP^{res} signal is totally collected in the pellet as in the supernatant no WB immunodetection was evidenced. Thus, this concentration corresponding to 0.14M of streptomycin in PK digestion medium was adopted for following validation in human TSE brain and tonsil samples.

We then compared the ability of streptomycin concentration versus our usual technique and versus others established sensitive protocols. In order to observe signals on the same membrane after immunodetection, we loaded in each well 1 mg equivalent brain tissue

obtained for each of the four different methods. As shown in figures 2a, 2b and 2c, the detected PrP^{res} signals indicated that streptomycin was a pertinent agent of concentration of PrP^{res} in the three different types of CJD samples. Indeed for the FFI Met/Met type 2 sample, signals with the four techniques were very similar whereas for CJD Met/Met type 1 PrP^{res}, signals appeared to be slightly more important with UC and LC protocols than with streptomycin and NaPTa protocols. Finally, for CJD Val/Val type 2, NaPTa and UC protocols gave better PrP^{res} signals than the two others.

In second series, we compared the analytical sensitivity and the ability of each protocol to recover PrP^{sc} from only 5 mg of brain tissue. As shown in figure 3, NaPTa and streptomycin protocols were the most efficient procedures for good recovery of PrP^{res} in s-CJD Met/Met 1 (Fig 3a) and FFI Met/Met 2 (Fig 3b) whereas no significant difference was seen for s-CJD Val/Val 2 samples (Fig 3c). For s-CJD Met/Met 1, we observed that UC protocol (Fig 3a lane 1) was the less sensitive, leading only very faint PrP^{res} signal on overexposed Western Blot. Dilution studies on s-CJD Met/Met 1 and Val/Val 2 permitted to confirm that NaPTa and streptomycin were the most sensitive protocols (data not shown). For FFI Met/Met 2 samples, serial dilutions 5, 10 and 20 fold were performed, corresponding to 0,2mg; 0,10 mg and 0,05 mg of tissue loaded on gel. As shown in Figure 4, we also observed that NaPTa and streptomycin were the most sensitive protocols, whereas the two others were not able to detect PrP^{res} in these diluted samples. We could also confirm that, in cases of s-CJD Met/Met 1, s-CJD Val/Val 2 and FFI Met/Met 2, the dilution limit differed as expected from known variation of PrP^{sc} concentration in corresponding samples.

Cerebral PrP^{res} detection using streptomycin precipitation (fig 5)

All brain specimens from the 98 confirmed TSE patients showed PrP^{res} positive signal on WB by immunodetection with 3F4 monoclonal antibody after streptomycin precipitation. As represented in figure 5, the 3-bands PrP^{res} pattern is clearly identified for these samples. When the signal was saturated, a smear all along the lane was found. For the specimen of the 52 non TSE patients (examples in figure 5), no signal was detected indicating that (i) the

digestion of PrP^c by PK was complete, and (ii) streptomycin addition did not interfere with immunodetection.

Most importantly, TSE and non TSE patients were correctly classified by the assay leading specificity and sensitivity at 100%.

Cerebral PrP^{res} molecular typing using streptomycin precipitation (fig 6)

The evaluation of streptomycin influence on the PrP^{res} molecular typing was further analysed. Using streptomycin precipitation, we were able to detect the two major WB bands with distinct apparent molecular weights of unglycosylated isoform that characterized type 1 and type 2 PrP^{res}. So type 1 and type 2 PrP^{res} were clearly discriminated. Although we did not perform exact determination of ratio diglycosylated / monoglycosylated bands, we nevertheless examine PrP^{res} molecular pattern obtained on different brain area and brain extracts in different experiments with streptomycin precipitation. The characteristic v-CJD glycotype in type 2b PrP^{res} seemed to be conserved (fig 6, lane 6) and was also easily discriminated from those of sporadic type 2a (fig 6, lane 4) and moreover from type 1 PrP^{res} (fig 6, lane 3 and 5). Concerning type 1 PrP^{res}, characteristics molecular patterns for sporadic (fig 6, lane 3) and E200K PRNP mutation (fig 6, lane 5) are clearly distinguish too.

Tonsil examination for PrP^{res} detection with streptomycin protocol (fig. 7)

The type 2b PrP^{res} was clearly identified in the two tonsils extracted from confirmed v-CJD cases (Fig. 7, lanes 4 and 5) with the characteristic three bands pattern, whereas the three non v-CJD showed a background and non specific signal around 30 kDa that did not fit with any characteristic three bands pattern of PrP^{res} (Fig. 7, lanes 1, 2 and 3). In v-CJD tonsils, the relative ratio of glycotype appeared to be consistent with that of corresponding brain extract.

DISCUSSION

The streptomycin precipitation protocol performed in this study is adapted from the one reported for brain PrP^{sc} detection in natural scrapie, natural BSE and experimental BSE in mice (19). Analysis of the supernatants after precipitation from a very low amount of human brain (5 mg) compared to that routinely used for UC (100 mg) shows that all PrP^{res} specific signal detected can be concentrated in the pellet, without significant residual signal in supernatant. So the full process used in animal TSE was successfully transferred to human application without modification.

Although the main objective was not a complete analytical study, we nonetheless compared this protocol with different reported processes using concentration steps as ultracentrifugation protocol (UC) commonly used in our lab for CJD diagnosis (27), a centrifugation protocol (LC) (29) and NaPTa step precipitation (NaPTa) (28) as previously described by others. In first series, these concentration protocols were tested as reported without modification prior a unique WB analysis. Here, the amounts of tissue tested were those recommended for streptomycin, LC, NaPTa and UC protocols (5, 8, 50 and 100 mg respectively). Thus, comparison of an equivalent quantity was achieved in WB analysis by loading 1 mg of brain tissue extract into the gel. In second series, we have compared the ability of each protocol to recover PrP^{res} from a small amount of brain tissue equivalent to that processed in streptomycin protocol (5 mg). This reproduced situations when only small quantities of original sample material are available (i.e tonsils).

From the present study, advantages and drawbacks of each protocol can be rapidly listed. Elimination of most of soluble proteins by UC allows loading high amounts of tissue (20 mg to 50 mg) without unspecific noise (not shown) but it is (i) time consuming (4 h 35 min.), (ii) large serial analysis cannot be performed within one day and (iii) recovery of the pellet needs experience with an important impact of manipulators' skillness (particularly when initial quantity is below 10mg of tissue). Moreover, this technique revealed poorly sensitive for

recovering PrP^{res} when performed from only 5 mg of tissue, in particular for s-CJD Met/Met 1 and FFI Met/Met 2. It thus appeared to be extremely dependent upon the initial amount of tissue. With NaPTa, high recovery of PrP^{res} in the pellet versus PrP^{c} offers a potential to load high amounts of tissue (25 to 50 mg) without unspecific noise but requires (i) long sequential steps (3h 30 min), (ii) time-consuming buffer and stock solution preparation and (iii) frequents need to solubilize a white precipitate as reported (28). Nonetheless, NaPTa also succeeded in recovering PrP^{res} in the different PrP^{sc} strains tested here from 5 mg of brain tissue. Using the centrifugation method (LC) (29), centrifugation at 20000 g reduced the preparation time (3h 05 min) whatever the amount of tissue. However with the recommended initial amount of 8 mg of tissue, PrP^{res} was clearly recovered, but when only decreasing to 5 mg, the sensitivity dropped down. For LC, ratio of proteinase K / amount of brain tissue is the highest of the four techniques, still proteinase K concentration needed to be increased to completely digest PrP^{c} for few cases. Finally, streptomycin concentration gave specific results with good sensitivity, with the lowest amount of tissue, the shortest preparation time (2h 30 min). Only in few cases complete recovery of pellet required a second low speed and short centrifugation step. In dilution experiments, the most sensitive protocols were found to be NaPTa and streptomycin.

The main objective was thereafter to evaluate the sensitivity and the specificity of the streptomycin protocol in a cohort representing the diversity of human TSE types.

The results obtained here with the post-mortem diagnosed cohort of 98 TSE patients and 52 non TSE patients yielded 100% specificity and 100% sensitivity, showing neither false positive nor false negative. This performance with such specificity provides criteria enabling to use this new protocol for PrP^{res} concentration. Indeed, no false negative could be admissible in the field of human TSE diagnosis. Actual sensitivity of the protocol also complies with the objective of detecting brain PrP^{res}, for post mortem diagnostic purposes. Precipitation by streptomycin thus reveal helpful in term of practicability, and could replace a cumbersome UC method with its different drawbacks. This protocol gave similar signal than

the two others methods used, i.e NaPTa and LC when the same quantities of brain tissue are loaded in the gel. For post-mortem brain diagnosis, decreasing amounts of tissue is not a critical step. But for ante-mortem biopsies of tonsils and others tissues as reported for olfactory mucosa and in our previous study on peripheral nerves (27, 30), processing low amounts without a good recovery of PrP^{sc} would be a limitation for certain methods. In the case of tonsil examination in clinically suspected v-CJD cases, our results obtained with streptomycin permitted to clearly detect characteristic PrP^{res} pattern in this lymphoid tissue. Even if a faint signal can be detected around 30 kDa on non v-CJD tonsils samples, no characteristic pattern of PrP^{res} can be detected on overexposed WB with these negatives samples whereas it clearly exists for positive samples (data not shown). We have noticed incidentally that freezing / thawing cycles have decreased this non specific signal whereas increasing PK concentration up to two fold had no influence. Some optimisation should be performed to improve specificity if single band analysis ever became relevant, but this streptomycin protocol should be sufficient for a global rapid test. These results were correlated with the confirmed diagnosis obtained after brain examination, confirming again a good sensitivity and specificity. These data, as those recently reported in C57Bl/6 mice inoculated i.c or i.p provide evidence that PrP^{res} could be detected either in lymphoid organs or in brain with a good sensitivity (31). Streptomycin seems then to be an efficient tool for peripheral tissue examination in living individuals.

The present protocol permits the recognition of the different glycoforms of human brain PrP^{res} by 3F4 antibody with the expected shift in the molecular weight (19). This shift does not alter the classical three band pattern and therefore, this method complies with the molecular PrP^{res} typing field (23). Finally, v-CJD molecular PrP^{res} pattern is discriminated from those found in sporadic or genetic CJD. Indeed, in our present conditions, we have worked with streptomycin quantity within the range of those shown not to increase molecular weight patterns in precipitated material from PK-digested homogenate(19). Moreover, in another study (20), still different patterns were reported using protocols inverting the proteinase K and streptomycin incubation steps when compared to our protocol. They thus yielded

patterns diverging from our own results, which we have obtained after setting up conditions most appropriate for our study dedicated to human CJD diagnostics. Thus our analyses had to be comparable in routine conditions to other reference techniques used in the human medical domain.

In conclusion, it is the first report to our knowledge on streptomycin Western-Blot for routine diagnosis of human TSEs. Streptomycin seems to act as a good precipitation agent for low amount of tissue containing PrP^{sc} and thus permits quick analyses on small quantities of tissues, with particular interest for biopsies. This protocol allowed us to detect PrP^{res} in small amounts of tonsil tissue for v-CJD patients. For peroneal nerve analysis in s-CJD as already reported (27, 32) it could also be an alternative to UC since only 20 % of sensitivity was found. Streptomycin also seems to be a valid alternative protocol to NaPTa when small amounts of tissue are available. Because satisfactory recovery efficiency of PrP^{res} spiked in CSF and urine was recently claimed (20), it could now be evaluated as a tool for a test detecting PrP^{sc} in human and animal biological fluids. Finally, because streptomycin is a well-known antibiotic available for human therapy, these in vitro results could raise questions about its eventual effects in vivo.

DISCLOSURE / CONFLIC OF INTEREST

All authors but two are hired by non-profit organizations and/or University Hospitals and declare no conflict of interest. The two authors from bioMérieux also declare no conflict of interst as HP has left this company and MD is no longer involved in Prion diagnostics, as this R&D domain has been closed by bioMérieux.

REFERENCES

1. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 10;95(23):13363-83.
2. Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. Lancet. 2004 Jan 3;363(9402):51-61.
3. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. Nature. 1989 Mar 23;338(6213):342-5.
4. Gambetti P, Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Lugaresi E. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. Brain Pathol. 1995 Jan;5(1):43-51.
5. Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. Lancet. 1996 Apr 27;347(9009):1181.
6. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet. 1996 Apr 6;347(9006):921-5.
7. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature. 1997 Oct 2;389(6650):498-501.
8. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature. 1997 Oct 2;389(6650):448-50, 526.
9. Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, et al. Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. Lancet. 2006 Jun 24;367(9528):2068-74.
10. Glatzel M, Giger O, Braun N, Aguzzi A. The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. Curr Mol Med. 2004 Jun;4(4):355-9.
11. Brown P. Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. Vox Sang. 2005 Aug;89(2):63-70.
12. Boelle PY, Cesbron JY, Valleron AJ. Epidemiological evidence of higher susceptibility to vCJD in the young. BMC Infect Dis. 2004 Aug 10;4:26.
13. Mead S, Joiner S, Desbruslais M, Beck JA, O'Donoghue M, Lantos P, et al. Creutzfeldt-Jakob disease, prion protein gene codon 129VV, and a novel PrPSc type in a young British woman. Arch Neurol. 2007 Dec;64(12):1780-4.
14. Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, et al. Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. Lancet Neurol. 2006 May;5(5):393-8.
15. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet. 2004 Feb 7;363(9407):417-21.
16. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. Lancet. 2004 Aug 7-13;364(9433):527-9.
17. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, et al. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. Lancet. 2006 Dec 9;368(9552):2061-7.
18. Health_Protection_Agency. Fourth case of variant CJD infection associated with blood transfusion. [Press release] United Kingdom: Health Protection Agency; 2007 [updated 2007; cited 18 january 2007]; Available from: http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733711457?p=1171991026241
19. Moussa A, Coleman AW, Bencsik A, Leclere E, Perret F, Martin A, et al. Use of streptomycin for precipitation and detection of proteinase K

resistant prion protein (PrPsc) in biological samples. Chem Commun (Camb). 2006 Mar 7(9):973-5.
20. Dong CF, Huang YX, An R, Chen JM, Wang XF, Shan B, et al. Sensitive detection of PrPSc by Western blot assay based on streptomycin sulphate precipitation. Zoonoses Public Health. 2007;54(8):328-36.
21. Bencsik AA, Coleman AW, Debeer SO, Perron H, Moussa A. Amplified immunohistochemical detection of PrPsc in animal transmissible spongiform encephalopathies using streptomycin. J Histochem Cytochem. 2006 Aug;54(8):849-53.
22. Bencsik AA, Leclere E, Perron H, Moussa A. New insights into early sequential PrPsc accumulation in scrapie infected mouse brain evidenced by the use of streptomycin sulfate. Histochem Cell Biol. 2008 May;129(5):643-50.
23. WHO. WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies, including variant Creutzfeldt-Jakob disease. Geneva, Switzerland World Health Organization; 2003. p. 90.
24. Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, Attane F, Besson G, Hannequin D, et al. Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. Hum Mutat. 2000 May;15(5):482.
25. Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. Acta Neuropathol. 1999 Apr;97(4):355-8.
26. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol. 1996 Jun;39(6):767-78.
27. Favereaux A, Quadrio I, Vital C, Perret-Liaudet A, Anne O, Laplanche JL, et al. Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol. 2004 May;61(5):747-50.
28. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. Lancet. 2001 Jul 21;358(9277):171-80.
29. Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, et al. Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the detection of the prion protein. J Virol Methods. 2000 Jan;84(1):77-89.
30. Tabaton M, Monaco S, Cordone MP, Colucci M, Giaccone G, Tagliavini F, et al. Prion deposition in olfactory biopsy of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol. 2004 Feb;55(2):294-6.
31. Leclere E, Moussa A, Chouaf-Lakhdar L, Coleman AW, Seigneurin JM, Perron H, et al. Prion early kinetics revisited using a streptomycin-based PrP(res) extraction method. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Aug 1;372(3):429-33.
32. Favereaux A, Quadrio I, Perret-Liaudet A, Vital C, Ouallet JC, Brochet B, et al. Prion protein accumulation involving the peripheral nervous system in a sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 2003 Dec;29(6):602-5.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

TABLES

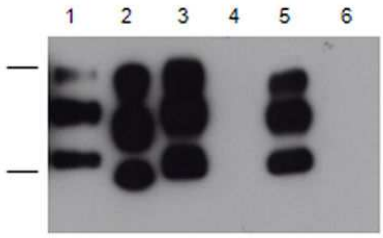
Table 1: Diagnostic classification of studied TSE patients

N° of cases	Aetiology	PrP^{res} molecular typing / Number of samples / *PRNP* mutation		Prion protein codon 129 polymorphism
80	Sporadic	Type 1 ; n=61	Type 1	MM; n = 50; MV; n = 8
			Type 1 majority + Type 2	MM; n = 3
		Type 2a ; n=19	Type 2	MM; n = 3; MV; n = 5; VV; n = 9
			Type 2 majority + Type 1	MM; n = 1; VV; n = 1
14	Genetic	Type 1; n=9	E200K	MM; n = 6; VV; n = 3
		Type 2a; n=2	V203I	MM; n = 2
		Type 1; n=1	D178N CJD	VV; n = 1
		Type 2; n=2	D178N FFI	MM; n = 2
2	Iatrogenic: Growth hormone	Type 1; n=2		MM; n = 1, MV; n =1
2	Variant	Type 2b; n=2		MM; n = 2

Necropsic brain tissue have been collected and treated according to the French ethical and technical legislation. Tonsil samples have been collected for diagnostic purpose of variant CJD. FFI: fatal familial insomnia ; CJD : Creutzfeldt – Jakob Disease ; D : Aspartic acid ; E : Glutamic acid ; I: Isoleucine ; K : Lysine ; M : Methionine ; N: Asparagine; V : Valine.

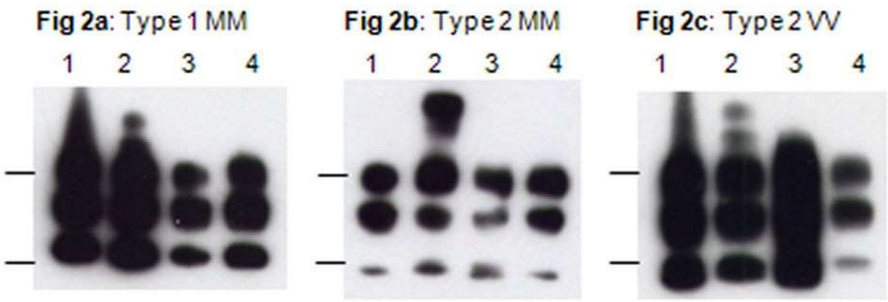
FIGURES

<u>Figure 1:</u> Supernatants analysis after streptomycin precipitation on 5 mg CJD brain.



Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from different suspected CJD patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 33kDa and 20 kDa, up to down respectively. PrP^{res} is immunodetected by 3F4 Ab. Lane 1 and 2: PrP^{res} type 1 and type 2 respectively, extracted using ultracentrifugation protocol. Lanes 3 – 4 and 5 – 6: PrP^{res} type 1 from two CJD patients, extracted using streptomycin protocol, respectively pellets (lanes 3-5) and supernatants (lanes 4-6).

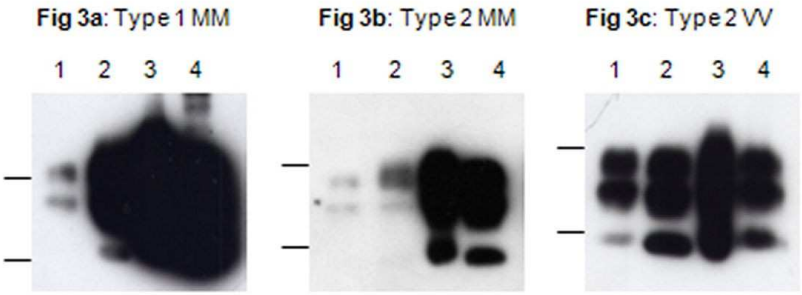
<u>Figure 2 a,b,c</u> : Comparison of PrP^{res} signals after different protocols of precipitation with the recommended initial amount of tissues



Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from different suspected TSE patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 33kDa and 20 kDa, up to down respectively. 1 mg equivalent brain was load in each well. PrP^{res} is immunodetected by 3F4 Ab.

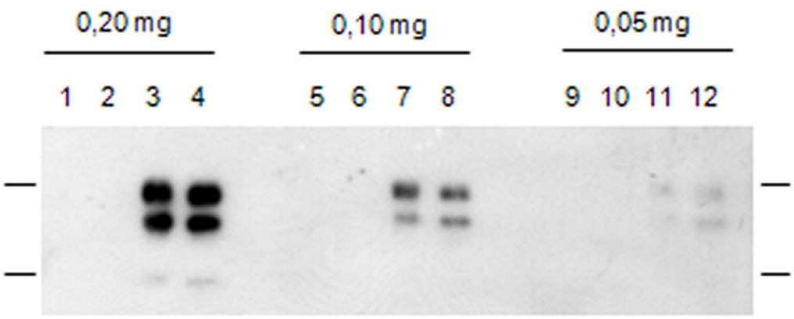
Figure 2a: s-CJD Type 1 PrP^{res}; figure 2b: FFI Type 2 MM PrP^{res}; figure 2c: s-CJD Type 2 VV PrP^{res}. Lanes 1: samples processed by the ultracentrifugation protocol (UC). Lanes 2: samples processed by the centrifugation step concentration protocol (LC). Lanes 3: Samples processed by the sodium phosphotungstic acid protocol (NaPTa). Lanes 4: samples processed by the streptomycin protocol.

Figure 3: Comparison of PrP^{res} signals after performing the four protocols with initial 5mg of brain tissue



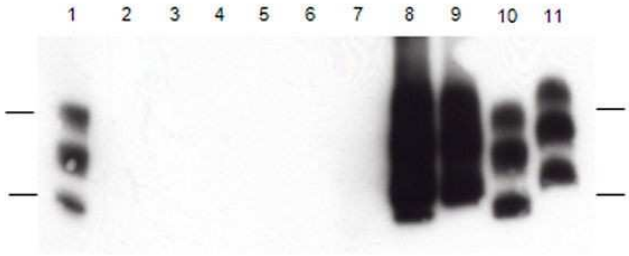
Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from different suspected CJD patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 33kDa and 20 kDa, up to down respectively. 5 mg of brain tissue was performed for each protocol and then 1 mg equivalent brain was load in each well. PrP^{res} is immunodetected by 3F4 Ab. Figure 3a: s-CJD Met/Met Type 1 PrP^{res}; figure 3b: FFI Met/Met Type 2 PrP^{res}; figure 3c: s-CJD Val/Val Type 2 PrP^{res}. Lanes 1: samples processed by the ultracentrifugation protocol (UC). Lanes 2: samples processed by the centrifugation step concentration protocol (LC). Lanes 3: samples processed by the sodium phosphotungstic acid protocol (NaPTa). Lanes 4: samples processed by the streptomycin protocol.

<u>Figure 4:</u> Detection of PrP^{res} after dilution of type 2 Met/Met FFI sample



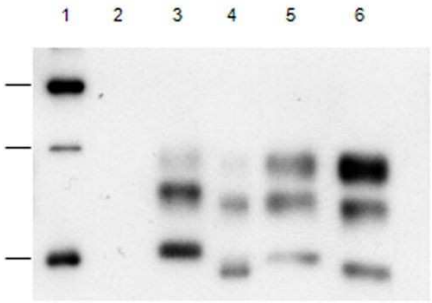
Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from one s-CJD patient with FFI is shown. The sample of FFI Type 2 Met/Met PrP^{res} was serially diluted in order to obtain 0,20 mg (lanes 1,2,3,4); 0,10 mg (lanes 5,6,7,8) and 0,05 mg (lanes 9,10,11,12) of brain tissue. <u>Lanes 1, 5 and 9:</u> samples processed by the ultracentrifugation protocol (UC). <u>Lanes 2, 6 and 10:</u> samples processed by the centrifugation step concentration protocol (LC). <u>Lanes 3, 7 and 11:</u> samples processed by the sodium phosphotungstic acid protocol (NaPTa). <u>Lanes 4, 8 and 12:</u> samples processed by the streptomycin protocol.

<u>Figure 5:</u> Analysis of brain PrP^{res} of suspected CJD patients using streptomycin precipitation (representative selection)



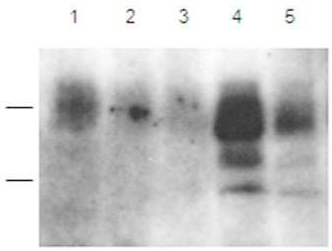
Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from different suspected CJD patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 33kDa and 20 kDa, up to down respectively. <u>Lane 1:</u> control CJD PrP^{res} type 2 (ultracentrifugation protocol); <u>Lanes 2, 3, 4, 5, 6 and 7:</u> non CJD patients; <u>Lanes 8, 9, 10 and 11:</u> CJD patients.

Figure 6: Distinction of PrP^{res} type 1 and type 2 using streptomycin protocol



Immunoblot analysis of prefrontal cortex homogenates obtained from different CJD patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 40 kDa, 30 kDa and 20 kDa, up to down respectively. PrP^{res} is immunodetected by 3F4 Ab. Lane 1: molecular marker, respectively from up to down: 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa. Lane 2: non CJD control sample. Lane 3: type 1 PrP^{res} (sporadic CJD patient); lane 4: type 2a PrP^{res} (sporadic CJD patient); lane 5: type 1 PrP^{res} (genetic CJD: E200K PRNP mutation); lane 6: type 2b PrP^{res} (v-CJD patient).

Figure 7: Tonsil analysis for PrP^{res} detection in five suspected v-CJD cases using streptomycin protocol



Immunoblot analysis of tonsil homogenates obtained from five suspected v-CJD patients is shown. Black lines correspond to molecular mass marker of 30 kDa and 20 kDa, up to down respectively. PrPres is immunodetected by 3F4 Ab. Lanes 1, 2 and 3: non v-CJD patients' tonsil examination using streptomycin protocol. Lanes 4 and 5: v-CJD patients' tonsil examination using streptomycin protocol.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. EVALUATION DES MARQUEURS BIOLOGIQUES UTILISES POUR LE DIAGNOSTIC DU VIVANT DU PATIENT

La recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR a été intégrée dès 1998 dans les critères de diagnostic des EST, il est toujours présent dans les révisions ou la publication de recommandations nationales et internationales (HAS, 2007a; WHO, 1998; WHO, 2003) (et Annexe 1). Cependant, cette protéine n'est pas totalement spécifique des EST et présente une sensibilité variable en fonction des différentes formes cliniques (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Heinemann et al, 2007; Sanchez-Juan et al, 2006; Zerr & Poser, 2002). Nous avons évalué la sensibilité et la spécificité de la technique de détection de la protéine 14.3.3 dans le LCR utilisée dans notre laboratoire sur une cohorte de patients où le diagnostic de certitude était assuré par l'examen neuropathologique du tissu cérébral.

1.1 Sensibilité de la protéine 14.3.3 en début d'évolution clinique

Globalement, nos résultats montrent une sensibilité de détection de la protéine 14.3.3 de 85,4 %, en considérant les résultats douteux comme positifs et en ne considérant que la première ponction, c'est-à-dire la plus précoce dans la suspicion d'une EST. Ces résultats sont très cohérents avec les données de la littérature où elle est rapportée être entre 85 % et 100 % (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2006; Van Everbroeck et al, 2003).

Le choix de classer les résultats douteux comme positifs a été guidé par l'interprétation clinique de ce type de résultat. Du fait de la plus faible sensibilité de la recherche de la protéine 14.3.3 en début d'évolution de la maladie, un premier résultat douteux entraîne régulièrement la répétition de la ponction dans l'hypothèse où le résultat deviendrait positif (Brandel et al, 2001; Giraud et al, 2002; Sanchez-Juan et al, 2007).

La sensibilité observée sur l'ensemble de la cohorte masque en réalité des différences importantes qui existent entre les différentes formes étiologiques d'EST. Elle est respectivement plus élevée pour les formes sporadiques puis acquises puis génétiques (92%, 70 %, 65%). Il existe aussi des variations importantes dans chaque sous-groupe étiologique. Pour la forme vMCJ par exemple, elle n'est que de 66,6 % (16,6 % si les douteux sont classés

négatifs). Ces résultats sont cohérents avec ceux observés par d'autres équipes (Brandel et al, 2001; Van Everbroeck et al, 2005a). La sensibilité est donc plutôt faible pour cette forme acquise. Du fait de la dissémination périphérique et du tropisme lymphoïde de l'agent infectieux dans le vMCJ et les conséquences sur les modes de transmission potentiel notamment par voie sanguine, il apparaît nécessaire de trouver un marqueur diagnostic plus sensible que les tests actuels (Hewitt et al, 2006b; Wadsworth et al, 2001).

Certaines demandes de recherche de protéine 14.3.3 sont clairement orientées en fonction d'un risque connu chez le malade, par exemple dans le cas d'une forme génétique connue chez un membre apparenté ou lorsqu'un facteur de risque individuel est identifié, tel que l'administration d'hormone de croissance issue d'un lot potentiellement contaminé ou une greffe de dure-mère d'un patient ayant développé a posteriori une EST (circulaire 138 de mars 2001 - Direction Générale de la Santé). Dans certains cas acquis, notamment pour les formes vMCJ et celles liées à l'hormone de croissance, la sensibilité est relativement faible en début d'évolution de la maladie (66,6 % dans les deux cas). Cette variabilité doit être prise en compte lors de l'interprétation du résultat, et doit donc être parfaitement explicitée sur le compte rendu d'analyses. En effet, cela entraîne comme conséquence pratique dans ces contextes de suspicion de rester réservé sur le diagnostic du malade devant un résultat négatif.

Dans les formes gMCJ, en revanche, la difficulté réside dans le fait que la mutation est très inconstamment fréquente dans la famille. Cette dernière n'est en effet connue dans la famille que parfois pour moins de la moitié des individus porteurs de la mutation (Dagvadorj et al, 2002; Kovacs et al, 2005b) Comme il existe une grande hétérogénéité de présentations cliniques de ces formes, elles se présentent très souvent comme un cas sporadique. L'analyse du gène PRNP conjointe à la recherche de protéine 14.3.3 doit donc être envisagée non seulement devant un résultat positif mais aussi devant un résultat négatif associé à une aggravation clinique rapide. Ceci pose bien sur un problème éthique quant à la gestion par le clinicien de l'annonce d'une maladie génétique à la famille. Par ailleurs, si le risque familial est connu, l'interprétation d'un résultat négatif doit se faire en fonction de la mutation impliquée. Pour les formes génétiques de présentation clinique particulière (IFF ou syndrome GSS) et assez spécifique, l'apport de la protéine 14.3.3 dans l'établissement du diagnostic est très limité.

En appariant l'âge des témoins (plus de 40 ans) avec les formes sMCJ, la sensibilité est la plus élevée de tous les sous groupes d'EST, atteignant 92 %. En répartissant les effectifs du groupe sMCJ selon le type de PrPres et le polymorphisme du codon 129, on constate une différence de sensibilité dans la détection de la protéine 14.3.3 selon ces phénotypes. La meilleure sensibilité est observée pour les cas sMCJ de présentation classique, c'est-à-dire les cas MM1 (100 %) et la plus faible pour les cas de présentation clinique moins classique, comme les cas MV2 (71,4 %). Là encore, nos données sont comparables à celles de la littérature (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2006). L'effectif de certains sous groupes est faible notamment pour les formes rares, par exemple deux cas MM2 étudiés, ce qui fragilise la généralisation des résultats à l'ensemble du groupe. Dans l'ensemble, on observe une sensibilité de recherche de la protéine 14.3.3 plus faible dans le groupe des hétérozygotes pour le codon 129 à 47,6 % (10 cas sur 21) que pour le groupe des homozygotes à 95,4 % (62 cas sur 65). Dans la littérature, les patients hétérozygotes présentent aussi des sensibilités plus faibles que les patients homozygotes (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2007).

Dans notre étude, cinq patients sMCJ présentaient une cooccurrence des deux types de PrPres. Cette cooccurrence était présente soit dans la même zone cérébrale, soit le type de PrPres différait dans une des 3 zones testées; le sixième patient de notre étude avec cette cooccurrence est un cas lié à l'administration de GH. Pour les cinq cas sMCJ, un de ces patients est homozygote méthionine au codon 129 et présentait un résultat de protéine 14.3.3 positif, les quatre autres sont hétérozygotes pour ce codon et présentaient des résultats négatifs (3 cas) ou douteux (1 cas). Là encore, l'effectif est faible pour généraliser les résultats obtenus. Cependant la tendance est d'avoir une plus faible sensibilité pour les cas hétérozygotes que pour les cas homozygotes. Ces résultats sont à rapprocher de ceux observés pour l'ensemble des cas sporadiques.

La sensibilité de ce test diagnostic semble donc influencée par le sous-type moléculaire de la PrPres et par le polymorphisme du codon 129. Ainsi, la détermination du polymorphisme du codon 129 du vivant du patient doit être plus systématiquement demandée pour l'interprétation d'un résultat négatif de protéine 14.3.3 dans le cadre d'une suspicion d'EST. Il est donc nécessaire de disposer d'une technique rapide et simple de détermination du codon 129 permettant un rendu rapide des résultats.

1.2 Spécificité de la recherche de la protéine 14.3.3 en début d'évolution clinique

Sur l'ensemble de la cohorte étudiée, en considérant les résultats douteux comme positifs et en ne considérant que les résultats de la première ponction, c'est-à-dire la plus précoce dans la suspicion d'une EST, la spécificité est seulement de 47,3 % et légèrement plus élevée pour les cas sMCJ à 50,7 %. Elle est très faible, et assez différente de celles retrouvées dans la littérature : 88,1 % pour Hisch *et al* ou 79,2 % pour Sanchez-Juan *et al* par exemple (Hsich et al, 1996; Sanchez-Juan et al, 2006). Néanmoins, dans l'étude de Sanchez-Juan *et al,* sur une grande cohorte de 1117 cas contrôles la recherche de protéine 14.3.3 est positive pour 27 % des patients souffrant de pathologies inflammatoires, 27 % des patients atteints de paranéoplasies, 27 % de patients atteints d'AVC et 31 % des patients d'épilepsies, mais seulement pour 10 % des patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives. Dans notre cohorte de témoins négatifs, 27 % des patients (20/74) sont atteints de pathologies non neurodégénératives de type inflammatoires, ischémiques ou infectieuses et donc susceptibles d'avoir un résultat positif dans une proportion importante de cas.

Notre étude comprend comme témoins les cas confirmés négatifs par l'analyse neuropathologique. Or, un résultat de protéine 14.3.3 rendu douteux ou positif a fréquemment déclenché la demande d'autopsie pour confirmation diagnostique auprès du clinicien. La plupart des résultats « vrais négatifs » diagnostiqués au laboratoire n'a pas bénéficié de confirmation diagnostique sur tissu cérébral après autopsie, notre population témoin est donc très probablement biaisée. La spécificité de notre méthode de recherche de la protéine 14.3.3 serait plus justement évaluée sur la cohorte de LCR reçus au laboratoire dans le cadre du diagnostic et pour lesquels un diagnostic d'exclusion des EST a été posé. Cette étude nécessiterait d'exploiter les 3127 demandes de protéine 14.3.3 reçues par notre laboratoire depuis 1997. Cependant, dans cette option, le risque est de considérer comme négatif vis-à-vis du diagnostic EST des patients ayant un résultat de protéine 14.3.3 négative mais réellement atteints d'EST (faux négatifs). Nous avons observé dans notre étude, et conformément aux données de la littérature, que dans les formes acquises (notamment vMCJ), dans certains cas gMCJ ou dans les cas sMCJ hétérozygotes pour le codon 129, la sensibilité peut être beaucoup plus faible que celle observée pour les formes sMCJ homozygotes au codon 129, formes qui constituent le sous-groupe le plus important des EST et donc la présentation clinique la plus typique (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Sanchez-Juan et al, 2007; Skinningsrud et al, 2008). Le choix de la cohorte contrôle pour évaluer la spécificité des

marqueurs dans le contexte des EST apparaît donc comme crucial, mais n'est pas sans difficulté. Le trop faible nombre d'autopsies réalisées en regard du nombre de suspicions constitue le principal obstacle pour la bonne évaluation de la spécificité de la recherche de la protéine 14.3.3. Dans cet objectif, une augmentation du nombre d'autopsies serait souhaitable pour une plus juste évaluation analytique des différents marqueurs biologiques. La difficulté logistique et pratique, notamment de disposer de salles d'autopsies spécifiques avec matériel réservé ou à usage unique, de filières d'évacuation des déchets tenant compte du risque EST, de la décontamination de la salle en fonction de ce risque, et en conséquence le coût de ces autopsies constituent un frein au développement à grande échelle de ces actes. Cela pose la question de la pertinence de l'évaluation des résultats du vivant du patient vis-à-vis du « gold standard » diagnostique dans la mesure où celui-ci, du fait de son trop petit effectif, est finalement un mauvais reflet de la situation réelle des cas non EST. Ces remarques s'appliquent aussi à la détermination de la sensibilité, notamment pour les formes d'EST les moins fréquentes dans lesquelles le résultat de recherche de protéine 14.3.3 est fréquemment négatif.

Actuellement le réseau national de surveillance des EST exclut toute MCJ dès que le diagnostic d'une autre pathologie a été établi ou lors d'une amélioration clinique. Dans cette optique très pragmatique, si on peut effectivement espérer que pour la grande majorité des cas ces critères sont suffisants pour éliminer une EST, il subsiste un doute. D'une part une polypathologie a été démontrée par l'analyse neuropathologique dans environ 10 % des cas associant par exemple la présence d'une EST à une autre maladie neurodégénérative de type Alzheimer ou une démence à corps de Lewy (Haraguchi et al, 2008), (données non publiées du laboratoire de Neuropathologie CBPE). D'autre part différents cas ont été rapportés avec une présentation atypique de paranéoplasie ou de syndromes épileptiques (Cohen et al, 2004; Mehta et al, 2008; Neufeld et al, 2003). Enfin, ce principe nécessite un suivi du patient qui, une fois le diagnostic d'exclusion d'EST établi, est souvent « perdu de vue » soit pour cause d'un retour à domicile, soit pour cause d'intégration dans un établissement de long séjour. Les formes d'évolution rapides et les cas, certes rares, d'évolution au contraire beaucoup plus longue y sont alors moins bien dépistées. Une des solutions pratiques est de proposer la vérification du premier résultat sur une seconde ponction lombaire à distance, ce qui peut toutefois poser problème du fait de caractère invasif du geste.

1.3 Apport de la seconde ponction de LCR sur la sensibilité et la spécificité

Pour 45 patients répartis en 28 cas d'EST positives et 17 cas d'EST négatives (soit 22,8 % de la cohorte totale, 22,7 % des cas positifs d'EST et 23% des cas négatifs d'EST), nous avons disposé d'une deuxième ponction de LCR. Parmi les cas d'EST positifs, aucun des 9 cas contrôlés avec une protéine 14.3.3 positive sur le premier prélèvement n'a changé de catégorie. Les 3 cas sMCJ qui avaient un résultat de recherche de protéine 14.3.3 douteuse à la première ponction ont vu la recherche devenir positive. Enfin, pour les 7 cas SMCJ ayant un résultat négatif de protéine 14.3.3 lors de la première ponction, 3 sont restés négatifs, 3 sont devenus positifs et 1 est devenu douteux lors du deuxième prélèvement. Dans cette population, la spécificité augmente alors de 23,5 % (4/17) à 41,2 % (7/17) et la sensibilité de 32,1 % (9/28) à 67,8 % (19/28). Cette forte augmentation de sensibilité permet donc de justifier la réalisation d'une seconde ponction lombaire, malgré son caractère invasif.

Il est à noter que les 3 cas restés négatifs sont des cas sporadiques de type MV2 ou MV1/2. Le polymorphisme du codon 129 apparaît donc à nouveau comme déterminant dans la sensibilité du test. Cela montre la difficulté diagnostique de ces formes atypiques.

Toutes étiologies confondues et sur l'ensemble de la population, la sensibilité calculée en tenant compte du deuxième prélèvement, lorsqu'il existe, est de 89,4 % (contre 85,4 % sur la première ponction). La spécificité est alors de 51,4 % contre 47,3 % lors de la première ponction. Les cas EST négatifs pour lesquels la recherche de protéine 14.3.3 est devenue ou restée positive sont majoritairement liés à des encéphalites, des ischémies cérébrales ou des processus tumoraux. La encore, la population témoin choisie présente un biais par rapport à la population générale des démences testées. En effet, pour les cas où le contrôle devient négatif, la suspicion d'EST est fréquemment levée et donc le diagnostic de certitude est rarement réalisé. Néanmoins conformément aux autres études, la répétition de la ponction permet d'améliorer la sensibilité du test (Collins et al, 2006; Giraud et al, 2002; Sanchez-Juan et al, 2007). A nouveau, les réserves émises pour l'évaluation de la spécificité et de la sensibilité concernant le choix de la cohorte au § 1.2 s'appliquent à l'analyse dans le cadre d'une seconde ponction.

1.4 Apports de l'aldolase et de la néoptérine

L'aldolase est une enzyme de la glycolyse existant sous différentes isoformes, et dont l'isoforme C est plus particulièrement présente dans le tissu cérébral (Thompson et al, 1982). Il a été décrit une augmentation de son activité dans le LCR notamment dans les cas de traumatismes crâniens sévères et dans les AVC (Linke et al, 2006). Le dosage de l'activité enzymatique de l'aldolase dans notre étude n'apporte pas d'amélioration de sensibilité ou de spécificité par rapport à la protéine 14.3.3. L'étude de la répartition des dosages en fonction du polymorphisme du codon 129 et du type de PrPres montre un fort chevauchement dans les populations. Il n'est pas possible de déterminer un seuil discriminant. De même, en fonction du type de PrPres uniquement, à l'exception du type 2b où l'activité enzymatique est plus faible, le recoupement entre les populations est important. Cependant, la conservation préanalytique de l'aldolase est délicate, son activité enzymatique diminue fortement si la conservation à +4°C est supérieure à 48h. Un dosage de cette activité de façon immédiate lors du prélèvement de la ponction améliorerait très certainement ses performances.

En revanche, le dosage de la néoptérine améliore nettement la spécificité de la recherche de protéine 14.3.3. Ce marqueur est un reflet de l'activation immunitaire car il est sécrété par le macrophage après stimulation par le γ interféron libéré par le lymphocyte T activé (Huber et al, 1984). Dosé dans le LCR, il représente alors l'activation immunitaire intrathécale (Abdulle et al, 2002). Dans la mesure où les pathologies inflammatoires, ischémiques et paranéoplasiques sont des causes fréquentes de résultats faussement positifs vis-à-vis du diagnostic des EST, un marqueur capable de les distinguer nous a paru intéressant dans ce contexte diagnostique (Sanchez-Juan et al, 2006). Le dosage de la néoptérine est réalisé de façon prospective au laboratoire pour chaque demande de recherche de protéine 14.3.3. Nous avons étudié la spécificité en fixant arbitrairement trois seuils à 10 nM, 15 nM et 20 nM, et en considérant que les résultats positifs de protéine 14.3.3 associés à une concentration de néoptérine supérieur au seuil étaient assimilés à un résultat négatif vis-à-vis du diagnostic d'EST. Nous avons observé une nette augmentation de la spécificité qui atteint son meilleur niveau à 71,2 % pour un seuil de néoptérine à 10 nM, contre 46,6 % sans tenir compte de la néoptérine. Cependant, dans notre cohorte, quatre patients atteints d'EST présentent malgré tout des concentrations de néoptérine compris entre 15 nM et 65 nM, et sont alors, dans cette stratégie, considérés comme non atteints d'EST. Pour un seuil à 20 nM, seul 2 cas EST sont mal classés pour onze cas non EST qui sont bien classés. On obtient pour

ce seuil une sensibilité de 83,1 % pour une spécificité de 61,6 % et une efficacité globale du test de 74,6 %, ce qui montre une amélioration sensible de la recherche de protéine 14.3.3. Le dosage de néoptérine doit donc être interprété dans un contexte clinico-biologique global, en tenant compte du fait que s'il montre la présence d'une activation immunitaire réelle, une EST peut y être associée.

Le choix de la cohorte de témoins négatifs ainsi que les réserves détaillées précédemment quant à la spécificité de la protéine 14.3.3 (§ 1.2) s'appliquent aussi pour ces marqueurs associés.

1.5 Conclusion

Notre étude montre que la protéine 14.3.3 est un marqueur diagnostic dont la sensibilité est très fortement liée à la forme d'EST considérée. Elle augmente au cours de l'évolution de la maladie et dépend, dans les formes sMCJ, du polymorphisme du codon 129 et du typage moléculaire de la PrPres. Ces résultats sont cohérents avec les différentes études de la littérature. Du fait du choix pour notre cohorte témoin de cas exclusivement confirmés par un examen encéphalique neuropathologique, « gold standard » diagnostique, la spécificité est plus faible que celles rapportées dans les autres études de la littérature. Ces résultats montrent l'importance du choix de la cohorte témoin sur les caractéristiques des marqueurs et les limites de la stratégie basée sur le diagnostic de certitude. L'association de la néoptérine, marqueur de l'activation immunitaire intrathécale, permet d'améliorer nettement la spécificité et l'efficacité du test pour un seuil de 20 nM. Devant un résultat négatif de protéine 14.3.3, l'interprétation diagnostique doit tenir compte de la forme d'EST suspectée cliniquement et aussi du polymorphisme du codon 129. En fonction de ces considérations, un contrôle de la ponction peut être envisagé pour augmenter la sensibilité. Devant un résultat positif, le dosage de la néoptérine constitue un marqueur complémentaire pour identifier des pathologies intercurrentes, notamment au dessus d'un seuil que l'on pourrait fixer à 20 nM, bien que celui-ci ne soit évidemment pas exclusif du risque d'EST.

La recherche de protéine 14.3.3 associée au dosage de la néoptérine constitue un bilan diagnostique performant et utile pour le diagnostic des EST du vivant du patient. Cependant, il est nécessaire de bien tenir compte des différents facteurs influençant la spécificité et la sensibilité du test pour une interprétation correcte et optimale des résultats. La détection dans

les tissus périphériques ou les liquides biologiques d'un marqueur plus spécifique des EST, comme à priori la protéine prion pathologique, s'avère indispensable pour améliorer ce diagnostic du vivant du patient.

2. DETECTION DE LA PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE DANS LES NERFS PERIPHERIQUES

Les EST affectent principalement le système nerveux central, mais l'accumulation de PrPsc et le caractère infectieux liés aux prions ne sont pas strictement confinés dans cette zone. De nombreuses études à partir des EST animales expérimentales ou naturelles ont montré le rôle du SNP dans la dissémination de l'agent pathogène dans l'organisme. Chez l'homme, son implication dans la physiopathologie des EST a aussi été largement étudiée.

Dans l'objectif de proposer un test diagnostic du vivant du patient plus spécifique que la recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR, nous avons recherché la présence de la PrPsc dans les nerfs périphériques de patients atteints de formes sMCJ.

2.1 Mise en évidence de la résistance partielle à la PK d'une forme de PrP présente dans le nerf péronier d'un cas sMCJ

A partir de l'étude d'un cas sMCJ, nous avons mis en évidence une forme de PrP partiellement résistante à l'action de la PK dans les nerfs sciatique et péronier par une technique de Western Blot (Article 1). A la concentration de PK utilisée, toute la PrPc est dégradée pour les cas contrôles, aucun signal n'est observé, alors que pour le cas sMCJ, un signal indiquant la présence d'une protéine résiduelle, incomplètement digérée, est mis en évidence. Pour obtenir ce résultat, nous avons principalement adapté la technique d'homogénéisation habituellement utilisée pour le tissu cérébral. Dans notre étude, nous avons homogénéisé la totalité du tissu nerveux à l'aide d'un système de broyage mécanique réalisé dans un tube scellé de petite taille contenant un barreau magnétique et refroidi par un bain d'azote liquide. Cette technique permet de réduire en une poudre très fine la totalité de l'échantillon, y compris les fractions les plus résistantes aux broyages traditionnels telles que la gaine de myéline. Cette poudre est ensuite remise en suspension et homogénéisée dans le tampon glucosé utilisé dans les techniques classiques sur tissu cérébral. Grâce à une technique de précipitation et de concentration par ultracentrifugation en milieu détergent, nous avons pu mettre en évidence un signal différentiel de PrP par Western Blot entre les témoins et un cas sMCJ sur le nerf péronier et le nerf sciatique (Article 1).

L'immunoréactivité vis-à-vis de la PrP a été révélée par l'IHC et localisée sur toute la longueur de la moelle épinière, du niveau cervical au niveau lombaire ainsi qu'au niveau de la corne postérieure de la moelle et tout le long de la fibre nerveuse. Ce patient était porteur d'un génotype homozygote valine pour le codon 129 et d'une PrPres de type 1 dans le tissu cérébral.

2.2 Mise en évidence de la PrPres dans le nerf périphérique superficiel d'un cas sMCJ

A partir de différents tissus obtenus après autopsies de trois cas sMCJ, nous avons montré la présence de PrPres au niveau de la moelle épinière pour ces trois cas par une technique Western Blot. De plus, pour un seul de ces cas, nous sommes parvenus à montrer l'accumulation de PrPres au niveau d'un ganglion de la chaîne parasympathique dorsale et du nerf péronier (Article 2). Pour parvenir à ce résultat sur l'échantillon de nerf péronier, nous avons utilisé la même technique de broyage que pour le cas sMCJ décrit précédemment (§ 2.1) puis une détection par Western Blot associée à une révélation par chimiluminescence, d'exposition longue (43 minutes). Pour les deux autres patients sMCJ, dans les mêmes conditions, aucun signal spécifique n'a pu être mis en évidence dans ces tissus ni par Western Blot ni par IHC. Chaque détection de PrPres par Western Blot était associée à un marquage positif par IHC de ces mêmes zones. Cette immunoréactivité a aussi été démontrée au niveau du nerf pour le cas présentant une accumulation de PrPres par Western Blot. Les dépôts de PrP sont présents aussi bien sur les fibres myélinisées que non myélinisées. Ce patient était homozygote méthionine pour le codon 129 et porteur d'une PrPres de type 1 dans le tissu cérébral.

2.3 Discussion

Nous avons mis en évidence la PrPres dans le nerf péronier d'un cas sMCJ homozygote méthionine pour le codon 129 et dans un autre cas homozygote valine pour le codon 129 d'une forme de PrP présentant une sensibilité à la PK différente des cas contrôles. Ces résultats ont été obtenus en adaptant la technique de détection de la PrPres cérébrale en fonction des particularités du tissu nerveux et notamment de l'étape de broyage qui s'avère probablement capitale pour pouvoir détecter de très faibles quantités de PrPres.

L'implication du SNP est apparue comme un facteur clé dans le transport de l'agent pathogène au cours du développement des EST, notamment à la suite d'études portant sur les formes acquises d'EST à l'aide de modèles animaux. Il a été montré notamment dans un modèle de souris que la suppression des fibres nerveuses sympathiques retardait le développement de la maladie suite à une inoculation intra – péritonéale (Glatzel et al, 2001). Dans la même étude, des souris transgéniques surexprimant une innervation sympathique au niveau des organes lymphoïdes sont plus sensibles à la maladie que les souris sauvages. Cela met donc en relief qu'il existe des modes de propagations indépendantes des fibres nerveuses mais que ces dernières participent activement à cette propagation. Par la suite, il a été montré la présence de PrPsc dans le tissu musculaire de souris après inoculation intracérébrale (Bosque et al, 2002). Chez les moutons, il a par ailleurs été rapporté la présence de PrPsc notamment dans le nerf sciatique et différents muscles après inoculation intracérébrale d'une souche de tremblante, mais aussi pour un petit nombre d'animaux atteints de tremblante naturelle à un stade préclinique (Andreoletti et al, 2004).

Dans les différentes formes d'EST humaines, la présence de PrPsc a pu être objectivée au niveau du SNP dans plusieurs études, et ce indépendamment des formes cliniques. Dans un modèle animal de primates (*Macaca fascicularis*), suite à l'inoculation par voie intracérébrale d'un homogénat cérébral d'un patient atteint de sMCJ, la PrPsc a été mise en évidence dans les terminaisons nerveuses de muscles qui présentaient eux mêmes une accumulation de PrPsc (Herzog et al, 2005). La technique utilisée consiste en une méthode ELISA commerciale (TeSeE Sheep and goat BioRad) dont l'étape de précipitation a été modifiée et fait intervenir une précipitation par l'acide phosphotungstique (NaPTa). La quantité présente dans les muscles est évaluée par les auteurs à environ 30000 fois moindre que dans le tissu cérébral.

Différentes études sur des tissus obtenus lors d'autopsies ont permis de mieux caractériser l'envahissement du SNP dans des cas humains de différentes étiologies. Au cours d'une première étude sur des cas sMCJ et iMCJ, un marquage de PrP au niveau de la moelle épinière a été mis en évidence par IHC pour 11 cas sMCJ sur 20 et pour les 4 cas iatrogènes testés liés à l'administration d'hormone de croissance extractive contaminée (Goodbrand et al, 1995). Dans une étude plus récente, il a été montré pour deux cas iatrogènes liés à une greffe de dure-mère une immunoréactivité par IHC au niveau d'un nerf superficiel, associée à la détection de PrPres par Western Blot dans un seul de ces deux cas. Dans cette étude, il n'a pas été démontré d'accumulation de PrPres pour les cas sMCJ étudiés (Ishida et al, 2005). La

technique utilisée pour cette dernière étude par Western Blot comprenait une étape de traitement par de la collagénase. Une autre étude sur 22 cas d'EST montre la présence de PrPres dans différents ganglions lymphoïdes de 10 cas sMCJ, 2 cas iMCJ et 1 cas vMCJ mais pour ces patients, les nerfs n'ont pas été étudiés (Lee et al, 2005a). Par ailleurs, la présence de PrPres a été objectivée dans la rate ou dans les muscles pour 15 patients sMCJ sur 32 (dont 3 associaient les deux marquages) grâce à l'utilisation d'une technique de précipitation par le NaPTa (Glatzel et al, 2003). Le niveau d'accumulation est estimé être 10000 fois plus faible que pour le tissu cérébral. Il est à noter que dans une seconde étude, aucun signal n'a été rapporté dans le muscle ou les nerfs pour les 7 cas sMCJ testés (Head et al, 2004b). Une étude plus récente a montré un faible signal de PrPres par Western Blot dans les muscles de 6 patients atteints de sMCJ sur 26 testés. Les dépôts de PrP dans ces muscles, localisés par une technique d'IHC, se trouvent le long des fibres nerveuses (Peden et al, 2006). La technique de Western Blot utilisée comprenait l'ajout des détergents lors de l'homogénéisation du tissu suivie d'une étape de précipitation par le NaPTa.

Tous ces résultats montrent que les fibres nerveuses correspondent à des lieux potentiels d'accumulation de la PrPsc. Si une immunoréactivité a pu être mise en évidence par IHC notamment le long des terminaisons nerveuses à l'intérieur des tissus musculaires, à l'exception de notre étude, aucun profil de PrPres n'a pu être identifié directement sur les nerfs périphériques dans les cas sMCJ (Peden et al, 2006). Le seul autre cas rapporté positif en Western Blot concerne une forme iMCJ homozygote méthionine au codon 129 (Ishida et al, 2005). Ces résultats indiquent qu'il existe des variations dans les niveaux d'accumulation en fonction des formes étiologiques et potentiellement des types de PrPres et du polymorphisme du codon 129, que la répartition de la PrPsc le long des fibres est hétérogène, que les techniques utilisées ne sont pas assez sensibles, ou enfin que les conditions de digestion par la PK ne sont pas adaptées à la forme présente dans les nerfs. Ces quatre propositions ne sont pas exclusives les unes des autres.

Les formes iatrogènes et vMCJ semblent les plus concernées par une dissémination importante de la PrPsc dans les tissus périphériques, la détection y étant plus fréquente que pour les formes sMCJ. Toutefois, ces premières formes sont les plus étudiées de la littérature sur ce plan. Dans les formes vMCJ, on sait que la localisation périphérique précède la localisation centrale, avec une invasion de type « centripète » de la PrPsc (Haik et al, 2003). Dans les formes sporadiques, la dissémination serait plutôt du cerveau vers la périphérie

(Ishida et al, 2005; Peden et al, 2006). L'analyse des muscles et des rates de cas sMCJ a montré la sensibilité la plus élevée dans les cas homozygotes méthionine avec une PrPres de type 1 et d'évolution longue. Le facteur temps pourrait alors influencer la quantité de PrPsc présente dans les tissus périphériques pour ces formes (Glatzel et al, 2003). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait disposer d'une cohorte de patients très importante dans chaque sous-type sMCJ avec des prélèvements à des temps d'évolution différents par rapport à la date de survenue des premiers signes. Il faut disposer quoi qu'il en soit d'une technique adaptée en terme de sensibilité, conditions de PK, et de répétabilité.

L'hétérogénéité de la répartition dans les tissus musculaires a été décrite dans différentes études. Il n'a pas toujours été possible de détecter la PrPsc dans les différentes zones d'un même muscle (Glatzel et al, 2003; Head et al, 2004b; Herzog et al, 2005; Peden et al, 2006). Dans toutes ces études, la répétabilité des techniques utilisées sur de très faibles quantités de matériel ont donné des résultats satisfaisants pour leurs auteurs, ne remettant pas en cause leurs techniques respectives. Par ailleurs, la mise en jeu de techniques adaptées aux spécificités du tissu nerveux ou connues pour être très sensibles a été la règle pour ces études.

Dans notre étude, pour atteindre un niveau de sensibilité suffisant pour une détection sur le nerf péronier d'un cas sMCJ, nous avons été contraints d'adapter le protocole standard de broyage de notre technique de routine (Article 2). Afin de broyer la totalité du tissu nerveux périphérique obtenu lors de l'autopsie, nous l'avons réduit en une poudre très fine grâce à l'agitation magnétique d'un barreau métallique dans une chambre individuelle contenant l'échantillon. Ce système, très efficace, nécessite un refroidissement dans un bain d'azote liquide ce qui rend son utilisation en routine difficilement envisageable, même pour un faible échantillonnage. D'autre part, la nature des matériaux de la chambre et du barreau magnétique (acier et polycarbonate) rend très difficile le nettoyage et impose un fonctionnement en matériel à usage unique, ce qui n'est pas supportable sur le plan économique pour un fonctionnement en routine. En revanche, l'utilisation de l'ultracentrifugation, dont la sensibilité avait été comparée par rapport aux techniques sans centrifugation dans notre laboratoire (données non publiées), s'est montrée indispensable pour concentrer la totalité de la PrPres contenue dans les 20 mg de nerf. La totalité du tissu extrait est déposée dans le gel d'électrophorèse pour obtenir un signal positif.

Le fait d'être les seuls à rapporter la présence de PrPres dans les nerfs périphériques d'un cas sMCJ nous fait évoquer l'existence d'une possible différence de résistance à la PK de la PrPsc présente dans ces tissus. Nous l'avons en effet remarqué lors de nos premiers essais de détection de la PrPsc sur les nerfs péronier et sciatique d'un cas sMCJ homozygote valine au codon 129 (Article 1). En effet, le signal obtenu par Western Blot dans cette étude est un signal différentiel de PrP résistant aux conditions de PK utilisées entre les nerfs témoins et le nerf du cas sMCJ : la digestion n'est que partielle pour le patient atteint d'EST alors qu'elle est totale pour les témoins. Cela soulève la question de la résistance à la PK de la PrPsc présente dans le nerf périphérique. Au niveau cérébral, les données de la littérature montrent qu'une fraction de la PrPsc reste sensible à l'action de la PK et que cette fraction est capable d'initier la réplication de la PrPc (Pastrana et al, 2006; Safar et al, 1998; Tzaban et al, 2002). Dans une étude récente, une forme de PrPsc présentant une résistance environ quatre fois plus faible à l'action de la PK que celle des formes classique a été rapportée (Gambetti et al, 2008). Cette forme a été identifiée chez 11 patients et présente un profil de migration électrophorétique particulier en échelle, de 6 kDa à 29 kDa dont de nombreux fragments de petites tailles. Ces profils ont été identifié par l'anticorps 1E4 dans des conditions de concentration de PK comprise entre 5 à 10 µg / ml. Tous ces patients sont homozygotes valine pour le codon 129 du gène PRNP. Devant la diversité des propriétés biochimiques des PrPsc retrouvées dans le tissu cérébral, ces variations sont aussi envisageables pour la PrPsc des tissus périphériques des patients atteints d'EST.

Dans la mesure où la protéine identifiée dans notre étude n'est pas présente dans les nerfs témoins, on peut supposer qu'elle joue un rôle dans la maladie, ou qu'elle en est simplement le témoin. La relative résistance à la digestion par la PK de la PrPsc des tissus périphériques pose aussi la question de la sensibilité des techniques utilisées. Les digestions mises en œuvre dans les différents protocoles utilisés ne sont peut être pas adaptées à cette forme particulière de PrPsc.

Une des pistes d'amélioration a été l'adaptation d'un kit ELISA commercial (TeSeE Sheep and goat BioRad®) utilisé pour le diagnostic des formes bovines et ovines d'EST (EFSA, 2005). Ce test présente l'avantage d'être capable d'identifier les formes atypiques de PrPres des petits ruminants grâce à la mise en jeu d'une digestion modérée de la PrPsc. Ces formes atypiques ont la particularité d'être plus sensible à la digestion par la PK que la PrPsc de la tremblante classique (Buschmann et al, 2004). Dans ce test, l'étape de digestion par la

PK est suffisante pour dégrader la totalité de la PrPc mais permet de conserver cette PrPsc spécifique. Il est de plus très sensible par la mise en œuvre d'une précipitation alcoolique de la PrPres et de l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-prion très avide, le Sha-31.

Dans notre optimisation de ce test, un intérêt particulier a été porté aux étapes pré analytiques et à l'adaptation de ce kit à du tissu d'origine humaine. Les premières optimisations ont concerné l'étape de broyage pour tenir compte de la résistance de la gaine de myéline au broyage traditionnel. Elles ont consisté essentiellement en l'introduction d'une bille supplémentaire de plus grosse taille dans le tube de broyage ainsi qu'un second cycle de broyage. Les différents volumes de réactifs ont aussi été adaptés à la plus faible quantité de tissu disponible (20 mg de nerf) par rapport au tissu cérébral (350 mg). Cela nous a conduit entre autre à utiliser des tubes de plus petite contenance pour que le broyage reste efficace. Nous avons ensuite modifié la nature et les proportions des détergents présents dans les différents tampons d'homogénéisation et de précipitation. Enfin, la sensibilité de l'étape de révélation a été améliorée par l'utilisation d'un anticorps primaire directement conjugué (Sha 31-POD). Ces travaux ont fait l'objet de mémoires de stage de 5ème année de Pharmacie de quatre étudiants successifs, dont un en a fait sa thèse d'exercice pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie (Mulet, 2007). A l'issue de ces différentes adaptations, notre test modifié ne s'avère cependant pas suffisamment sensible pour la détection dans les nerfs périphériques humains.

2.4 Conclusion

Nous avons montré la présence dans le nerf péronier et le nerf sciatique pour un cas sMCJ d'une forme de PrP présentant une sensibilité à la PK différente de la PrPc des témoins (Article 1). Dans un autre cas sMCJ, la PrPres a été mise en évidence par Western Blot dans le nerf péronier en mettant en œuvre une technique de broyage spécifique du tissu nerveux (Article 2). Cette technique ne nous a toutefois pas permis de détecter une accumulation de PrPres dans les nerfs périphériques des deux autres cas testés. Du fait de ces résultats encourageants, l'analyse de ce tissu nerveux périphérique nous semble être pertinente pour le diagnostic du vivant du patient, associée à une technique de détection sensible.

La pratique des biopsies de nerfs est encadrée par des recommandations précises de la Haute Autorité de Santé, actualisées en mai 2007 (HAS, 2007b). Elles sont réalisées pour les cas où le diagnostic des neuropathies périphériques n'a pas pu être établi avec certitude par les marqueurs biologiques et paracliniques reconnus ou pour préciser l'étiologie de la neuropathie. Le caractère invasif a été récemment évalué dans ce contexte, et montre un rapport bénéfice / risque favorable lorsque la biopsie est réalisée dans le cadre d'un schéma diagnostic bien établi (Hilton et al, 2007; Vital et al, 2008). La présence de PrPres a été objectivée au niveau de la muqueuse olfactive obtenue lors de l'autopsie dans des cas sMCJ (Zanusso et al, 2003). A la suite de ces premiers résultats, une biopsie de cette muqueuse a été réalisée par rhinoscopie chez un patient suspect de sMCJ. La présence de PrPsc sur l'épithélium olfactif est observée par IHC mais aucun signal n'a été détecté en Western Blot (Tabaton et al, 2004). La présence de PrPres a été par la suite confirmée sur le tissu cérébral de ce patient. La biopsie de nerf périphérique apparaît comme bien moins invasive que le prélèvement par rhinoscopie.

Ainsi, nous avons poursuivi l'étude avec des outils nous laissant espérer une augmentation de sensibilité et la reconnaissance de PrPsc de sensibilité à la PK différente. Différents essais d'optimisation d'une technique ELISA développée pour le diagnostic des EST animales (TeSeE Sheep and goat Biorad®) ont été réalisés. Ils n'ont cependant pas permis d'atteindre une sensibilité suffisante pour la détection dans les nerfs humains. Le développement d'outils alternatifs de précipitation et concentration de la PrPsc plus sensibles est donc nécessaire dans l'objectif d'un test diagnostic du vivant du patient sur ce type de tissu.

3. UTILISATION DE LA STREPTOMYCINE POUR LE DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DES MALADIES A PRIONS HUMAINES

Le faible niveau d'accumulation dans certaines zones cérébrales et surtout dans les tissus périphériques a encouragé le développement de techniques plus sensibles que la technique de Western Blot utilisée pour les homogénats cérébraux sans traitements préalables. Différents ligands de la PrP ont été proposés en vue de l'extraire plus spécifiquement des échantillons tissulaires. Dans cette optique, la capacité de la streptomycine à se lier via ses fonctions guanidinium à une ou plusieurs molécules de PrP a été démontrée sur des échantillons de cerveau d'origine animale (Moussa et al, 2006).

Sur du tissu cérébral d'origine animale, la streptomycine a la capacité de se lier à la PrP. Dans le contexte de développement d'un test du vivant du patient, notre objectif a été d'évaluer les aptitudes de la streptomycine à se lier à de la PrP d'origine humaine. A l'aide d'une technique de Western Blot incluant une étape de précipitation par la streptomycine, son efficacité a tout d'abord été vérifiée sur du tissu cérébral d'origine humaine de différentes formes d'EST, en comparaison à d'autres protocoles bien décrits dans la littérature. Enfin, la sensibilité et la spécificité sur les tissus lymphoïdes ont été évaluées sur un faible échantillonnage.

3.1 Précipitation de la PrPres humaine par la streptomycine

Notre protocole de précipitation par la streptomycine nous a permis de mettre en évidence la PrPres d'origine humaine cérébrale dans un large panel de 98 patients atteints de différentes formes d'EST (Article 3). Par l'étude associée de 52 cas exempts de ces pathologies, nous avons pu déterminer la spécificité et la sensibilité de notre protocole qui s'élèvent chacune à 100%. Dans les conditions opératoires déterminées de notre technique, aucun signal n'est mis en évidence dans le surnageant après mise en jeu de la streptomycine. La totalité de la PrPres est bien précipitée par cet agent, dans les limites de sensibilité de notre révélation immunologique.

Une particularité de notre technique est de n'utiliser que 5 mg de tissu cérébral, ce qui représente une faible quantité initiale. Pour mieux décrire ses performances et notamment sa

capacité à précipiter de faibles quantités de PrP, nous avons comparé les résultats obtenus avec différents protocoles bien décrits dans la littérature, adaptés à cette faible quantité de tissu initiale pour trois types de PrPres : 1 cas sMCJ MM1, 1cas IFF MM2 et 1 cas sMCJ VV2. Il s'agit du protocole standard d'ultracentrifugation en milieu détergent utilisé dans notre laboratoire pour le diagnostic de routine (Brown et al, 1986; Madec et al, 1998), d'une centrifugation à froid (Lee et al, 2000) et enfin d'une précipitation par le NaPTa (Wadsworth et al, 2001). Cette étude comparative montre que notre protocole est aussi sensible que la précipitation par le NaPTa dans les cas sMCJ MM1 et IFF MM2 ; ces deux protocoles étant plus sensibles que la centrifugation à froid et l'ultracentrifugation. Dans le cas sMCJ VV2, il n'y a pas de différences évidentes entre les quatre protocoles (Article 3, figure 3). Des études de dilutions pour le cas IFF MM2 ont confirmé ces premières observations.

Avec l'utilisation de la streptomycine, la détermination des différents profils caractéristiques des différentes souches de PrPres humaines a été effectuée avec succès, dans la totalité des différents cas testés. Nous avons pu différencier sans difficulté la PrPres de type 1 de celle de type 2 selon la classification de Parchi *et al* (Parchi et al, 1996). Les ratios de glycosylations de la PrPres, s'ils n'ont pas été confirmés par des études de quantification, semblent conservés, particulièrement dans le cas du vMCJ. L'ensemble de ces données nous permet de proposer notre protocole utilisant la streptomycine dans le cadre du diagnostic des EST sur tissu cérébral et du typage électrophorétique de la PrPres cérébrale.

3.2 Utilisation de la streptomycine dans d'autres tissus que le SNC

Un des avantages de notre protocole est l'utilisation d'une faible quantité de tissu initiale. Ce point n'est pas critique pour le diagnostic de certitude sur tissu cérébral, mais est important dans le contexte de prélèvements de tissus périphériques pour un diagnostic précoce du vivant du patient. Nous avons alors appliqué cette technique à cinq échantillons d'amygdales prélevées dans le cadre de suspicions de vMCJ. Dans les échantillons de patients atteints de vMCJ, nous sommes parvenus à mettre en évidence le profil caractéristique de PrPres de type 2b selon Parchi *et al* alors qu'un signal non spécifique est détecté pour les 3 cas confirmés exempts de vMCJ (Article 3, figure 7).

3.3 Discussion

Dans notre étude, l'utilisation de la streptomycine a montré son efficacité pour mettre en évidence la PrPres humaine et ce pour les différentes étiologies d'EST testées avec une sensibilité et une spécificité de 100%. En plus de ces caractéristiques analytiques indispensables, un de nos objectifs était de disposer d'une technique plus facile à mettre en œuvre que la méthode classique par ultracentrifugation utilisée en routine dans notre laboratoire. Nous avons alors comparé le protocole utilisant la streptomycine avec trois autres protocoles bien décrits dans la littérature : une ultracentrifugation en milieu détergent, une précipitation par l'acide phosphotungstique (NaPTa) et une centrifugation à froid (Lee et al, 2000; Madec et al, 1998; Wadsworth et al, 2001). Le protocole streptomycine que nous avons établi nous permet de précipiter la PrPres dans un temps relativement court (2h30 au total) comparativement aux 4h30 environ nécessaires au protocole standard par ultracentrifugation. De plus, l'étape de remise en solution des culots par cette dernière technique est délicate et nécessite du personnel entraîné pour être reproductible. La technique de centrifugation à froid apporte un gain de temps substantiel (gain de 1h30 environ par rapport à l'ultracentrifugation) mais aux dépends de la sensibilité pour des quantités de tissus plus faibles. La technique au NaPTa nécessite une préparation relativement longue et laborieuse de tampons, de même que l'étape de précipitation qui nécessite parfois une double centrifugation. Le protocole utilisant la streptomycine apparaît comme un bon compromis pour l'ensemble de ces critères car ne nécessitant pas de préparation spécifique de tampon et le plus rapide.

Nous avons démontré que la streptomycine est un agent capable de favoriser la précipitation de la PrP d'origine humaine à partir de très faibles quantités de tissu, seulement 5mg contre 8 mg dans la méthode de centrifugation à froid, 50 mg pour la méthode au NaPTa, et 100 mg pour notre technique de routine par ultracentrifugation (Lee et al, 2000; Madec et al, 1998; Wadsworth et al, 2001). Lorsque l'on diminue la quantité de matériel initial à 5 mg pour chaque technique, la sensibilité est parfois grandement mise en défaut. Ce point est notamment vérifié pour la technique de centrifugation à froid où la sensibilité diminue considérablement entre 8 mg et 5 mg de tissu traité, alors qu'elle est bonne pour la quantité recommandée dans le protocole standard de la littérature. Ces résultats laissent penser que cette quantité est un point critique dans l'efficacité de la méthode. Concernant la sensibilité de la précipitation par le NaPTa, elle reste excellente même lorsque l'on diminue la quantité de tissu. Elle est comparable à celle de la streptomycine. Sa bonne sensibilité avait

précédemment déjà été rapportée par rapport à la technique de centrifugation à froid dans une étude sur des tissus de l'épithélium olfactif En effet, cette centrifugation à froid ne permettait pas d'obtenir un signal en Western Blot sur 100mg de ce tissu, alors que la PrPres était mise en évidence avec le protocole au NaPTa (Zanusso et al, 2003). Pour l'ultracentrifugation en milieu détergent, la sensibilité pour une quantité initiale de 5 mg de tissus est plus faible que pour les autres protocoles. Il est probable que cela soit lié à la remise en suspension d'un très petit culot après centrifugation, ce qui pointe la difficulté technique de cette méthode. Finalement, les méthodes les plus sensibles de notre étude sur 5 mg de tissus sont le NaPTa et la streptomycine. Ces résultats sont encourageants dans l'optique de l'utilisation de la streptomycine sur de très faibles quantités de tissus comme par exemple une biopsie de nerf.

Cette bonne sensibilité de la streptomycine a par ailleurs été décrite dans des protocoles d'IHC où elle a permis la détection d'atteintes précoces de certains tissus chez des animaux atteints d'EST naturelles ou expérimentales dans des études d'inoculations chez des souris (Bencsik et al, 2008; Leclere et al, 2008). Dans une étude comparative de différents protocoles d'IHC sur des tissus animaux, un prétraitement à la streptomycine a permis un gain de sensibilité important (Bencsik et al, 2006).

Concernant la détection dans les amygdales, nous avons mis en évidence un profil de type 2b dans les cas de patients atteints de vMCJ et aucun signal spécifique pour les autres patients. Notre protocole nous a donc permis de correctement classer les patients par rapport au diagnostic définitif de vMCJ. Cependant, si aucun profil spécifique de la PrPres n'est révélé pour les cas négatifs, il subsiste néanmoins un signal non spécifique pour un poids moléculaire apparent d'environ 30 kDa. L'augmentation de la PK n'a pas dégradé ce signal, qui diminue en revanche lors de cycle de congélations / décongélations successifs. Des optimisations techniques, notamment concernant le tampon d'homogénéisation de ce type de tissu, semblent aussi nécessaires. Il ne nous a pas été possible de les réaliser du fait d'une trop faible quantité de matière disponible. L'ensemble de ces données est cohérent avec celles obtenues chez l'animal, la streptomycine ayant permis la détection de PrP dans la rate de souris inoculées par voie intracérébrale (Leclere et al, 2008).

Dans le tissu cérébral, comme dans le tissu lymphoïde, notre protocole utilisant la streptomycine nous a permis de clairement distinguer différents profils de migration de PrPres. Ces profils sont cohérents avec le typage moléculaire de la PrPres décrits dans les

principales classifications proposées dans la littérature (Hill et al, 2003; Parchi et al, 1996). Dans nos conditions opératoires, c'est-à-dire en faisant agir la streptomycine après l'étape de digestion par la PK et ce contrairement à certaines conditions décrites dans la littérature, nous n'avons pas constaté de modifications du poids moléculaire apparent de migration de la PrPres (Dong et al, 2007; Moussa et al, 2006). Du fait de la non spécificité de la streptomycine vis-à-vis de la forme PrPsc, il est capital de réaliser l'étape de digestion par la PK avant la précipitation par la streptomycine pour une bonne détection et une migration permettant le typage moléculaire. La séquence de réalisation de ces traitements est donc critique.

3.4 Conclusion

Nous avons établi un protocole de détection de la PrPres d'origine humaine par Western Blot faisant intervenir une étape de précipitation par la streptomycine. En la comparant à la praticabilité de trois autres protocoles bien établis de la littérature (ultracentrifugation en milieu détergent, précipitation au NaPTa, centrifugation à froid), il est apparu qu'elle s'avère être un protocole facile et rapide à mettre en œuvre. La sensibilité de cette technique est comparable à celle du meilleur des trois protocoles testés, c'est-à-dire la précipitation au NaPTa. La détection de PrPres de type 2b par notre protocole a été démontrée dans les amygdales de patients atteints de vMCJ. Une optimisation de l'étape de broyage reste cependant indispensable pour ce type de tissu afin d'éliminer tout signal résiduel pouvant interférer dans la sensibilité du test.

La streptomycine permet de précipiter la PrPres à partir de seulement 5 mg de tissu, il serait maintenant intéressant d'évaluer cette technique dans des tissus périphériques comme le nerf péronier. L'étape d'homogénéisation du nerf sera un point crucial pour la bonne détection dans ce type de tissu. De même, un gain de sensibilité pourrait aussi être apporté si nécessaire par le couplage à une technique d'amplification du signal de type iPCR quantitative ou PMCA.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le diagnostic de certitude des EST repose sur la mise en évidence de la PrPsc dans les tissus cérébraux obtenus généralement après autopsie. Du vivant du patient, le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments intégrant des données cliniques, paracliniques (EEG, imagerie) et biologiques validés par un consensus international (WHO, 2003) (Annexe 1). Concernant les marqueurs biologiques, à l'heure actuelle, il n'existe pas de technique permettant la détection de la PrPsc dans les fluides biologiques. La stratégie diagnostique s'appuie sur un marqueur de lyse neuronale non spécifique, la protéine 14.3.3. La mise en évidence de cette protéine dans le LCR constitue un critère décisif dans le degré de probabilité pour le patient d'être atteint d'une EST : passage d'un cas « possible » à un cas « probable » en cas de positivité de la recherche.

Dans notre travail, nous avons comparé les performances de notre technique de détection de la protéine 14.3.3 dans le LCR, utilisée en routine depuis 1997 dans le cadre des suspicions des EST reçues au laboratoire, à celles décrites dans la littérature pour le diagnostic des EST. Nous avons montré que si la sensibilité est comparable à celles rapportées dans la littérature, en revanche notre spécificité est plus faible (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Gmitterova et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2006). De façon prospective et conjointe à la détection de la protéine 14.3.3, la concentration en néoptérine et l'activité enzymatique de l'aldolase ont été mesurées dans les échantillons de LCR. Si l'aldolase ne semble par apporter un gain significatif en sensibilité ou en spécificité, la néoptérine en revanche est un bon marqueur de diagnostic différentiel si l'on considère un seuil de 20 nM. Au dessus de cette valeur, un résultat positif de protéine 14.3.3 est plus souvent relié à un autre diagnostic qu'à une EST. Nous avions choisi pour notre cohorte de patients négatifs de n'inclure que les cas confirmés à l'examen neuropathologique comme étant exempt de toute EST. Nous avons donc tenu compte du « gold standard » diagnostique, sur tissus obtenus lors de l'autopsie. Les difficultés pour organiser des autopsies de façon générale, et lors de suspicion d'EST en particulier, ont pour conséquence une faible réalisation de ces actes en regard du nombre de suspicions, et ce d'autant plus que le résultat de protéine 14.3.3 est négatif. Nous avons alors été confrontés dans notre étude à une sous-estimation importante des patients « Vrais Négatifs » pour la protéine 14.3.3, confirmés sur le plan neuropathologique. Cette option s'avère donc être un biais important de notre étude. Il sera important de réévaluer notre spécificité vis-à-vis de la cohorte totale de LCR analysés au laboratoire, en tenant compte des diagnostics définitifs retenus par le Réseau National de Surveillance de la MCJ pour l'ensemble des cas.

Par ailleurs et conformément à la littérature, nous avons observé dans notre étude une plus faible sensibilité de la protéine 14.3.3 dans les formes sMCJ atypiques et les formes acquises que pour les formes sMCJ plus classiques (Castellani et al, 2004; Collins et al, 2006; Gmitterova et al, 2008; Sanchez-Juan et al, 2006). Du fait des problèmes de santé publique liés à la transmissibilité des EST et devant ces variations, la nécessité de disposer d'un diagnostic de certitude plus sensible et plus spécifique du vivant du patient s'impose.

Dans la théorie du prion, la PrPsc est le composant majeur voire unique de l'agent responsable de la transmission des EST (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). Comme elle constitue à l'heure actuelle le marqueur diagnostique de certitude des EST, nous nous sommes focalisés sur la mise au point d'une méthode de détection de cette protéine dans les tissus périphériques. Dans l'objectif de proposer un test du vivant du patient, nous avons étudié sa présence dans les nerfs périphériques de patients atteints de formes sMCJ. Grâce à la mise en œuvre d'une étape de broyage permettant de réduire en une poudre très fine la totalité du tissu nerveux suivie d'une concentration des protéines par ultracentrifugation, cette présence a été affirmée pour un cas sur trois. Par ailleurs, nous avions mis en évidence dans un cas sMCJ de type VV1 un dépôt de PrP en IHC le long du nerf péronier corrélé à un signal en Western Blot, signal cependant non caractéristique du profil classiquement retrouvé dans les EST. Devant ces résultats, la question de l'hétérogénéité éventuelle de la répartition de la PrPsc le long des fibres nerveuses, la possible différence de résistance à la PK de cette forme de PrPsc observée dans notre première étude ou encore le moment de l'envahissement de ces tissus par rapport à l'évolution de la maladie rend complexe cette recherche avec nos outils actuels. De plus, notre technique de broyage s'est avérée être lourde et coûteuse, impossible à appliquer en routine sur un nombre important d'échantillons. Plusieurs essais d'adaptation d'un kit ELISA pour le diagnostic des formes animales n'a pas permis un gain de sensibilité suffisant pour ces tissus. La simplification de notre protocole et l'amélioration de sa sensibilité sont des pré-requis indispensables pour poursuivre notre étude sur une plus grande cohorte plus représentative de la diversité des cas.

Dans l'optique d'augmenter la sensibilité de notre diagnostic, nous avons voulu tester une molécule récemment décrite dans le champ diagnostic des EST, la streptomycine. Suite à une publication ayant montré un intérêt dans la précipitation des différentes formes de PrPsc animales (Leclere et al, 2008; Moussa et al, 2006) nous avons montré qu'elle était aussi active sur des échantillons tissulaires humains avec une spécificité et une sensibilité de 100 %. Les

profils moléculaires de la PrPres obtenus après précipitation par la streptomycine dans les différentes étiologies d'EST sont conformes à ceux décrits dans la littérature (Hill et al, 2003; Parchi et al, 1996).

Notre protocole faisant intervenir la streptomycine s'est avéré être aussi sensible à partir de faibles quantités de tissus (5 mg) que la technique au NaPTa, reconnue pour être très sensible notamment dans l'étude des tissus périphériques (Herzog et al, 2005; Peden et al, 2006; Wadsworth et al, 2001; Zanusso et al, 2003). Il nous permet aussi, dans les tissus lymphoïdes, d'identifier correctement la PrPres de type 2b dans les cas vMCJ. En revanche, une optimisation technique est nécessaire du fait de la persistance d'un signal non spécifique pour les témoins négatifs.

Pour augmenter encore la sensibilité de notre protocole intégrant la streptomycine, une amplification de la PrPsc présente dans le nerf avec une technique de type PMCA pourrait être employée. Cette technique a permis une détection présymptomatique de PrPsc cérébrale dans une étude d'EST expérimentale avec un gain de quatre semaines par rapport aux techniques classiques, puis une détection présymptomatique a été possible dans le sang et les urines de hamster (Gonzalez-Romero et al, 2008; Saa et al, 2006; Soto et al, 2005). Une amplification du signal via une technique d'iqPCR permettrait aussi un gain notable de sensibilité (Gofflot et al, 2005). L'ensemble de ces adaptations pourrait permettre une détection dans des tissus comme le nerf périphérique et constituer un diagnostic du vivant du patient, avant d'envisager l'application du protocole dans les fluides biologiques.

ANNEXES

Critères diagnostiques de la MCJ (EURO/NEURO CJD) mai 2003

Les cas déclarés (signalement et notification obligatoires) :

Il s'agit de suspicion de cas signalés ou déclarés à un des partenaires du Réseau. Depuis 1996, un nombre important de cas sont signalés qui au décours de l'évolution ou à l'autopsie s'avèrent ne pas être des maladies de Creutzfeldt-Jakob.

MCJ SPORADIQUE

Définie

Confirmation neuropathologique ou immunocytochimique.

Probable

I + 2 de II + III

Possible + 14-3-3 positive

Possible

I + 2 de II + durée inférieure à 2 ans

- *I* *démence rapidement progressive*
- *II* *A myoclonies*
  B anomalies visuelles ou cérébelleuses
  C syndrome pyramidal ou extrapyramidal
  D mutisme akinétique
- *III* *EEG typique*

MCJ PAR TRANSMISSION ACCIDENTELLE

Définie

MCJ définie avec un facteur de risque iatrogène reconnu

Probable

Syndrome cérébelleux prédominant progressif chez un patient traité par hormone hypophysaire.

MCJ probable avec un facteur de risque iatrogène reconnu (greffe de dure-mère humaine, greffe de cornée ou exposition à des instruments de neurochirurgie provenant d'un patient atteint de maladie à prion humaine définie ou probable)

MCJ GENETIQUE

Définie

MCJ définie + MCJ définie ou probable chez un apparenté du 1er degré

MCJ définie avec une mutation pathogène de PRNP

Probable

Trouble neuropsychiatrique progressif + MCJ définie ou probable chez un apparenté du 1er degré

Trouble neuropsychiatrique progressif + mutation pathogène de PRNP

VMCJ

Défini

IA et preuve neuropathologique de vMCJ

Probable

I et 4/5 de II et IIIA et IIIB

I et IVA

Possible

I et 4/5 de II et IIIA

I	A	trouble neuropsychiatrique progressif
	B	durée de la maladie > 6 mois
	C	les examens de routine ne sont pas en faveur d'un autre diagnostic
	D	pas d'argument pour une exposition à une source iatrogène potentielle
	E	pas d'argument pour une forme familiale de MCJ
II	A	symptômes psychiatriques précoces [a]
	B	symptômes sensitifs douloureux persistants [b]
	C	ataxie
	D	myoclonies ou chorée ou dystonie
	E	démence
III	A	pas d'EEG typique de MCJ sporadique [c] (ou pas d'EEG disponible)
	B	« signe du pulvinar »bilatéral sur l'IRM
IV	A	biopsie d'amygdale positive [d]

Notes :

a dépression, anxiété, apathie, retrait, illusions

b inclue des douleurs franches ou des dysesthésies

c complexes triphasiques périodiques généralisé a environ 1 cycle /seconde

d la biopsie d'amygdale ***n'est pas recommandée en routine****, ni en cas d'anomalies typiques de MCJ sporadique mais peut être utile dans les cas où les symptômes cliniques sont compatibles avec une vMCJ sans «signe du pulvinar» bilatéral sur l'IRM*

e spongiose et dépôts de PrP étendus avec des plaques florides dans le cortex cérébral et le cervelet

ANNEXE 2

MODE OPERATOIRE LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE - CENTRE DE BIOLOGIE EST :

Mise en évidence de la PrPres cérébrale par Western Blot

PrP-res DANS LE TISSU CEREBRAL

PAR WESTERN BLOT

1. PRELEVEMENTS

Origine des prélèvements

Les échantillons congelés (-80°C) sont fournis par le laboratoire d'anatomopathologie (HCL ou extérieur).

- Tissu cérébral prélevé lors d'une autopsie.

  Les régions étudiées sont le cervelet (**CE**), le Striatum (**St**) aussi appelé noyaux gris centraux (NGC) et le cortex préfrontal (**CO**) parfois occipital (CO bis).

- Tissu cérébral prélevé lors d'une biopsie (Bi)

La région étudiée est généralement le cortex préfrontal.

2. ENREGISTREMENT

Code informatique : **PRP** pour les HCL

PRP R pour les hôpitaux extérieurs

Préciser en RCO : N° Anapath – Prescripteur

Renseigner la nature du prélèvement : *autopsie ou biopsie cérébrale*.

3. PRINCIPE

Les **ESST** sont caractérisées par une accumulation de la protéine **PrP-res** dans le cerveau. La **PrP-res** est détectée par Western blot après traitement d'un homogénat de cerveau avec la protéinase K. La **PrP-c** est entièrement dégradée alors que la PrP-res reste détectable. L'anticorps anti-protéine prion révèle trois bandes de poids moléculaire compris entre 30 et 18 kDa correspondant aux formes : diglycosylée, monoglycosylée et non glycosylée.

La PrPres est révélée par le couple Ac primaire / Ac secondaire 3F4/AC-HRP puis Chimiluminescence.

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Sous P.S.M. attribué à la biochimie dans le L3.

Matériel

Minibroyeur PELLET à piles (2 x LR6) VWR
Balance PG 203-S METTLER.TOLEDO
Microcoupelles de pesée petit modèle
Scalpels à usage unique (x10) Stérilisation
Pinces stériles U.U. (x100) Ref 030633 D.Dutscher
Microtubes 1,5 ml + piston bleu PELLET (x100) Ref 06163 VWR
Microtubes 1,5 ml conique, faible adsorption à bouchons vissés (x1000) Ref 039182 D.Dutscher

Bouchons à joint O-ring / mauve (x1000) Ref 39194 D.Dutscher
Bouchons à joint O-ring / jaune (x1000) Ref 39196 D.Dutscher
Seringue et aiguille de calibration EST (x200) Ref 355 1174 BIORAD
Tubes minisorp 3 ml 11x70 mm (x 3600) Ref 055232 D.Dutscher
Bouchons diamètre 11 mm (x 3600) Ref 055238 D.Dutscher
Minipastettes Ref 6305 COSTAR
Tube Quick seal (11x32) fond rond 2 ml (x50) Ref 25079 VWR
Ou Ref 344625 BECKMAN
Soudeur Cordless Tube Topper BECKMAN
Batterie Ref 927937 BECKMAN
Avec TIP chauffant à sceller Ref 358317 BECKMAN
Embout de scellage (x1) Ref 348120 BECKMAN
Ultracentrifugeuse TL 100 (UF lipides) BECKMAN
+ rotor angle fixe TLA 120-2 (L3) BECKMAN
+ Spacers pour tube Quick Seal (x1) Ref 344674 BECKMAN
BM sec MULTIBLOK avec bloc pour microtube conique 1,5 ml LABLINE

Réactifs

Réactifs primaires

Glucose 5 % Solution injectable I.V ampoule 10 et 20 ml Pharmacie
Nacl 0,9 % (eau physiologique) Bouteille 500 ml Pharmacie
TRIZMA pré-set crystal pH 7,4 Ref T7693 -100G SIGMA
Protéinase K / Amersco® Ref 0706-100 mg INTERCHIM
Sarkosyl 30 % sol. Aqueuse / Fluka Ref 61747 (100 ml) SIGMA

Pefabloc SC AEBSF / Boehringer Ref 1429 868 (100 mg) ROCHE

SDS Ref 161 0301 (100 gr) BIORAD

D (+) saccharose Ref 27 480 294 (1 kg) PROLABO

Tampon Tris HCL, pH 6,8 Ref 161-0799 (1L) BIORAD

2-Mercaptoéthanol Ref 161-0710 (25 ml) BIORAD

Bleu Bromophénol (BBP)

Réactifs préparés

TBS 7,4 [X20] (2M) : 15,2 g TRIZMA pré-set crystal 7,4 dans 50 ml Nacl 0,9% - **+ 4°C**

TBSG 7,4 [X2] (200 mM) :1 ml TBS 7,4 [X20] + 9 ml glucose 5% - **+ 4°C** 1 mois

PK (1) : Protéinase K à 10 mg/ml: flacon 100 mg / 10 ml H_2O UP

Fractions aliquotes 0,5 ml – congélateur L3 **– 80°C**

PK (2) : Protéinase K à 0,5 mg/ml : diluer PK (1) au 1/20e dans H_2O UP

Fractions aliquotes 0,7 ml – congélateur L3 **– 20°C**

Peut être recongelé.

T4215 : Solution de traitement échantillons

		[finale]
SDS (peser avec masque)	2 g	4%
Saccharose	2,5 g	5 %
Tampon Tris HCL, pH 6,8	12,5 ml	125 mM
H_2O UP	≈ 20 ml	
BBP	quelques grains	
2 Mercaptoéthanol	1 ml	2 %
H2O UP	QSP 50 ml	

Fractions aliquotes 1,2 ml – congélateur L3 ***– 20°C*** Peut-être recongelé

Sucrose 10 % : D. saccharose 1 g/10 ml H_2O UP

Préparation extemporanée.

Pef : Péfabloc à 100 mM :

Actif à stopper l'action de la PK à **[1 mM] final**

Reprendre le flacon de 100mg par 4 ml Tris HCL pH 6,8

Fractions aliquotes de 50 µl et 100 µl – congélateur L3 **– 80°C** ***Ne pas recongeler***

Préparation de l'homogénat de cerveau

Matériel

Attribuer un N° travail P3 par zone de prélèvement (ex : 205 CE)

Préparer le nécessaire à toute la manipulation et pour chaque prélèvement :

1 microtube bleu + piston Pellet

2 microtubes à vis + bouchon mauve

1 seringue 1 ml + aiguille (calibration EST)

Scalpel, coupelle, pince UU, papier absorbant.

Répartir une ampoule de solution glucosée 5 % en fractions aliquotes (tubes)

Pipette 200 µl + embouts jaunes.

Mode opératoire

Travailler par patient (3 prélèvements)

Sortir les prélèvements quelques minutes avant d'appliquer le protocole.

Protocole biopsie- autopsie – Homogénat 20% en glucosé 5%

Pesée : 20 à 200 mg (p) de tissu cérébral congelé : tube bleu

Broyage : + 1 volume (v) sol.glucosée (p/v) + piston bleu sur mini broyeur

+ 2 volumes sol.glucosée (rinçage du piston)

Filtration : Aspirer lentement le produit de broyage

Si résistance éliminer le micro caillot sur papier absorbant

→ Tube vissant

Rinçage : + 1 volume sol.glucosée dans tube bleu Rincer tube bleu, aiguille + seringue 1 ml.

→ Tube vissant

Soit en finale : 1v matière (p/v) + 4v sol.glucosée = dil. 1/5°

Remarque : quand la quantité de tissu cérébral est suffisante, le broyage manuel peut être remplacé par la technique BioRad utilisant le Precess 48 (cf. procédure ELISA et Western-Blot BioRad). Le broyat ainsi préparé est aussi un homogénat 20%.

Homogénat de travail à 10% en milieu glucosé tamponné 7,4

Dilution au ½ dans TBSG 7,4 [X2] : Microtubes à vis + bouchon violet: 500µl+500µl

Conservation : congélateur – 80°C

Préparation des SAF : technique par ultracentrifugation

La veille, s'assurer de la disponibilité de l'ultracentrifugeuse. *Vérifier l'étuve à 37°C*

Traitement à la PK

Par **25 µg pour 100 mg** de tissu cérébral

Décongeler à température ambiante :

- les homogénats 10% (bouchons violets) dont un tube témoin Négatif

- un aliquot de PK(2)

Ajouter la PK (2) dans les tubes : 50 µl/100 mg tissu (soit 1ml homogénat 10%)

Homogénéiser au vortex et par retournement.

Placer à l'étuve 37°C – 1 heure.

Stopper l'action de la PK : 1µl Pef pour 100µl de volume réactionnel

Mode opératoire de l'ultracentrifugation (ref AFSSA-AGB)

Mettre le soudeur en charge. Peut être remplacé par un fer à souder.

Préparer pour chaque prélèvement les tubes suivants, identifiés avec le n° de travail P3 :

Tube « minisorp » (3 ml) + 600 µl sarkosyl + bouchon

Tube Quick Seal® (2 ml) + 300 µl saccharose 10 % à la seringue

N° de travail marqué en haut et en bas (indispensable par la suite).

2 microtubes 1,5 ml à vis + 1 bouchon jaune.

Mini pastette à embout fin

Nécessaire à souder – pipette 1 ml + embouts bleus

Rotor ultra + spacers noirs

Dans chaque tube minisorp:

ajouter 1000 µl d'homogénat traité (ou sa totalité complétée à 1000µl avec H2O UP)

homogénéiser par retournement

Temps de contact minimum avant centrifugation : 15 min. (permet la formation des SAF)

- Puis dans le tube Quick Seal:

déposer la solution précédente, délicatement sur le coussin de sucrose avec la mini-pastette au contact de la paroi

compléter avec H2O UP jusqu'à la base de la cheminée (**attention aux bulles**).

- Essuyer le goulot des tubes (évite de contaminer les capuchons)

- Souder les tubes et placer les spacers noirs sur les tubes.

- Les répartir dans le rotor (équilibrer si tubes < 10) : **numérotation vers l'intérieur** pour garder le culot visible après la centrifugation.

- Fermer hermétiquement le rotor. Attention ! Le manipuler sans geste brusque.
- Lancer l'ultracentrifugeuse : Prog. N° 7 (100 000 rpm – 2 heures à 20°C)

Pendant le temps de l'ultracentrifugation, préparer l'étape suivante :
Préchauffer bain marie sec à environ 100°C
Décongeler une fraction aliquote de Td 4125
Prévoir ciseaux réservés au poste et papier absorbant
Poudrier pour déchet liquide – mini pastettes – portoir barrette Beckman
Pipette 200 µl + embouts jaunes

- A la fin de la centrifugation, sortir les tubes sous P.S.M. dans le P3
- Couper la cheminée à la base en plaçant un papier absorbant sur le dessus.
- Aspirer le surnageant au 2/3 dont la fraction lipidique.
- Couper le tube en son milieu, sans faire bouger le culot.
- Terminer l'aspiration du surnageant et sécher le culot par retournement du tube sur papier absorbant.
- Reprendre le culot par100 µl de la solution de traitement T4215 pour 1000 µl homogénat 10% traité
- Transférer dans microtube à vis + bouchon jaune
- Placer 10 min à 100°C. Vortexer. Laisser refroidir.
- Centrifuger 5 min à 14 000 G à 20°C.
- Décanter dans autre microtube à vis + bouchon jaune (le même) numéroté.
- Congeler à **– 80°C** dans boîte WB n° X.

NB : si le culot « glisse » ou «flotte », transférer la suspension dans le microtube à vis de même identification et centrifuger 10mn 14 000 G puis éliminer le surnageant (pastette fine) et poursuivre par la reprise du culot.

Retranscrire les informations sur la fiche patient (*annexe 1*) gardée en Neurochimie.

Variante technique : Technique courte (adaptée de Collinge et al 1996)

A utiliser sur fraction aliquote de l'homogénat 10% et après action de la PK (cf. 4.4/1)

Homogénéiser le broyat après action de la PK et arrêt par Péfabloc

Traiter le broyat par le même volume de T4215 + bouchon orange. Vortexer.

Placer 10 mn à 100°C

Laisser refroidir.

Centrifuger 5 mn à 14 000 G à 20°C.

Décanter dans un microtube à vis + bouchon orange et congeler à -80°C.

5. ELECTROPHORESE

Matériel

Générateur EPS 3500 XL Amersham / Bioscience

Unité Multiphor II «

Réfrigérant Multitemps «

Cuve électrophorèse SE250 Hoefer® Amersham / Bioscience

+ adaptateur PSA 240

Cassette SE245 pour couler 2 gels Réf. 80 6146 50

Plaque alumine (x1) Réf. 80.6136.24

Plaques de verre 10 x 8 cm (x10) Réf. 80.6136.81

Ecarteur 1,5 mm x 8 cm (x1) Réf. 80.6138.33

Peigne 1,5 mm – 10 puits (x1) Réf. 80.6139.09

Peigne 1,5 mm – 15 puits (x1) Réf. 80.6139.85

Joint mousse 4,5 mm x 61 cm Réf. 80 6137 19

Embouts Prot/Elec TIPS BULK (x1000) Réf. 223.9915 BIORAD

Réactifs

Réactifs primaires

Acrylamide/Bisacryl Solution 37,5 : 1 Réf. 0254 – 500 ml Amresco®/INTERCHIM

Persulfate d'ammonium (4 x 25g) Réf. 0486-25 «

Temed Réf. T-9281 SIGMA

10X **T**RIS/**G**lycine/**S**DS Buffer (1l) Réf. 161.0732 BIORAD

Stacking Gel Buffer pH 6,8 (1l) Réf. 161.0799 BIORAD

Résolving Gel Buffer pH 8,8 (1l) Réf. 161.0798 BIORAD

SDS solution 10% (250 ml) Ref: 161.0416 BIORAD

N. Butanol ou Butanol-1

Prestained SDS-PAGE Std Low (0,5 ml)Réf. 161.0305 BIORAD

Magic Mark Western Protéin Std (250µl)Ref. LC5602 INVITROGEN

Réactifs préparés

Persulfate NH4 10 % : 0,1 g/ 1 ml H20 UP

10 jours +4°C

N. Butanol saturé à l'eau : Butanol (2/3) + H_20 UP (1/3) → Agiter fortement

Renouveler l'opération si nécessaire

Laisser décanter – utiliser la couche supérieure.

Tampon de migration : TGS [x1] : TGS [x10] : 100 ml

6 mois +4°C H_20 UP SQP ⌊ 1 l

Préparation des gels

2 gels SDS-PAGE 16 % avec Stacking 4 %, épaisseur 1,5 mm, 10 ou 15 puits

Utiliser la cassette SE245 du système Hoefer®

Réactifs	Gel 16 %	Gel 4 %
Acryl/Bisacryl Solution T = 40 % C = 2,6 %	6,0 ml	0,5 ml
Tampon Résolution pH 8,8	3,75 ml	/
Tampon Stacking pH 6,8	/	1,25 ml
H2O UP	5,0 ml	3,15 ml
SDS 10 %	150 µl	50 µl
Persulfate NH4 10 %	100 µl	25 µl
Temed Déclenche la polymérisation	10 µl	5 µl
Volume final	15 ml	5 ml

Couler le gel 16 % : remplir sans introduire de bulle sur une hauteur 6 cm *environ 7 ml* et couvrir par 0,5 ml N. Butanol saturé à l'eau

Laisser polymériser 20 à 30 minutes

Eliminer et rincer le Butanol par H_20 UP (pissette)

Couler le gel 4 % : introduire le peigne sans piéger de bulle pour une bonne formation des puits. *environ 2 ml*

Laisser polymériser 15 minutes.

Conservation des gels dans le tampon pour électrophorèse (migration)

Pour utilisation différée de 24 à 48 heures : placer les gels à +4°C.

Electrophorèse

Préchauffer le bain marie sec à 100°C.

Reconditionnement des échantillons

Décongeler :

le Standard Poids moléculaire (PM)

les échantillons patients, le Témoin Nég traité simultanément (Test PK)

un aliquot de témoin positif (cf. **annexe 2**)

Placer les échantillons au BM 100°C - 5 minutes

Laisser refroidir

Centrifuger pour récupérer le condensât (centrifugeuse de paillasse)

Vortexer pour homogénéiser

Préparation de la cuve Hoefer®

- Relier le corps de cuve aux tuyaux du réfrigérant.
- Clipper celui-ci sur le support installé dans un plateau.
- Allumer le réfrigérant – **Température 11°C**
- Monter les gels sur le corps de cuve avec les pinces : **Attention au sens**
- Si migration sur un gel, remplacer le 2ème par plaque de verre.
- Remplir la cuve avec environ 250 ml de tampon de migration TGS [x1]
- Placer les masques et retirer les peignes.

Migration

Utiliser le plan de manipulation gel Hoefer® approprié (cf ***annexe 3***)

Pour le diagnostic – gels 10 puits :

Dépôts sur chaque gel : 1er puits PM 3 ou 6 µl

2ème puits Tpos 10 µl

3ème puits Tneg 10 µl

4 à 9ème puits Echantillons 10 µl

Ne pas utiliser le 10ème puits (effet de bord)

Fermer la cuve en respectant les pôles + et -.

Brancher au générateur en respectant les pôles + et -.

Migration : courant constant (V) - conditions limitantes (mA et W)

Prog n° 3 : Step 1 90 V 100 mA 30 W OH10

Step 2 200 V 100 mA 30 W 1H30 (stop Auto)

Noter les conditions électriques sur plan de manip (début et fin)

RUN témoin HV allumé en orange

STOP manuel après 1 H 15 (Step 2)

Eteindre le réfrigérant

Pour le typage – gels 15 puits :

Dépôts sur chaque gel 5 µl échantillons dilués en intercalant les témoins typages (***annexe 2***)

6. ELECTROTRANSFERT

Matériel

Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Réf. 170-3940 BIORAD

Générateur Power PAC 300 BIORAD

Papier buvard Extra Thick (7,5x10 cm) X 60 Réf. 170-3965 BIORAD

Membrane PVDF 0.45µm

Rouleau (26,5cm x 3,75 m) Réf. IPVH 00010 MILLIPORE

Réactifs

Réactifs primaires

Ethanol Absolu (5l) Réf.528131 CARLO ERBA

Méthanol pour analyse Réf.414814 CARLO ERBA

10X **T**RIS/**G**lycine Buffer (1l) Réf.161.0734 BIORAD

Réactifs préparés

Tampon d'électrotransfert [x1] TG [X10] 100 ml

3 mois – température ambiante Méthanol 200 ml

H_20 UP QSP 1 l

Préparation du transfert

Par gel il faut : - 1 membrane PVDF 8,5 (L) x 6 (l) identifiée

- 2 papiers buvard épais

Conditionner les membranes par bains successifs :

- éthanol x1 – eau x3 – tampon transfert x1- réserver

Imbiber **par capillarité** les buvards dans le tampon de transfert.

Transfert (semi-sec)

En système semi-sec constitué d'une cuve à anode platine (+) et d'une unité supérieur à cathode inox (-) avec couvercle étanche.

Construction du « sandwich »

Se munir de gants vinyles (2ème paire)

Sur la cuve (+) effectuer 2 « sandwich » côte à côte ou un au centre :

Pour chacun :

déposer le 1er buvard

déposer la membrane PVDF, n° lisible vers le haut

déposer sur le bord droit 0,5 ml tampon transfert (pastette)

récupérer le gel n°1 et décoller la plaque de verre

Le gel reste sur la plaque alumine. Eliminer le stacking gel

déposer le gel sur la membrane n°1 en plaçant le témoin PM coloré (1er puits) sur la droite

faire de même pour le gel n°2

Changer les gants vinyles « contaminés »

déposer au centre du gel 0,5 ml de tampon transfert (pastette)

couvrir avec le 2ème buvard

faire rouler un tube en verre (pipette) sur chaque « sandwich » pour éliminer les bulles et l'excès de tampon.

Poser l'unité supérieur (-) en engageant bien les encoches des poignées en exerçant une pression.

Fermer avec le couvercle étanche.

brancher au générateur en respectant les pôles (code couleur).

Migration

35 min – 20V (Barletta et al) – 350 mA (limitant)

Réserver les membranes dans tampon immunoblotting (PBS).

Rincer les plaques métalliques avec chiffons mouillés. Essuyer.

7. IMMUNOBLOTTING

Matériel

Agitateur 3D à plateau POLYMAX 1040

Bacs noirs pour réactifs radio

Cassette d'exposition Ref E6767 SIGMA

Boyau plastique transparent au format de la cassette (12 x 16 cm)

Réactifs

Réactifs primaires

PBS pH 7,2 (poudre dose x 4) Ref. 75 511 Biomérieux

Lait écrémé en poudre (sachet) Magasin

Tween 20 (100 ml) Ref. P-7949 SIGMA

Ac 3F4 purifié (1 ml) Signet Ref. 9620-013 PROTEOGENIX

Ac anti-souris IgG fc γ – HRP Ref. 115-035-071 INTERCHIM

SuperSignal® West Dura (100ml)Pierce Ref. 34075 INTERCHIM

SuperSignal® West Femto (100ml)Pierce Ref. 34095 INTERCHIM

Film BIOMAX MR-1 (13 x 18 cm)(X50) Ref. Z 35,042-7 SIGMA

Révélateur KODAK concentré Lx24 (2 x 4 l) Ref. 5554901 VWR

Fixateur KODAK concentré AL4 (2 x 4 l) Ref. 5555001 VWR

Réactifs préparés

Tampon phosphate salin pH 7,2 PBS 1 flacon dose H_20 UP QSP 1l

2 mois +4°C

Réactifs extemporanés

Tampon de saturation : PBS à 5 % lait (W/V) *30 ml par manip 2 gels*

Tampon de lavage : PBS à 0,1 % Tween 20 (V/V) *250 ml*

Les Ac sont dilués dans le tampon de lavage.

Les réactifs Radio sont dilués au 1/5e dans leur bac respectif (30 ml + 120 ml H_20 UP)

Immunorévélation

Les différentes étapes s'effectuent dans une boîte à fond plat au format de la membrane.

Compter 10 ml de réactifs Ac par membrane

Couvrir. Placer sous agitation – Température ambiante.

Déroulement de l'immunoblotting :

Saturation	PBS 5 % lait	1 H (1 nuit à +4°C)
Lavage	PBS 0,1 % TW	Rapide
1er Ac	Ac 3F4 au 1/10 000e	1 H
Lavage	PBS 0,1 % TW	3 x 5 mn
2ème Ac	Anti-souris – HRP 1/20 000e	30 mn
Lavage	PBS 0,1 % TW	2 x 5 mn 1 x 15 mn
Lavage	PBS	≈ 30 min (plusieurs bains) (1 nuit à +4°C)
Révélation substrat	SuperSignal® Dura 1 vol flacon brun + 1 vol flacon blanc	Imprégner recto 1min -verso Réserver dans plastique transparent

Révélation Développement (dans la pièce noire)	Cassette : film + membrane	2 min renouveler ± selon interprétation 30 min si négatif
	bain révélateur eau courante bain fixateur eau courante	1min 30 sec 1min 1 min

8. CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Echantillons de cerveau : boîtes Ex

Echantillons traités : boîtes Wx

Conservation au congélateur L3 –80°C

Traçabilité sur fiches dans classeur « Neurochimie Autopsie/Biopsies » dans le L3

9. CONTROLE DE QUALITE

Témoin Négatif : préparé à partir de cerveau de patient à pathologie autre que ESST et testé négatif en W.B.

Homogénat de cerveau 1/10e (P/V) (cf. 4.3 Préparation des homogénats)

Fractions aliquotes 0,5 ml – congélateur L3 –80°C

A traiter à chaque préparation de SAF, permet de vérifier l'activité de la PK.

Témoin positif :

Préparé à partir de cerveau autopsique de patient MCJ (*Annexe 2*)

Homogénat de cerveau 1/10e (P/V) (§ 4.3 Préparation des homogénats)

Traité par technique Ultra centrifugation

Fractions aliquotes 50 µl – congélateur L3 –80°C

A poser sur chaque gel d'électrophorèse.

Témoin de poids moléculaire

P.M coloré pour SDS PAGE

Fractions aliquotes 100 µl – congélateur L3 –20°C peut être recongelé

A poser sur chaque gel d'électrophorèse pour vérifier la bonne marche de la migration et du transfert.

M.M Western Protéin Standart

– congélateur L3 –20°C peut être recongelé

A poser sur SDS PAGE en mode typage – Marque à la révélation.

10.RESULTATS

Interprétation

La PrPres peut être en quantité très faible dans le tissu cérébral et sa localisation n'est pas homogène.

Ainsi l'absence de détection de PrPres n'exclut pas sa présence et donc le diagnostic de MCJ, notamment dans les biopsies.

Pour les autopsies, la détection s'effectuant sur trois zones différentes correspondant chacune à 10 mg équivalent cerveau (technique ultra) l'absence de PrPres n'est pas en faveur d'une MCJ.

Une recherche diagnostiquée positive est typée par comparaison à des profils référentiels.

Saisie et rendu des résultats

Les résultats sont saisis dans LMX par le technicien:

ERM – N° dossier – PRION

Pr Pres ? PRP- pour absence de PrPres détectable

Conclusion PRP F5 saisir « Recherche terminée »

PRP+ pour présence de PrPres détectable

Conclusion PRP F5 saisir « À typer »

Les CR sont archivés sur le serveur Neurochimie dans le dossier : S:\Laboratoire\NEUROCHIMIE\Prions\CR diagnostic\ puis dossier de l'année en cours

Créer un nouveau dossier avec la date du jour sous le format « AAAAMMJJ » pour chaque patient.

Un masque de saisie permet de copier un CR « SNC positif » ou « SNC négatif ».

Le CR est accompagné d'une fiche analytique avec l'image scannée du blot.

Les CR sont signés par le BR et rendus aux différents cliniciens correspondants.

Archivage

Les fiches patients (annexe1) sont classées dans «WB PRION – Fiches Patients». Les plans de manipulation (annexe 3) sont classés dans « «WB PRION – Manipulations». L'ensemble de ces dossiers patients est conservé sous clés dans le bureau du BR (APL).

ANNEXE 3

MODE OPERATOIRE – LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE – CENTRE DE BIOLOGIE EST

Recherche de la protéine 14.3.3 dans le LCR par Western Blot

Recherche de la protéine 14.3.3 par Western Blot

1. PRINCIPE

Les protéines de LCR sont séparées par électrophorèse horizontale SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF par électrotransfert en système semi-sec à plaques graphites. Une immuno révélation par un premier Ac anti 14.3.3 (β - K19) spécifique reconnaissant toutes les isoformes, puis un 2ème Ac marqué à la PAL révélée par le substrat NBT/BCTP, permet de visualiser une bande majoritaire de 30 Kda.

La sensibilité de la technique est supérieure au seuil physiologique de protéines 14.3.3 présentes dans le cerveau ; seule une quantité anormalement augmentée de P 14.3.3. est mise en évidence par technique de WB.

NB : La lyse des globules rouges et blancs augmente la quantité de protéines 14.3.3. dans les échantillons de LCR (protéines 14.3.3 présente dans leur cytoplasme) ; les étapes de centrifugation et séparation du culot avant congélation sont donc importantes.

2. HYGIENE ET SECURITE

Les LCR suspects de MCJ sont traités dans le laboratoire de diagnostic des maladies à Prions (L3). Se référer aux procédures mises en place.

3. PRELEVEMENT

LCR : 1ml minimum

Les conditions de prélèvements et d'acheminement sont données dans la ***PE02 MCJ***.

4. ENREGISTREMENT

Code info LMX : **P1433**

La recherche de P14.3.3 est incluse dans le code bilan **MCJ**.

5. ELECTROPHORESE

Matériel

Système MULTIPHOR II® - Amersham / Pharmacia Biotech

Réfrigérant MULTITEMPS III®

Générateur EPS 3500 XL®

Centrifugeuse BECKMAN GS-15R – Rotor F2402

B.M sec MULTIBLOK-Labline avec bloc pour tube conique 1,5 ml

Microtubes 1,5 ml sans jupe – ref 66803 Polylabo

Bouchons à joint moulé, Naturel – ref 67933

Polylabo

Embouts effilés Prot/Elec TIPS BULK – ref 223.9915 Biorad

VIVASPIN 500(5 mW c.o) ref 06159020 Prolabo

Réactifs primaires

TRIS – *ref 1.08382* (500 gr) – MERCK

SDS – *ref 161.0301* (100 gr) – BIORAD

Glycérol 99 % - *ref G9012* (100 ml) – SIGMA

Bleu de bromophénol (BBP)

Distillat de Pétrole désaromatisé (1 l) – Droguerie

EXELGEL® SDS homogène 15 % - *ref 80.1262-01*/Pharmacia Biotech+4°C

EXELGEL® SDS Buffer Strips – *ref 17.1342-01* / Pharmacia Biotech+4°C

Dithiothréitol (DTT) *ref D9779* (1 gr) – SIGMA+4°C, atmosphère sèche

Réactifs préparés

TRIS 0,05M pH 7,4 + BBP	TRIS	0,15 g
(à refaire à chaque préparation	HCL	4N pH 7,4
de la solution de traitement)	BBP	quelques grains
H_20 UP	QSP 50 ml	

Solution de traitement	SDS (peser avec masque)	1 g
(dans poudrier (30 ml)	TRIS 0,05M pH 7,4 + BBP	10 ml
sur agitateur magnétique)	glycérol 99 %	5 ml

Répartir en fractions aliquotes de 450 µl. Conservation : congélateur –20°C, 1 an.

Préparation des échantillons

Décongeler les LCR à tester et les 2 témoins.

Préparer le plan de manip. (cf. *annexe 1*) :

Noter le taux de protéines présentes dans le LCR.

Prévoir 2 puits par patient (LCR pur et concentré).

Cas particulier :

Si QI pour concentrer ou Prot ≥ 0,70 : poser 2 fois LCR pur

Si Prot ≥ 1,50 : diluer le LCR dans H_20 U.P

Allumer le BM sec : position « High », graduation 2,5.

Concentration des LCR : si PTL < 0,70 g/l

Si PTL< 0,70 g/L, pour obtenir PTL ≤ 1,3 g/l : utiliser des tubes VIVASPIN 500 pour concentrer l'échantillon.

Ex : Prot LCR 0,35 g/l → LCR [x3]

Soit n le facteur de concentration nécessaire pour obtenir une concentration de l'échantillon ≤ 1,3 g/l, avec n = 4 maximum

M.O VIVASPIN : Rincer la membrane du tube par 500 µl H_20 U.P

Centrifuger 5 min à 12 000 g

Vider l'éluat (dessous)

P.E. LCR = 50 µl x n

Centrifuger 5 min à 12 000 g

Reprendre le rétentat (au dessus du filtre) par 50 µl H_20 U.P

Traitement des échantillons

Préparer la solution de dénaturation :

450 µl sol. Traitement (aliquot congelé –20°C)

+ 50 µl sol. DTT à 10 mg / 100 µl H20 U.P – préparation extemporanée

Dans microtubes 1,5 ml (bouchons vissés)

50 µl LCR pur ou [xn] ou témoin

+ 10 µl sol. de dénaturation (multipette eppendorf)

Boucher, vortexer et placer au BM sec 98°C ± 3°C pendant 3 mn

Laisser refroidir

Préparation de l'électrophorèse

Allumer le réfrigérant : programmer une température de 15°C

Ouvrir le sachet de gel, enlever le film protecteur en conservant le numéro de lot

Déposer, à la pastette, 2 ml de pétrole sur la plaque thermostatée

Placer le gel, puits côté cathode (-) ;

Eliminer l'excès de pétrole

Mettre des gants vinyl et placer les mèches : anode (+) orangée et cathode (-) transparente

Déposer les échantillons (embouts effilés) : PE = 12 µl

Vérifier l'écartement des électrodes en position haute

Vérifier la connexion du fil rouge (+) dans la cuve

Poser et brancher les électrodes (position basse)

Fermer le couvercle étanche et le brancher au générateur

Migration

Allumer le générateur : bouton « Power ON » à l'arrière droit de l'appareil

Sélectionner le **prog. N° 1** en utilisant les flèches ↓↑ (le n° du programme clignote)

Conditions électrophorétiques (limitantes) :

Stacking :	Step/1	600 V	20 mA	30 W	0H15
Migration :	Step/2	600 V	50 mA	30 W	2H45 (max)

RUN le courant passe : spot HV on orange allumé

STOP manuel à 2H15 de migration (stop automatique à 2H30)

Noter les conditions électriques à chaque étape et à la fin sur le plan de manip.

Pendant la migration, préparer l'électrotransfert

Après usage, nettoyer les électrodes avec un papier absorbant humide et les ranger dans leur boite protectrice

Eliminer les mèches

Placer le gel sur papier absorbant

Essuyer et retirer la plaque thermostatée et éteindre le réfrigérant

6. ELECTROTRANSFERT

Matériel

Système « fil Remover » ref 18.1013.75 Amersham/Pharmacia Biotech

Fil métallique (x3) *ref 18.1013.79*

Novablot • cathode *ref 18.1019.86*

• anode ref 80.1257.87

Papier filtre EPH électrode wick 104 x 253 mm (x 500) ref 80.1129 .52

Membrane PVDF « Immobilon P » (rouleau) – Millipore ref IPVH00010

Plats pyrex : 20 x 30 cm

Tube en verre h = 10 cm

Réaticfs

Réactifs primaires

TRIS *ref 1.08382* (500 g)	MERCK
Glycine *ref 0167* (1 kg)	AMRESCO® - Interchim
SDS *ref 161.0301* (100 g)	BIORAD
Méthanol pour analyse *ref 0930516* (1 l)	Marché HCL
SDS	MERCK
Ethanol pour analyse (5 l)	Pharmacie

Réactif préparé

Tampon d'électrotransfert	TRIS (48 mM)	5,81 g
(6 mois – t° ambiante)	Glycine (38 mM)	2,93 g

SDS 0,375 g

Méthanol 200 ml

H_2O U.P QSD 1 l

Préparation du transfert

Membrane PVDF

Découper au dimension : 10 x 25 cm pour gel complet

Noter la date sur grand bord.

Conditionnement dans plat pyrex

Recouvrir d'éthanol

Remplacer par de l'eau U.P., la maintenir immergée

Renouveler l'eau

La membrane est conditionnée quand elle ne remonte plus à la surface

Garder en attente dans tampon de transfert

Papier filtre

Réserver 2 x 9 papiers filtres de la dimension de la membrane

Imbiber dans tampon de transfert par capillarité pour ne pas introduire de bulles.

Novablot

Placer les deux électrodes graphites à plat sur la paillasse le fil noir (-) et le fil rouge (+) dirigés vers le haut.

Les imbiber d'eau U.P. (pissette). Eliminer l'excès.

Transfert

Les protéines du gel chargées négativement vont, dans le champ électrique, se diriger vers le pôle (+) et se fixer sur la membrane PVDF.

Construction du « sandwich »

Il s'effectue sur la cathode (-) : fil noir.

Déposer la 1ère épaisseur de buvard (x9)

Se munir de gants vinyls

Placer le gel en gardant le sens de migration, puits à droite, sur le système film Remover

Décoller le gel avec le fil métallique

Retourner le gel et son film sur l'épaisseur de buvard (puits à gauche) à partir de la migration

Retirer le film en maintenant le gel sur les buvards

Avec le doigt humecté de tampon : chasser les bulles

Couvrir le gel avec la membrane, date du côté des puits, côté gel, en chassant les bulles du doigt

Couvrir de la 2ème épaisseur de buvard (x9)

Découper la zone des puits avec un embout jaune et l'éliminer

Rouler le tube en verre sur toute la surface.

Poser la plaque graphite (+) fil rouge à plat dessus.

Prendre l'ensemble Novablot et le retourner **plaque (+) fil rouge dessous**

Déposer dans la cuve Multiphor et brancher les fils rouge et noir.

Fermer le couvercle et brancher au générateur

Migration

Sélectionner le **Prog n° 2** en utilisant les flèches ↓↑ (le n° du programme clignote)

Step/1 : 35 v – 150 mA – 15 W – 1H30

Noter les conditions électriques de transfert sur le plan de manip (début et fin).

STOP auto à 1H30 de migration

Réserver la membrane dans tampon immunoblotting.

Rincer les plaques graphites à grande eau et les égoutter

Ranger rapidement.

7. IMMUNOBLOTTING

Matériel

Plastique transparent

Sondeuse

Agitateur à bascule

Réactifs primaires

TRIZMA® Pré-set pH Crystals, pH = 7,4 *ref T7693-100g* SIGMA

Chlorure de sodium 0,9 % (1 l) VERSOL® (Pharmacie)

Lait écrémé poudre (sachet) Magasin

Anticorps (Ac) : Anti 14.3.3 β (K19) **+4°C**, *ref Sc 629* Santa Cruz (TEBU)

Anti Rabbit IgG-PAL **+4°C**, *ref Sc 2057* Santa Cruz (TEBU)

Step™ NBT/BCIP **+4°C** *ref 34042* Pierce (INTERCHIM)

Réactifs préparés

Tampon TRIS Salin 0,1 M pH = 7,4 ± 0,2

TBS [x10] *Peser 15,16 g de poudre TRIZMA®*

6 mois à +4°C puis dissoudre dans 1 l Nacl 0,9 %

Tampon Immunoblotting TBS [x10] à **diluer au 1/10è**

TBS [x1] **dans Nacl 0,9 %** 1 mois à +4°C

Réactifs extemporanés

Tampon de saturation : TBS [x1] à 1 % lait (W/V)

Tampon de lavage TBS [x1] à 0,1 % lait (W/V)

Dilution des Ac : dans le tampon de lavage.

Immunorévélation

Les différentes étapes s'effectuent dans une boîte à fond plat (dimensions adaptées à celles de la membrane).

Compter 20 ml de réactif Ac pour une membrane complète.

Couvrir de parafilm et placer sous agitation.

Saturation	TBS 1 % lait	1 nuit (sachet) à +4°C (ou 1H à température ambiante)
1er Ac	Anti 14.3.3 β (K19) 1/500e	2 H
Lavage	TBS 0,1 % lait	3 x 5 mn
2ème Ac	Anti lapin – PAL 1/1000e	1 H
Lavage	TBS 0,1 % lait	3 x 5 mn
Lavage	TBS	5 mn
Révélation	NBT / BCIP +4°C Temp. Labo 30 mn, abri lumière	quelques mn (jusqu'à apparition des témoins)
Rinçage	H_2O U.P	2 bains

Laisser sécher la membrane sur papier absorbant. Glisser la membrane sèche sous plastique transparent.

8. CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Les protéines 14.3.3 dans le LCR centrifugées sont stables après plusieurs cycles de congélation / décongélation et stables au moins 48 H à +4°C et au moins 1 an à -80°C.

Archiver les aliquots LCR et sérum éventuellement associés dans la biothèque « MCJ » boîte Rn – Congélateur –80°C.

Tracer sur cahier biothèque « MCJ » Routine.

9. CONTROLE DE QUALITE

Au cours de chaque électrophorèse, un témoin nettement positif (LCR patient AVC ou post-mortem) et un témoin positif correspondant à la limite de détection de la méthode sont analysés (*cf annexe 2*). La positivité de ces derniers permet la validation de la série.

10. RESULTAT

Interprétation de l'image du blot

La lecture se fait sur le dépôt LCR Pur de chaque patient.

Evaluer l'absence ou l'intensité de coloration de la bande majoritaire.

Le témoin positif sert de référence Positif ++

Le 2ème témoin est considéré comme douteux.

Saisie des résultats sur LMX

Saisir les résultats par la fonction « ERM »

Saisir le numéro LMX du dossier patient

Saisir l'interprétation codée à l'aide du « ? » :

S00 = nég.	S02 = douteux	S03 = positif faible
S04 = positif	S05 = positif fort	

En fin de saisie, confirmer par « F12 »

Interprétation des résultats

Les Protéines 14.3.3 sont retrouvées dans le LCR des patients atteints de Maladie de Creutzfeldt-Jacob mais pas dans les autres démences. En revanche, des faux positifs sont constatés dans les encéphalites virales (herpès et autres), les ischémies cérébrales, les hémorragies cérébrales. L'interprétation du résultat des Prot. 14.3.3 dans le LCR ne peut être isolé du reste du bilan biochimique (Aldolase, Néoptérine) et du contexte clinique.

Archivage

Les résultats sont édités en double et archivés après bilan « MCJ » complet dans le dossier du patient. Les dossiers sont archivés par ordre alphabétique dans les dossiers suspendus pièce BSP 4009.

ANNEXE 4

MODE OPERATOIRE – LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE – CENTRE DE BIOLOGIE EST :

Dosage de la néoptérine par CLHP

Dosage de la néoptérine par CLHP

1-DESCRIPTION SOMMAIRE DES PRINCIPES TECHNIQUES

Après séparation CLHP, dosage fluorimétrique de la Néoptérine et simultanément dosage spectrophotométrique de la Créatinine dans divers liquides biologiques.

2-PERFORMANCES ANALYTIQUES

Reproductibilité.

Répétabilité.

Domaine de mesure : Néopterine >0.5nmol/L Créatinine >4µmol/L

3-LISTE DES MATERIELS ET DES REACTIFS

Appareillage

- Pilote EMPOWER
- Pompes WATERS 515 (pompe A et B)
- Injecteur WATERS 717 Plus Autosampler
- Four de colonne T=25°C CROCO-CIL
- Détecteur spectro SPECTRA PHYSICS 200 (SATIN)

  Détecteur Fluo WATERS 2475
- Pompes WATERS 501 (rinçage des colonnes)

Consommables et réactifs : cf tableau en annexe

4- HYGIENE / SECURITE

- Respecter la procédure liée à la manipulation des LCR (***PE05 LCR MCJ***).

  Pour la manipulation des échantillons suspects de MCJ, porter deux paires de gants superposées et travailler sous la hotte MCJ pour les transferts d'échantillons dans les vials et les tubes.

- Respecter la procédure spécifique liée à la manipulation d'Acétonitrile (fiche toxicologique du produit dans le classeur noir Sécurité HPLC).

- Respecter la procédure générale liée à la maintenance des appareils (Changement de la lampe Xénon du spectro, manuel des fournisseurs)

Gestion des effluents

Les effluents organiques (>à 15% de solvant) sont stockés dans un bidon DECHETS LABO SERVICE à étiquette à fond rouge et indiqué sur celle-ci les différents solvants et le labo, bidon placé sous la hotte solvant. Lorsqu'il est plein , descendre le bidon au sous-sol et le déposer dans la pièce X1013. Penser à inscrire sur le tableau dans notre spécialité le nombre de bidons à enlever et à ramener pour obtenir un autre bidon 10L d' avance ;

Gestion des déchets

Les tubes primaires et secondaires pour Urines suivent la voie classique d'élimination des déchets (***cf PE12 TRIELIMDEH***).

Les tubes primaires et secondaires de LCR sont jetés dans la poubelle MCJ sous la hotte et suivent la voie classique d'élimination des déchets LCR (***cf PE12 TRIELIMDEH***).

5- MODE OPERATOIRE

5-1-Etapes pré analytiques

5-1-1 Prélèvement

100 µl de LCR

quelques ml d'urines d'une miction matinale de préférence

5-1-2 Enregistrement informatique

NEOL dans le LCR, compris dans le code bilan **MCJ**

NEOU dans les urines (dosage de Néoptérine et de créatinine)

5-1-3 Traitement pré analytique de l'échantillon à la réception

- Néoptérine du LCR :

Le prélèvement est centrifugé par le technicien du poste Cytochimie LCR (poste 5). Le surnageant est conservé à +4°C Tous les prélèvements sont transférés à -80°C (congélateur commun, étage du bas, dans la pièce 4007) par le technicien Neurochimie à la fréquence d'une fois par jour

- Néoptérine urinaire :

Le tube d'urine est centrifugé et décanté (**pas remplir plus de 3 ml**),en 3 tubes à hémolyse par le technicien du poste Neurochimie qui fait doser la créatininurie sur l'appareil Architect, situé au PTPP

1 tube pour le dosage de créatininurie non récupéré

1 tube pour le dosage de la Néoptérine , à congeler à - 20°C (congélateur n° 30).

1 tube à conserver et à congeler à - 20°C (congélateur n° 30).

Rq : Pour les urines des protocoles de Recherche Biomédicale, les prélèvements sont aliquotés en double.

5-1-4 Traitement pré analytique de l'échantillon dans l'UF Neurochimie

- Néoptérine du LCR :

A réaliser uniquement si la protéinorachie excède 1 g/l : ultrafiltration sur Vivaspin : mettre au moins 150 µl de LCR dans un vivaspin et boucher.

centrifuger 30 minutes à 10000 g (maximum) dans la centrifugeuse SIGMA 1-13 ou miniSpeed Plus (20 minutes à 14000 g)

Injecter le jour même sinon congeler à - 80°C (congélateur commun, étage du bas, dans la pièce 4007)

- Néoptérine urinaire :

A faire juste avant l'injection des prélèvements.

Après décongélation, chauffer les urines à 56°C pendant ½ heure (bain-marie sec) (inactivation virale et solubilisation des cristaux).

Centrifuger à 15000g pendant 10 minutes. (Prog 1 sur centrifugeuse JOUAN GR4i,pièce 4020)

Diluer au 1:10ème ou plus dans la phase d'élution sans CH3CN

5-2 Etapes analytiques

Précautions liées à la technique CLHP

Ne jamais utiliser de l'eau en bouteille plastique.

Rincer toute la vaisselle trois fois avec de **l'eau ultra pure** avant de l'utiliser.

Filtrer ou centrifuger tout ce qui est injecté dans la colonne (phases, échantillons...).

5-2-1 Préparation, stockage et chargement des réactifs

- Solution mère de Tampon

Tampon Phosphate 15M pH 5,9

102,1 g KH2PO4 + **39,4 g** K2HPO4 QSP 1 litre H2O ultra pure.

Vérifier le pH (valeur théorique 5,9 ± 0.2) et noter la valeur exacte sur le cahier et sur le flacon.

Conservation 4 mois dans un flacon brun à +4°C (frigo n°13).

- Phase mobile

15 ml de solution mère de tampon QSP 2 litres H2O ultra pure.

+ 3 ml CH3CN grade CLHP

Transvaser dans un flacon brun.

Utilisation 2 jours au maximum, conservation à t° ambiante. La préparer à chaque manipulation

- Solutions étalon

- Solution stock de Néoptérine à 39,5 µmol/l

Préparer 2 litres H2O ultra-pure contenant 30mg de DTE.

Peser 20 mg de *D(+)Néoptérine* (PM = 253,22)

Reprendre les 20 mg par 2 ml d'HCl 0,1N, et ajuster à 2 litres avec l'H2O / DTE

Agiter pendant 4 heures en maintenant la fiole à l'obscurité (papier aluminium).

Aliquoter des fractions de 1ml dans des tubes Eppendorf noirs.

Congeler à -80°C (congélateur n° 19).

Conservation 4 ans maximum.

Contrôler la concentration dans une série étalonnée avec l'étalon antérieur.

- Solution stock de Créatinine à 20 mmol/l

Peser 565,5 mg de *Créatinine* (PM = 113,1).

Reprendre par 250 ml d'H2O ultra pure.

Agiter pendant 2 heures en maintenant la fiole à l'obscurité (papier aluminium).

Aliquoter des fractions de 1ml dans des tubes à hémolyse.

Congeler à -20°C (congelateur n°30)

Conservation 1 an maximum.

Contrôler la concentration dans une série étalonnée avec l'étalon antérieur et sur HITACHI 917 (mode urine).

Préparation de la gamme étalon

Travailler à l'abri de la lumière (tubes protégés par du papier aluminium).

Décongeler les étalons stock de Néoptérine et Créatinine.

Procéder en suivant les instructions de la fiche : gamme étalonnage néoptérine et créatinine

cf. annexe 1 : Gamme étalon (fiche placée dans le classeur protocoles HPLC)

- Contrôle *:* Contrôle de qualité interne

LOX (X = numéro de lot en cours) .

Contrôle urinaire stocké dans le frigo au PTPP et conservé lors de l'utilisation dans le frigo N° 13 en Neurochimie

5-2-4 Analyse des échantillons

Sur la pompe Waters 501, rincer colonne et précolonne avec de l'acétonitrile (environ 30 min débit 0,2 ml/min).

Pendant ce temps, allumer les deux pompes 515, rincer le système (pompes, wisp et détecteurs) avec de l'eau ultra pure. Débit= 1ml/min.

Allumer l'injecteur et son réfrigérant.

Allumer le Empower ***Cf PE04 EMPOWER.***

Brancher la colonne en sortie de Wisp et la rincer avec de l'eau ultra pure 1 Heure à 0,2 ml/min.

Mettre ensuite en place la phase mobile sur la pompe A, monter le débit à 0,43 ml/min et laisser équilibrer environ 1 heure.

Pendant ce temps, allumer les détecteurs et effectuer manuellement les réglages suivants :

SPECTRA PHYSICS λ 235 nm

Channel 1.5

Range 1 : 1 AUFS (ne pas renseigner le range 2)

Rise Time : 1 s

avant de commencer les injections appuyer sur la touche **ZERO**

Fluo WATERS 2475 λ excitation : **354** nm, λ emission : **458** nm

Gain : 100

EUFS : 10 000

Mode sample energy

Sur le EMPOWER :

sélectionner le Projet Dosagneop (*cf PE04 EMPOWER*)

Ouvrir le système Chaîne HPLC (*cf PE04 EMPOWER*)

Remplir le Quick Set (***cf PE04 EMPOWER***).

Chaine gauche in Néoptérine as Chantal/Administrator - QuickSet

File Edit View Inject Actions Customize Help

Sample Set Method: Untitled

	Vial	SampleName	Function	Processing	Method Set / Report Method	# of Injs	Inj Vol (ul)	Run Time (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)
2			Clear Calibration	Normal	Néoptérine Urinaire				
3	1	Etalon 1	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	2	3,0	20,00	0,00
4	2	Etalon 2	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	2	3,0	20,00	0,00
5	3	Etalon 3	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	2	3,0	20,00	0,00
6	4	Contrôle LO4 pur	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	1	3,0	20,00	20,00
7	5	Urine 1	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	1	3,0	20,00	20,00
8	6	Urine 2	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	1	3,0	20,00	20,00
9	7	Urine 3	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine Urinaire	1	3,0	20,00	20,00
10			Clear Calibration	Don't Process or Report	Néoptérine				
11	8	Etalon 4	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	0,00
12	9	Etalon 5	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	0,00
13	10	Etalon 6	Inject Standards	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	0,00
14	11	Controle LO4 1/10	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	20,00
15	12	Sérum 1	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	20,00
16	13	Sérum 2	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	20,00
17	14	Sérum 3	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine	1	80,0	20,00	20,00
18	15	H2O	Inject Samples	Don't Process or Report	Néoptérine	3	00,0	2,00	2,00

Samples / Single / Sample Sets / Running /

Urines (à diluer au 1/10)

Standards :Etalons 1, 2 ,3 et 4

Method Set : **Dosageneop**

Injection : **10 µl**

Run Time : **30min** pour les étalons

55min pour les échantillons et contrôles

LCR

Standards :Etalons 1, 2 ,3 et 4

Method Set : **Dosagneop**

Injection : **10 µl**

Run Time : **30min** pour les étalons

55min pour les échantillons et contrôles

Imprimer le Sample set et l'utiliser comme feuille de route pour charger les vials (pas de possibilité d'identification) sur le carrousel.

Démarrer avec le feu vert (***cf PE04 MILLENNIUM***).

Vérifier le débit : **0.43 ml/min**

Vérifier la stabilité de la **pression** environ **1000psi --1500psi** (≅ 120 bars)

5-3 Etapes post analytiques

5-3-1 Analyse des résultats

Sélectionner les filtres en fonction de SATIN ou SATIN-2 (***cf PE04 EMPOWER***.

• Urines

Méthode de Calcul Satin : **Créatinine Urinaire**

Satin 2 : Néoptérine Urinaire

• LCR

Méthode de Calcul Satin : **Créatinine**

Satin 2 : Néoptérine

Noter les valeurs des concentrationsde la page *Alter Sample – Amounts Standards* (***cf PE04 EMPOWER***).

• Urines et LCR

Un exemple de valeurs

Etalons 1 : Créatinine 3,8 mmol/l - Néoptérine 182 nanomol/l

Etalons 2 : Créatinine 1,9 mmol/ l- Néoptérine 91 nanomol/l

Etalons 3 : Créatinine 0,38 mmol/l - Néoptérine 9,1 nanomol/l

Etalons 4 : Créatinine 0,06 mmol/l - Néoptérine 3 nanomol/l

Choisir la méthode en fonction de l'échantillon sélectionné (***cf PE04 EMPOWER***).

• Urines

Méthode de Calcul Satin : **Créatinine Urinaire**

Satin 2 : Néoptérine Urinaire

• LCR

Méthode de Calcul Satin : **Créatinine**

Satin 2 : Néoptérine

Recopier les résultats sur le cahier de paillasse.

5-3-2 Validation technique

- Contrôle des tracés (Séparation, Symétrie des pics, Niveau du bruit de fond, Stabilité des temps de rétention...)

- Validation de la calibration par les valeurs du contrôle LOX. Reporter ses valeurs sur la fiche de Contrôle continu.(Classeur contrôle CLHP).

- Contrôle de l'intégration de chaque échantillon pour vérifier que le pic est correctement identifié.

5-3-3 Saisie des résultats

Saisir manuellement les résultats sur LMX

5-3-4 Edition et Transmission des résultats

L'édition des résultats n'est possible qu'après validation biologique

6-CONSERVATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES APRES ANALYSE

Les vials sont éliminés selon la ***PE12 TRIELIMDECH.***

7-PROCEDURE SPECIFIQUE DE RECONDITIONNEMENT DE L'ANALYSEUR APRES ANALYSE

Arrêt de la manipulation

- Eteindre les détecteurs, le four et le réfrigérant.
- Rinçer le circuit sur H_2O 1 heure à 0,4 ml/mn. (Methode Manuelle)
- Puis rincer la colonne sur CH3CN 1 heure à 0,4 ml/mn.
- Fermer la colonne sur CH3CN.
- Faire une purge du wisp (- purge page - start purge)

- Faire un nettoyage de l'aiguille (diag page -usurmaint page-NDL wash page - start NDLW)

- Réinitialiser le wisp (usurmaint page – diag page – main page)

- Faire deux purges sur chaque pompe

- Eteindre le Wisp et les pompes.

Arrêt du EMPOWER

- cf PE04 EMPOWER

8-GESTION DES REACTIFS ET CONSOMMABLES

Le technicien NEUROCHIMIE gère totalement les stocks de réactifs et consommables .

9-ASSURANCE DE QUALITE

9-1 Contrôle des performances

Carte de contrôles classeur Contrôles CLHP

Suivi des colonnes (Pression, Efficacité, Symétrie des pics, Résolution)

9-2 Gestion des documents

Documents d'enregistrement

Résultats conservés sur EMPOWER et archives gravées sur CD.

Résultats répertoriés dans le cahier "dosage de la néoptérine".

Traçabilité des contrôles et des actions correctives

Le EMPOWER conserve la traçabilité complète des manipulations.et des actions correctives. (Normes GBEA)

Procédure d'exécution

Cf. PE4 Millennium

Documents bibliographiques (annexes 6 - 7 - 8)

- Métabolisme des ptéridines non conjuguées chez l'homme (J.L.DHONDT et col.)
- La néoptérine urinaire : intérêt dans l'exploration de certaines néoplasies (P. MURA et col.)
- Neopterin as marker for activation of cellular immunity (H. WACHTER et col.)

ANNEXE 5

Fiche technique du réactif pour dosage de l'aldolase (Randox®)

Application du dosage pour le LCR – paramétrage sur Architect C16000 Abbott®

RANDOX

ALDOLASE

Fructose-1,6-diphosphate aldolase
EC 4.1.2.13
Manual

INTENDED USE

For the quantitative *in vitro* determination of Aldolase in serum or plasma. This product is suitable for Manual use.

Cat. No.

AD 189	1. Buffer/Substrate	5 x 20 ml
5 x 20 ml	2. NADH	2 x 1 ml
40 tests	3. GDH/TIM/LDH	1 vial

PRINCIPLE

Aldolase converts fructose-1,6-diphosphate (F-1,6-DP) to glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DAP). The addition of triosephosphate isomerase (TIM), glycerolphosphate dehydrogenase (GDH) and NADH converts the dihydroxyacetone phosphate to glycerol-1-phosphate. The rate of the aldolase reaction is measured by the decrease in absorbance at 340 nm as a consequence of the conversion of NADH to NAD^+.

$$\text{F-1,6-DP} \xrightarrow{\text{Aldolase}} \text{GAP} + \text{DAP}$$

$$\text{GAP} \xrightarrow{\text{TIM}} \text{DAP}$$

$$2\text{DAP}+2\text{NADH}+2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} 2\text{Glycerol-1-phosphate}+2\text{NAD}^+$$

SAMPLE

Serum, heparinized plasma or EDTA plasma.

REAGENT COMPOSITION

Contents	Concentration in the Test
1. Buffer/Substrate	
Collidine buffer	51 mmol/l, pH 7.4
Mono-iodoacetate	0.27 mmol/l
F-1,6-DP	2.7 mmol/l
2. NADH	0.23 mmol/l
3. GDH/TIM/LDH	
GDH	≥ 326 mU/ml
TIM	≥ 4.35 U/ml
LDH	≥ 616 mU/ml

SAFETY PRECAUTIONS AND WARNINGS

For *in vitro* diagnostic use only. Do not pipette by mouth. Exercise the normal precautions required for handling laboratory reagents.

Solution 1 contains Sodium Azide. Avoid ingestion or contact with skin or mucous membranes. In case of skin contact, flush affected area with copious amounts of water. In case of contact with eyes or if ingested, seek immediate medical attention.

Sodium Azide reacts with lead and copper plumbing, to form potentially explosive azides. When disposing of such reagents flush with large volumes of water to prevent azide build up. Exposed metal surfaces should be cleaned with 10% sodium hydroxide.

Health and Safety Data Sheets are available on request.

The reagents must be used only for the purpose intended by suitably qualified laboratory personnel, under appropriate laboratory conditions.

STABILITY AND PREPARATION OF REAGENTS

1. **Buffer/Substrate**
   Reconstitute one vial of Buffer/Substrate 1 with **20 ml** of redistilled water. Stable for two weeks at +2 to +8°C.

2. **NADH**
   Reconstitute one vial of NADH 2 with **1 ml** of redistilled water. Stable for 4 weeks at +2 to +8°C.

3. **GDH/TIM/LDH**
   Contents ready for use. Stable up to the expiry date specified when stored at +2 to +8°C.

MATERIALS PROVIDED

Buffer/Substrate
NADH
GDH/TIM/LDH

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Randox Assayed Multisera Level 2 (Cat. No. HN 1530) and Level 3 (Cat. No. HE 1532).
0.9% NaCl Solution

PROCEDURE

Wavelength:	340 nm (Hg 365 nm, or Hg 334 nm)
Cuvette:	1 cm light path
Temperature:	37°C
Measurement:	against sample blank

Pipette into test tubes:

	Sample blank	Sample
Sample	0.2 ml	0.2 ml
Buffer/Substrate	-	2.50 ml
0.9% NaCl Solution	2.50 ml	-
NADH	-	0.05 ml
GDH/TIM/LDH	-	0.01 ml

Mix, incubate for 5 min at 37°C.
Read absorbance A_1, against sample blank.
Allow to stand at 37°C for exactly 20 min after first reading and then measure absorbance A_2 against blank.

$(A_1 - A_2 = \Delta A)$

* If A_1 <0.95 dilute 1+1 with 0.9% NaCl and reassay. Multiply the result by 2.

CALCULATION

To calculate Aldolase activity use the following formulae:

U/l =	54.8 x ΔA 340 nm
U/l =	55.8 x ΔA Hg 334 nm
U/l =	101.5 x ΔA Hg 365 nm

QUALITY CONTROL
Randox Assayed Multisera, Level 2 and Level 3 are recommended for daily quality control. (The material should be stabilised by adding 1 drop (25-30µl) of 0.7M Acetic acid solution to 1ml of the serum within 30 minutes of reconstitution). Two levels of controls should be assayed at least once a day. Values obtained should fall within a specified range. If these values fall outside the range and repetition excludes error the following steps should be taken:

1. Check instrument settings and light source.
2. Check cleanliness of all equipment in use.
3. Check water, contaminants ie bacterial growth may contribute to inaccurate results.
4. Check reaction temperature.
5. Check expiry date of kit and contents.
6. Contact Randox Laboratories Customer Technical Support, Northern Ireland (028) 94422413.

INTERFERENCE
Haemolysis interferes with the test.

REFERENCE VALUES [1]
Serum: up to 7.6 U/l (37°C)

It is recommended that each laboratory establish its own reference range to reflect the age, sex, diet and geographical location of the population.

LINEARITY
If the absorbance change ΔA exceeds 0.500 (340 nm/Hg 334 nm) or 0.250 (Hg 365 nm) dilute 0.1 ml of sample with 0.9 ml of NaCl solution and repeat assay. Multiply result by 10.

REFERENCE
1. Feissli, S., *et al*., (1966). Klin. Wschr. **44:** 390

Revised 08/07/04 bm

RANDOX Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY
Tel:CRUMLIN (028)94422413 Fax.No.INT.44 (028)94452912 UK (028)94452912
Email: applications@randox.com Website: www.randox.com

RANDOX

c Aldo LCR

PARAMETRES GENERAUX

NOM: c Aldo LCR
N°dosage: 2998*
Version dosage: 1
Type de dosage: Photométrique
Version cal: 0

DEFINITION DE LA RECTION

Mode de réaction: Cinétique décroissante
Longueur d'onde primaire: 340
Longueur d'onde secondaire: 404
Dernière lecture requise 33
Limites d'absorbance: -0.10000 - 2.0000

Type blanc échantillon: Aucun
Dosage du blanc:

Temps de lecture principale: 27 - 33
Temps de lecture Flex 0 - 0
le lecture correction couleur: 0 - 0
Temps de lecture du blanc:

REACTIF/ECHANTILLON

Réactif: ALDO
Volume réactif R1: 180
Volume eau R1 0
Mode distribution R1: Type 0
Nom du diluant: Saline

Volume réactif R2: 36
Volume eau R2: 0
Mode de distribution R2: Type 0
de de distribution du diluent: Type 0

Nom dilution	Volume échantillon	Volume échantillon dilué	Volume diluant	Volume d'eau	Facteur de dilution
Standard	20	0	0	0	1 : 0.52
Dilution 1 :10	20	10	180	0	1 : 10.0

CONTROLES DE VALIDITE

Type de vérification de la réaction: Aucune
Plage temps de lecture A:
Limites de calcul:

Plage de temps lecture B:
Absorbance minimum:
% Linéarité ratio:

Valeur d'absorbance maximum:

c Aldo LCR

PARAMETRES DE CALIBRATION

Méthode de calibration: Facteur
Utiliser facteur cal de:
Intervalle cal.complète en heures: 24
Type d'ajustement: Aucun
Facteur cal attendu: 0
% tolérance facteur cal attendu: 0

écart: Blanc
Ajustement maximum courbe: 0

Nom du groupe de calibrateurs: ALD EAU

Facteur: 3587.0
le cal.ajustement en heures: 0
Niveau cal. Ajustement:
/pe de deman,de par défaut: Complète
ıites d'absorbance du blanc: 0 - 0

Plage écart absorbance: 0 - 0

Répliques: 1

Niveau de calibrateur	Concentration	Volume échantillon	Volume échantillon dilué	Volume diluant	Volume d'eau
ALD EAU1	0	10	0	0	0

SMART WASH

COMPONENT	REAGENT / ASSAY	WASH	VOLUME	REPLICATES	WASH PROTOCOL

PARAMETRES DE RESULTATS

Limites linéarité: 0 - 50

Limites annotations:

Genre	Age	Valeur normale	Valeur extrème
Indifférent	0 -130 ans	0.0 - 0.5	

PARAMETRES D'INTERPRETATION

NAME	RANGE	RESULTS REVIEW

c Aldo LCR

UNITES DE RESULTATS

Unités de concentration résultat:	UI/l	Facteur de corrélation:	0.52
Nombre de décimales du résultat:	1	Ordonnée à l'origine:	0

ANNEXE 6

Caractéristiques de l'ensemble de la cohorte de patients étudiée, par groupe étiologique

	EST positifs	EST négatifs
Sexe	M : 66 (53,7%) F : 57 (46,3 %)	M : 35 (47,3 %) F : 39 (52,7 %)
Age moyen (années)	63,8 (23 – 89)	66,8 (8 – 92)
Répartition étiologique des EST		
Sporadiques :	89/123	
Génétiques :	20/123	
Acquises :	14/123	
dont	6 vMCJ, 6 GH et 2 DM	
Polymorphisme du codon 129 (%)		
MM :	72/120 (60 %)	8/31 (25,8 %)
MV :	32/120 (27 %)	20/31 (64,5 %)
VV :	16/120 (13 %)	3/31 (9,7 %)
Sporadiques MCJ (87/89)		
MM :	51/87 (58,7 %)	
MV :	21/87 (24,1%)	
VV :	15/87 (17,2 %)	
Type de PrPres (118/123)		
1 :	81/118 (68,6 %)	
2a :	25/118 (21,2 %)	
2b :	6/118 (5,1 %)	
Mixte :	6/118 (5,1 %)	
Sporadiques MCJ (87/89)		
1 :	62/87 (71,3%)	
2a :	20/87 (23 %)	
Mixte :	5/87 (5,7 %)	
Aldolase (UI/L)		
Moyenne (ET) (Min – max)	1,9 (1,25) (0,3 – 9)	3,5 (17,9) (0,1 – 143)
Médiane	1,6	0,9
Néoptérine (nM)		
Moyenne (ET) (Min – max)	5,6 (8,31) (0,2 – 66,4)	18,8 (49,8) (0,3 – 405)
Médiane	4,1	5,8
Protéinorachie (g/L)		
Moyenne (ET) (Min – max)	0,45 (0,20) (0,10 – 1,20)	0,58 (0,50) (0,11 – 3,73)
Médiane	0,40	0,44
Leucocytes (élement / mm^3)		
Moyenne (ET) (Min – max)	2 (2,8) (1 – 20)	7 (16,0) (1 – 76)
Médiane	1,00	1

M : Méthionine, V : Valine ; PrPres : protéine prion résistante à la protéinase K. La classification utilisée pour le typage moléculaire de la PrPres est celle décrite par Parchi *et al* 1996.

ANNEXE 7

Tableau des résultats des principales caractéristiques des patients retenus dans l'étude

Tableau récapitulatif des données biochimiques de chaque patient inclus dans l'étude, avec âge, sexe et étiologie.

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
antma31	F	69	EST neg	nd		négative	0,9	7,7	0,58	1					
arnca26	F	74	EST neg	nd		négative	1,6	16,2	0,39	nd					
barpi29	M	78	EST neg	nd		douteux	0,6	2,9	0,41	1	positive	1,1	6,3	0,34	nd
berge57	F	45	EST neg	nd		négative	0,1	3,3	0,6	nd	négative	0,5	7,4	0,17	1
bersi25	F	73	EST neg	nd		négative	1,0	0,9	0,39	nd					
bishe30	M	77	EST neg	nd		douteux	0,6	4,0	1,05	1					
bonje30	M	71	EST neg	nd		négative	1,0	5,7	0,43	nd					
boufr45	F	57	EST neg	nd		négative	0,3	2,5	0,19	nd					
bouho45	M	61	EST neg	nd		positive	1,4	40,1	0,56	5					
brore39	M	63	EST neg	nd		négative	nd	2,0	0,77	1					
canfl91	M	8	EST neg	nd		négative	0,7	3,4	0,11	1					
cerma38	F	67	EST neg	nd		négative	0,8	0,3	0,25	26					
chaje25	F	77	EST neg	nd		négative	0,8	8,1	0,39	nd					
chama13	F	86	EST neg	nd		négative	0,6	5,4	0,19	nd					
chaso33	F	73	EST neg	nd		douteux	0,9	3,6	0,53	nd	positive	0,9	2,5	0,4	nd
chelo23	F	79	EST neg	nd		négative	3,9	107,4	0,33	10					
colge25	F	73	EST neg	nd		négative	0,3	nd	nd	nd					
colsa80	M	20	EST neg	nd		positive	2,0	16,3	0,46	nd					
comay28	F	75	EST neg	nd		positive	1,4	21,1	0,21	nd					
cotlo24	F	83	EST neg	nd		douteux	1,4	9,9	0,69	nd	négative	0,9	5,4	0,6	nd
crijo27	M	74	EST neg	nd		positive	0,9	4,9	0,81	nd					
depre42	F	64	EST neg	nd		positive	nd	405,0	0,41	1					
derro28	M	78	EST neg	nd		positive	1,5	12,5	0,48	nd	négative	0,7	7,7	0,64	1
desje60	M	44	EST neg	nd		positive	1,2	90,0	0,64	26					
dupan91	F	17	EST neg	nd		douteux	3,0	69,3	0,44	nd					
dursu24	F	74	EST neg	nd		négative	0,6	21,7	nd	nd					
ferge22	F	86	EST neg	nd		négative	nd	7,6	0,23	nd					
ferju11	F	89	EST neg	nd		positive	1,1	7,2	1,46	nd					
filce81	F	19	EST neg	nd		douteux	1,5	2,6	0,96	5	positive	8,1	3,7	0,97	6

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
filma23	F	79	EST neg	nd		négative	0,6	5,7	0,17	1					
forhe60	M	42	EST neg	nd		négative	0,2	5,0	0,36	1					
fouje29	F	72	EST neg	nd		douteux	1,0	11,9	0,31	nd					
gaima23	M	78	EST neg	nd		négative	0,5	5,8	0,49	1					
gauel33	F	73	EST neg	nd		négative	0,6	4,0	0,4	nd					
gerfr24	M	76	EST neg	nd		douteux	0,6	3,1	0,6	nd					
guige26	M	77	EST neg	nd		négative	3	5,1	0,31	nd	négative	0,3	4,8	0,34	nd
gunch24	M	83	EST neg	nd		douteux	ND	3,1	0,45	nd					
hugla71	M	36	EST neg	nd		positive	nd	47	0,65	nd	positive	nd	52	0,31	nd
humma22	M	82	EST neg	nd		négative	0,6	2,1	0,29	nd					
Jonja33	M	71	EST neg	nd		positive	1,2	11,6	1	nd					
latmi49	F	57	EST neg	nd		positive	5,5	3,5	0,42	nd					
maggu39	M	64	EST neg	nd		positive	2,1	4,5	1,53	nd					
maian28	M	80	EST neg	nd		positive	nd	8,2	0,36	nd					
mirge26	F	76	EST neg	nd		douteux	0,8	7,0	0,19	nd					
misyo32	F	74	EST neg	nd		positive	0,6	23,2	0,88	nd	positive	1,4	23,7	0,4	nd
morma57	F	51	EST neg	nd		négative	0,4	3,2	0,27	nd					
nolle22	m	85	EST neg	nd		négative	0,7	4,9	0,82	nd					
odopa30	F	69	EST neg	nd		négative	0,4	3,3	0,31	1					
olllu27	M	74	EST neg	nd		négative	3,5	5,5	0,38	nd					
padfr29	M	74	EST neg	nd		négative	0,5	6,8	0,34	1					
pagsi28	F	72	EST neg	nd		négative	1,0	15,0	1	nd					
parpi73	M	nd	EST neg	nd		positive	6,7	11,5	2	76	positive	6,3	18,1	1,88	nd
payje25	F	80	EST neg	nd		négative	0,4	10,7	0,25	2					
perre24	F	77	EST neg	nd		négative	0,5	4,9	0,29	nd					
perre35	F	69	EST neg	nd		négative	0,7	7,2	0,28	nd	négative	0,4	6,5	0,54	nd
petna69	F	29	EST neg	nd		négative	nd	2,2	0,45	9					
phigu36	M	63	EST neg	nd		négative	1,3	6,2	3,73	nd	négative	1,6	9,0	0,38	nd
pican12	M	92	EST neg	nd		douteux	0,6	17,9	0,44	nd					
pircy73	M	28	EST neg	nd		positive	143,0	42,6	0,87	nd					

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
pouso69	F	35	EST neg	nd		positive	1,6	22,8	0,64	nd					
redma37	F	68	EST neg	nd		douteux	1	4,4	0,45	nd	douteux	1,4	7,3	0,47	nd
reyje40	M	68	EST neg	nd		positive	nd	1,2	0,43	nd					
rocmo36	F	64	EST neg	nd		positive	2,3	3	0,38	nd	négative	0,5	4,6	0,31	nd
rulje31	M	73	EST neg	nd		douteux	1,7	5,6	0,44	1	positive	1,7	3,9	0,63	nd
sapma22	F	85	EST neg	nd		douteux	0,7	5,9	0,41	nd	positive	0,9	5,4	0,77	nd
sarro21	M	87	EST neg	nd		douteux	nd	5,8	0,44	1					
tates11	F	91	EST neg	nd		positive	1,1	3,1	0,53	1					
tauer64	M	44	EST neg	nd		positive	nd	5,9	0,35	1	positive	1,1	5,4	0,35	1
thije33	F	75	EST neg	nd		positive	nd	43,0	1,11	nd					
torpi23	M	84	EST neg	nd		négative	0,7	20,2	0,34	nd					
tropa21	M	86	EST neg	nd		positive	0,8	14,7	0,92	nd					
vaube34	F	73	EST neg	nd		négative	0,7	4,7	0,35	nd					
voyje63	M	44	EST neg	nd		négative	0,6	3,3	0,57	1					
vuoge41	M	65	EST neg	nd		positive	4,0	54,0	0,93	2					
ALLJE27	F	75	spo	ND	MM1	positive	2,0	3,5	0,34	nd					
Artde26	F	78	spo	negatif	VV2	positive	2,9	4,3	0,43	1					
aubgi25	F	80	spo	ND	MM1	douteux	0,6	5,5	0,33	nd					
badma23	F	83	spo	negatif	MM1	positive	9,0	7,1	0,58	nd					
BARVI28	M	72	spo	ND	MM1	positive	nd	4,7	0,50	1					
baure46	F	55	spo	negatif	MV1	négative	0,3	2,1	0,19	1	positive	0,6	4,8	0,36	1
bedam34	M	65	spo	negatif	MM1	positive	1,9	1,3	1	nd	positive	3,4	2,9	0,27	1
Benre14	M	89	spo	negatif	MM1/2	positive	1,4	14,9	0,22	2					
BERMA27	F	75	spo	negatif	MM1	positive	1,8	8,4	0,31	nd					
BERPA56	M	45	spo	negatif	MM1	positive	1,6	3,2	0,50	nd					
BERRO22	F	79	spo	Negatif	MM1	positive	3,2	3,9	0,38	nd					
borem31	M	66	spo	negatif	MV2	positive	nd	2,7	0,68	1					
boura32	M	68	spo	negatif	VV1	positive	3,7	4,7	0,46	1					
braja41	F	66	spo	ND	MV1/2	positive	1,9	4,3	0,34	1					

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
BRUAN49	M	53	spo	negatif	MM1	positive	2,2	6,2	0,36	1					
CAIMA42	M	54	spo	negatif	VV2	positive	nd	nd	0,45	1					
calso42	F	65	spo	negatif	MM1	positive	ND	3,8	0,35	nd					
carch45	F	nd	spo	negatif	nd	positive	2,8	4,1	0,36	4					
casjo47	F	58	spo	negatif	MM1	positive	1,7	4,0	0,42	nd					
chach49	F	58	spo	negatif	MV2	négative	0,8	5,6	0,36	nd	positive	0,8	4,3	0,39	nd
chaed58	F	49	spo	negatif	MV1	douteux	1,5	2,5	0,31	nd	positive	1,2	2,9	0,44	nd
Chaju21	F	84	spo	ND	MM1	positive	1,0	5,6	0,30	nd					
CHAJU31	F	71	spo	negatif	MM1	positive	1,8	9,6	0,47	1					
CHAMA28	F	83	spo	negatif	MM1	positive	3,5	3,1	0,91	1					
chamo31	F	74	spo	negatif	MM1	positive	1,6	6,2	0,41	nd					
chrfr36	M	71	spo	negatif	MV1/2	négative	0,8	6,9	0,55	nd	négative	0,6	6,1	0,34	nd
coqje31	M	71	spo	negatif	MV1	positive	1,4	6,1	0,85	1					
dahod25	F	73	spo	negatif	MV2	douteux	nd	nd	0,30	1					
darfa67	F	32	spo	negatif	MM2	négative	0,9	0,9	nd	nd	douteux	3,9	1,2	00/01/1900	nd
Deyan32	F	72	spo	negatif	MM1	positive	1,5	8,9	0,58	1					
drero49	M	58	spo	negatif	MM1	positive	1,2	2,9	0,78	1					
dubmi48	M	58	spo	ND	MM1	positive	2,8	15,4	0,34	nd					
DUMCL40	F	62	spo	negatif	VV2	positive	1,1	4,0	0,57	1					
FAREU37	M	60	spo	negatif	MM1	positive	nd	0,9	0,45	1					
FAVGE36	M	59	spo	negatif	MM1	positive	nd	nd	nd	nd					
fercl36	F	63	spo	negatif	MM1	positive	nd	1,6	0,3	1	positive	7,7	2,3	0,29	1
ganlu25	M	72	spo	negatif	VV2	positive	nd	2,5	0,34	1					
gasfl36	M	64	spo	negatif	VV2	positive	2,9	1,3	0,40	1					
gilan32	F	73	spo	ND	MM1	positive	nd	3,4	0,29	nd					
Goyga27	M	76	spo	negatif	MM1	positive	2,9	4,3	0,21	nd					
gozje47	M	58	spo	ND	VV2	positive	1,2	6,9	0,37	2					
GRAMA13	F	87	spo	ND	MM1	positive	2,8	3,9	0,25	1					
hummo25	F	82	spo	negatif	MV1/2	négative	0,9	4,4	0,32	nd	négative	1,2	4,3	0,31	nd
Jaysu38	F	65	spo	negatif	MM1	positive	2,0	3,5	0,27	1					

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
Jeuod26	F	77	spo	negatif	MM1	positive	1,2	8,6	0,31	1					
JUNSY32	F	69	spo	negatif	VV1	positive	1,2	3,7	0,35	1	positive	1,0	3,2	0,39	1
LABHE27	F	73	spo	negatif	VV1	positive	1,2	5,9	0,21	1					
LAFAL23	M	72	spo	negatif	VV1	positive	nd	nd	nd	nd					
Lafod38	F	65	spo	negatif	MM1	positive	0,5	7,2	0,33	nd					
Lapfr42	F	62	spo	negatif	MV1	positive	1,9	3,2	0,58	nd					
Lefyv30	M	74	spo	ND	MM1	positive	3,0	4,4	0,49	1					
LEOCL30	M	71	spo	negatif	MM1	positive	2,5	3,4	0,52	nd					
Leysu26	F	78	spo	negatif	MM1	positive	1,9	5,5	0,40	1					
lhoje43	M	63	spo	ND	MM1	douteux	0,5	3,3	0,32	nd					
maccl36	F	71	spo	ND	MM1	positive	nd	2,9	0,87	1					
Maqan38	F	65	spo	negatif	MV1	douteux	0,7	4,2	0,31	nd					
marja35	F	72	spo	negatif	MV1/2	douteux	nd	5,4	0,29	1	positive	1,0	5,5	0,28	1
marra26	F	81	spo	negatif	MM1	positive	1,2	4,8	0,38	1					
MEUMA38	F	63	spo	negatif	VV2	positive	2,0	7,7	0,40	nd					
Molro29	M	75	spo	negatif	VV2	positive	3,3	8,3	0,37	1					
moujo22	M	78	spo	negatif	MV1	positive	1,3	4,2	0,50	nd					
MURGI33	M	68	spo	negatif	MV1	positive	3,4	4,4	0,17	1	positive	1,6	5,5	0,24	3
netan44	F	56	spo	negatif	MM1	positive	1,9	0,7	nd	nd					
OGDPI36	M	65	spo	ND	MM1	positive	1,6	4,5	0,43	1					
ORICL44	M	58	spo	negatif	MM1	positive	1,9	2,9	0,42	20					
pacja38	M	68	spo	negatif	MM1	positive	1,8	4,1	1,01	nd					
PaiRe49	M	54	spo	ND	MV2	positive	1,2	2,7	0,53	nd					
paqma61	F	46	spo	negatif	MV2	douteux	0,7	2,7	0,17	1	positive	2,1	13,9	1,44	25
penje31	F	76	spo	negatif	MM1	positive	ND	3,9	0,47	1					
perfe28	M	77	spo	negatif	MV1	négative	0,9	8,1	0,94	nd	positive	3,4	6,5	1,07	nd
pezpa31	M	76	spo	negatif	MM1	positive	1,1	3,4	0,47	1					
raqma36	F	61	spo	negatif	MV2	positive	nd	0,2	0,27	1					
ricle26	F	60	spo	negatif	MV1	positive	0,8	6,1	0,34	nd					
RICMA25	M	77	spo	ND	MV1	positive	1,4	66,4	0,41	2					

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
ROBAB34	M	68	spo	negatif	MM1	positive	0,9	62,3	0,49	1					
rouan21	F	79	spo	negatif	MM1	positive	1,9	4,6	0,47	nd					
SADJU30	**F**	71	spo	negatif	MM1	positive	4,8	4,2	0,30	nd					
sanan50	M	58	spo	nd	nd	positive	nd	3,2	0,63	10					
SEDAN22	M	78	spo	ND	MM1	positive	3,0	3,2	1,20	1					
troal47	M	60	spo	negatif	MV2	négative	1,7	3,9	0,46	nd	négative	0,6	5,6	0,55	6
Truma24	F	79	spo	negatif	MM1	positive	nd	4,9	0,37	1					
URBMA40	M	62	spo	negatif	MM2	positive	2,3	6,8	0,75	nd					
valra37	M	69	spo	ND	VV2	positive	2,7	3,8	0,26	nd					
veima40	F	60	spo	ND	MM1	positive	nd	2,4	0,32	nd					
velgu23	M	84	spo	ND	MM1	positive	2,2	5,7	0,45	nd					
VIALO16	M	82	spo	nd	nd	positive	3,2	1,8	0,45	nd					
viejo27	F	80	spo	ND	MM1	positive	nd	6,1	0,38	5					
VINPI36	M	60	spo	negatif	MM1	positive	nd	nd	nd	nd					
VUIHE30	M	66	spo	negatif	VV2	positive	nd	nd	nd	nd	positive	nd	nd	nd	nd
BAUJE43	F	59	Mut	V210I	MV1	positive	1,0	3,0	0,37	1					
beler60	M	45	Mut	E200K	MM1	positive	2,5	4,0	0,27	1	positive	1,2	2,6	0,52	nd
BERRE45	M	57	Mut	E200K	MV1	positive	0,8	3,6	0,48	2					
BONPR39	M	62	Mut	E200K	MM1	positive	1,2	3,9	0,68	nd	positive	1,1	3,8	0,89	nd
braol68	M	37	Mut	E200K	MV1	négative	0,6	3,2	0,54	nd	positive	1,8	3,5	0,25	11
chada33	F	74	Mut	D178NIFF	MM2	négative	nd	4,3	0,47	nd	négative	0,7	5,1	0,48	nd
dessu29	F	71	Mut	E200K	MV1	douteux	4,1	3,9	0,32	1	positive	3,1	22,0	0,46	nd
GAMAN	M	nd	Mut	V210I	nd	positive	nd	nd	nd	nd					
JACGE35	M	66	Mut	E200K	MM1	positive	1,5	3,0	1,00	nd					
jacje40	M	66	Mut	E200K	MM1	positive	1,5	5,9	0,54	2					
JACMI31	M	69	Mut	E200K	MM1	positive	2,0	4,5	0,83	1					
leval53	M	46	Mut	D178NIFF	MM2	négative	nd	nd	0,43	nd	négative	nd	nd	nd	nd
manlu29	F	71	Mut	E200K	MM1	positive	3,6	6,7	0,24	nd					
PARGI56	M	45	Mut	D178N	VV1	positive	1,4	2,9	0,37	nd	positive	2,0	3,5	0,32	1

Patient	sexe	Age	Etiologie	Anomalie génétique	Type de PrPres et codon 129	P14.3.3 n°1	Aldolase n°1	Néoptérine n°1	Protéinorachie n°1	GB /mm3 n°1	P14.3.3 n°2	Aldolase n°2	Néoptérine n°2	Protéinorachie n°2	GB /mm3 n°2
Perir50	F	55	Mut	E200K	MV1	négative	1,0	3,1	0,70	1					
PERJE50	F	49	Mut	E200K	MM1	positive	nd	2,1	nd	nd					
POCYV40	M	61	Mut	E200K	MM1	négative	2,5	2,8	0,42	nd					
Rocjo35	F	68	Mut	D178N	MM2	négative	0,4	4,3	0,54	3					
rouje55	M	49	Mut	Mut GSS	nd	négative	0,7	5,8	0,30	nd					
VILCL32	F	71	Mut	V203I	MM1	positive	4,4	4,8	0,25	nd					
FUMCO43	F	52	DM	negatif	MM1	positive	nd	nd	nd	nd	positive	nd	nd	nd	nd
REBMI53	M	49	DM	negatif	MV1	positive	2,0	3,2	0,56	1					
arrla70	M	34	GH	negatif	MV2	négative	0,8	2,2	0,10	1					
besje68	M	35	GH	negatif	MV1/2	négative	0,4	4,9	0,21	nd	négative	0,5	1,9	0,2	nd
honar68	M	32	GH	negatif	MM1	positive	4,3	0,9	0,27	1					
juber67	M	38	GH	negatif	MM1	douteux	0,6	3,2	0,34	nd	positive	2,1	2,8	0,75	nd
meula75	M	nd	GH	negatif	nd	positive	2,5	5,4	0,81	nd					
roswi68	M	38	GH	negatif	MV2	douteux	2,5	5,7	0,47	5					
bouha83	M	23	v-MCJ	negatif	MM2B	douteux	0,8	3,6	0,42	1					
giljo53	F	54	v-MCJ	negatif	MM2B	négative	0,6	2,1	0,32	nd	négative	0,6	2,0	0,3	nd
queal48	M	57	v-MCJ	negatif	MM2B	douteux	1,1	5,7	0,35	1	douteux	1,4	5,4	0,32	1
ROCFR65	M	37	v-MCJ	negatif	MM2B	positive	nd	nd	nd	nd					
RODHE68	M	28	v-MCJ	negatif	MM2B	douteux	nd	nd	0,19	nd	positive	nd	nd	0,52	nd
trocl58	M	47	v-MCJ	negatif	MM2B	négative	0,8	7,4	0,58	1					

Etiologies : DM : cas iatrogène suite à une greffe de dure-mère ; GH : cas iatrogène suite à l'administration intra-musculaire d'hormone de croissance ; Mut : cas génétique ; spo : cas sporadique ; v-MCJ : variant de la MCJ ; EST neg : cas témoin exempt d'EST.

Type de PrPres et codon 129 : PrPres de type 1 ou 2 associée au polymorphisme du codon 129. M : allèle méthionine V : allèle valine

ND / nd : non déterminé, non dosé

ANNEXE 8

Résultats de la détection de la protéine 14.3.3 dans le LCR par Western Blot en fonction des groupes étiologiques, sensibilité et spécificité par groupes étiologiques

Tableau de synthèse des résultats de protéine 14.3.3 par groupe étiologiques avec sensibilité et spécificité.

	Après première ponction de LCR									Après seconde ponction de LCR				
	EST Neg	EST Pos	EST Neg > 40 ans	sMCJ	gMCJ	E200K	MCJ acquises	GhMCJ	vMCJ	EST Neg	EST Pos	EST Neg > 40 ans	sMCJ	vMCJ
Douteux → négatif														
P14.3.3 négative	50	31	46	14	8	4	9	4	5	47	21	44	8	4
P14.3.3 positive	24	92	19	75	12	8	5	2	1	27	102	21	81	2
Sensibilité	74,8 % (92/113)		84,3 % (75/89)		60 % (12/20)	66,6 % (8/12)	35,7 % (5/14)	33,3% (2/6)	16,6% (1/6)	82,9 % (102/123)		91 % (81/89)		33,6 % (2/4)
Spécificité	67,6 % (50/74)		70,7 % (46/65)							63,5 % (47/74)		67,6 % (44/65)		
Douteux → positif														
P14.3.3 négative	35	18	33	7	7	3	4	2	2	38	13	36	3	2
P14.3.3 positive	39	105	32	82	13	9	10	4	4	36	110	29	86	4
Sensibilité	85,4% (105/123)		92 % (82/89)		65 % (13/20)	75 % (9/12)	71,4 % (10/14)	66,6 % (4/6)	66,6 % (4/6)	89,4 % (81/89)		96,6 % (86/89)		66,6 % (4/6)
Spécificité	47,3 % (35/74)		50,7 % (33/65)							51,4 % (44/65)		55,4 % (36/65)		
Effectif total	74	123	65	89	20	12	14	6	6	74	123	65	89	6

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdulle S, Hagberg L, Svennerholm B, Fuchs D, Gisslen M (2002) Continuing intrathecal immunoactivation despite two years of effective antiretroviral therapy against HIV-1 infection. *AIDS* **16**(16)**:** 2145-2149

Abdulle S, Hagberg L, Svennerholm B, Fuchs D, Gisslen M (2008) Cerebrospinal fluid viral load and intrathecal immune activation in individuals infected with different HIV-1 genetic subtypes. *PLoS ONE* **3**(4)**:** e1971

AFSSAPS. (2003) Analyse du risque de transmission de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob par les médicaments d'origine humaine et par les produits sanguins labiles. . AFFSAPS Paris, p. 22.

Aitken A (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**(3)**:** 162-172

Aksamit AJ, Jr., Preissner CM, Homburger HA (2001) Quantitation of 14-3-3 and neuron-specific enolase proteins in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **57**(4)**:** 728-730

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**(5090)**:** 764-766

Alper T, Haig DA, Clarke MC (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**(3)**:** 278-284

Alperovitch AD-LN, Brandel J, Salomon D. (2004) La maladie de Creutzfeldt-Jakob en France, 1992-2002. Rapport du Réseau National de Surveillance de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et des maladies apparentées. Institut National de Veille Sanitaire.

Andreoletti O, Simon S, Lacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbiere F, Ferre P, Foucras G, Laude H, Eychenne F, Grassi J, Schelcher F (2004) PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* **10**(6)**:** 591-593

Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B (2007) Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* **4**(8)**:** 645-650

Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, Hughson AG, Moore RA, Johnson LM, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B (2008) Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods* **5**(3)**:** 211-212

Bahl JM, Heegaard NH, Falkenhorst G, Laursen H, Hogenhaven H, Molbak K, Jespersgaard C, Hougs L, Waldemar G, Johannsen P, Christiansen M (2008) The diagnostic efficiency of biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease compared to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*

Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB (1995) Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. *J Biol Chem* **270**(33)**:** 19197-19200

Barletta JM, Edelman DC, Highsmith WE, Constantine NT (2005) Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods* **127**(2)**:** 154-164

Baron T (2002) Mouse models of prion disease transmission. *Trends Mol Med* **8**(10)**:** 495-500

Bartz JC, Bessen RA, McKenzie D, Marsh RF, Aiken JM (2000) Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **74**(12)**:** 5542-5547

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**(3)**:** 417-428

Bastian FO, McDermott ME, Perry AS, Carver LA, Dash S, Garry RF (2005) Safe method for isolation of prion protein and diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol Methods* **130**(1-2)**:** 133-139

Bencsik AA, Coleman AW, Debeer SO, Perron H, Moussa A (2006) Amplified immunohistochemical detection of PrPsc in animal transmissible spongiform encephalopathies using streptomycin. *J Histochem Cytochem* **54**(8)**:** 849-853

Bencsik AA, Debeer SO, Baron TG (2005) An alternative pretreatment procedure in animal transmissible spongiform encephalopathies diagnosis using PrPsc immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **53**(10)**:** 1199-1202

Bencsik AA, Leclere E, Perron H, Moussa A (2008) New insights into early sequential PrPsc accumulation in scrapie infected mouse brain evidenced by the use of streptomycin sulfate. *Histochem Cell Biol* **129**(5)**:** 643-650

Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M, Kretzschmar H (2000) Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10)**:** 5468-5473

Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, Tuzi NL, Head MW, Ironside JW, Will RG, Manson JC (2006) Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol* **5**(5)**:** 393-398

Boesenberg-Grosse C, Schulz-Schaeffer WJ, Bodemer M, Ciesielczyk B, Meissner B, Krasnianski A, Bartl M, Heinemann U, Varges D, Eigenbrod S, Kretzschmar HA, Green A, Zerr I (2006) Brain-derived proteins in the CSF: do they correlate with brain pathology in CJD? *BMC Neurol* **6:** 35

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**(4579)**:** 1309-1311

Bosque PJ, Ryou C, Telling G, Peretz D, Legname G, DeArmond SJ, Prusiner SB (2002) Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6)**:** 3812-3817

Brandel JP, Peoc'h K, Beaudry P, Welaratne A, Bottos C, Agid Y, Laplanche JL (2001) 14-3-3 protein cerebrospinal fluid detection in human growth hormone-treated Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol* **49**(2)**:** 257-260

Brandel JP, Preece M, Brown P, Croes E, Laplanche JL, Agid Y, Will R, Alperovitch A (2003) Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK. *Lancet* **362**(9378)**:** 128-130

Brown P (2007) Creutzfeldt-Jakob disease: reflections on the risk from blood product therapy. *Haemophilia* **13 Suppl 5:** 33-40

Brown P, Brandel JP, Preece M, Sato T (2006) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: the waning of an era. *Neurology* **67**(3)**:** 389-393

Brown P, Coker-Vann M, Pomeroy K, Franko M, Asher DM, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC (1986) Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by Western blot identification of marker protein in human brain tissue. *N Engl J Med* **314**(9)**:** 547-551

Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I, Fletcher A, Will RG, Pocchiari M, Cashman NR, d'Aignaux JH, Cervenakova L, Fradkin J, Schonberger LB, Collins SJ (2000) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* **55**(8)**:** 1075-1081

Bruce ME (2003) TSE strain variation. *Br Med Bull* **66:** 99-108

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**(6650)**:** 498-501

Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, Haltia M, Hauw JJ, Ironside JW, Jellinger K, et al. (1995) Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* **5**(4)**:** 459-466

Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**(1)**:** 95-130

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**(7)**:** 1339-1347

Buerger K, Otto M, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, DeBernardis J, Kerkman D, Schroder J, Schonknecht P, Cepek L, McCulloch C, Moller HJ, Wiltfang J, Kretzschmar H, Hampel H (2006) Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* **27**(1)**:** 10-15

Burkhard PR, Sanchez JC, Landis T, Hochstrasser DF (2001) CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology* **56**(11)**:** 1528-1533

Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Luhken G, Baron T, Groschup MH (2004) Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117**(1)**:** 27-36

Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, Moleres FJ, Parchi P, Zou WQ, Gambetti P (2006) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain* **129**(Pt 9)**:** 2266-2277

Capellari S, Parchi P, Cortelli P, Avoni P, Casadei GP, Bini C, Baruzzi A, Lugaresi E, Pocchiari M, Gambetti P, Montagna P (2008) Sporadic fatal insomnia in a fatal familial insomnia pedigree. *Neurology* **70**(11)**:** 884-885

Castellani RJ, Colucci M, Xie Z, Zou W, Li C, Parchi P, Capellari S, Pastore M, Rahbar MH, Chen SG, Gambetti P (2004) Sensitivity of 14-3-3 protein test varies in subtypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **63**(3)**:** 436-442

Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C (2008) Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell* **134**(5)**:** 757-768

Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005a) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**(2)**:** 195-206

Castilla J, Saa P, Soto C (2005b) Detection of prions in blood. *Nat Med* **11**(9)**:** 982-985

Caughey B, Baron GS (2006) Prions and their partners in crime. *Nature* **443**(7113)**:** 803-810

Cervia JS, Sowemimo-Coker SO, Ortolano GA, Wilkins K, Schaffer J, Wortham ST (2006) An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfus Med Rev* **20**(3)**:** 190-206

Chang B, Cheng X, Yin S, Pan T, Zhang H, Wong P, Kang SC, Xiao F, Yan H, Li C, Wolfe LL, Miller MW, Wisniewski T, Greene MI, Sy MS (2007) Test for detection of disease-associated prion aggregate in the blood of infected but asymptomatic animals. *Clin Vaccine Immunol* **14**(1)**:** 36-43

Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N (1996) New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* **347**(9009)**:** 1181

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**(6017)**:** 331-333

Cohen D, Kutluay E, Edwards J, Peltier A, Beydoun A (2004) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsy Behav* **5**(5)**:** 792-796

Collie DA, Summers DM, Sellar RJ, Ironside JW, Cooper S, Zeidler M, Knight R, Will RG (2003) Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease with the pulvinar sign: MR imaging findings in 86 neuropathologically confirmed cases. *AJNR Am J Neuroradiol* **24**(8)**:** 1560-1569

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**(6602)**:** 685-690

Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP (2006) Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**(9528)**:** 2068-2074

Collins SJ, Lawson VA, Masters CL (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **363**(9402)**:** 51-61

Collins SJ, Sanchez-Juan P, Masters CL, Klug GM, van Duijn C, Poleggi A, Pocchiari M, Almonti S, Cuadrado-Corrales N, de Pedro-Cuesta J, Budka H, Gelpi E, Glatzel M, Tolnay M, Hewer E, Zerr I, Heinemann U, Kretszchmar HA, Jansen GH, Olsen E, Mitrova E, Alperovitch A, Brandel JP, Mackenzie J, Murray K, Will RG (2006) Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **129**(Pt 9)**:** 2278-2287

Cronier S, Gros N, Tattum MH, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J, Wadsworth JD (2008) Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J*

Curin Serbec V, Bresjanac M, Popovic M, Pretnar Hartman K, Galvani V, Rupreht R, Cernilec M, Vranac T, Hafner I, Jerala R (2004) Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue. *J Biol Chem* **279**(5)**:** 3694-3698

Dagvadorj A, Petersen RB, Lee HS, Cervenakova L, Shatunov A, Budka H, Brown P, Gambetti P, Goldfarb LG (2002) Spontaneous mutations in the prion protein gene causing transmissible spongiform encephalopathy. *Ann Neurol* **52**(3)**:** 355-359

Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S (2007) Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(23)**:** 9741-9746

Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J (1991) CJD discrepancy. *Nature* **353**(6347)**:** 801-802

Dong CF, Huang YX, An R, Chen JM, Wang XF, Shan B, Lei YJ, Han L, Zhang BY, Han J, Dong XP (2007) Sensitive detection of PrPSc by Western blot assay based on streptomycin sulphate precipitation. *Zoonoses Public Health* **54**(8)**:** 328-336

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**(8)**:** 734-746

EFSA. (2005) Scientific Report of the European Food Safety Authority on the Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants. In EFSA (ed.).

EUROCJD/NEUROCJD. Number of cases and current data on CJD cases: http://www.eurocjd.ed.ac.uk/results.htm The European And Allied Countries Collaborative Study Group Of CJD.

Everest DJ, Waterhouse S, Kelly T, Velo-Rego E, Sauer MJ (2007) Effectiveness of capillary electrophoresis fluoroimmunoassay of blood PrpSc for evaluation of scrapie pathogenesis in sheep. *J Vet Diagn Invest* **19**(5)**:** 552-557

Favereaux A, Quadrio I, Vital C, Perret-Liaudet A, Anne O, Laplanche JL, Petry KG, Vital A (2004) Pathologic prion protein spreading in the peripheral nervous system of a patient with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **61**(5)**:** 747-750

Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A (2000) Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* **408**(6811)**:** 479-483

Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40:** 617-647

Furukawa H, Doh-ura K, Okuwaki R, Shirabe S, Yamamoto K, Udono H, Ito T, Katamine S, Niwa M (2004) A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins. *J Biol Chem* **279**(22)**:** 23661-23667

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**(5025)**:** 794-796

Gajdusek DC, Zigas V (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* **257**(20)**:** 974-978

Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ (2008) A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* **63**(6)**:** 697-708

Gertz HJ, Henkes H, Cervos-Navarro J (1988) Creutzfeldt-Jakob disease: correlation of MRI and neuropathologic findings. *Neurology* **38**(9)**:** 1481-1482

Giraud P, Biacabe AG, Chazot G, Later R, Joyeux O, Moene Y, Perret-Liaudet A (2002) Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease during the disease course. *Eur Neurol* **48**(4)**:** 218-221

Gisslen M, Hagberg L, Rosengren L, Brew BJ, Cinque P, Spudich S, Price RW (2007) Defining and evaluating HIV-related neurodegenerative disease and its treatment targets: a combinatorial approach to use of cerebrospinal fluid molecular biomarkers. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**(1)**:** 112-119

Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **349**(19)**:** 1812-1820

Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A (2001) Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**(1)**:** 25-34

Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A (2005) Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* **62**(4)**:** 545-552

Gmitterova K, Heinemann U, Bodemer M, Krasnianski A, Meissner B, Kretzschmar HA, Zerr I (2008) 14-3-3 CSF levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease differ across molecular subtypes. *Neurobiol Aging*

Gofflot S, Deprez M, el Moualij B, Osman A, Thonnart JF, Hougrand O, Heinen E, Zorzi W (2005) Immunoquantitative PCR for prion protein detection in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Chem* **51**(9)**:** 1605-1611

Gofflot S, El MB, Zorzi D, Melen L, Roels S, Quatpers D, Grassi J, Vanopdenbosch E, Heinen E, Zorzi W (2004) Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein. *J Immunoassay Immunochem* **25**(3)**:** 241-258

Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C (2008) Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett*

Goodall CA, Head MW, Everington D, Ironside JW, Knight RS, Green AJ (2006) Raised CSF phospho-tau concentrations in variant Creutzfeldt-Jakob disease: diagnostic and pathological implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**(1)**:** 89-91

Goodbrand IA, Ironside JW, Nicolson D, Bell JE (1995) Prion protein accumulation in the spinal cords of patients with sporadic and growth hormone associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* **183**(1-2)**:** 127-130

Grassi J, Creminon C, Frobert Y, Fretier P, Turbica I, Rezaei H, Hunsmann G, Comoy E, Deslys JP (2000) Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch Virol Suppl*(16)**:** 197-205

Green AJ (2002a) Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**(6)**:** 427-440

Green AJ (2002b) Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biochem Soc Trans* **30**(4)**:** 382-386

Green AJ, Ramljak S, Muller WE, Knight RS, Schroder HC (2002) 14-3-3 in the cerebrospinal fluid of patients with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease measured using capture assay able to detect low levels of 14-3-3 protein. *Neurosci Lett* **324**(1)**:** 57-60

Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, Zeidler M, McKenzie JM, MacLeod MA, Ironside JW, Will RG, Knight RS (2001) Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**(6)**:** 744-748

Green KM, Castilla J, Seward TS, Napier DL, Jewell JE, Soto C, Telling GC (2008) Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog* **4**(8)**:** e1000139

Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG (2008) Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis* **14**(9)**:** 1406-1412

Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, Privat N, Kemeny JL, Perret-Liaudet A, Hauw JJ (2003) The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med* **9**(9)**:** 1121-1123

Haraguchi T, Terada S, Ishizu H, Sakai K, Tanabe Y, Nagai T, Takata H, Nobukuni K, Ihara Y, Kitamoto T, Kuroda S (2008) Coexistence of Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease pathology: An autopsy case showing typical clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*

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

HAS. (2007a) Détection de la protéine 14-3-3 dans le LCR. . Haute Autorité de Santé, Paris, p. 78.

HAS. (2007b) Prise en charge diagnostique des neuropathies périphériques (polyneuropathies et mononeuropathies multiples). Haute Autorité de Santé, Paris, p. 28.

Head MW, Bunn TJ, Bishop MT, McLoughlin V, Lowrie S, McKimmie CS, Williams MC, McCardle L, MacKenzie J, Knight R, Will RG, Ironside JW (2004a) Prion protein heterogeneity in sporadic but not variant Creutzfeldt-Jakob disease: UK cases 1991-2002. *Ann Neurol* **55**(6)**:** 851-859

Head MW, Ritchie D, Smith N, McLoughlin V, Nailon W, Samad S, Masson S, Bishop M, McCardle L, Ironside JW (2004b) Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. *Am J Pathol* **164**(1)**:** 143-153

Head MW, Tissingh G, Uitdehaag BM, Barkhof F, Bunn TJ, Ironside JW, Kamphorst W, Scheltens P (2001) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a young Dutch valine homozygote: atypical molecular phenotype. *Ann Neurol* **50**(2)**:** 258-261

Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Gloeckner SF, Kretzschmar HA, Zerr I (2007) Molecular subtype-specific clinical diagnosis of prion diseases. *Vet Microbiol* **123**(4)**:** 328-335

Herzog C, Riviere J, Lescoutra-Etchegaray N, Charbonnier A, Leblanc V, Sales N, Deslys JP, Lasmezas CI (2005) PrPTSE distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **79**(22)**:** 14339-14345

Herzog C, Sales N, Etchegaray N, Charbonnier A, Freire S, Dormont D, Deslys JP, Lasmezas CI (2004) Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* **363**(9407)**:** 422-428

Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG (2006a) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* **91**(3)**:** 221-230

Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG (2006b) Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components. *Vox Sang* **91**(4)**:** 348

Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J (1999) Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* **353**(9148)**:** 183-189

Hill AF, Collinge J (2003a) Subclinical prion infection. *Trends Microbiol* **11**(12)**:** 578-584

Hill AF, Collinge J (2003b) Subclinical prion infection in humans and animals. *Br Med Bull* **66:** 161-170

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**(6650)**:** 448-450, 526

Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, Ironside JW, Collinge J (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **126**(Pt 6)**:** 1333-1346

Hillier CE, Llewelyn JG, Neal JW, Ironside JW (2001) Creutzfeldt-Jakob disease in a young person with valine homozygosity at codon 129: sporadic or variant? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**(1)**:** 134-135

Hilton DA, Jacob J, Househam L, Tengah C (2007) Complications following sural and peroneal nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **78**(11)**:** 1271-1272

Hilton DA, Sutak J, Smith ME, Penney M, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Head MW, Wiley CA, Ironside JW (2004) Specificity of lymphoreticular accumulation of prion protein for variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Pathol* **57**(3)**:** 300-302

HPA. (2007) Fourth case of variant CJD infection associated with blood transfusion. Health Protection Agency, United Kingdom.

Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG (1996) The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* **335**(13)**:** 924-930

Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H (1984) Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* **160**(1)**:** 310-316

INVS. Nombre de cas certains ou probables de MCJ en France : http://www.invs.sante.fr/publications/mcj/donnees_mcj.html. Institut National de Veille Sanitaire (France).

Ironside JW, McCardle L, Horsburgh A, Lim Z, Head MW (2002) Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS* **110**(1)**:** 79-87

Ironside JW, Ritchie DL, Head MW (2005) Phenotypic variability in human prion diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**(6)**:** 565-579

Ishida C, Okino S, Kitamoto T, Yamada M (2005) Involvement of the peripheral nervous system in human prion diseases including dural graft associated Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**(3)**:** 325-329

Johnson RT (2005) Prion diseases. *Lancet Neurol* **4**(10)**:** 635-642

Jones M, Peden AH, Prowse CV, Groner A, Manson JC, Turner ML, Ironside JW, MacGregor IR, Head MW (2007) In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrPSc. *J Pathol* **213**(1)**:** 21-26

Jones M, Wight D, McLoughlin V, Norrby K, Ironside JW, Connolly JG, Farquhar CF, Macgregor IR, Head MW (2008) An Antibody to the Aggregated Synthetic Prion Protein Peptide (PrP106-126) Selectively Recognizes Disease-Associated Prion Protein (PrP(Sc)) from Human Brain Specimens. *Brain Pathol*

Kariv-Inbal Z, Ben-Hur T, Grigoriadis NC, Engelstein R, Gabizon R (2006) Urine from scrapie-infected hamsters comprises low levels of prion infectivity. *Neurodegener Dis* **3**(3)**:** 123-128

Kimberlin RH (1982) Scrapie agent: prions or virinos? *Nature* **297**(5862)**:** 107-108

Knight R (2006) Creutzfeldt-Jakob disease: a rare cause of dementia in elderly persons. *Clin Infect Dis* **43**(3)**:** 340-346

Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**(6489)**:** 471-474

Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B (1997) Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* **390**(6655)**:** 74-77

Kovacs GG, Head MW, Hegyi I, Bunn TJ, Flicker H, Hainfellner JA, McCardle L, Laszlo L, Jarius C, Ironside JW, Budka H (2002) Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol* **12**(1)**:** 1-11

Kovacs GG, Preusser M, Strohschneider M, Budka H (2005a) Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am J Pathol* **166**(1)**:** 287-294

Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Zerr I, Kretzschmar HA, de Pedro-Cuesta J, Calero-Lara M, Glatzel M, Aguzzi A, Bishop M, Knight R, Belay G, Will R, Mitrova E (2005b) Genetic prion disease: the EUROCJD experience. *Hum Genet* **118**(2)**:** 166-174

Krasnianski A, Kallenberg K, Collie DA, Meissner B, Schulz-Schaeffer WJ, Heinemann U, Varges D, Summers DM, Kretzschmar HA, Talbot T, Will RG, Zerr I (2008) MRI in the classical MM1 and the atypical MV2 subtypes of sporadic CJD: an inter-observer agreement study. *Eur J Neurol* **15**(8)**:** 762-771

Kropp S, Schulz-Schaeffer WJ, Finkenstaedt M, Riedemann C, Windl O, Steinhoff BJ, Zerr I, Kretzschmar HA, Poser S (1999) The Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **56**(1)**:** 55-61

Kuczius T, Brinkmann B, Grassi J (2007) Immunoreactivity enhancement with chelators for increasing the detection sensitivity of human PrPSc by Western blotting. *Neurochem Int* **50**(1)**:** 102-108

Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Poser S, Kretzschmar H, Rietveld I, Mitrova E, Cuesta Jde P, Martinez-Martin P, Glatzel M, Aguzzi A, Knight R, Ward H, Pocchiari M, van Duijn CM, Will RG, Zerr I (2005) Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* **64**(9)**:** 1586-1591

Lane A, Stanley CJ, Dealler S, Wilson SM (2003) Polymeric Ligands with Specificity for Aggregated Prion Proteins. *Clin Chem* **49**(10)**:** 1774-1775

Lasmezas CI, Comoy E, Hawkins S, Herzog C, Mouthon F, Konold T, Auvre F, Correia E, Lescoutra-Etchegaray N, Sales N, Wells G, Brown P, Deslys JP (2005) Risk of oral infection with bovine spongiform encephalopathy agent in primates. *Lancet* **365**(9461)**:** 781-783

Lasmezas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marce D, Lamoury F, Kopp N, Hauw JJ, Ironside J, Bruce M, Dormont D, Deslys JP (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-- Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7)**:** 4142-4147

Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF (2005) Prion protein glycosylation. *J Neurochem* **93**(4)**:** 793-801

Lawson VA, Priola SA, Meade-White K, Lawson M, Chesebro B (2004) Flexible N-terminal region of prion protein influences conformation of protease-resistant prion protein isoforms associated with cross-species scrapie infection in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **279**(14)**:** 13689-13695

Leclere E, Moussa A, Chouaf-Lakhdar L, Coleman AW, Seigneurin JM, Perron H, Bencsik A (2008) Prion early kinetics revisited using a streptomycin-based PrP(res) extraction method. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(3)**:** 429-433

Lee CC, Kuo LT, Wang CH, Scaravilli F, An SF (2005a) Accumulation of prion protein in the peripheral nervous system in human prion diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(8)**:** 716-721

Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, Gilligan KJ, Rubenstein R, Fournel M, Petteway SR, Jr. (2000) Monitoring plasma processing steps with a sensitive Western blot assay for the detection of the prion protein. *J Virol Methods* **84**(1)**:** 77-89

Lee IS, Long JR, Prusiner SB, Safar JG (2005b) Selective precipitation of prions by polyoxometalate complexes. *J Am Chem Soc* **127**(40)**:** 13802-13803

Lezmi S, Bencsik A, Baron T (2006) PET-blot analysis contributes to BSE strain recognition in C57Bl/6 mice. *J Histochem Cytochem* **54**(10)**:** 1087-1094

Ligios C, Cancedda GM, Margalith I, Santucciu C, Madau L, Maestrale C, Basagni M, Saba M, Heikenwalder M (2007) Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS ONE* **2**(9)**:** e859

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* **88**(2)**:** 673-728

Linke S, Goertz P, Baader SL, Gieselmann V, Siebler M, Junghans U, Kappler J (2006) Aldolase C/zebrin II is released to the extracellular space after stroke and inhibits the network activity of cortical neurons. *Neurochem Res* **31**(11)**:** 1297-1303

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**(9407)**:** 417-421

Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15)**:** 8334-8339

Madec JY, Groschup MH, Buschmann A, Belli P, Calavas D, Baron T (1998) Sensitivity of the Western blot detection of prion protein PrPres in natural sheep scrapie. *J Virol Methods* **75**(2)**:** 169-177

Manuelidis L, Yu ZX, Barquero N, Mullins B (2007) Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6)**:** 1965-1970

Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* **512**(1-3)**:** 25-28

Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**(5796)**:** 133-136

McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75**(19)**:** 9320-9327

Mead S (2006) Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet* **14**(3)**:** 273-281

Mead S, Joiner S, Desbruslais M, Beck JA, O'Donoghue M, Lantos P, Wadsworth JD, Collinge J (2007) Creutzfeldt-Jakob disease, prion protein gene codon 129VV, and a novel PrPSc type in a young British woman. *Arch Neurol* **64**(12)**:** 1780-1784

Mehta LR, Huddleston BJ, Skalabrin EJ, Burns JB, Zou WQ, Gambetti P, Chin SS (2008) Sporadic fatal insomnia masquerading as a paraneoplastic cerebellar syndrome. *Arch Neurol* **65**(7)**:** 971-973

Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**(1)**:** 63-74

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

Minor P, Newham J, Jones N, Bergeron C, Gregori L, Asher D, van Engelenburg F, Stroebel T, Vey M, Barnard G, Head M (2004) Standards for the assay of Creutzfeldt-Jakob disease specimens. *J Gen Virol* **85**(Pt 6)**:** 1777-1784

Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E (2003) Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* **2**(3)**:** 167-176

Morel N, Simon S, Frobert Y, Volland H, Mourton-Gilles C, Negro A, Sorgato MC, Creminon C, Grassi J (2004) Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by nonspecific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *J Biol Chem* **279**(29)**:** 30143-30149

Moussa A, Coleman AW, Bencsik A, Leclere E, Perret F, Martin A, Perron H (2006) Use of streptomycin for precipitation and detection of proteinase K resistant prion protein (PrPsc) in biological samples. *Chem Commun (Camb)*(9)**:** 973-975

Mulcahy ER, Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA (2004) Prion infection of skeletal muscle cells and papillae in the tongue. *J Virol* **78**(13)**:** 6792-6798

Mulet M (2007) Evaluation du test commercial TeSeETM sheep/goat Western-Blot des Laboratoires Bio-Rad dans la perspective du développement d'un test diagnostique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob du vivant du patient. Essais préliminaires, faisabilité et pistes d'amélioration. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Thesis, Faculté de Pharmacie ISPB, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon

NCJDSU. CJD statistics. http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm. The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (United Kingdom).

Neufeld MY, Talianski-Aronov A, Soffer D, Korczyn AD (2003) Generalized convulsive status epilepticus in Creutzfeldt-Jakob disease. *Seizure* **12**(6)**:** 403-405

Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Nakamura Y, Mizusawa H, Yamada M (2007) Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology* **69**(4)**:** 360-367

Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, Cartoni C, Ingrosso L, Boyle A, Galeno R, Sbriccoli M, Lipp HP, Bruce M, Pocchiari M, Agrimi U (2006) Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* **2**(2)**:** e12

Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P (2004) Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by

protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* **279**(16)**:** 16797-16804

Notari S, Capellari S, Langeveld J, Giese A, Strammiello R, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P (2007) A refined method for molecular typing reveals that co-occurrence of PrP(Sc) types in Creutzfeldt-Jakob disease is not the rule. *Lab Invest* **87**(11)**:** 1103-1112

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**(4)**:** 735-746

Otto M, Lewczuk P, Wiltfang J (2008) Neurochemical approaches of cerebrospinal fluid diagnostics in neurodegenerative diseases. *Methods* **44**(4)**:** 289-298

Otto M, Stein H, Szudra A, Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Poser S, Kretzschmar HA, Mader M, Weber T (1997) S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* **244**(9)**:** 566-570

Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, Poser S (2002) Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **58**(2)**:** 192-197

Owen JP, Maddison BC, Whitelam GC, Gough KC (2007) Use of thermolysin in the diagnosis of prion diseases. *Mol Biotechnol* **35**(2)**:** 161-170

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23)**:** 10962-10966

Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou WQ, Estey LA, Lamontagne J, Lehto MT, Kondejewski LH, Francoeur GP, Papadopoulos M, Haghighat A, Spatz SJ, Head M, Will R, Ironside J, O'Rourke K, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabartty A, Cashman NR (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med* **9**(7)**:** 893-899

Parchi P, Capellari S, Chin S, Schwarz HB, Schecter NP, Butts JD, Hudkins P, Burns DK, Powers JM, Gambetti P (1999a) A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* **52**(9)**:** 1757-1763

Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **39**(6)**:** 767-778

Parchi P, Castellani R, Cortelli P, Montagna P, Chen SG, Petersen RB, Manetto V, Vnencak-Jones CL, McLean MJ, Sheller JR, et al. (1995) Regional distribution of protease-resistant prion protein in fatal familial insomnia. *Ann Neurol* **38**(1)**:** 21-29

Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P,

Kretzschmar H (1999b) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* **46**(2)**:** 224-233

Parchi P, Notari S, Weber P, Schimmel H, Budka H, Ferrer I, Haik S, Hauw JJ, Head MW, Ironside JW, Limido L, Rodriguez A, Strobel T, Tagliavini F, Kretzschmar HA (2008) Inter-Laboratory Assessment of PrP(Sc) Typing in Creutzfeldt-Jakob Disease: A Western Blot Study within the NeuroPrion Consortium. *Brain Pathol*

Pastrana MA, Sajnani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C, Requena JR (2006) Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction. *Biochemistry* **45**(51)**:** 15710-15717

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**(9433)**:** 527-529

Peden AH, Ritchie DL, Head MW, Ironside JW (2006) Detection and localization of PrPSc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* **168**(3)**:** 927-935

Peoc'h K, Schroder HC, Laplanche J, Ramljak S, Muller WE (2001) Determination of 14-3-3 protein levels in cerebrospinal fluid from Creutzfeldt-Jakob patients by a highly sensitive capture assay. *Neurosci Lett* **301**(3)**:** 167-170

Perron H, Dupin M, Cecillon S, Jolivet M, Kopp N, Chazot G, Vighetto A, Moussa A, Coleman AW, Perret-Liaudet A (2005) A Novel Immunoassay For The Detection Of Resistant Prion Protein (PrPres) In Human Plasma. In *Prion 2005 - Between fundamentals and society's need*. Düsseldorf Germany

Picard-Hagen N, Gayrard V, Viguie C, Moudjou M, Imbs C, Toutain PL (2006) Prion protein in the cerebrospinal fluid of healthy and naturally scrapie-affected sheep. *J Gen Virol* **87**(Pt 12)**:** 3723-3727

Piening N, Weber P, Giese A, Kretzschmar H (2005) Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(2)**:** 339-343

Polymenidou M, Stoeck K, Glatzel M, Vey M, Bellon A, Aguzzi A (2005) Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol* **4**(12)**:** 805-814

Priola SA, Chabry J, Chan K (2001) Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155. *J Virol* **75**(10)**:** 4673-4680

Priola SA, Lawson VA (2001) Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J* **20**(23)**:** 6692-6699

Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**(4542)**:** 136-144

Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23)**:** 13363-13383

Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11)**:** 6675-6679

Puoti G, Giaccone G, Rossi G, Canciani B, Bugiani O, Tagliavini F (1999) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: co-occurrence of different types of PrP(Sc) in the same brain. *Neurology* **53**(9)**:** 2173-2176

Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Vanderstichele H, Otto M, Wiltfang J, Kretzschmar H, Vanmechelen E, Forstl H, Kurz A (2003) Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol Psychiatry* **8**(3)**:** 343-347

Ritchie DL, Head MW, Ironside JW (2004) Advances in the detection of prion protein in peripheral tissues of variant Creutzfeldt-Jakob disease patients using paraffin-embedded tissue blotting. *Neuropathol Appl Neurobiol* **30**(4)**:** 360-368

Saa P, Castilla J, Soto C (2006) Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* **313**(5783)**:** 92-94

Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**(6839)**:** 810-813

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* **4**(10)**:** 1157-1165

Safar JG, Lessard P, Tamguney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F, Dearmond SJ, Prusiner SB (2008) Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis* **198**(1)**:** 81-89

Safar JG, M.D G, Letessier F, Kuo A, Pomeroy K, Deering C, Serban A, Groth D, Miller B, DeArmond SJ, Prusiner SB (2007) Prions in Plasma of Patients with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. In *Prion 2007*. Edinburgh Scotland UK

Safar JG, Wille H, Geschwind MD, Deering C, Latawiec D, Serban A, King DJ, Legname G, Weisgraber KH, Mahley RW, Miller BL, Dearmond SJ, Prusiner SB (2006) Human prions and plasma lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30)**:** 11312-11317

Sanchez-Juan P, Green A, Ladogana A, Cuadrado-Corrales N, Saanchez-Valle R, Mitrovaa E, Stoeck K, Sklaviadis T, Kulczycki J, Hess K, Bodemer M, Slivarichova D, Saiz A, Calero M, Ingrosso L, Knight R, Janssens AC, van Duijn CM, Zerr I (2006) CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **67**(4)**:** 637-643

Sanchez-Juan P, Sanchez-Valle R, Green A, Ladogana A, Cuadrado-Corrales N, Mitrova E, Stoeck K, Sklaviadis T, Kulczycki J, Hess K, Krasnianski A, Equestre M, Slivarichova D, Saiz A, Calero M, Pocchiari M, Knight R, van Duijn CM, Zerr I (2007) Influence of timing on CSF tests value for Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis. *J Neurol* **254**(7)**:** 901-906

Sano T, Smith CL, Cantor CR (1992) Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* **258**(5079)**:** 120-122

Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Eguchi K, Satoh A, Tsujihata M, Niwa M, Katamine S, Kurihara S, Matsuo H (2006) 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell Mol Neurobiol* **26**(1)**:** 45-52

Sayer NM, Cubin M, Rhie A, Bullock M, Tahiri-Alaoui A, James W (2004) Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers. *J Biol Chem* **279**(13)**:** 13102-13109

Schmerr MJ, Jenny AL, Bulgin MS, Miller JM, Hamir AN, Cutlip RC, Goodwin KR (1999) Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy. *J Chromatogr A* **853**(1-2)**:** 207-214

Schoch G, Seeger H, Bogousslavsky J, Tolnay M, Janzer RC, Aguzzi A, Glatzel M (2006) Analysis of prion strains by PrPSc profiling in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Med* **3**(2)**:** e14

Schroter A, Zerr I, Henkel K, Tschampa HJ, Finkenstaedt M, Poser S (2000) Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **57**(12)**:** 1751-1757

Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000) The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* **156**(1)**:** 51-56

Scott MR, Peretz D, Nguyen HO, Dearmond SJ, Prusiner SB (2005) Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol* **79**(9)**:** 5259-5271

Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Seifert B, Miele G, Aguzzi A (2005) Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310**(5746)**:** 324-326

Serban A, Legname G, Hansen K, Kovaleva N, Prusiner SB (2004) Immunoglobulins in urine of hamsters with scrapie. *J Biol Chem* **279**(47)**:** 48817-48820

Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R (2001) A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* **276**(34)**:** 31479-31482

Shiga Y, Miyazawa K, Sato S, Fukushima R, Shibuya S, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Mugikura S, Tamura H, Higano S, Takahashi S, Itoyama Y (2004) Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **63**(3)**:** 443-449

Skinningsrud A, Stenset V, Gundersen AS, Fladby T (2008) Cerebrospinal fluid markers in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebrospinal Fluid Res* **5:** 14

Soto C, Anderes L, Suardi S, Cardone F, Castilla J, Frossard MJ, Peano S, Saa P, Limido L, Carbonatto M, Ironside J, Torres JM, Pocchiari M, Tagliavini F (2005) Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett* **579**(3)**:** 638-642

Spencer MD, Knight RS, Will RG (2002) First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ* **324**(7352)**:** 1479-1482

Steinhoff BJ, Racker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I, Kretzschmar H, Weber T (1996) Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **53**(2)**:** 162-166

Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, Schulz-Schaeffer W, Poser S, Kretzschmar HA (2004) Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **56**(5)**:** 702-708

Supattapone S (2004) Prion protein conversion in vitro. *J Mol Med* **82**(6)**:** 348-356

Tabaton M, Monaco S, Cordone MP, Colucci M, Giaccone G, Tagliavini F, Zanusso G (2004) Prion deposition in olfactory biopsy of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **55**(2)**:** 294-296

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**(5295)**:** 2079-2082

Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, Sidle KC, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21)**:** 9936-9940

Thompson RJ, Kynoch PA, Willson VJ (1982) Cellular localization of aldolase C subunits in human brain. *Brain Res* **232**(2)**:** 489-493

Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Kratzel C, Mai J, Beekes M (2004) Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest* **113**(10)**:** 1465-1472

Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Wrede A, Wemheuer W, Brenig B, Kratzel C, Lemmer K, Beekes M (2007) Accumulation of pathological prion protein PrPSc in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog* **3**(5)**:** e66

Toni M, Massimino ML, Griffoni C, Salvato B, Tomasi V, Spisni E (2005) Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrPC) expression and metabolism in neuronal cells. *FEBS Lett* **579**(3)**:** 741-744

Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, Shaked G, Gabizon R, Taraboulos A (2002) Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* **41**(42)**:** 12868-12875

Uro-Coste E, Cassard H, Simon S, Lugan S, Bilheude JM, Perret-Liaudet A, Ironside JW, Haik S, Basset-Leobon C, Lacroux C, Peoch K, Streichenberger N, Langeveld J, Head MW, Grassi J, Hauw JJ, Schelcher F, Delisle MB, Andreoletti O (2008) Beyond PrP res type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog* **4**(3)**:** e1000029

Van Everbroeck B, Boons J, Cras P (2005a) Cerebrospinal fluid biomarkers in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurol Neurosurg* **107**(5)**:** 355-360

Van Everbroeck B, Pals P, Martin JJ, Cras P (1999) Antigen retrieval in prion protein immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **47**(11)**:** 1465-1470

Van Everbroeck B, Quoilin S, Boons J, Martin JJ, Cras P (2003) A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**(9)**:** 1210-1214

Van Everbroeck BR, Boons J, Cras P (2005b) 14-3-3 {gamma}-isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**(1)**:** 100-102

Vital C, Vallat JM, Vital A (2008) Nerve biopsy is still very useful: a personal view. *J Peripher Nerv Syst* **13**(1)**:** 103-104

Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, Welch J, Stone L, Lloyd SE, Hill AF, Brandner S, Collinge J (2004) Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science* **306**(5702)**:** 1793-1796

Wadsworth JD, Collinge J (2007) Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6)**:** 598-609

Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J (1999) Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol* **1**(1)**:** 55-59

Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**(9277)**:** 171-180

Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1772**(6)**:** 654-672

WHO. (1998) Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human Transmissible Spongiform Encephalopathies : Report of a WHO consultation. In WHO (ed.), *WHO_EMC_ZDI_98.9*. World Health Organization, Geneva, p. 32.

WHO. (2003) WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies, including variant Creutzfeldt-Jakob disease. World Health Organization, Geneva, Switzerland p. 90.

Wieser HG, Schindler K, Zumsteg D (2006) EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurophysiol* **117**(5)**:** 935-951

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**(9006)**:** 921-925

Wiltfang J, Otto M, Baxter HC, Bodemer M, Steinacker P, Bahn E, Zerr I, Kornhuber J, Kretzschmar HA, Poser S, Ruther E, Aitken A (1999) Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurochem* **73**(6)**:** 2485-2490

Wong BS, Green AJ, Li R, Xie Z, Pan T, Liu T, Chen SG, Gambetti P, Sy MS (2001) Absence of protease-resistant prion protein in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* **194**(1)**:** 9-14

Yull HM, Ritchie DL, Langeveld JP, van Zijderveld FG, Bruce ME, Ironside JW, Head MW (2006) Detection of type 1 prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* **168**(1)**:** 151-157

Zanusso G, Farinazzo A, Fiorini M, Gelati M, Castagna A, Righetti PG, Rizzuto N, Monaco S (2001) pH-dependent prion protein conformation in classical Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* **276**(44)**:** 40377-40380

Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, Farinazzo A, Gardiman M, Cavallaro T, Bentivoglio M, Righetti PG, Pocchiari M, Rizzuto N, Monaco S (2003) Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **348**(8)**:** 711-719

Zeidler M, Sellar RJ, Collie DA, Knight R, Stewart G, Macleod MA, Ironside JW, Cousens S, Colchester AC, Hadley DM, Will RG (2000) The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **355**(9213)**:** 1412-1418

Zerr I, Bodemer M, Racker S, Grosche S, Poser S, Kretzschmar HA, Weber T (1995) Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **345**(8965)**:** 1609-1610

Zerr I, Poser S (2002) Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* **110**(1)**:** 88-98

Zou S, Fang CT, Schonberger LB (2008) Transfusion transmission of human prion diseases. *Transfus Med Rev* **22**(1)**:** 58-69

RESUME

Le diagnostic biologique des maladies à prions du vivant du patient repose sur la recherche de protéine 14.3.3 dans le liquide céphalo-rachidien. Le dosage conjoint de la néoptérine permet d'améliorer nettement sa spécificité. Cependant, les performances analytiques ne sont pas suffisantes pour établir un diagnostic de certitude. Dans la quête d'un marqueur supposé plus spécifique, nous avons recherché la protéine prion pathologique résistante à la protéinase K (PrPres) dans le nerf péronier. Malgré l'optimisation de notre méthode, nous ne l'avons détecté que dans un cas sur trois. Cela nous a conduit à utiliser et valider la streptomycine comme ligand exogène pour concentrer la PrPres. Nous avons démontré sa capacité à concentrer la PrPres d'origine cérébrale et amygdalienne; sa sensibilité analytique s'avère être équivalente, pour une faible quantité de tissu initiale (5 mg), à celle de l'acide phosphotungstique. Par ailleurs, nous avons pu correctement classer, à partir d'un nombre significatif d'échantillons cérébraux, les patients EST des patients non atteints d'une EST avec une sensibilité et une spécificité de 100 %. Ainsi, nous disposons d'un outil susceptible d'augmenter la sensibilité des techniques initialement utilisées pour détecter la PrPres dans des nerfs facilement accessibles par biopsie.

TITLE

Technological improvement for early diagnosis in prion diseases

ABSTRACT

Prion diseases are characterised by the accumulation of an abnormal isoform of the prion protein (PrPsc) in different tissues. Biological diagnosis is based on the determination of the protein 14.3.3 in cerebro-spinal fluid (CSF). On the same samples, adding the determination of neopterin increases the specificity of the protein 14.3.3. Nevertheless, analytical characteristics of the protein 14.3.3 determination are not sufficient to ascertain the diagnosis during life-time. We then proposed to assess the presence of the direct marker, the PrPsc resistant to proteinase K (PrPres), in peroneal nerves. The weak sensitivity of the technique developed (1 positive sample about 3) encouraged us to use and validate an external ligand, streptomycin, in order to concentrate the PrPsc. We demonstrated the ability of the streptomycin to act as a precipitating agent for PrPsc on brain and tonsil samples. The analytical sensitivity was comparable to this obtain after phosphotungstic acid precipitation with small quantity of initial tissue (5 mg). Moreover, using a significant number of brain samples, patients with TSE were accurately classified from those without TSE with sensitivity and specificity to 100 %. We then propose to test this protocol on nerves samples biopsies.

DISCIPLINE

Neurosciences médicales

MOTS-CLES

Protéine 14.3.3, Creutzfeldt-Jakob, Streptomycine, Néoptérine, Western Blot, Prions

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

Laboratoire de Neurobiologie
Hospices Civils de Lyon
59 boulevard Pinel
69677 Bron Cedex

Laboratoire des Biomatériaux
Faculté de Pharmacie de Lyon
8 avenue Rockefeller
69373 Lyon

Maladies Neurologiques
BioMérieux SA
Chemin de l'Orme
69290 Marcy l'Etoile