



**HAL**  
open science

# Physiopathologie des formes infectieuses de maladies à prions humaines : étude des formes iatrogènes secondaires à un traitement par l'hormone de croissance

Laurène Peckeu

## ► To cite this version:

Laurène Peckeu. Physiopathologie des formes infectieuses de maladies à prions humaines : étude des formes iatrogènes secondaires à un traitement par l'hormone de croissance. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066583 . tel-01919102

**HAL Id: tel-01919102**

**<https://theses.hal.science/tel-01919102>**

Submitted on 12 Nov 2018

**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.

Université Pierre et Marie Curie

ED 394

Physiologie, physiopathologie et thérapeutique (P2T)

*Institut du Cerveau et de la Moelle épinière – INSERM U1127*

*Équipe « Maladie d'Alzheimer, maladies à prions »*

**Physiopathologie des formes infectieuses de maladies à prions**

**humaines :**

**étude des formes iatrogènes secondaires à un traitement par**

**l'hormone de croissance**

Par Laurène PECKEU

Thèse de doctorat en Sciences

Dirigée par Stéphane HAIK

Présentée et soutenue publiquement le 04 Décembre 2017

Devant un jury composé de :

M. Pierre AUCOUTURIER	PU-PH	UPMC	Examineur
M. Jean-Philippe DESLYS	DR	CEA	Rapporteur
M. Alexis ELBAZ	DR	INSERM	Rapporteur
M. Thierry BILLETTE DE VILLEMEUR	PU-PH	UPMC	Examineur
M <sup>me</sup> Dominique COSTAGLIOLA	DR	INSERM	Co-directeur
M. Jean-Philippe BRANDEL	PH	APHP	Co-directeur
M. Stéphane HAIK	DR	INSERM	Directeur



# Remerciements

Voilà, la rédaction de ce manuscrit touche à sa fin. Enfin ... pas tout à fait ... Il me reste encore « quelques » pages à rédiger et relire. Cette belle aventure de THESE se termine et disons que je n'y crois toujours pas, plutôt pas encore.

Les premières personnes que je souhaite remercier sont les membres de mon jury, votre présence à tous est un immense honneur. Merci au Pr Pierre Aucouturier d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie également le Dr Jean-Philippe Deslys et le Dr Alexis Elbaz, en leurs qualités de rapporteurs, d'avoir consacré de leur temps à la relecture, l'évaluation et la critique de ce manuscrit. J'adresse mes remerciements au Pr Thierry Billette de Villemeur qui a si aimablement accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur.

Ce travail de thèse est le fruit d'un mélange de deux disciplines ; les Prions (oui, c'est une discipline à part entière) et l'Epidémiologie. Je tiens à remercier particulièrement pour son engagement dans cette thèse, M<sup>me</sup> Dominique Costagliola. Votre connaissance scientifique et votre rigueur méthodologique m'ont permis de mener à bien mes travaux. Je vous suis reconnaissante de m'avoir permis d'évoluer dans le domaine de l'épidémiologie.

Pour la partie prionologique, mes plus grands remerciements vont bien sûr à mon directeur de thèse, Stéphane Haïk. Merci de m'avoir permis d'effectuer ce parcours (du combattant) au sein de votre laboratoire, je sors grandie de cette riche expérience et c'est à vous que je le dois. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Jean-Philippe Brandel, qui a également contribué à l'aboutissement de ce travail. Jean-Philippe, je vous suis extrêmement reconnaissante pour vos conseils, votre soutien et votre implication dans cette thèse. Merci à tous les deux pour le temps que vous avez pris à relire, corriger et écouter mes questionnements, je sais que quelques dimanches ont été dédiés à ce travail. Merci aussi pour les après-midi « écriture à 6 mains » lors de la rédaction de nos articles qui furent de grands moments d'échange scientifique mais aussi de (fous) rires. Je n'oublierai jamais ce côté agréable de la rédaction.

Je remercie mes collègues de l'équipe de recherche sur les maladies à prions. Nous ne partageons pas les mêmes locaux mais les déjeuners de retour de L3 le mardi furent des moments d'échange d'expérience. Le L3, je ne croyais pas qu'en temps qu'épidémiologiste j'aurai l'opportunité de retourner à la biologie fondamentale, c'est pour ça j'adresse un grand MERCI à Audrey et Serfi pour leur implication, leur aide, leur soutien et le management de la partie souris. Merci d'avoir pris le temps de m'enseigner les techniques de laboratoire et de l'expérimentation animale. Ce qui se passe au L3 reste au L3 (pour raison de sécurité), je ne m'étendrai donc pas sur nos diverses aventures souristiques.

Un grand, grand, grand, grand merci aux membres de la cellule nationale de référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob et maladies apparentées, localisée dans les bâtiments des folles (pour une équipe essentiellement féminine travaillant sur une pathologie neurodégénérative on ne peut pas faire mieux !). Merci d'avoir partagé mon quotidien, pendant ces 2+3 années (2 en tant qu'épidémiologiste du réseau et 3 années de thèse), nos pauses dej et thés furent le théâtre de conversations diverses et variées des plus sérieuses aux plus légères. Merci donc pour ces moments de décompression et de votre soutien tout au long de ces années. Un merci particulier à Manon sur qui j'ai pu compter pour répondre à mes diverses interrogations sur « l'histoire GH » et à Marlyse pour son aide avec le réseau mais également pour m'avoir permis de rédiger une partie de cette thèse dans le calme de la campagne.

Mon quotidien et « quelques » soirées ont été joyeusement occupés à l'ICM grâce aux Ajités. Je vous remercie particulièrement pour l'organisation des happy hour, certains devineront pourquoi. Une mention spéciale pour Morwena qui est sur tous les fronts, toujours là pour un conseil scientifique, administratif et personnel. Merci aussi à Camille pour m'avoir apporté un brin de folie durant ces années, tu es en pleine rédaction de ta propre thèse, courage (nul doute que tu en as) ça vaut le coup.

Je souhaite remercier spécialement Alizée pour notre complicité durant ces années. Cela a commencé autour des cours de salsa et de « quelques » virées nocturnes pour évoluer vers des discussions, échanges et débats que j'apprécie toujours autant. Tu m'as permis aussi de connaître des gens extraordinaires, je pense à Marwa, Auréliane et Antoine, merci à cette petite bande pour les échanges plus ou moins sérieux, les moments passés ensemble et nos envies de refaire le monde.

Une grande pensée plus qu'affectueuse à ma Jo. Je ne sais pas comment t'exprimer mes remerciements, ma joie de partager de précieux moments avec toi et de se raconter mutuellement nos expériences. Merci pour tout ce qui nous attache depuis toutes ces années.

شكراً كثيراً

to Sami's family. A big THANK YOU for all the kindness and goodwill that you give me every time.

A mes parents sans qui de toute évidence je ne serais pas. Vous avez toujours cru en moi même lorsque je doutais de moi-même, vous avez toujours été convaincu de mes capacités à réaliser mes projets. Il m'est difficile de résumer en quelques mots tout ce que vous m'avez apporté de mes premiers pas à aujourd'hui : amour, joie, bonheur, soutien et encouragements, et je m'arrête là pour les mots mais mes pensées vont bien au-delà.

A mon papi et ma mamie qui ne seront pas témoins de ce chemin parcouru mais qui sans aucun doute en auraient été très fiers.

Et voilà il n'y a plus que toi à remercier,

سامي حبيبي ما كنت لوحدي في هذا المشوار  
ما بعرف لوين راح نروح السنه الجاي، بس أنا راح ضلني معك

Et merci à la souris verte, aux bisounours et « petits bois » quand c'était la fin des haricots.

## Publications

Brandel, J-P., L. Peckeu, and S. Haik (2013). "The French surveillance network of Creutzfeldt–Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide." *Transfusion clinique et biologique* 20.4: 395-397.

Haïk, Stéphane, et al. (2014). "Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *The Lancet Neurology* 13.2: 150-158.

L. Peckeu, H. Noël, V. Vaillant, S. Haik, J-P. Brandel (2013). "La surveillance des encéphalopathies subaigües spongiformes transmissibles (ESST) en France, données 2009-2010". *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 1 :17-24.

Peckeu, Laurene, et al. "Accuracy of diagnosis criteria in patients with suspected diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and detection of 14-3-3 protein, France, 1992 to 2009" (2017). *Eurosurveillance* 22.41: 16-00715.

## Communications affichées

Peckeu, Laurene, et al. "Iatrogenic CJD after human GH treatment in France: effect of sex, dose and genetics on the susceptibility of a possible infection by a V2 sCJD strain." (2016). *PRION*. Vol. 10. 530 WALNUT STREET, STE 850, PHILADELPHIA, PA 19106 USA: TAYLOR & FRANCIS INC.

Peckeu, Laurene, et al. "Iatrogenic CJD after human GH treatment in France" (2017). *PRION* 2017.

## Communications orales

Peckeu, Laurene, et al. "Maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène après traitement par hormone de croissance extractive : relation génotype-phénotype" (2015). 4<sup>ème</sup> journée d'actualité sur les maladies à prions et autres protéinopathies.

Peckeu, Laurene, et al. "Iatrogenic CJD after human GH treatment in France" (2017). *PRION* 2017.

# Liste des abréviations

ACTH	Hormone adrénocorticotrope
A $\beta$	Peptide bêta amyloïde
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CDI	Conformation-dependent immunoassay
CWD	Chronic wasting disease
EEG	Electroencéphalogramme
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
ESV	Encéphalopathie spongiforme du vison
ESST	Encéphalopathie subaiguë spongiforme transmissible
EuroCJD	European CJD surveillance network
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GFAP	Protéine glio-fibrillaire acide
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
HHS	Human and Health Services
hGH	Hormone de croissance d'origine humaine
hGN	Gonadotrophine pituitaire d'origine humaine
IFF	Insomnie fatale familiale
IGAS	Inspection générale des affaires sociales
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MCJ post-hGH	Maladies de Creutzfeldt-Jakob iatrogène secondaire au traitement par l'hormone de croissance extractive d'origine humaine
MRC	Medical Research Council
NHPP	National Hormone and Pituitary Program
PCH	Pharmacie centrale des hôpitaux de l'Assistance Publique de Paris
PK	Protéinase K
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification
<i>PRNP</i>	Gène codant la protéine prion humaine
PrP	Protéine prion



Souris PrP <sup>0/0</sup>	Souris dont le gène de la PrP a été invalidé
PrP <sup>c</sup>	Protéine prion cellulaire
PrP <sup>res</sup>	Fragment de la protéine prion résistant à la protéinase K
PrP <sup>sc</sup>	Protéine prion pathologique (« scrapie »)
PrP*	Monomère partiellement déplié de PrP
QuIC	Quaking induced conversion
RT-QuIC	Real time QuIC
SGGS	Syndrome de Gertsmann-Sträussler-Scheinker
sMCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TSH	Thyréostimuline
URIA	Unité de radio-immunologie
UI	Unités internationales
vMCJ	Variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob

# Sommaire

Introduction.....	1
I. La protéine prion : PrP.....	1
A. La protéine prion cellulaire.....	1
a) Expression génétique.....	1
b) Structure spatiale.....	2
c) Cycle cellulaire.....	4
d) Expression cellulaire.....	5
e) Fonctions physiologiques.....	6
1. Souris knock out.....	6
2. Activité apoptotique.....	7
3. Stress oxydant.....	7
4. Rôle de la PrP <sup>c</sup> dans la synapse.....	8
5. Signalisation et neuritogenèse.....	9
B. La protéine prion pathogène.....	10
a) Structure et propriétés biochimiques.....	10
b) Réplication et conversion.....	12
1. Modèle de nucléation-polymérisation.....	13
2. Modèle auto-catalytique.....	13
C. Souches de prions.....	14
a) Concept.....	14
b) Tropisme de souche.....	18
c) Barrière d'espèce.....	20
d) « Traceback phenonenon ».....	22
II. Les Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles (ESST).....	24
A. Les ESST animales.....	24
a) La tremblante naturelle des petits ruminants (ou scrapie).....	24
b) L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB).....	26
c) Les autres ESST animales.....	28
1. La maladie du dépérissement chronique des cervidés (Chronic Wasting Disease).....	28
2. L'encéphalopathie du vison.....	29
3. L'encéphalopathie spongiforme féline.....	29
B. Les ESST humaines.....	29
a) La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique.....	30
1. Epidémiologie.....	30
2. Clinique.....	33
3. Neuropathologie.....	35
4. Aspect moléculaire.....	36
5. Influence de la génétique.....	37
b) Les ESST génétiques.....	38
1. Les maladies de Creutzfeldt-Jakob génétiques.....	39
2. Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.....	40
3. L'insomnie fatale familiale.....	41
c) Les ESST acquises.....	42
1. Le Kuru.....	42
2. La variante de la MCJ.....	45
3. Les maladies de Creutzfeldt-Jakob iatrogènes.....	50
d) Techniques de détection de la PrP.....	56
1. Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA).....	56
2. Quaking-Induced Conversion (QuIC) et Real Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC).....	56

III. L'hormone de croissance .....	57
A. Aspects historiques.....	57
B. Synthèse et mode d'action.....	58
C. Indication thérapeutique .....	59
a) Déficit isolé et idiopathique en hormone de croissance .....	59
b) Panhypopituitarisme .....	60
c) L'irradiation crânienne .....	60
d) Le syndrome de Turner .....	60
e) Le syndrome de Down ou trisomie 21.....	61
f) La petite taille idiopathique (« idiopathic short stature » ISS).....	61
g) L'insuffisance rénale chronique .....	62
h) Le craniopharyngiome.....	62
i) L'hypoglycémie néonatale .....	62
D. Méthode de purification .....	62
a) Extraction de la GH par Li et Evans.....	62
b) Préparation Wilhelmi .....	63
c) Préparation Raben.....	63
d) Préparation Lowry .....	64
E. Une contamination mondiale.....	66
a) La cohorte américaine .....	67
1. Organisation du système.....	67
2. Epidémiologie.....	68
b) La cohorte britannique.....	69
1. Organisation du système.....	69
2. Epidémiologie.....	71
c) L'organisation du système français .....	72
1. Le prélèvement et la collecte des hypophyses .....	73
2. Extraction de l'hormone de croissance.....	75
3. Conditionnement et distribution du produit final .....	77
4. Facteurs ayant probablement contribué à augmenter le risque de contamination.....	78
Objectifs généraux .....	81
Résultats.....	83
I. Article 1: Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France .....	84
A. Introduction.....	84
B. Résultats .....	86
C. Discussion.....	105
D. Perspectives.....	108
II. Article 2: Factors influencing the incubation of Creutzfeldt-Jakob disease after growth hormone treatment.....	109
A. Introduction.....	109
B. Résultats .....	110
Le format de l'article (short communication) a limité le nombre de figure et données pouvant être incluses. Ainsi, la représentation graphique des distributions observées et estimées par notre modèle de Weibull n'a pas pu être intégrée ainsi que le test d'adéquation des données au modèle. Ces résultats complémentaires sont présentés ci-dessous. ....	121
C. Discussion.....	121
D. Perspectives.....	123
III. Article 3: Iatrogenic CJD after growth hormone treatment in France: similarities and differences with the British epidemic.....	124
A. Introduction.....	124
B. Résultats .....	125
C. Discussion.....	142
IV. Inoculation des cas représentatifs à la souris transgénique sur-exprimant la PrP humaine ...	145
A. Introduction.....	145

B. Matériel et méthode.....	146
a) Sélection des patients.....	146
b) Inoculation des animaux.....	147
1. Anesthésie et expérimentation animale .....	147
2. Autopsie.....	148
3. Récupération des organes .....	148
4. Broyat d'organes infectés .....	148
C. Résultats .....	148
Discussion générale et perspectives.....	149
Annexe .....	156
Bibliographie.....	175

# Introduction

Les Encéphalopathies Subaigües Spongiformes Transmissibles (ESST) ou maladies à prions sont des affections neurodégénératives se développant aussi bien chez l'homme que l'animal et ayant, la particularité d'être transmissibles naturellement ou expérimentalement. Elles se caractérisent également par leur rareté, leur phase d'incubation longue et asymptomatique, leur évolution fatale sans rémission, l'absence de réaction inflammatoire ou immunitaire détectable et par un tableau neuropathologique associant perte neuronale, spongiose et gliose astrocytaire (Prusiner 1982).

Ces pathologies ont été décrites chez l'animal au Royaume-Uni dès 1732, avec la tremblante du mouton (ou scrapie). Chez l'homme, c'est en 1920, que les premières observations « d'encéphalomyélopathie disséminée » sont faites par Creutzfeldt puis par Jakob, l'année suivante (Creutzfeldt 1920, Jakob 1921).

En 1936, Cuillé et Chelle, deux vétérinaires français prouvent la transmissibilité de la tremblante à partir d'un broyat de cerveau par inoculation intracérébrale à un animal sain et rapportent que les propriétés de l'agent ressemblaient à celles d'un virus (Cuillé and Chelle 1936, Cuillé 1936).

Les travaux de Prusiner, en 1982, sur les propriétés physicochimiques et biologiques de l'agent responsable de la scrapie vont apporter un nouvel éclairage. L'extrême résistance de l'agent aux procédures standards d'inactivation, une taille estimée bien plus petite que tous les agents pathogènes connus jusque-là et l'absence d'acide nucléique spécifique détectable suggèrent que l'agent de la scrapie est une nouvelle entité infectieuse. Stanley Prusiner propose alors le terme prion pour « proteinaceous infectious particle » et formule l'hypothèse que l'agent serait de nature exclusivement protéique et constitué d'agrégats d'une forme anormale d'une protéine de l'hôte, la PrP (Prusiner 1982).

## I. La protéine prion : PrP

### A. La protéine prion cellulaire

#### a) Expression génétique

Le gène codant la PrP a été localisé et séquencé par Weismann et ses collaborateurs en 1985 (Oesch, Westaway et al. 1985). Il est nommé *PRNP* chez l'homme, *Prnp* chez la souris, et gène PrP pour les autres espèces animales (Chesebro, Race et al. 1985, Kretzschmar, Stowring et al. 1986). Ce gène, très conservé au cours de l'évolution, a été identifié chez tous les mammifères et quelques autres espèces animales (oiseaux, amphibiens et poissons)

(Rongyan, Xianglong et al. 2008). Selon l'espèce considérée, il se localise sur différents chromosomes ; le chromosome 20 chez l'homme, le chromosome 13 chez les ovins et bovins et le chromosome 2 chez la souris. C'est un gène cellulaire composé d'un promoteur, de deux ou trois exons dont l'un est beaucoup plus long que les autres, d'un ou deux introns séparant le (ou les) exon(s) plus petit(s) de l'exon principal.

L'exon principal contient l'ensemble de la phase ouverte de lecture. La longueur de cette partie codante représente 85% de la longueur totale de l'ARN. Cette séquence est très conservée, surtout chez les mammifères, et est constituée de 759 à 768 nucléotides (Basler, Oesch et al. 1986). Le fait que la séquence codante soit inscrite en totalité dans un seul exon élimine toute possibilité d'épissage alternatif lors de la synthèse de la protéine.

La transcription du gène de la PrP conduit à un ARNm de 2,5kb qui est ensuite traduit pour donner naissance à la protéine prion cellulaire (PrP<sup>c</sup>).

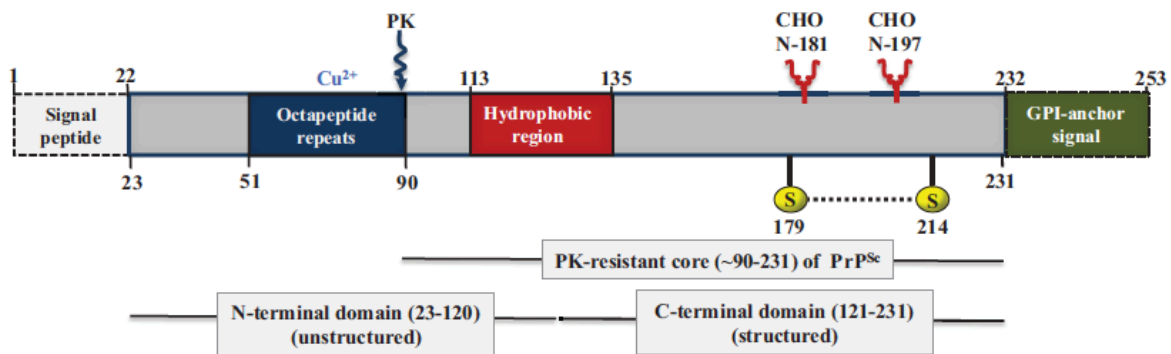
### b) Structure spatiale

La protéine prion humaine est formée initialement de 253 acides aminés. Lors de la maturation de la protéine un peptide signal de 22 acides aminés (localisé à l'extrémité N-terminale) et une séquence de 22 acides aminés de l'extrémité C-terminale vont être éliminés. Cette suppression à l'extrémité C-terminale, permet l'ajout de l'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ainsi la PrP<sup>c</sup> mature (résidu 23 à 231) contient 209 acides aminés (Figure 1) répartis sur deux domaines principaux : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. Le domaine N-terminal de la PrP humaine s'étend du résidu 23 au résidu 120 et est relativement peu structuré et non conformé dans l'eau, le domaine C-terminal présente une organisation plus complexe (Aronoff-Spencer, Burns et al. 2000).

- Le domaine N-terminal : ce domaine contient un motif correspondant à une répétition de 5 séquences d'octapeptides (PHGGGWGQ) se situant entre les résidus 51 et 90 (Acevedo-Morantes and Wille 2014). Ce motif, très pourvu en histidine, est reconnu pour son affinité de liaison aux ions cuivre (Cu<sup>2+</sup>). Il a été également suggéré que ce domaine pouvait interagir avec les ions zinc (Zn<sup>2+</sup>) (Schmitt-Ulms, Ehsani et al. 2009). Ce motif est clivé lors de la digestion partielle de la PrP<sup>sc</sup> par la protéinase K (PK). Le domaine transmembranaire de la PrP se situe du résidu 113 au résidu 135. Il contient une séquence palindromique (acide aminés 113 à 120) riche en alanine et glycine (AGAAAAGA), lui attribuant son caractère hydrophobe. Des études récentes ont montré que la délétion du palindrome prévient la conversion de la PrP en sa forme

pathogène (Holscher, Delius et al. 1998, Norstrom and Mastrianni 2005). La mutation A117V est responsable d'une forme génétique de maladie à prions (syndrome de Gerstmann Staussler Scheinker) (Hegde, Mastrianni et al. 1998).

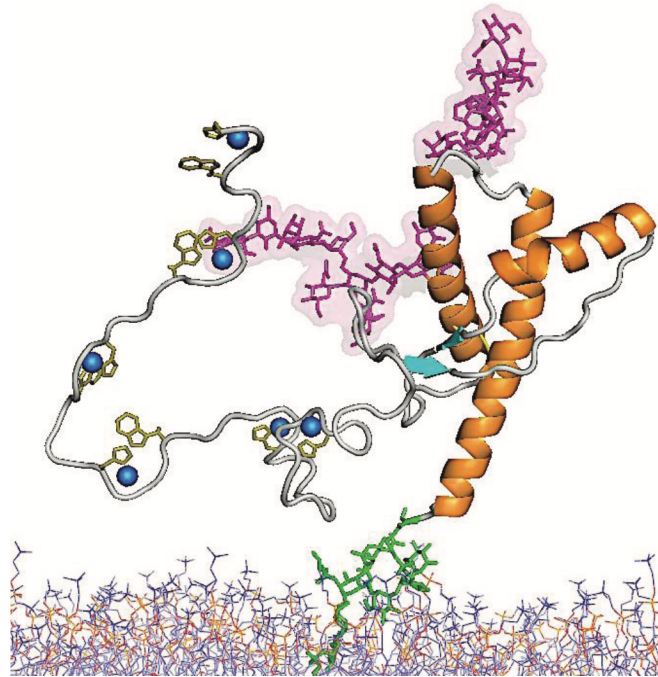
- Le domaine C-terminal de la PrP s'étend de l'acide aminé 121 à 231. C'est à l'intérieur de ce domaine globulaire que sont contenus les 3 hélices  $\alpha$  (résidus 144-154, 173-194 et 200-228) et les deux feuillets  $\beta$  antiparallèles (résidus 128-131 et 161-164) (Zahn, Liu et al. 2000). La protéine possède un pont disulfure entre les deux cystéines 179 et 214, reliant les hélices  $\alpha$  2 et 3 et permettant une stabilité de la structure protéique. Elle présente deux sites de glycolysation en position asparagine 181 et asparagine 197, permettant la fixation (non constante) de chaînes oligosaccharidiques. L'existence de ces deux sites donne à la protéine la possibilité d'avoir trois glycoformes (diglycosylée, monoglycosylée et non glycosylée).



**Figure 1 : Représentation schématique de la protéine prion humaine.**

(Acevedo-Morantes and Wille 2014)





**Figure 2 : Structure tertiaire de la PrP<sup>c</sup>.**

Les deux chaînes oligosaccharidiques en position Asn 181 et Asn 197 apparaissent en rose sur le schéma. L'ancre GPI C-terminale est en vert ancrée à la membrane cellulaire. Les ions cuivre en bleu sur le schéma sont liés aux séquences d'octapeptides en partie N-terminale (Acevedo-Morantes and Wille 2014).

### c) Cycle cellulaire

La PrP<sup>c</sup> est une sialoglycoprotéine et sa voie de biosynthèse est similaire aux autres protéines membranaires. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE), puis subit ses modifications post-traductionnelles (clivage du peptide signal N-terminal, addition des chaînes oligosaccharides liées en N-terminal sur deux sites, formation du pont disulfure, clivage en C-terminal du peptide hydrophobe puis attachement de l'ancre GPI) à la fois dans le RE et l'appareil de Golgi. Elle atteint ensuite la surface membranaire (Harris 2003). Après leur exposition à la face externe de la membrane plasmique, les molécules de PrP<sup>c</sup> sont ensuite internalisées par endocytose. La majorité de ces molécules est redéployée intacte à la membrane cellulaire. Un faible pourcentage va être clivé par protéolyse au niveau du résidu 110. Les produits du clivage sont relargués dans le milieu extracellulaire. La PrP a une demi-vie de 3 à 6 heures et suit la voie de dégradation classique des protéines excrétées dans le compartiment lysosomal (Taraboulos, Raeber et al. 1992).

La PrP peut exister sous 3 formes topologiques différentes : la forme ancrée dans les radeaux lipidiques de la membrane (« raft ») via un groupe GPI (PrP<sup>c</sup>), et deux entités transmembranaires (C<sup>tm</sup>PrP et N<sup>tm</sup>PrP), qui traversent la membrane cytoplasmique dans des directions opposées. Ces deux formes sont produites dans de faibles proportions (< 10 %) au cours du métabolisme de la PrP<sup>c</sup> dans le RE (Hegde, Mastrianni et al. 1998). La surexpression de la forme C<sup>tm</sup>PrP est à l'origine d'une neurodégénérescence sévère chez la souris et dans le syndrome de Gerstmann Straussler Scheinker la mutation A117V induirait une augmentation de la synthèse et l'accumulation de C<sup>tm</sup>PrP (Hegde, Tremblay et al. 1999, Zanusso, Petersen et al. 1999). La N<sup>tm</sup>PrP semble ne pas avoir de rôle pathogène.

#### d) Expression cellulaire

La PrP<sup>c</sup> est une protéine ubiquitaire majoritairement exprimée dans les neurones (Bendheim, Brown et al. 1992). Le niveau d'expression de l'ARNm ne semble pas modifié par l'infection (Oesch, Westaway et al. 1985). Cependant, une étude récente suggère une baisse de la concentration de PrP<sup>c</sup> lors de l'infection d'autant plus marquée que l'incubation est longue (Mays, Kim et al. 2014).

La régulation de l'expression du gène de la PrP a été étudiée par McKinley et al (1987) au cours du développement cérébral d'hamsters syriens (McKinley, Hay et al. 1987). Un faible niveau d'ARNm a été trouvé dans les 10 premiers jours suivant la naissance, atteignant un maximum entre 10 jours et 20 jours puis restant constant tout au long de la vie. Ces changements sont corrélés aux changements morphologiques (différenciation neuronale, synaptogenèse et myélinisation) observés au cours du développement cérébral des mammifères.

Par hybridation in situ, Brown et al ont pu démontrer une expression du gène *Prnp* à la fois dans les neurones et les cellules non neuronales de la souris (cellules épendymaires, cellules microgliales, épithélium du plexus choroïde, astrocytes, péricytes, cellules endothéliales et méninges) (Brown, Goller et al. 1990). Les analyses immunohistochimiques de Bendheim et al ont précisé la localisation de la protéine. Elle prédomine dans les neurones, au niveau du neuropile de l'hippocampe, des noyaux caudés du thalamus et des racines dorsales des ganglions (Bendheim, Brown et al. 1992). Un niveau élevé d'expression de la PrP<sup>c</sup> est détecté dans les neurones de l'hippocampe notamment dans les champs CA1, CA3 et CA4 et le gyrus denté. Le fornix, le thalamus et le tronc cérébral expriment la PrP<sup>c</sup> à un niveau moins élevé. Dans le cervelet, les cellules de la couche granulaire expriment peu la

PrP<sup>c</sup> contrairement à la couche moléculaire (Barmada, Piccardo et al. 2004). Parmi les différents types de neurones, ce sont les neurones GABAergiques qui expriment le plus fortement la PrP<sup>c</sup> (Ford, Burton et al. 2002).

Au niveau périphérique, le cœur, l'épithélium bronchique, l'estomac, les intestins, la rate, les testicules et les ovaires expriment tous la PrP<sup>c</sup>. Elle est également présente dans les cellules du système lymphoïde et du système nerveux périphérique. Enfin pour les tissus extra-embryonnaires, les transcrits ont été localisés dans les cellules maternelles du placenta, le tissu amniotique et le cordon ombilical (Manson, West et al. 1992).

## e) Fonctions physiologiques

### 1. *Souris knock out*

Afin de déterminer les rôles physiologiques de la PrP<sup>c</sup>, la première stratégie a été la construction de modèles murins transgéniques « knock out » dont le gène *Prnp* a été invalidé (*Prnp*<sup>0/0</sup>). Deux lignées de souris ont été développées : Zürich I et Edinburgh I (Bueler, Fischer et al. 1992, Manson, Clarke et al. 1994). Il n'a pas été décelé d'anomalie pathologique chez ces souris qui sont résistantes à l'infection par le prion et ne montrent pas d'anomalie pathologique évidente (Bueler, Aguzzi et al. 1993). Cependant les souris de la lignée Edinburgh I présentaient des perturbations du cycle circadien et des déficits cognitifs concernant l'apprentissage spatial et la mémoire (Tobler, Gaus et al. 1996, Criado, Sanchez-Alavez et al. 2005). En outre, dans les deux lignées, il était observé des altérations de la fonction synaptique, notamment un affaiblissement de l'inhibition rapide induite par les récepteurs GABA (impliqués dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire à long terme) et une sensibilité augmentée au stress oxydatif (Collinge, Whittington et al. 1994, Herms, Kretschmar et al. 1995, Brown, Nicholas et al. 2002). A la suite de ces travaux, trois autres lignées ont été développées : Nagasaki I, Rcm0 et Zürich II. En comparaison aux souris de la première génération, ces souris développaient une ataxie progressive avec perte de cellules de Purkinje dans le cervelet (Sakaguchi, Katamine et al. 1996, Katamine, Nishida et al. 1998). L'interprétation de ces résultats était que la PrP<sup>c</sup> jouait un rôle dans la survie des cellules de Purkinje. Cependant, dans cette lignée murine, il a été découvert qu'une modification de l'expression du gène *Prnd* codant pour la protéine Doppel était responsable du phénotype observé (Moore, Lee et al. 1999, Watts and Westaway 2007).

Les fonctions des domaines central et N terminal de la protéine ont été également étudiées au moyen de divers mutants transgéniques ce qui a permis d'identifier les rôles

primordiaux de ces domaines dans la survie des individus puisque la délétion ou la surexpression de portions de PrP<sup>c</sup> aboutit au développement d'une ataxie létale et de pathologies de la substance blanche et de la myéline (Shmerling, Hegyi et al. 1998, Radovanovic, Braun et al. 2005).

## 2. *Activité apoptotique*

Des expériences utilisant des neurones en culture suggèrent que la PrP<sup>c</sup> exercerait une activité cytoprotectrice, plus particulièrement contre les stress internes et environnementaux qui initient l'apoptose (Roucou, Gains et al. 2004, Roucou and LeBlanc 2005). L'un des exemples les plus marquants de cette activité a été la mise en évidence de l'activité protectrice de la PrP<sup>c</sup> contre l'apoptose induite par Bax, protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 sur des cultures de neurones fœtaux humains. L'injection de plasmides codant pour Bax dans des neurones fœtaux en culture induisait l'apoptose de 90% de la culture, tandis que dans la culture co-injectée par des plasmides codant pour Bax et pour la PrP<sup>c</sup>, le pourcentage de cellules apoptotiques était réduit à 10% (Bounhar, Zhang et al. 2001, Roucou, Guo et al. 2003). Ces données sont également appuyées par les expériences de culture de neurones provenant de souris « knock out ». Dans ces cellules, l'expression de la PrP<sup>c</sup> est capable de restaurer la résistance à l'apoptose (Kim, Lee et al. 2004). La fonction anti-apoptotique de la PrP<sup>c</sup> est aussi suggérée par l'interaction directe avec la protéine STI-1 (stress-inducible protein-1), qui exerce une activité neuroprotectrice en activant la protéine kinase (PKA). En revanche, d'autres études contredisent l'hypothèse du rôle anti-apoptotique de la PrP<sup>c</sup>, par exemple ; la réponse apoptotique à un traitement par la staurosporine de cellules embryonnaires et de neurones en culture primaire est régulée positivement par l'expression de la PrP<sup>c</sup> (Paitel, Sunyach et al. 2004).

## 3. *Stress oxydant*

L'implication du stress oxydatif chronique est une hypothèse fréquemment énoncée pour expliquer la pathogénèse des affections neurodégénératives. Un rôle protecteur de la PrP<sup>c</sup> contre ce stress oxydatif a été mis en évidence par des expériences de cultures primaires de neurones issus de souris invalidées pour le gène de la PrP et de lignées sauvages. En effet, les neurones issus des souris *Prnp*<sup>0/0</sup> sont plus susceptibles aux traitements par des agents induisant le stress oxydatif (Brown, Schulz-Schaeffer et al. 1997, Brown, Nicholas et al. 2002). En accord avec ces résultats, le tissu cérébral des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> révèle

des changements biochimiques indiquant un stress oxydatif (concentration élevée en protéines carbonylées et produits de peroxydation des lipides) (Wong, Liu et al. 2001). De plus, les lésions cérébrales induites par l'hypoxie et l'ischémie induisant probablement la mort neuronale via un stress oxydatif sont plus sévères chez les souris mutées *Prnp*<sup>0/0</sup> (McLennan, Brennan et al. 2004, Sakurai-Yamashita, Sakaguchi et al. 2005, Spudich, Frigg et al. 2005).

Par la capacité de sa région octapeptidique à lier les ions cuivre, la PrP<sup>c</sup> pourrait induire l'activation de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme dépendante du cuivre et responsable de la détoxification des espèces réactives oxygénées (ROS) induisant le stress oxydatif (Hornshaw, McDermott et al. 1995, Brown, Qin et al. 1997). Une seconde hypothèse serait que la PrP<sup>c</sup> posséderait une activité intrinsèque de SOD (Brown, Wong et al. 1999). Une troisième possibilité serait que la PrP<sup>c</sup> en liant les ions cuivre empêcherait ces derniers de catalyser la formation des ROS. Finalement, la PrP<sup>c</sup> pourrait agir en aval de la formation des ROS et de la mise en place du stress oxydatif. Dans certains cas, le stress oxydatif peut activer les voies apoptotiques et les effets anti-apoptotiques décrits antérieurement pourraient être responsable du rôle cytoprotecteur de la PrP<sup>c</sup> (Halliwell 2006).

#### 4. Rôle de la PrP<sup>c</sup> dans la synapse

Plusieurs résultats suggèrent que la PrP<sup>c</sup> pourrait jouer un rôle dans la structure, fonction et le maintien de la synapse. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les dysfonctionnements synaptiques sont une des caractéristiques majeures de maladies à prions (Jeffrey, Halliday et al. 2000). Des études de localisation de la PrP<sup>c</sup> fusionnée avec la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) indiquent que la PrP<sup>c</sup> est préférentiellement concentrée le long des axones et au niveau des terminaisons pré-synaptiques (Moya, Sales et al. 2000, Laine, Marc et al. 2001, Ford, Burton et al. 2002, Sales, Hassig et al. 2002, Mironov, Latawiec et al. 2003, Barmada, Piccardo et al. 2004). De plus, la PrP<sup>c</sup> subit un transport axonal antérograde et rétrograde (Borchelt, Koliatsos et al. 1994, Moya, Hassig et al. 2004) et le complexe PrP<sup>c</sup>-GFP fusionné serait transporté dans les vésicules synaptiques. Dans les expériences de culture primaire de neurones hippocampiques, la PrP recombinante induit la formation rapide des axones et dendrites et augmente le nombre de contacts synaptiques, suggérant que la PrP<sup>c</sup> aurait un rôle de régulateur dans la formation des synapses (Kanaani, Prusiner et al. 2005). Les enregistrements électrophysiologiques de coupes de cerveaux de souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> sont concordants avec le rôle de la PrP<sup>c</sup> dans la transmission synaptique. Ainsi en absence de PrP<sup>c</sup>, la potentialisation à long terme est altérée et l'inhibition

rapide impliquant les récepteurs GABA A est diminuée (Collinge, Whittington et al. 1994, Manson, Hope et al. 1995). Des études plus récentes démontrent une corrélation positive entre le niveau d'expression de la PrP<sup>c</sup> et l'intensité de la transmission glutamatergique au niveau des neurones de l'hippocampe qui serait liée au recrutement plus efficace des fibres pré-synaptiques (Carleton, Tremblay et al. 2001). Cet effet résulterait du recrutement plus efficace des fibres pré-synaptiques lorsque la concentration de la PrP<sup>c</sup> est augmentée.

D'autres anomalies neurobiologiques en relation avec la fonction et la formation synaptique ont été rapportées chez les animaux *Prnp*<sup>0/0</sup>, telles des altérations dans l'organisation des fibres nerveuses, des troubles du rythme circadiens et des déficiences dans l'apprentissage du processus spatial (Tobler, Gaus et al. 1996, Colling, Khana et al. 1997, Criado, Sanchez-Alavez et al. 2005).

### 5. Signalisation et neuritogenèse

La PrP<sup>c</sup> est une glycoprotéine ancrée à la membrane plasmique par un groupement GPI au niveau des radeaux lipidiques, où se concentre également un grand nombre de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire. Cette localisation suggère pour la PrP<sup>c</sup> une fonction de récepteur et/ou de transmission des signaux à travers le cytoplasme et, de fait, plusieurs études ont montré le couplage fonctionnel de la PrP<sup>c</sup> à des voies de signalisation intracellulaire. La chaîne polypeptidique de la PrP<sup>c</sup> est entièrement extracellulaire, ce qui suppose que la PrP<sup>c</sup> interagit probablement avec une protéine transmembranaire. Parmi les partenaires identifiés de la PrP<sup>c</sup> figurent plusieurs récepteurs transmembranaires impliqués dans l'adhérence cellulaire : la molécule d'adhérence neuronale NCAM (neural cell adhesion molecule), le précurseur et différentes isoformes du récepteur non-intégrine de la laminine LPR/LR (laminin receptor precursor/laminin receptor (Rieger, Edenhofer et al. 1997, Schmitt-Ulms, Legname et al. 2001, Simoneau, Haik et al. 2003). Il est également intéressant de noter que l'interaction directe de la PrP<sup>c</sup> avec la laminine s'est révélée essentielle à la formation de neurites. Inversement, l'inactivation de la PrP<sup>c</sup> dans la lignée PC12 entraîne une inhibition de la différenciation cellulaire dépendante de la laminine et une rétraction des neurites (Graner, Mercadante et al. 2000). D'autres études montrent que l'interaction de la PrP<sup>c</sup> avec NCAM serait aussi impliquée dans la neuritogenèse. Cette réponse implique le recrutement de NCAM pour la PrP<sup>c</sup> au niveau des radeaux lipidiques et l'activation de la protéine kinase Fyn (Mouillet-Richard, Ermonval et al. 2000, Santuccione, Sytnyk et al. 2005). STI-1 est un partenaire de la PrP<sup>c</sup> responsable d'une activité

neuroprotectrice, via l'activation de la PKA, et d'un rôle de la PrP<sup>c</sup> dans la croissance de neurites via l'activation de ERK (Lopes, Hajj et al. 2005).

## B. La protéine prion pathogène

### a) Structure et propriétés biochimiques

Un seul et unique gène code la PrP<sup>c</sup> et la protéine prion pathogène (PrP<sup>sc</sup>). La séquence primaire de la PrP<sup>sc</sup> est par conséquent identique à celle de la PrP<sup>c</sup> (Stahl, Baldwin et al. 1993). Les expériences de purification des deux isoformes ont révélé, cependant, des propriétés biochimiques différentes. La plus remarquable est la résistance de la PrP<sup>sc</sup> aux protéases. En Western Blot, la protéine apparaît sous la forme de trois bandes caractéristiques, qui correspondent à ses différentes glycoformes (non, mono et di-glucosylée). Après digestion par la PK, une partie des acides aminés de la région N-terminale de la PrP<sup>sc</sup> est clivée (au niveau de l'acide aminé 90), générant un fragment de poids moléculaire de 27 à 30 kDA (PrP 27-30 ou PrP<sup>res</sup>) alors que la totalité de la PrP<sup>c</sup> est digérée (McKinley, Meyer et al. 1991). Cette résistance partielle semble liée à la capacité que possède la PrP<sup>res</sup> à s'agréger, à se polymériser et former des structures fibrillaires (prions rods) visible en microscopie électronique. Après traitement au rouge Congo, ces bâtonnets insolubles sont biréfringents en lumière polarisée ce qui est caractéristique des plaques amyloïdes (Prusiner, McKinley et al. 1983). Des structures similaires, baptisées SAF pour « scrapie associated fibrils » ont été détectées dans le cerveau des animaux infectés (Merz, Somerville et al. 1981). A noter également que dans le cerveau de patients atteints de Kuru et de maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), les dépôts de PrP peuvent être détectés sous forme de dépôts diffus, fibres amyloïdes, plaques condensées ou florides.

La résistance de la PrP<sup>res</sup> à la chaleur, aux radiations et aux détergents sont d'autres caractéristiques qui opposent les deux conformères. Seuls les solvants organiques et les fortes températures sont capables d'inactiver la protéine prion pathologique (Tableau 1).

	<b>PrP<sup>c</sup></b>	<b>PrP<sup>sc</sup></b>
<b>Infectiosité</b>	-	+
<b>Résistance PK</b>	-	+
<b>Solubilité dans les détergents</b>	+	-
<b>Digestion PIPLC</b>	+	-
<b>Structure II</b>		
Hélice $\alpha$	<b>43 %</b>	<b>30 %</b>
Feuillet $\beta$	<b>3 %</b>	<b>43 %</b>
<b>Structure III</b>		
Hélice $\alpha$	<b>4</b>	<b>2</b>
Feuillet $\beta$	<b>2</b>	<b>4</b>
Temps de demi-synthèse	<b>&lt; 1 h</b>	<b>15 h</b>
Temps de demi-vie	<b>3-6 h</b>	<b>&gt; 24 h</b>

**Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la PrP<sup>c</sup> versus la PrP<sup>sc</sup>.**

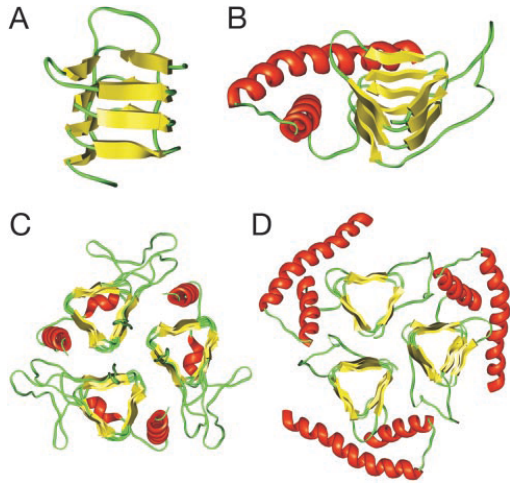
(Prusiner 2001)

Les particularités physico-chimiques de la PrP<sup>sc</sup> ont été attribuées à la structure spatiale secondaire et tertiaire de la molécule. Les premières données identifiant les différences structurales proviennent de l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et dichroïsme circulaire. La structure secondaire de la PrP<sup>sc</sup> est majoritairement constituée de feuillets  $\beta$  puisqu'elle possède 30% d'hélices  $\alpha$  et 43% de feuillets  $\beta$  tandis que la PrP<sup>c</sup> comprend 42% d'hélices  $\alpha$  et 3% seulement de feuillets  $\beta$  (Bazan, Fletterick et al. 1987, Nguyen, Inouye et al. 1995).

L'analyse de la structure tridimensionnelle de la PrP<sup>sc</sup> par la spectroscopie par RMN ou diffraction des rayons X est rendue impossible du fait de son insolubilité dans les détergents. Une nouvelle approche a été développée par Wille et al. 2002, fondée sur l'analyse par microscopie électronique de cristaux à deux dimensions de PrP<sup>sc</sup>. Grâce à l'empilement de ces structures, en microscopie électronique, il est possible de reconstruire des images de l'unité répétitive avec une assez haute résolution (Wille, Michelitsch et al. 2002). Les monomères de PrP<sup>sc</sup> sembleraient posséder deux hélices  $\alpha$  correspondant aux hélices 2 et 3 de la PrP<sup>c</sup> et, un feuillet  $\beta$  à la place des 2 feuillets  $\beta$  (Riesner 2003). Les monomères pourraient s'assembler en unité de 3 à 6 molécules via les feuillets  $\beta$ , formant le cœur de la structure, les arbres de glycosylation se situant en périphérie (Figure 3 et 4). L'empilement de

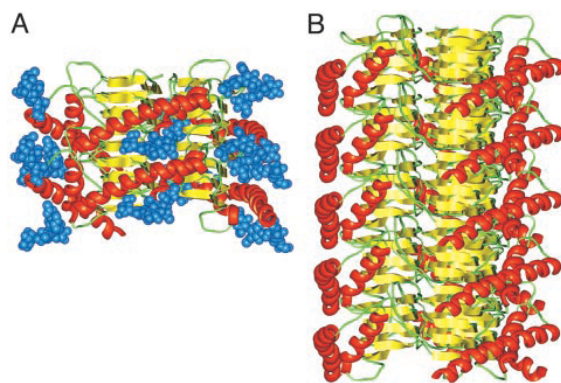


ces trimères formerait des fibrilles enroulées en hélice gauche. L'assemblage de ces fibrilles pourrait conduire à la formation des fibres amyloïdes (Govaerts, Wille et al. 2004).



**Figure 3 : Représentation des monomères de PrP<sup>sc</sup> (A et B) et de leur assemblage en trimères (C et D).**

(Govaerts, Wille et al. 2004)



**Figure 4 : Modèle de l'assemblage fibrillaire construit sur l'assemblage de trimères.**

(Govaerts, Wille et al. 2004)

### b) Réplication et conversion

La réplication des prions est initiée lorsque la PrP<sup>sc</sup> interagit avec la PrP<sup>c</sup>, catalysant ainsi sa conversion en forme pathologique. Le mécanisme précis de cette transconformation n'est pas complètement identifié mais deux modèles théoriques ont été proposés :

- Le modèle de nucléation-polymérisation

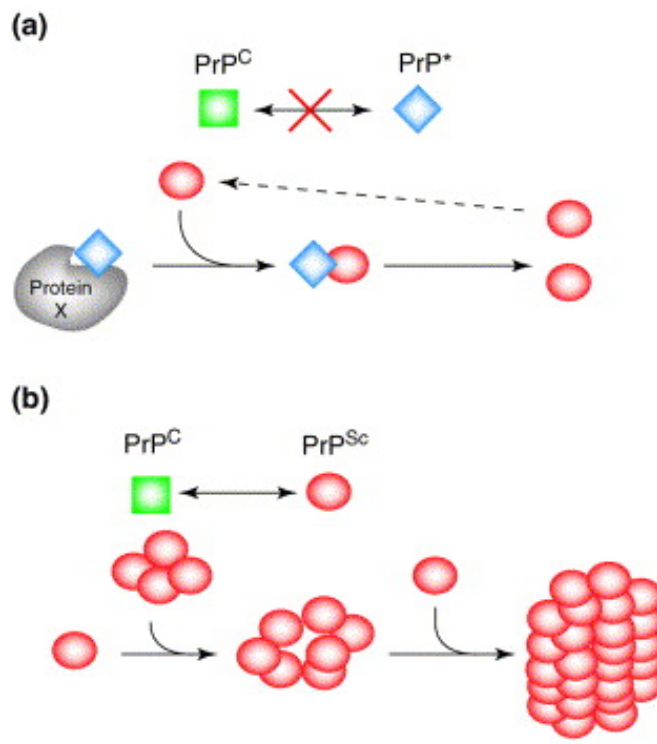
- Le modèle auto-catalytique

### **1. Modèle de nucléation-polymérisation**

Dans ce modèle, la transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> monomérique serait réversible, la PrP<sup>sc</sup> étant moins stable que la PrP<sup>c</sup> (Figure 5b). L'agrégation de la PrP<sup>sc</sup> permet sa stabilisation. La PrP<sup>sc</sup> oligomérique permettrait le recrutement des monomères de PrP<sup>c</sup> et catalyserait leurs conversions en forme pathogène par incorporation au polymère de PrP<sup>sc</sup>. Quand l'agrégat de PrP<sup>sc</sup> atteint une masse critique, il se dissocie en plusieurs fractions. Cette fragmentation permet de générer de nouveaux noyaux de PrP<sup>sc</sup> capables de recruter et convertir d'autres molécules de PrP<sup>c</sup> (amplification) (Soto 2011). L'étape de nucléation limiterait la conversion spontanée de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>. C'est cette conversion spontanée qui serait à l'origine des cas sporadiques de la maladie. Dans les formes infectieuses, cette étape serait franchie par l'apport de noyaux de PrP<sup>sc</sup>. Dans les formes génétiques, les mutations de la PrP pourraient accroître l'affinité de la PrP pour le polymère en élongation (Sheila 1997).

### **2. Modèle auto-catalytique**

Le modèle auto-catalytique ou « template-directed refolding » fait intervenir un intermédiaire amorçant la réaction de conversion de la PrP<sup>c</sup> en de PrP<sup>sc</sup> (Cohen, Pan et al. 1994) (Figure 5a). Les fluctuations stochastiques lors de la formation de PrP<sup>c</sup> génèreraient de façon réversible un monomère partiellement déplié appelé PrP\*. L'association de la PrP<sup>c</sup> à des facteurs cellulaires ou à une protéine chaperonne pourrait également être à l'origine de la formation de PrP\*. A l'état normal, la concentration de PrP\* est faible, conduisant à la production d'une quantité infime de PrP<sup>sc</sup>. Dans les formes infectieuses, l'apport exogène de PrP<sup>sc</sup> induirait la conversion de PrP\* en PrP<sup>sc</sup>. L'insolubilité de la PrP<sup>sc</sup> rendrait cette conversion irréversible et la formation de PrP\* suivie de la PrP<sup>sc</sup> favoriserait l'augmentation de la concentration de la PrP<sup>sc</sup>. Dans les formes héréditaires, les mutations de la PrP<sup>sc</sup> induiraient la déstabilisation de la PrP<sup>c</sup> favorisant sa conversion en PrP\*. Les cas sporadiques pourraient résulter du franchissement aléatoire de la barrière d'énergie entre PrP<sup>c</sup> et PrP\* conduisant à l'accumulation d'un niveau suffisant de PrP\* convertible en PrP<sup>sc</sup>.



**Figure 5 : Modèle autocatalytique de conversion de la PrP<sup>c</sup> en de PrP<sup>sc</sup> (a) et modèle de nucléation-polymérisation de la PrP<sup>c</sup> en de PrP<sup>sc</sup> (b).**

(Soto and Saborio 2001)

### C. Souches de prions

#### a) Concept

La particularité des ESST provient également de la variabilité parfois extrême dans leurs phénotypes clinique et neuropathologique. Les facteurs participant à cette diversité ne sont pas encore complètement connus mais les caractéristiques génétiques de l'hôte ainsi que les propriétés de souches expliqueraient en partie cette diversité. En effet, malgré l'absence d'acide nucléique, différentes souches de prions ont été isolées (Prusiner 1998). La première expérience mettant en évidence ce phénomène de souches a été réalisée par Dickinson en 1973, à partir d'isolats de tremblante de la chèvre inoculés à la souris. Les souches se différenciaient selon le degré de vacuolisation et la distribution des lésions de spongieuse dans neuf régions cérébrales spécifiques définissant ainsi le « profil lésionnel » (Fraser and Dickinson 1973). Dans cette expérience, 5 souches d'agents ont pu être isolées uniquement sur la base de ces caractéristiques histopathologiques.

Les souches d'ESST se caractérisent également par l'induction d'une maladie dont les caractéristiques sont très reproductibles chez un groupe d'animaux ayant le même fond

génétique (Bruce 1976, Morales, Abid et al. 2007). Ainsi, pour une même dose infectante inoculée selon une voie donnée, chez des souris syngéniques, chaque souche d'agent, diffère selon :

- la période d'incubation
- la localisation de la PrP anormale
- la distribution des lésions cérébrales

Néanmoins lors de la transmission primaire d'une souche à un nouvel hôte, la période d'incubation est généralement longue et variable d'un individu à l'autre. Les caractéristiques de la souche s'établissent après 2 à 3 passages sériés chez des hôtes syngéniques. Le temps d'incubation diminue pour se stabiliser et les profils lésionnels deviennent constants : la souche est ainsi « stabilisée » (Dickinson 1975, Bruce, McBride et al. 1989, Bruce and Fraser 1991, Bruce, McConnell et al. 1991).

L'existence de diverses souches de prions, en l'absence d'acide nucléique, peut s'expliquer par l'adoption de différentes conformations de la PrP<sup>sc</sup>. Dans leurs travaux de Bessen et Marsh se sont intéressés à l'étude des propriétés biochimiques et physiques de la PrP<sup>sc</sup> à partir de 2 souches (HY et DY) de l'encéphalopathie du vison. En effet, la PrP<sup>sc</sup> de la souche HY ayant un phénotype d'hyperexcitabilité et de la souche DY ayant un phénotype léthargique (« Drowsy ») se distinguent par leurs propriétés de sédimentation, sensibilité à la protéinase K, leur migration sur gel de polyacrilamide et l'immunoréactivité de la partie N-terminale de la protéine après digestion à la protéinase K. Des travaux complémentaires ont suggéré que des différences dans les structures secondaire et/ou tertiaire de la PrP<sup>sc</sup> aboutissent à des sites de clivage PK et des vitesses de dégradation différentes (Bessen and Marsh 1994). D'autres résultats très convaincants proviennent des expériences d'inoculation de souris transgéniques exprimant une protéine prion chimère homme-souris par des extraits de cerveaux de patients atteints d'Insomnie Fatale Familiale (mutation D178N) ou de forme sporadique de MCJ (sMCJ) (Telling, Parchi et al. 1996). Les caractéristiques biochimiques de la PrP<sup>sc</sup> associée à ces deux types d'extraits (migration de la bande non glycosylée à 19kDa pour l'IFF et 21kDa pour la sMCJ étudiée, en Western blot après traitement à la PK) sont conservées après passages successifs aux souris transgéniques, indiquant que la protéine prion chimère homme-souris peut adopter au moins deux structures tridimensionnelles distinctes. Ces différences de structure seraient dues à un enrichissement en feuillet  $\beta$ ; l'ancre GPI des deux souches présente des organisations semblables supposant que cette structure n'est pas

impliquée dans la variabilité inter-souche (Bessen and Marsh 1994). Cependant, la mise en évidence de conformères différents n'est pas aisée puisque certains épitopes de la PrP<sup>sc</sup>, notamment ceux de la partie globulaire, sont difficilement accessibles. La méthode de conformation-dépendant immunoassay (CDI), par dénaturation par les sels chaotropiques et liaison à différents anticorps, expose ces épitopes « enfouis » et permet de distinguer des structures spécifiques de souches. Safar et al. ont ainsi pu révéler l'existence de 8 conformères correspondant à 8 souches de prions de hamster (Safar, Wille et al. 1998).

Toutes ces études montrent que chez un même hôte peuvent exister plusieurs conformations de PrP<sup>sc</sup> correspondant à plusieurs souches de prions. Les travaux de Wadsworth et al. apportent un nouvel élément quant à la propagation de différentes souches. Dans un modèle de souris transgéniques surexprimant la PrP humaine, ils ont pu démontrer que la susceptibilité aux différentes souches de prions est dépendante du polymorphisme au codon 129 du gène *PRNP* (Wadsworth, Asante et al. 2004). Dans le cas de la tremblante chez le mouton et la chèvre, des polymorphismes jouant un rôle dans la susceptibilité aux souches de prions ont également été identifiés (Baylis and Goldmann 2004).

Concernant les cas sMCJ chez l'homme, une combinaison de six sous types moléculaires peut être définie en fonction du profil électrophorétique de la PrP<sup>sc</sup> après digestion à la PK (type 1 ou 2) et du polymorphisme au codon 129 du gène *PRNP* : Méthionine-Méthionine (MM), Valine-Valine (VV) et Méthionine-Valine (MV) : MM1, MV1, MM2, MV2, VV1, VV2. L'équipe d'Edimbourg a étudié la transmission de ces six sous-types par inoculation à des souris exprimant les différents génotypes du gène humain *PRNP*. Dans ces expériences, seulement quatre souches distinctes ont été identifiées après deux passages. Les isolats MM1 et MV1 ont montré des propriétés biologiques similaires définissant ainsi la souche M1. La souche associée au type MV2 n'était pas distinguable de la souche associée au type VV2 (souche V2). Les isolats VV1 et MM2 constituaient les souches VV1 et MM2 (Bishop, Will et al. 2010). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le campagnol et le primate. Premièrement, malgré une homologie de séquence faible entre l'homme et le campagnol, il a été montré qu'il était possible de réaliser une transmission primaire, d'extrait de cerveau de patient sMCJ, au campagnol avec des temps d'incubation similaires à ceux observés chez la souris transgénique PrP humaine (Nonno, Di Bari et al. 2006). Chez ces animaux, les sous-types MM1 et MV1 semblent être associés au même agent et différent du génotype MM2. Les génotypes MV2 et VV2 n'ont pas pu être transmis. Deuxièmement, les études de transmission aux primates ont également montré des propriétés de transmission semblables entre le couple MM1/MV1 d'une part et le couple MV2/VV2

d'autre part (Parchi, Cescatti et al. 2010). De plus, les mêmes types de lésions ont été constatés chez les cas dissociés MM1+2 et les cas MM1. De ces études, il semblerait que chez les cas sMCJ deux souches distinctes existent (souche M1 et V2) ainsi que deux souches supplémentaires (M2 et V1). Les travaux du groupe de Fabrizio Tagliavini sur la transmission d'homogénats de cerveaux issus de patients sporadiques MM2 aux souris transgéniques MM, ont permis de mettre en évidence deux profils cliniques différents ayant des propriétés de souches distinctes. La souche M2 a donc été subdivisée en deux groupes : MM2 corticale et MM2 thalamique (Moda, Suardi et al. 2012).

Ces résultats *in vivo* sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Head sur un système *in vitro* acellulaire (Protein misfolding cyclic amplification, PMCA) et partiellement concordants avec ceux de l'équipe d'Andréoletti qui ont étudié les profils de résistance à la PK de la PrP<sup>sc</sup> et qui ont pu ainsi identifier des signatures et propriétés biochimiques différentes dans les sMCJ (Tableau 2) : PrP<sup>sc</sup> MM1/MV1, PrP<sup>sc</sup> MV2/VV2, PrP<sup>sc</sup> VV1 et PrP<sup>sc</sup> MM2 (Jones, Peden et al. 2008, Uro-Coste, Cassard et al. 2008, Haik and Brandel 2011). En revanche, les cas dissociés MV1+2 et VV1+2 ont montré des propriétés biochimiques semblables aux MV2 et VV2. De plus, en utilisant la méthode du CSI (« conformational stability immunoassay ») basée sur une résistance de la PrP<sup>sc</sup> à la dénaturation par des sels chaotropiques, Gambetti et son équipe ont observé que lorsque les deux types 1 et 2 de la PrP<sup>sc</sup> sont présents dans la même région anatomique (cas dissociés MM1 + 2) ou mélangés *in vitro*, la PrP<sup>sc</sup> de type 1 se comportait comme la PrP<sup>sc</sup> de type 2 (Cali, Castellani et al. 2009, Gambetti, Cali et al. 2011).

		Molecular sCJD subtypes						
		MM1+2	MM1*	MV1*	VV1	MM2**	MV2	VV2
Methods used for strain discrimination	Transmission to bank vole	nd	<i>M1</i>	<i>M1</i>	nd	<i>M2</i>	<i>nt</i>	<i>nt</i>
	Transmission to squirrel monkey	<i>M1</i>	<i>M1</i>	<i>M1</i>	nd	nd	<i>V2</i>	<i>V2</i>
	Transmission to transgenic mouse lines	nd	<i>M1</i>	<i>M1</i>	<i>V1</i>	<i>M2?</i>	<i>V2#</i>	<i>V2#</i>
	PMCA (using brain homogenates from transgenic mice as substrates)	nd	<i>(M1)</i>	<i>(M1)</i>	<i>(V1)</i>	<i>(M2)</i>	<i>(V2)</i>	<i>(V2)</i>
	PK resistance of PrP <sup>Sc</sup>	nd	<i>(M1)</i>	<i>(M1)</i>	<i>(V1)</i>	<i>(M2)</i>	<i>(V2)</i>	<i>(V2)</i>

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif suggérant un nombre limité de souches dans la forme sporadique de la MCJ.**

Le sous-type moléculaire des sMCJ est classé en fonction du type de PrP<sup>Sc</sup> (1 et/ou 2) et le génotype au codon 129 du gène *PRNP* (MM, MV, VV). nd : pas de donnée, nt : pas de transmission. (Haik and Brandel 2011)

### b) Tropisme de souche

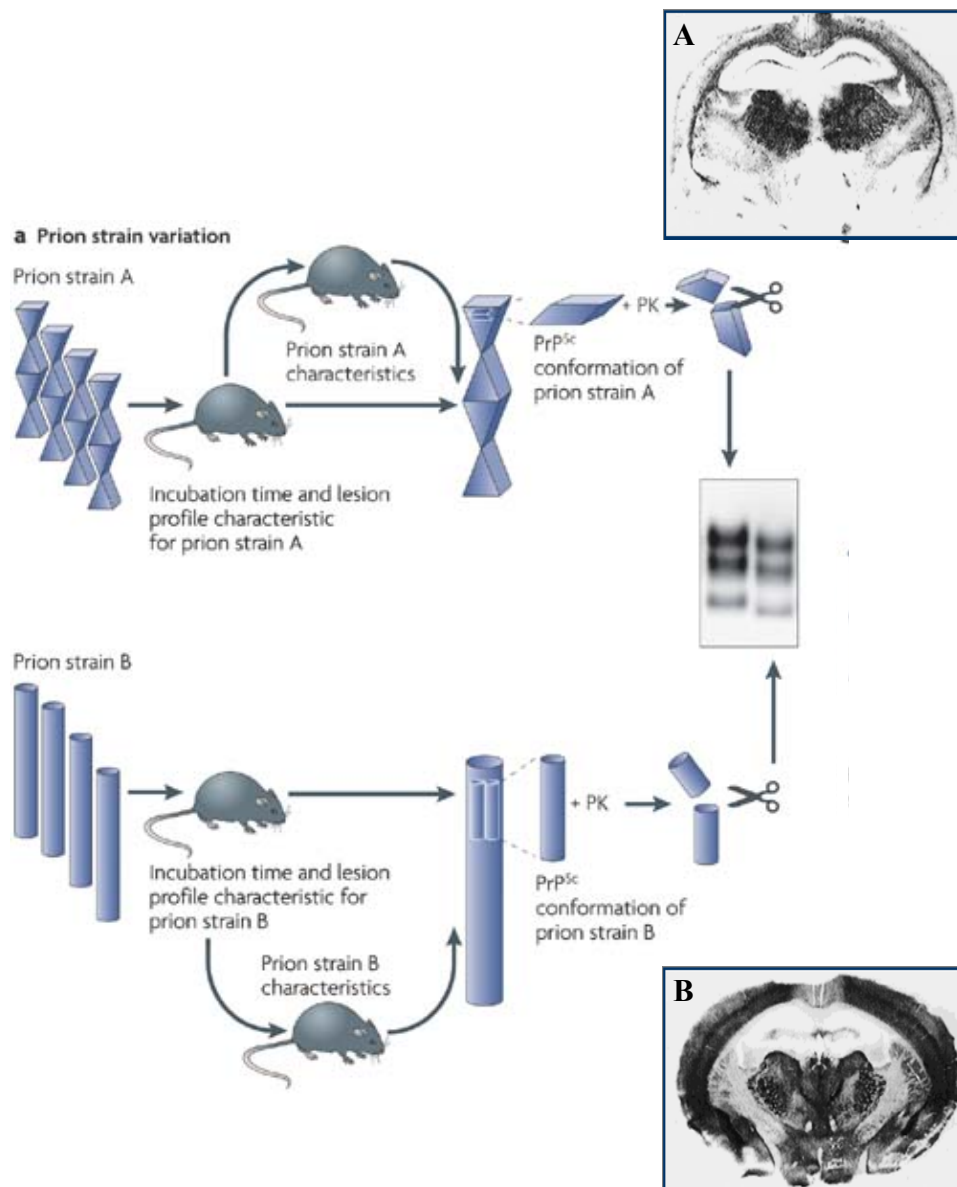
Les différences de distribution des agents de type prion suggèrent l'existence d'un tropisme cellulaire spécifique de souche. En effet, certaines souches de prions vont se propager dans des régions spécifiques du système nerveux central (neurotropisme) (Figure 6) et pourront être retrouvées dans les organes lymphoïdes (lympho-tropisme) ou dans les tissus périphériques. Des études suggèrent que ce tropisme est régi par la structure tertiaire ou quaternaire de la PrP<sup>Sc</sup> lui conférant la capacité d'interagir avec différentes molécules de surface propres à un type cellulaire et de ce fait de cibler un type cellulaire spécifique (Aguzzi, Baumann et al. 2008). Il est également possible que, au delà de leur capture, l'efficacité de la conversion des prions soit limitée à certaines cellules contenant un cofacteur compatible avec la souche de prion. Dans cette hypothèse, le cofacteur est exprimé dans un groupe précis de cellules et les produits de conversion créés sont des variantes spécifiques d'organe (ou de tissu) (Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007). Une souche de prion ne serait pas un unique ensemble clonal de PrP<sup>Sc</sup> mais un ensemble de différentes conformations en équilibre dynamique, avec un composant majeur et des composants mineurs et les différents

conformères seraient sélectionnés selon l'environnement dans lequel ils se développent (Collinge and Clarke 2007, Li, Browning et al. 2010, Haik and Brandel 2011). La nature du ou des cofacteur(s) n'est pas encore déterminée mais ce pourrait être des protéines chaperonnes, des récepteurs spécifiques, des acides nucléiques, des lipides particuliers, des facteurs de transcriptions ...

L'équipe de Bartz a étudié la neuroinvasion par inoculation périphérique des 2 souches de prion du vison (HY et DY) après passage chez le hamster. La transmission de la maladie a échoué pour la souche DY tandis que la souche HY a induit la pathologie avec une réplication en périphérie (rate). L'inoculation de la souche DY dans la langue montrait que cette souche était capable d'induire la maladie mais la PrP<sup>Sc</sup> n'a pas été retrouvée en périphérie (rate et ganglions lymphatiques). Ces travaux indiquent que la souche DY peut se propager de la langue au cerveau via les nerfs crâniens sans étape de réplication dans le tissu lymphoïde (Bartz, Dejoia et al. 2005).

D'autres études *in vivo*, se sont intéressées au neurotropisme. L'injection stéréotaxique de la souche scrapie 22L dans le cervelet de souris sauvages (C57BL/6) induit une pathologie différente de celle observée chez les souris inoculées par la même souche mais dans différentes régions cérébrales. Les souris, dont l'inoculation avait été réalisée dans le cervelet, avaient une période d'incubation plus courte et la vacuolisation n'était observée que dans le cervelet (Kim, Carp et al. 1987). Les expériences *in vitro* de cultures primaires de neurones en grains du cervelet infectés par la souche 22L donnent des résultats identiques à l'observation *in vivo* confirmant l'existence d'un tropisme spécifique de la souche et du type neuronal utilisé (Hannaoui, Maatouk et al. 2013).





**Figure 6 : Exemple caractéristique de deux souches d'ESST.**

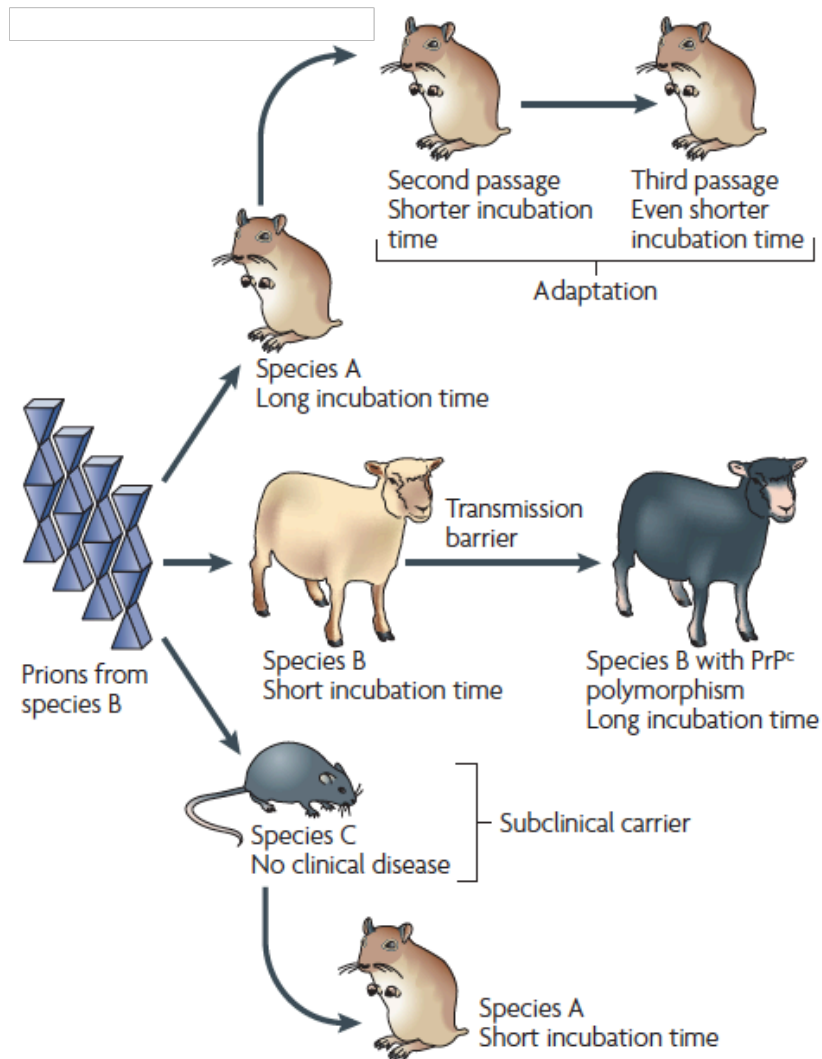
Modèle de transmission de deux souches (A et B) à des animaux syngéniques conduisant à deux PrP<sup>Sc</sup> différents. Les deux souches propagées chez le même animal montrent des sites d'accumulation distincts. (Telling, Parchi et al. 1996, Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007)

### c) Barrière d'espèce

La transmission de l'agent infectieux entre les différentes espèces de mammifères peut être rendue difficile voire totalement inefficace : ce sont les phénomènes de barrière d'espèce (Pattison 1965) (Figure 7). Le premier passage de l'agent infectieux de l'espèce A à l'espèce B n'induit pas de pathologie à l'ensemble des animaux du groupe B et les animaux atteints

présentent des périodes d'incubation plus longues et très variables. Les différences entre les espèces dans la séquence de la protéine prion (chacune pouvant engendrer un nombre limité de conformations) peuvent au moins, en partie, expliquer ce phénomène (Chen and Gambetti 2002, Vanik, Surewicz et al. 2004, Jones and Surewicz 2005). Chez certaines espèces, la conformation de la PrP<sup>c</sup> ne permet pas la conversion de cette dernière à partir d'une protéine prion infectieuse d'une autre espèce. Le phénomène de barrière d'espèce s'opère, à titre d'exemple, entre la souris et le hamster. Les prions de hamster ne se propagent pas chez la souris et aucune accumulation de PrP<sup>sc</sup> n'est détectée (Race, Meade-White et al. 2002). Après un second passage chez la souris par inoculation des échantillons de cerveaux PrP<sup>sc</sup> négatifs, aucun des animaux ne présentait de signes cliniques après 650 jours. Cependant, l'injection de ces mêmes homogénats de cerveaux murins chez le hamster aboutit à une mortalité rapide de ces animaux. Ces expériences indiquent que l'agent infectieux s'est « silencieusement » répliqué chez la souris mais a maintenu son pouvoir infectieux complet envers les hamsters. Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Collinge (Hill, Joiner et al. 2000, Hill and Collinge 2003).

Le franchissement de la barrière d'espèce semble être facilité par l'homologie de séquence entre la PrP<sup>c</sup> de l'hôte et la PrP<sup>sc</sup>. Ainsi, chez la souris, l'expression de la PrP<sup>c</sup> humaine sur fond génétique *Prnp*<sup>0/0</sup> les rend permissives à l'agent de la MCJ sporadique, tandis que les souris sauvages même si elles expriment le transgène HuPrP ne propagent pas les prions humains (Telling, Scott et al. 1994).



**Figure 7 : Phénomène de barrière d'espèce.**

(Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007)

d) « Traceback phenomenon »

Les expériences de transmission de la souche variante de MCJ (vMCJ) (adaptation humaine de l'agent bovin) aux souris humanisées surexprimant la PrP montrent que la concordance entre le génotype au codon 129 du gène *PRNP* de l'hôte et de l'inoculum influence la susceptibilité (Prusiner, Scott et al. 1990, Korth, Kaneko et al. 2003). La transmission de la forme sMCJ aux souris transgéniques ayant un génotype différent de celui de l'inoculum (cross-sequence transmission) résulte en un allongement de la période d'incubation et l'acquisition de nouvelles propriétés conformationnelles de la PrP (Kobayashi, Asano et al. 2007). Par exemple, la transmission d'une souche VV2 aux souris homozygotes MM génère un fragment PrP<sup>sc</sup> de taille intermédiaire entre le type 1 et le type 2. Ces

changements de taille de la PrP<sup>sc</sup> ont également été observé par Tagushi et al et Hill et al., après inoculation des souches vMCJ et scrapie (Hill, Desbruslais et al. 1997, Hill, Joiner et al. 2000, Peretz, Williamson et al. 2002, Taguchi, Mohri et al. 2003). Cependant, lorsque ces fragments de taille anormale sont inoculés à un nouvel hôte possédant le même génotype que l'inoculum d'origine, le type de PrP<sup>sc</sup> observé est celui de l'inoculum initial. L'explication la plus plausible émise par l'équipe de Kobayashi, est que les prions intermédiaires conservent en mémoire les propriétés des prions « parentaux » et de fait, lorsque les prions intermédiaires sont transmis à l'hôte original, les prions parentaux ré-émergent et deviennent dominants. Ce concept de « traceback phenomenon » a été appuyé par les expériences de transmission de l'agent bovin aux souris transgéniques et « knock in » exprimant la PrP bovine. Les souris montraient une grande susceptibilité aussi bien à l'agent bovin qu'à la souche vMCJ (Scott, Peretz et al. 2005, Asano, Mohri et al. 2006). Le « traceback phenomenon » a été utilisé par les chercheurs japonais, pour émettre des hypothèses sur l'identité de la souche infectieuse des cas de MCJ iatrogènes secondaires à une greffe de dure-mère. Ainsi, les caractéristiques de la PrP<sup>sc</sup> résultant de ces expériences et la susceptibilité des animaux homozygotes VV font supposer que la souche responsable de ces formes infectieuses est de type VV2 (Kobayashi, Sakuma et al. 2010).

## II. Les Encéphalopathies Subaigües Spongiformes Transmissibles (ESST)

### A. Les ESST animales

#### a) La tremblante naturelle des petits ruminants (ou scrapie)

Elle fut décrite pour la première fois chez le mouton en 1732. En 1898, Besnoit et Morel rapportent des lésions nerveuses de spongieuse et pensent à une étiologie infectieuse (Besnoit C 1898). Ils tentent en 1899, de transmettre la tremblante par inoculation de broyats de tissu cérébral, par transfusion ou par cohabitation avec des animaux malades, mais c'est un échec. La transmission est démontrée par Cuillé et Chelle, en 1936, par inoculation intraoculaire de tissu nerveux infecté au mouton, après une période asymptomatique de 14 à 36 mois (Cuillé 1936). En 1938, ces deux chercheurs réussirent à transmettre la maladie à la chèvre, franchissant ainsi la barrière d'espèce (Cuillé 1936). En 1946, la confirmation du caractère infectieux est apportée par contamination accidentelle de 1200 moutons par la tremblante au cours d'une vaccination contre le louping-ill, encéphalite due à un virus neurotrope transmis par morsure de tiques. Ce vaccin avait été préparé à partir de cerveaux, moelle épinière et rate de moutons infectés (Gordon 1946, WS 1946).

La tremblante est reconnue aujourd'hui dans de nombreux pays d'Europe et du monde (Brown and Bradley 1998, Detwiler and Baylis 2003). Elle touche souvent les ovins et plus accessoirement les caprins. L'âge des animaux cliniquement atteints se situe entre 2 et 5 ans. Dans les conditions naturelles, une grande variabilité de la durée de survie est observée. La symptomatologie est variable selon les souches de tremblante. En général, la maladie se manifeste par des troubles du comportement avec hyperexcitabilité, bruxisme, parfois passivité ou somnolence ; des troubles de la coordination, plus marqués au niveau du train postérieur, avec des tremblements de la tête et du cou; des troubles de la vue ; une perte de poids, des troubles de l'alimentation et un prurit dorsolombaire caractéristique à l'origine du nom scrapie (to scrape : se gratter en anglais). L'examen neuropathologique révèle une spongieuse cérébrale caractéristique des ESST avec mort neuronale (Dickinson, Meikle et al. 1968, Chesebro 1998). Les lésions sont localisées au système nerveux central (SNC), prédominant dans le cervelet, le tronc cérébral et la moelle. Il n'y a pas de foyer inflammatoire mais une hypertrophie des astrocytes, une vacuolisation du cytoplasme neuronal et la présence de plaques amyloïdes.

Les modalités de transmission naturelle de la maladie sont encore mal élucidées. Dans la grande majorité des cas, la maladie apparaît spontanément et se propage au sein du troupeau. Le risque individuel de contamination est d'autant plus grand que le séjour au sein du troupeau infecté est prolongé. L'accroissement de ce risque pourrait s'expliquer soit par l'augmentation avec le temps de la probabilité de pénétration de l'agent à dose infectante efficace, soit par la pénétration répétée de petites doses.

Chez les ovins, la susceptibilité de la tremblante est associée au polymorphisme de trois codons du gène PRP: 136, 154 et 171. Parmi les combinaisons possibles sur les codons 136 (T/A/V), 154 (R/H) et 171 (Q/R/H/K) uniquement 5 variants alléliques ont été observés (ARQ, ARR, VRQ, AHQ et ARH). Les animaux de génotype A<sub>136</sub> R<sub>154</sub> R<sub>171</sub>/ A<sub>136</sub> R<sub>154</sub> R<sub>171</sub> (noté simplement ARR/ARR), placés dans un milieu fortement contaminant ou inoculés par voie orale, ne développent pas la maladie. Cependant, le caractère absolu de cette résistance a été remis en question. Deux cas d'infection naturelle par la tremblante classique, associés à des signes cliniques ont été rapportés et la PrP<sup>sc</sup> a été trouvée dans la rate d'un animal ARR/ARR contaminé par voie orale avec l'agent bovin (Andreoletti, Morel et al. 2006, Groschup, Lacroux et al. 2007). Il n'en demeure pas moins que les animaux hétérozygotes ARR semblent peu susceptibles. En revanche, les animaux porteurs des allèles ARQ et VRQ sont fortement susceptibles (Tableau 3). La sensibilité relative des animaux d'un génotype donné peut varier en fonction de l'environnement et de la souche de tremblante (Foster and Dickinson 1988, Goldmann, Hunter et al. 1994, Hunter 1997, Benestad, Sarradin et al. 2003).

Genotype	Cases per year (n)	Percentage of sheep	Cases per year per million (n)	95 % CI (lower-upper)
ARR/ARR	0	21.3	0	0.0-0.3
ARR/AHQ	0.3	5.6	0.3	0.0-1.6
ARR/ARQ	2.0	28.0	0.4	0.2-0.8
ARR/ARH	0	2.1	0	0.0-2.9
AHQ/AHQ	2.0	1.9	5.0	2.3-10.9
ARQ/AHQ	11.0	6.3	8.7	6.2-12.1
AHQ/ARH	0	0.3	0	0.0-20.6
ARH/ARH	0.7	1.6	2.0	0.5-7.3
ARQ/ARH	1.6	1.6	5.2	2.2-12.1
ARQ/ARQ	89.6	12.2	36.9	33.1-41.0
ARR/VRQ	12.0	9.6	6.3	4.5-8.6
AHQ/VRQ	0.3	2.5	0.7	0.0-3.7
ARQ/VRQ	264.0	5.9	225.4	214.7-236.0
ARH/VRQ	22.7	0.3	405.0	321.9-508.2
VRQ/VRQ	94.8	0.9	544.5	490.5-602.9

**Tableau 3 : Susceptibilité à la tremblante classique en fonction des différents génotypes ovins.**

IC à 95% : Intervalle de confiance à 95% (Baylis, Chihota et al. 2004). Etude cas témoins comparant les fréquences génotypiques de plus de 1543 cas cliniques (observés à l'état naturel) confirmés et de celles de près de 15000 animaux cliniquement sains issus de 44 élevages britanniques. Le risque a été établi pour chacun des 15 génotypes et décrit en termes de nombre de cas par année et par millions d'ovins.

Les programmes de lutte contre la tremblante ont été longtemps fondés sur l'abatage total des cheptels atteints mais avec comme résultat une fréquente réinfection des animaux nouvellement introduits. Compte tenu du déterminisme génétique face à la tremblante, des programmes de sélection génétique favorisant l'introduction de l'allèle de résistance ARR dans les cheptels par l'utilisation de béliers homozygotes ARR et des brebis au moins hétérozygotes ARR ont été mis en place dans l'ensemble des pays européens (Barillet 2002).

#### **b) L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)**

L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) ou « maladie de la vache folle » est apparue en Grande Bretagne en 1985 (Wells, Scott et al. 1987). Depuis, cette maladie a été identifiée dans de nombreux pays avec un total de près de 200 000 cas répertoriés à ce jour, dont la grande majorité en Grande-Bretagne (185 000 cas) (source : Organisation mondiale de la santé animale).

L'ESB touche essentiellement les vaches adultes de 3 à 7 ans sans prédisposition pour un sexe ou une race donnée. La maladie se caractérise par l'apparition de symptômes nerveux sensitifs et moteurs. L'animal montre tout d'abord des troubles du comportement (nervosité et crainte), une hyperexcitabilité, des myoclonies et une ataxie. Pendant la phase clinique, l'animal chute fréquemment, tremble, maigrit puis reste en décubitus. La durée d'évolution de la maladie est variable de 7 jours à plusieurs mois (6 à 8 semaines dans la majorité des cas) (Wilesmith, Wells et al. 1988, Scott, Aldridge et al. 1989).

Il n'existe pas d'argument en faveur d'une grande variabilité de sensibilité génétique à l'agent de l'ESB chez les bovins. Le gène PRP n'est pas caractérisé par un grand polymorphisme, seules des variations du nombre de répétition des octapeptides ont été rapportées sans qu'aucune implication sur la sensibilité à la maladie ait pu être mise en évidence (Goldmann, Hunter et al. 1991).

L'origine de l'épizootie en Europe est liée à l'utilisation de farine de viandes contaminées dans l'alimentation des bovins. L'abaissement des températures de stérilisations

associé à la suppression de l'extraction lipidique, instaurés pour des raisons d'économie et de sécurité, auraient permis le recyclage et la dissémination de l'agent infectieux au sein des élevages britanniques. Cependant, l'origine de la souche n'est toujours pas connue et deux hypothèses sont plausibles : une souche ovine de tremblante transmise à la vache avec le franchissement de la barrière d'espèce ou une souche bovine naturelle recyclée. L'hypothèse de l'origine ovine de l'ESB repose sur des expérimentations montrant la susceptibilité des bovins à l'agent de la tremblante naturelle via l'inoculation sous-cutanée, intracérébrale ou orale d'homogénats de cerveaux de mouton et de chèvre atteints. Dans ces expériences, la maladie s'est développée chez 3 bovins sur 10, avec néanmoins des signes cliniques et des lésions neuropathologiques différentes de l'ESB « classique » (Clark, Hourrigan et al. 1995). L'hypothèse d'une forme sporadique d'ESB est également envisageable (Marsh, Bessen et al. 1991). Les études menées par Collinge et collaborateurs, en 1996, sur les bovins atteints ont montré une unicité de la souche de l'ESB « classique » (Collinge, Sidle et al. 1996). Toutefois, la large campagne de dépistage de la PrP<sup>sc</sup> dans les tissus nerveux de bovins a permis de mettre en évidence des formes atypiques d'ESB : un type H (High) identifié par Biacabe et al. en 2000 et un type L (Low) aussi appelé souche BASE (Bovine Amyloïde Spongiform Encephalopathy) identifié par Casalone et al. en 2004 (Biacabe, Laplanche et al. 2004, Casalone, Zanusso et al. 2004). Les souches se différencient par le poids moléculaire des différentes bandes di-, mono- et non glycosylées (Baron, Biacabe et al. 2007). En plus de ce profil électrophorétique différent, les formes atypiques se distinguent par le profil lésionnel, l'aspect des dépôts de PrP<sup>sc</sup> et une plus grande sensibilité de la PrP<sup>sc</sup> à la digestion par la PK (Baron, Biacabe et al. 2006, Beringue, Bencsik et al. 2006, Buschmann, Gretzschel et al. 2006). Les études histopathologiques ont montré l'existence de plaques amyloïdes associées exclusivement à la forme L (Casalone, Zanusso et al. 2004). Les résultats des essais de transmission de ces formes atypiques sur différentes lignées de souris transgéniques exprimant la PrP bovine ou humaine ont permis de mettre en évidence leur caractère transmissible et de montrer leurs caractéristiques de souches nettement distinctes de celles de l'agent de l'ESB classique (Laude and Beringue 2009). Cependant la propagation de l'agent de type L sur des souris « ovinisées » a provoqué un glissement phénotypique avec acquisition de caractéristiques moléculaires (signature PrP<sup>res</sup>), biologiques (temps d'incubation) et neuropathologiques (topologie de dépôts de PrP et de la spongiose dans le cerveau) identiques à celles de l'ESB classique (Laude and Beringue 2009). Ces résultats suggèrent qu'un scénario de type « traceback phenomenon » pourrait expliquer l'origine de



l'épizootie bovine. L'ESB dériverait de l'agent de l'ESB-L après passage chez un hôte intermédiaire tel que le mouton.

c) Les autres ESST animales

**1. La maladie du dépérissement chronique des cervidés (*Chronic Wasting Disease*)**

La maladie du dépérissement chronique ou Chronic Wasting Disease (CWD) touche les ruminants sauvages (élan, cerfs, wapiti, orignaux ...) en liberté ou en captivité. A partir de 1967, plusieurs dizaines de cas ont été reconnus aux USA dans des centres de recherche et dans des parcs zoologiques du Wyoming et du Colorado et dans une réserve naturelle au Canada. Cependant, depuis les années 2000, les zones géographiques touchées par les cas de CWD sauvages se sont étendues à 21 états américains et depuis lors, une surveillance renforcée a été mise en place aux Etats-Unis (source : Centers for Disease Control and Prevention). Cette pathologie se limitait aux territoires nord-américain et sud-coréen, jusqu'à la découverte en avril 2016, en Norvège, d'un cas de CWD chez un renne et de deux cas, en mai 2016, chez des élan vivant à l'état sauvage. Deux cas supplémentaires ont ensuite été identifiés chez des rennes. Ces cas ont motivé la mise en place par la Commission Européenne d'activités de surveillance afin d'appréhender les risques de transmission et de dissémination à travers toute l'Europe en particulier en Norvège, Finlande et Suède puisque les cervidés se déplacent librement sur ces territoires.

La maladie se développe chez des animaux âgés de 3 à 5 ans. La période naturelle d'incubation est inconnue. La maladie se traduit par un amaigrissement progressif, signe le plus frappant qui lui a donné son nom. Cet amaigrissement s'associe à une apathie, des difficultés de déglutition, une hypersialorrhée et des troubles du comportement. La mort survient dans un délai de 1 à 8 mois. Les lésions neuropathologiques sont typiques des ESST avec de nombreuses plaques amyloïdes de type florides. En 2003, Miller et Williams ont apporté la preuve d'une transmission horizontale dans un même troupeau et émettent l'hypothèse d'une contamination par voie orale (Miller and Williams 2004). Cette hypothèse est renforcée en 2006 avec les travaux de Mathiason et al. identifiant l'agent pathogène dans la salive des cervidés contaminés (Mathiason, Powers et al. 2006).

## ***2. L'encéphalopathie du vison***

L'encéphalopathie spongiforme du vison (ESV) ou transmissible mink encephalopathy, est connue depuis 1947 et les premiers foyers sont apparus dans des élevages aux USA, d'autres foyers ont été rapportés par la suite au Canada, Finlande, Russie et Allemagne. La contamination orale alimentaire est très probable, par le biais des préparations industrielles contenant de la farine de viande et d'os destinées à nourrir les visons (Marsh 1990). Pour les cas finlandais, une consommation à partir de têtes de moutons a été mise en évidence suggérant que certaines étaient infectées par l'agent de la tremblante (Marsh 1979).

La maladie apparaît après une incubation de 7 à 12 mois et se traduit par des troubles du comportement : hyperexcitabilité, perte de la propreté, phases d'auto et hétéro-agressivité pouvant conduire à des mutilations. La mort survient après 3 à 8 semaines d'évolution (Marsh and Hanson 1969). Comme nous l'avons précédemment vu (voir paragraphe souche), plusieurs souches ont été identifiées grâce à des séries de transmission expérimentale au hamster et au primate où deux souches ont été isolées appelées « drowsy » (DY) et « hyper » (HY) responsables des syndromes cliniques éponymes (Marsh, Bessen et al. 1991, Bessen and Marsh 1994).

## ***3. L'encéphalopathie spongiforme féline***

Cette encéphalopathie aurait également pour origine une contamination par voie alimentaire via les farines animales et les carcasses de bovins infectés ; l'agent infectieux étant identique à celui de l'ESB. Le premier cas d'encéphalopathie féline a été rapporté en 1989 chez un chat domestique puis en 1992, un puma et deux guépards nés dans le même zoo ont développé la maladie. L'évolution clinique ressemble à celle des autres ESST marquée par des troubles du comportement, une agressivité et des tremblements. Une phase comprenant des anomalies très importantes du sommeil est particulière à cette forme. L'évolution est rapidement mortelle en quelques semaines.

## **B. Les ESST humaines**

Chez l'homme, les ESST se répartissent en 3 groupes selon leur étiologie : la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sMCJ), les formes génétiques (maladies de Creutzfeldt-Jakob génétiques, Syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (SGSS) et Insomnie Fatale Familiale (IFF)) et les formes acquises, comprenant le Kuru, les maladies de Creutzfeldt-

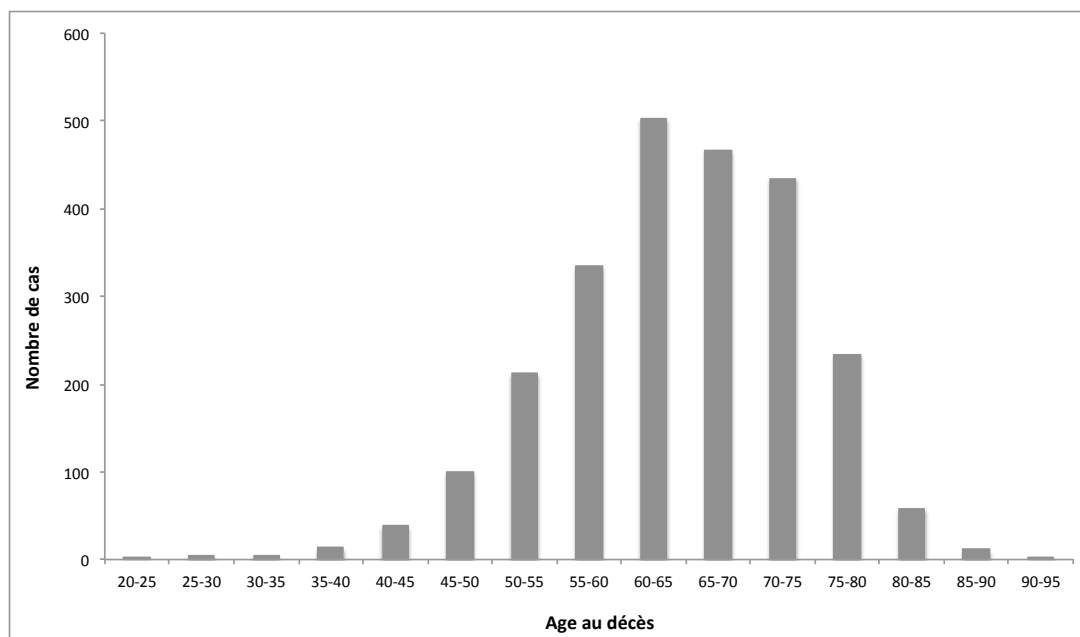
Jakob iatrogènes et la variante de la MCJ (vMCJ). Dès 1992, en France, un réseau d'épidémiologie-surveillance de la MCJ a été mis en place par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) en raison de la possibilité du passage de l'agent ESB à l'homme et de l'apparition des cas de MCJ iatrogènes liés à l'hormone de croissance. Avec l'émergence de la vMCJ en 1996, puis la confirmation que cette nouvelle forme de MCJ résultait du passage de l'agent de l'ESB à l'homme, les MCJ et les autres ESST humaines ont été inscrites sur la liste des maladies à déclaration obligatoire. A la fin des années 2000, après la deuxième « crise de la vache folle », le Réseau National de surveillance des maladies de Creutzfeldt-Jakob et des maladies apparentées (RNS-MCJ), structure pluridisciplinaire, a été créé. Son objectif principal est de détecter tous les cas d'ESST humaines afin de les classer par étiologie, d'en estimer l'incidence, de décrire leur répartition temporo-spatiale et leurs tendances évolutives, et de détecter les cas groupés. Une surveillance active de ces pathologies, au niveau européen, a été également mise en place. L'European CJD surveillance Network (EuroCJD) comporte les 28 pays de l'union européenne et de l'association européenne de libre-échange et 9 pays non européens participant à la production de statistiques sur les cas de MCJ.

#### a) La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique

##### *1. Epidémiologie*

La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique est la forme la plus anciennement connue et la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 80% de l'ensemble des ESST humaines. Néanmoins, cette pathologie est rare avec une incidence comprise entre 1 à 2 cas par million d'habitants dans le monde. En France, entre 100 et 130 cas, sans distinction de sexe, sont répertoriés par le RNS-MCJ chaque année. L'âge moyen au décès est de 69,6 ans (écart-type=9,4). Cependant, il existe des formes juvéniles, ainsi il a été recensé un cas de 20 ans et un autre de 24 ans (Figure 8). La répartition géographique sur le territoire français est homogène. Le taux de mortalité (peu différent de l'incidence en raison de la rapidité d'évolution et du caractère constamment fatal de la maladie) a eu tendance à augmenter. Cette tendance a été également observée dans tous les autres pays où une surveillance épidémiologique existe. Elle est probablement due à la mise en place de ces activités de surveillance et de déclaration systématiques des cas, mises en place depuis le début des années 1990. Afin d'obtenir des données comparables, les systèmes de surveillance épidémiologique ne recensent que les cas de sMCJ probables et certains en appliquant les

critères définis par EuroCJD qui ont évolué au fil du temps et qui ne sont plus tout à fait identiques à ceux de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Tableau 4) depuis le début de l'année 2017. La mortalité annuelle est plus élevée en France que dans les trois autres pays européens ayant des tailles de populations équivalentes à la France (Allemagne, Italie, Royaume-Uni) : 1,44 (cas/millions d'habitants) versus 1,23, 1,23 et 1,04. Ceci est probablement dû à l'activité de surveillance plus intense et à une définition de suspicion de MCJ plus large en France que dans les autres pays (Brandel, Peckeu et al. 2013). La cause de la sMCJ n'est pas connue. Plusieurs études épidémiologiques de type cas-témoin ont été réalisées, mais n'ont pas permis l'identification d'un ou plusieurs facteurs de risque pouvant expliquer l'ensemble des cas de sMCJ sporadique (Wientjens, Davanipour et al. 1996, van Duijn, Delasnerie-Laupretre et al. 1998, Collins, Law et al. 1999, Ward, Everington et al. 2002, Linsell, Cousens et al. 2004). Il n'y a pas de différences socio-économiques, climatiques ou culturelles, pas d'antécédents particuliers. Il faut tout de même noter que certaines études ont mis en évidence un excès d'interventions neurochirurgicales ou ophtalmologiques chez les patients atteints de sMCJ par rapport à la population témoin (Masters, Harris et al. 1979, Ward, Everington et al. 2008). Une origine alimentaire par la consommation de viande ou de cervelle de mouton contaminés par l'agent de la tremblante a été envisagée sans qu'aucune preuve formelle n'ait pu être apportée. Des cas de sMCJ ont été rapportés chez des sujets végétariens stricts (Davanipour, Alter et al. 1985, Diringer 1995). Enfin, l'incidence de la sMCJ en Australie, pays où la tremblante du mouton est réputée éradiquée, est la même que dans les pays ayant des cas de tremblante (Masters, Harris et al. 1979).



**Figure 8 : Représentation du nombre de cas de MCJ sporadique selon l'âge au décès. Données du Réseau National de Surveillance des Maladies de Creutzfeldt-Jakob.**

Formes sporadiques		
I	Démence rapidement progressive	
II	A	Myoclonies
	B	Anomalies visuelles ou cérébelleuses
	C	Syndrome pyramidal ou extrapyramidal
	D	Mutisme akinétique
III	EEG typique	
IV	Hypersignaux du noyau caudé ou du putamen à l'IRM cérébrale*	
<p>– <b>Définies</b> Confirmation neuropathologique ou immunocytochimique</p> <p>– <b>Probables</b> I + 2 des critères II + III ou I + 2 des critères de II + IV* ou MCJ possible + protéine 14-3-3 positive</p> <p>– <b>Possibles</b> I + 2 des critères de II + durée inférieure à 2 ans</p>		

\* À partir du 1<sup>er</sup> janvier 2010.

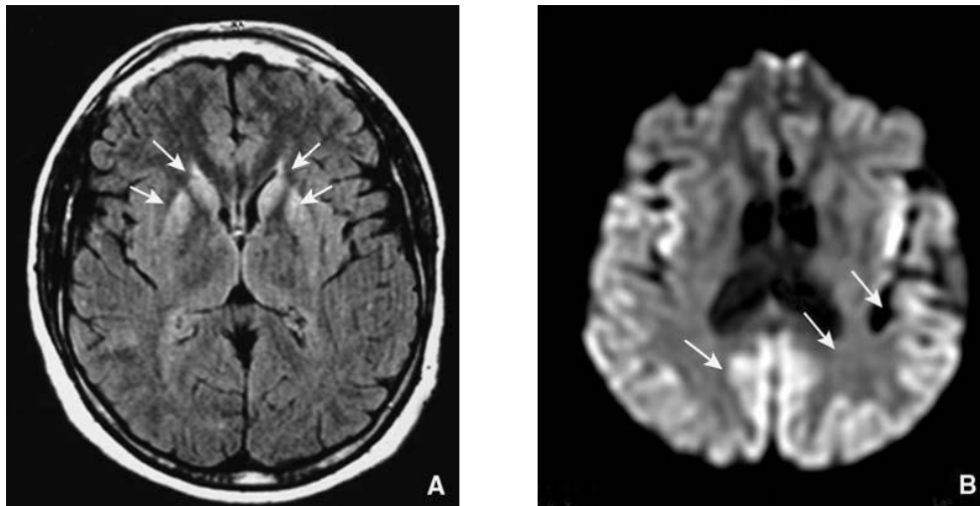
**Tableau 4 : Critères de classement et de diagnostic de la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.**

Les critères cliniques appliqués depuis janvier 2017 incluent pour la définition des cas « Probables » un syndrome neurologique progressif avec un résultat positif en RT-QuIC dans le liquide céphalo-rachidien ou autres tissus. La présence d'hypersignaux à l'IRM en deux régions corticales (temporale, pariétale, occipitale) a été également incluse dans les critères de probabilité diagnostic.

## **2. Clinique**

La maladie peut débuter par une phase de prodromes aspécifiques tels que : asthénie, anxiété, insomnie, anorexie, dépression. Dans d'autres cas, la maladie commence d'emblée par des symptômes attribuables à une atteinte du système nerveux central (hémiplégie, épisode de confusion mentale, paresthésie d'un membre). Une démence rapidement progressive représente le signe cardinal de la maladie. Elle se caractérise par des troubles de la mémoire, de l'orientation temporelle ou spatiale, du langage, de la coordination ou de la reconnaissance. Les myoclonies, très fréquentes, sont spontanées ou provoquées par une stimulation sensorielle. Elles sont souvent diffuses. Le syndrome cérébelleux est surtout marqué par des troubles de l'équilibre (ataxie), il peut engendrer aussi une dysarthrie et un nystagmus. L'ataxie évolue vite, empêchant la marche. Les troubles visuels sont polymorphes : simple gêne visuelle, hémianopsie, diplopie, mauvaise perception des couleurs. Les illusions et hallucinations (visuelles et auditives) sont les manifestations les plus spectaculaires. La survenue d'une cécité corticale est possible. Le syndrome pyramidal peut être complet ou se résumer à des réflexes trop vifs. Les signes extrapyramidaux, quand ils existent, sont variés : hypertonie, dystonie, tremblements, mouvements choréiques. Les autres manifestations neurologiques sont plus rares : anomalies oculomotrices, troubles sensitifs, atteinte de la corne antérieure de la moelle. Des crises d'épilepsie isolées ou un état de mal épileptique sont possibles. L'évolution se fait généralement vers un état de mutisme akinétique. La durée de survie est en moyenne de 7 mois et excède très rarement 2 ans.

Les examens paracliniques contribuent à la précision du diagnostic. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) tient une place importante. Sur les séquences pondérées en T2 (T2, FLAIR) et l'imagerie de diffusion (séquence la plus sensible), les hypersignaux striataux constituent l'anomalie la plus caractéristique et la plus fréquente (67% des cas). Ils sont en général bilatéraux et symétriques et peuvent coexister avec des hypersignaux des cortex cérébraux ou cérébelleux (Schroter, Zerr et al. 2000) (Figure 8). Le scanner cérébral n'est pas un examen contributif au diagnostic de la sMCJ, il est normal ou révèle une atrophie non spécifique.

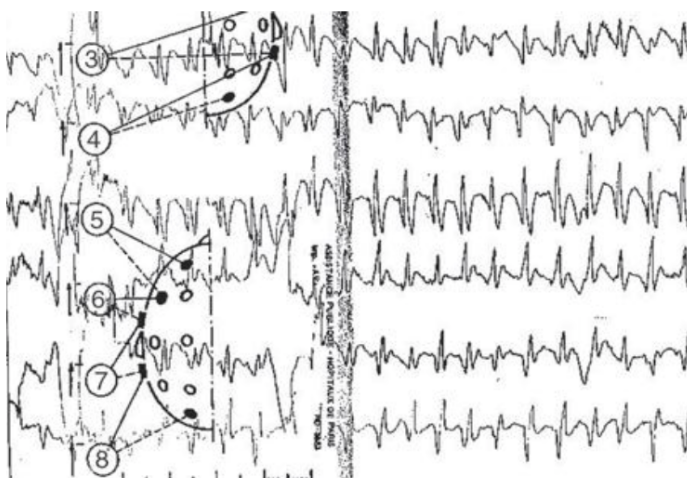


**Figure 9 : Aspects IRM au cours de la MCJ sporadique.**

A : Séquence FLAIR : la tête des noyaux caudés et les putamens apparaissent en hypersignal sur la séquence FLAIR

B : Séquence de diffusion : hypersignaux corticaux grossièrement symétriques prédominant sur les cortex insulaires et le lobe occipital (forme de Heidenheim)

L'électroencéphalogramme (EEG) bien que peu sensible et non totalement spécifique reste un outil diagnostique utile. Le tracé montre au début un ralentissement du rythme de base (ondes lentes delta), mais l'élément le plus caractéristique est l'apparition de décharges périodiques régulières, bi ou tri-phasiques (Figure 9). Ces anomalies apparaissent au cours de l'évolution et peuvent être transitoires, d'où l'intérêt de répéter l'examen.



**Figure 10 : Electroencéphalogramme au cours de la MCJ sporadique.**

Complexes triphasiques, symétriques, synchrones, diffus et périodiques à un cycle par seconde

Les maladies à prions humaines ne s'accompagnent d'aucune réaction immunitaire, ni inflammatoire de telle sorte que les examens biologiques usuels sont normaux. L'examen du liquide céphalorachidien (LCR) est normal avec parfois une protéinorachie modérément augmentée. Le LCR est paucicellulaire : moins de 10 éléments/mm<sup>3</sup>. Plusieurs marqueurs de destruction neuronale (NSE, protéine Tau et protéine 14-3-3) peuvent être anormalement détectés ou être présents à des taux trop élevés dans le LCR de patients atteints de sMCJ. Ainsi une forte augmentation de la concentration de la protéine Tau alors que les protéines A-bêta amyloïde et phospho-Tau sont normales ou subnormales est très évocatrice de sMCJ. Cependant le marqueur le plus utilisé pour le diagnostic de sMCJ est la protéine 14-3-3. Cette protéine est une protéine ubiquitaire, existant sous 7 isoformes, particulièrement abondante dans les neurones et régulatrice de nombreuses fonctions cellulaires. Sa présence dans le LCR est un indicateur de souffrance neuronale. Les valeurs de sensibilité et la spécificité de la détection de la protéine 14-3-3 sont élevées. Cependant, dans environ 10% des cas de sMCJ, la protéine 14-3-3 n'est pas détectée et à contrario, une détection positive n'est pas toujours associée au diagnostic de sMCJ. En dehors de la MCJ, la protéine 14-3-3 peut être détectée dans le LCR dans de nombreuses situations cliniques, notamment en cas d'encéphalite infectieuse, accident vasculaire cérébral, épilepsie ou état de mal épileptique, syndrome paranéoplasique. De même, une détection positive de la protéine 14-3-3 associée à une augmentation (au-delà de 60 nmol/l) de la néoptérine (marqueur de stimulation de l'immunité cellulaire) doit faire évoquer une étiologie autre que celle de la MCJ.

### ***3. Neuropathologie***

La certitude diagnostique n'est obtenue que par l'examen neuropathologique du tissu cérébral, recueilli, le plus souvent, en post-mortem. En effet, la biopsie cérébrale n'est pas conseillée car d'une part c'est un geste invasif sur des patients fragiles et d'autre part un résultat négatif ne permet pas d'éliminer totalement le diagnostic (Depaz, Haik et al. 2012). L'examen macroscopique du cerveau est généralement normal en dehors de l'observation d'une atrophie parfois intense. La triade lésionnelle caractéristique : spongieuse, gliose et perte neuronale, associée parfois à la présence de plaques amyloïdes est caractéristique (Figure 10). L'immunocytochimie de la PrP permet d'identifier la protéine déposée sous différentes



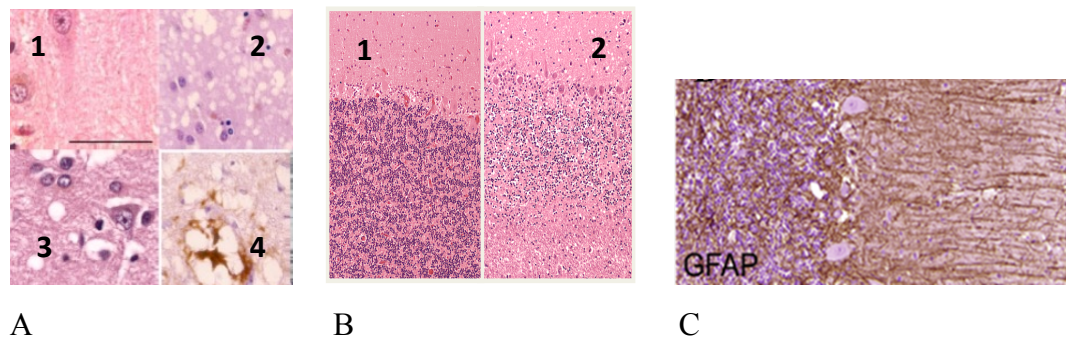
formes (dépôts synaptiques, focaux, périvacuolaires, plaques). Les lésions microscopiques touchent surtout la substance grise, notamment les cortex cérébral et cérébelleux et les noyaux gris centraux.

La spongiose du neuropile est la lésion la plus significative. En microscopie photonique, elle se traduit par des cavités développées entre les corps cellulaires. En microscopie électronique, ces cavités apparaissent situées dans le cytoplasme, de contenu clair. Elles affectent surtout les prolongements neuronaux, à distance ou non des synapses. La spongiose est diffuse et nette.

La mort neuronale fait probablement suite à la spongiose. Elle est d'intensité variable. L'apoptose en est le mécanisme causal le plus souvent évoqué (Williams, Van Dam et al. 1997, Miller and Williams 2004).

La gliose est très fréquente et souvent sévère. Elle est due à une hypertrophie et à une prolifération des astrocytes.

Les plaques amyloïdes, dues à des dépôts extracellulaires de fibres formées de PrP anormale, mise en évidence par immunocytochimie, sont rares dans les sMCJ.



**Figure 11 : Lésions neuropathologiques de MCJ sporadique.**

A : Spongiose corticale (coloration hématoxyline-éosine (1,2,3) et immunocytochimie anti PrP (4)) 1 : Cortex normal, 2,3 et 4 : sMCJ.

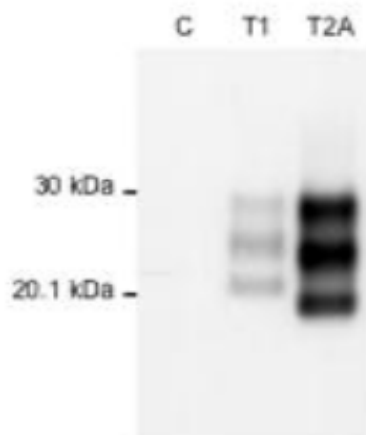
B : Perte neuronale (exemple de la couche des grains du cervelet) 1 : témoins, 2 : sMCJ.

C : Gliose astrocytaire (immunomarquage de la GFAP) dans le cortex cérébelleux.

#### 4. Aspect moléculaire

L'étude par Western blot, sur un fragment de tissu cérébral congelé, permet de confirmer la présence de PrP<sup>res</sup>. Pour la forme sporadique, deux profils de migration peuvent être observés selon la classification de Parchi, Castellani et al. 1996 : type 1 et type 2A, avec

respectivement une migration de la bande non glycosylée à 21kDa et à 19kDa (Figure 11) (Parchi, Castellani et al. 1996).



**Figure 12 : Classification du profil de migration en Western Blot de la PrP<sup>res</sup>.**

Type 1 et 2A de la MCJ sporadique.

### 5. Influence de la génétique

Aucun facteur de risque contribuant à la survenue des cas de sMCJ n'a été identifié. Cependant, comme évoqué dans le paragraphe « Souche de prions », il existe chez l'homme un polymorphisme sur le codon 129 du gène *PRNP*, définissant trois génotypes : méthionine/méthionine (MM), valine/valine (VV) et méthionine/valine (MV). Dans la population générale, on observe 50% d'homozygotes (MM ou VV) et 50% d'hétérozygotes (MV). Dans la MCJ sporadique, 80% des patients sont homozygotes avec une nette prédominance du génotype MM (Laplanche, Delasnerie-Laupretre et al. 1994). L'homozygotie MM constitue donc un facteur de risque pour la sMCJ sporadique mais non un facteur causal.

Nous avons vu que les signes cliniques peuvent être variable d'un patient à l'autre. Différentes formes cliniques ont été individualisées : les formes pariéto-occipitale ou amaurotique de Heidenhain avec prédominance des signes visuels (cécité corticale, agnosie visuelle) ; la forme cérébelleuse de Brownell et Oppenheimer dominée par l'ataxie ; la forme thalamique de Garcin particulière par l'intensité de la démence et des mouvements anormaux ; la forme amyotrophique avec une atteinte de la corne antérieure de la moelle et un syndrome pyramidal. On peut y ajouter de très exceptionnels cas sans démence, certifiés par l'examen neuropathologique, se révélant par un état de mal épileptique brutal sans reprise de conscience ou par des signes neurologiques moteurs ou sensitifs focaux d'évolution rapide.

L'observation de ces différentes formes cliniques est un argument en faveur de l'existence de souches différentes de prion à l'origine de la sMCJ (voir paragraphe Souches de prions).

Les variations du phénotype clinique en fonction du polymorphisme du codon 129 et du profil de migration de la PrP<sup>res</sup> en Western Blot sont un argument de plus en faveur de la présence de différentes souches de prions. Plusieurs formes cliniques de sMCJ correspondent à ces différents sous-types moléculaires (Bahn and Parchi 1999, Parchi, Giese et al. 1999) :

- forme MM1 ou MV1 : caractérisée par une démence rapide avec des myoclonies précoces, une atteinte visuelle, un EEG caractéristique, des hypersignaux striataux dans 70% des formes MM1 et corticaux dans 77% des cas de MV1 (Meissner, Kallenberg et al. 2009) et une durée moyenne d'évolution de 4 mois (correspondant à la forme amaurotique de Heidenhain) ;
- forme VV2 : caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce, une démence tardive, un EEG non caractéristique, des hypersignaux striataux dans 77% des cas associés parfois à des hypersignaux thalamiques et une durée moyenne d'évolution de 6,5 mois (correspondant à la forme de Brownell et Oppenheimer) ;
- forme MV2 : caractérisée par une ataxie cérébelleuse associée à une démence, un EEG non caractéristique, des hypersignaux striataux dans 80% des cas associés parfois à des hypersignaux thalamiques et une durée d'évolution de 17 mois ;
- forme MM2-thalamique : caractérisée par une insomnie, une ataxie, une démence, un EEG non caractéristique et une durée moyenne d'évolution de 16 mois ;
- forme MM2-corticale : caractérisée par une démence progressive, un EEG non caractéristique, des hypersignaux corticaux dans 77% des cas et une durée d'évolution de 16 mois ;
- forme VV1 : caractérisée par une démence progressive, un EEG non caractéristique, des hypersignaux corticaux dans près de 90% des cas et une durée d'évolution de 15 mois.

### b) Les ESST génétiques

Les ESST génétiques représentent 10 à 15% des ESST et sont toutes liées à des mutations ou insertions du gène *PRNP*. Elles se transmettent sur le mode autosomique dominant avec une pénétrance variable. Le diagnostic, évoqué parfois sur une histoire familiale évocatrice (mais manquante dans environ 50% des cas), sera affirmé par l'étude génétique. En fonction de la clinique, des lésions histologiques, de la mutation en cause ou de

la taille des insertions, on différencie les MCJ génétiques, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF).

### 1. Les maladies de Creutzfeldt-Jakob génétiques

#### Epidémiologie

Les MCJ génétiques sont dues principalement à des mutations du gène *PRPN* situées sur les codons 200, 178 et 210 mais également à des insertions d'un nombre variable d'octapeptides (1 à 9). Des mutations situées sur les codons 180, 232, 196, 203 et 211 ont été découvertes chez des patients présentant un tableau clinique de MCJ. En France, la mutation du codon 200 est la mutation la plus fréquente (EUROCID Group 2001). Elle est également responsable de foyers de cas de MCJ en Slovaquie, en Israël et au Chili. En 2016, un cas porteur de la mutation G114V a été signalé au RNS-MCJ. Ce patient était le premier cas français identifié, la mutation n'ayant été décrite que dans une famille uruguayenne et chinoise (Rodriguez, Peoc'h et al. 2005, Ye, Han et al. 2008).

#### Clinique et neuropathologie

Le tableau clinique dépend de la mutation et la symptomatologie peut varier, au sein d'une même famille, entre les individus ou d'une génération à l'autre.

**Mutation 200<sup>Lys</sup>.** Elle entraîne une substitution de la glutamine par une lysine. Excepté un âge de début plus précoce (entre 50 et 60 ans), les signes cliniques (démence myoclonique d'évolution rapide) et neuropathologiques sont comparables à ceux de la forme sporadique (Laplanche, Delasnerie-Laupretre et al. 1994).

**Mutation 178<sup>ASN</sup>.** Elle entraîne la substitution de la proline en arginine. La mutation 178 donne un tableau de MCJ quand le codon 129 de l'allèle qui porte la mutation code une valine (Montagna, Gambetti et al. 2003). Les différences avec la sMCJ portent sur l'âge de survenue (autour de 46 ans), la durée d'évolution (en moyenne 20 mois) et l'absence de signes EEG caractéristiques. En revanche les données neuropathologiques sont identiques à celles de la forme sporadique.

**Autres mutations.** Elles présentent un tableau proche de celui observé au cours de la sMCJ.

**Insertions.** Les insertions de répétitions d'un motif de 24 paires de base sont la cause de certaines ESST. L'analyse des phénotypes n'est pas aisée car chaque insertion n'a été décrite que dans un nombre limité de familles (Goldfarb, Brown et al. 1991). Les tableaux

clinique et neuropathologique sont ceux d'une MCJ lorsque le nombre de répétitions est inférieur à 4 (Laplanche, Delasnerie-Laupretre et al. 1995). Plus le nombre d'insertion est grand, plus l'âge de survenue sera précoce et la durée d'évolution lente (plusieurs années).

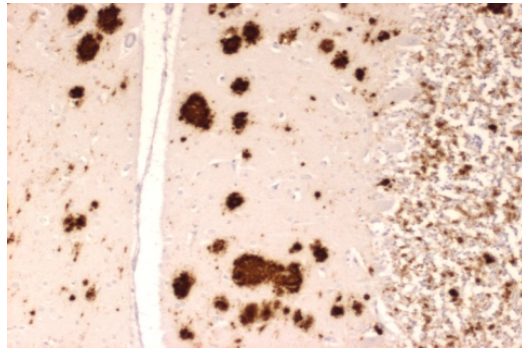
## ***2. Le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker***

### Epidémiologie

La première observation a été faite par les médecins Gerstmann, Straüssler et Scheinker, en 1936, chez une jeune patiente autrichienne. Diverses mutations peuvent être en cause dans le SGSS. La mutation 102 est la plus fréquente et a été décrite dans plusieurs pays d'Europe et au Japon. La mutation 117 a été décrite dans quatre familles, notamment en Allemagne, Alsace et au Royaume-Uni. Les autres mutations sont beaucoup plus rares : mutation 198 décrite dans une seule famille américaine, mutation 217 décrite dans une famille suédoise, mutation 145 observée chez une patiente japonaise, mutation 105 identifiée au Japon et mutation 211 (E211D) présente chez un patient français (Kovacs, Trabattoni et al. 2002, Peoc'h, Levavasseur et al. 2012). Les insertions longues peuvent être à l'origine d'un tableau clinique et neuropathologique de SGSS.

### Clinique et neuropathologie

**Mutation 102<sup>Leu</sup>**. Cette mutation (substitution de la proline en leucine) est responsable de la forme ataxique du SGSS. La maladie débute vers 40 ans par un syndrome cérébelleux puis apparaissent ensuite des troubles oculomoteurs, des signes pyramidaux et des troubles intellectuels. L'évolution peut être longue pouvant aller jusqu'à une dizaine d'années. En plus des lésions habituelles observées dans les ESST, l'examen neuropathologique met en évidence la présence de plaques amyloïdes multicentriques, caractéristiques du SGSS, situées surtout dans le cervelet (Figure 12).



**Figure 13 : Plaques multicentriques dans le cervelet d'un patient atteint de SGSS.**

**Mutation 117<sup>Val</sup>.** Dans la majorité de familles porteuses de la mutation, la symptomatologie clinique varie d'un individu à l'autre (Mallucci, Campbell et al. 1999). Dans la famille alsacienne, cette symptomatologie s'enrichit de génération en génération : démence isolée dans les trois premières générations, associée, dans les autres, à un syndrome pyramidal et pseudobulbaire. L'examen neuropathologique révèle la présence de plaques uni ou multicentriques.

**Mutations 198<sup>Ser</sup> et 217<sup>Arg</sup>.** Ces mutations sont associées à une forme particulière de la maladie, caractérisée par la présence de plaques multicentriques avec dégénérescence neurofibrillaires identiques à celles vues dans la maladie d'Alzheimer.

**Mutation 145<sup>Stop</sup>.** Le tableau clinique est proche de celui observé dans la maladie d'Alzheimer et la durée d'évolution est lente, pouvant aller jusqu'à 21 ans. Les plaques amyloïdes détectées sont constituées d'une PrP tronquée.

**Mutation 105<sup>Leu</sup>.** Cette mutation a été observée uniquement au Japon. Dans un premier temps, les symptômes cliniques sont dominés par une paraparésie spastique et une labilité émotionnelle puis, dans un second temps, la démence apparait. Les lésions neuropathologiques dominant dans le lobe frontal (nombreuses plaques). Le cervelet est peu atteint.

### ***3. L'insomnie fatale familiale***

#### Epidémiologie

L'IFF est liée à une mutation du codon 178 associée, sur le même allèle, à un codon 129 codant une méthionine (Montagna, Gambetti et al. 2003). Elle a été rapportée pour la première fois en Italie, en 1985, par Médori et al.. Plusieurs familles ont été recensées en

France. L'âge moyen de début de maladie est de 50 ans. La durée moyenne de la maladie est de 14 mois avec des extrêmes allant de 6 à 32 mois.

### Clinique et neuropathologie

La maladie est caractérisée par l'association d'une insomnie rebelle (avec rêves et hallucinations), de troubles végétatifs sévères (disparition des rythmes circadiens, hyperactivité sympathique, troubles sphinctériens), de difficultés motrices et d'une démence qui peut être tardive. Les myoclonies sont rares. Les patients homozygotes MM ont une durée d'évolution courte (souvent inférieure à un an) avec principalement des troubles du sommeil et neurovégétatifs. Les patients hétérozygotes ont une durée d'évolution plus longue et présentent des signes neurologiques, ataxie ou dysarthrie, en début de maladie (Cortelli, Gambetti et al. 1999). L'EEG de veille est perturbé mais non caractéristique. L'EEG de sommeil note une disparition de l'activité delta, des fuseaux de sommeil et des complexes K (Sforza, Montagna et al. 1995). Il existe des phases anormales de sommeil paradoxal. La topographie des lésions de l'IFF souligne le rôle du thalamus dans la régulation du cycle veille-sommeil. Les noyaux antérieurs et dorso-médian du thalamus sont atrophiques. Ces anomalies peuvent être détectées lors d'une IRM multimodalités (Haik, Galanaud et al. 2008). A l'examen neuropathologique, la perte neuronale et la gliose touchent surtout le thalamus, la spongiose est quasiment absente.

Pour l'ensemble des cas génétiques, la fréquence des anomalies caractéristiques sur l'EEG et de la détection de la protéine 14-3-3 est variable en fonction de la forme. Un tracé EEG périodique et une protéine 14-3-3 positive sont fréquents en cas de mutation 200 mais, en revanche, rares en cas de SGSS ou d'IFF.

### c) Les ESST acquises

Les formes acquises sont rares avec des fréquences variables selon les pays. Elles sont toutes dues à une contamination accidentelle.

## **1. Le Kuru**

### Epidémiologie

Le Kuru est une affection neurologique décrite en 1957 par Gajdusek et Zigas (Gajdusek and Zigas 1959, Wilson, Zigas et al. 1959). Elle est la première encéphalopathie spongiforme humaine pour laquelle le mode de transmission a été découvert. L'isolement

géographique, les rites traditionnels des individus atteints de cette pathologie et l'efficacité de transmission de la scrapie par voie alimentaire ont fait suspecter une contamination interhumaine par voie orale (Gajdusek 1977). Cette découverte valut le prix Nobel de médecine au Dr Gajdusek en 1976 et souligne pour la première fois chez l'homme le caractère transmissible et infectieux de ces maladies.

L'épidémie a principalement touché les individus appartenant au groupe culturel et linguistique des Foré de Papouasie Nouvelle-Guinée et plus accessoirement aux sujets issus de vallées distantes mais mariés et intégrés aux familles Foré. Elle a représenté jusqu'à 50% des causes de décès dans la région. Au total, 2700 décès ont été répertoriés, avec plus de 200 morts par an à la fin des années 1950. A la fin des années 1990, le nombre de décès par année a chuté à 6 et aucun cas n'a été identifié depuis 2004 (Collinge, Whitfield et al. 2006). Selon la tradition orale, les premiers cas seraient apparus vers 1920. La nette prédominance des cas parmi les femmes et les jeunes enfants (des deux sexes), et seulement 2% de cas chez des adultes de sexe masculin ainsi que l'isolement géographique de ces communautés, a permis aux médecins en charge de l'enquête épidémiologique de soupçonner les rites culturels comme étant à l'origine de l'épidémie (Alpers 1987, Alpers and Kuru Surveillance 2005). La transmission de la maladie était due aux rites funéraires cannibales, impliquant la consommation d'organes infectieux de sujets eux-mêmes décédés de Kuru. Les femmes et les enfants consommaient les viscères et le cerveau, hautement infectieux, tandis que les muscles, faiblement infectieux, étaient réservés aux hommes. De plus, les hommes (contrairement aux enfants) se tenant éloigné des préparatifs, limitaient ainsi leur exposition à d'éventuels tissus infectés. L'incidence différente selon le sexe et l'âge a pu être expliquée par cette différence d'exposition et renforcée par le fait que, chez les jeunes enfants, le risque d'infection était similaire chez les garçons et les filles (Huillard d'Aignaux, Cousens et al. 2002). La susceptibilité du Kuru en fonction du génotype au codon 129 a été étudiée chez les Foré. Comme pour la MCJ sporadique, l'homozygotie MM semble être un facteur de susceptibilité. La comparaison de la fréquence des trois génotypes entre un groupe de patients atteint de Kuru et un groupe non affecté par le Kuru au moment de l'épidémie (1957-1959) et n'ayant pas développé la maladie par la suite a montré une répartition significativement différente. Dans le deuxième groupe, aucun patient n'était homozygote MM, suggérant que les homozygotes MM (plus sensible au Kuru) avaient été décimés par l'épidémie de Kuru (Lee, Brown et al. 2001). Cependant, la répartition des génotypes MM, MV et VV du groupe des Foré 30 à 35 ans après l'épidémie de Kuru (population pouvant représenter la population



existante de Foré avant le début de l'épidémie) n'était pas différente de celles observées dans les populations britannique et américaine (Lee, Brown et al. 2001).

Aucun cas n'existe pour les sujets nés après 1959 alors que le cannibalisme fut interdit en 1956. Il est donc possible que les 9 cas de Kuru survenus chez les sujets nés entre 1956 et 1959 sont dus à des contaminations isolées (pratique du cannibalisme malgré l'interdiction ou contamination par le sol sur lequel les repas rituels étaient préparés) (Collinge, Whitfield et al. 2006). La connaissance de cette date de fin d'exposition a permis l'étude et la modélisation de la période d'incubation du Kuru en fonction de différents facteurs tels que l'âge d'exposition, le sexe et le génotype au codon 129. Il résulte de ces études que la période moyenne d'incubation a été estimée entre 10,3 et 13,2 ans et que le 90<sup>ème</sup> percentile, pour le scénario le plus pessimiste, est de 27 ans (Huillard d'Aignaux, Cousens et al. 2002). La plus longue période d'incubation observée pour le Kuru est de 51 ans (Collinge, Whitfield et al. 2006). La période d'incubation était plus courte chez les femmes mais reflètent, selon les auteurs, les hauts niveaux d'exposition des femmes à l'agent infectieux. L'âge d'exposition n'avait aucune influence sur la période d'incubation. Il a été rapporté que la durée moyenne de la maladie était plus courte chez les jeunes patients atteints de Kuru (15 mois d'évolution pour les adultes et 9 mois chez les enfants et les adolescents) (Alpers 1964). En revanche, la période d'incubation variait selon le génotype au codon 129, plus longue chez les individus hétérozygotes MV (Collinge, Whitfield et al. 2006).

### Clinique et neuropathologie

Le tableau clinique et l'évolution étaient stéréotypés durant moins d'un an. L'évolution a pu être séparée en 3 phases : la phase ambulatoire, la phase sédentaire et la phase terminale. La phase ambulatoire était marquée par une ataxie cérébelleuse, un tremblement et des troubles oculomoteurs. Les fonctions intellectuelles étaient peu atteintes, seuls de légers troubles de la mémoire étaient relevés, si bien que la maladie était reconnue dès les premiers signes par le sujet touché lui-même (Alpers and Kuru Surveillance 2005). Deux à trois mois plus tard, la phase sédentaire se manifestait durant laquelle le patient ne pouvait plus se tenir debout, présente un strabisme, une rigidité, des myoclonies et un syndrome pseudobulbaire. A ce stade, la démence progressait et s'associait souvent à une labilité émotionnelle. La phase terminale, proche du mutisme akinétique, survenait après 3 à 9 mois d'évolution. Il n'y avait aucune anomalie biologique. Les EEG en fin d'évolution montraient un ralentissement avec une désorganisation générale du tracé. Les lésions neuropathologiques révélaient une atrophie vermieuse, une prolifération astrogliale, une

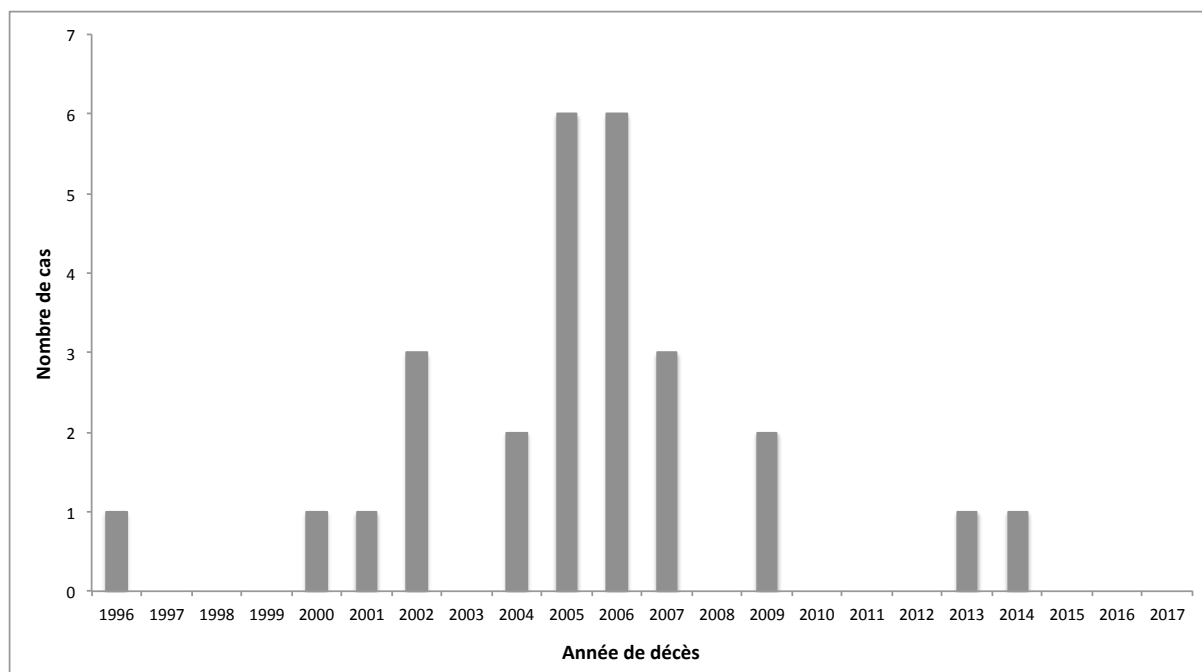
spongieuse, une perte neuronale intense et la présence de plaques amyloïdes (plaques de type Kuru), situées dans le cortex cérébelleux et le sous-cortex, dans trois quarts des cas.

## 2. *La variante de la MCJ*

### Epidémiologie

La mise en place de la surveillance épidémiologique des ESST en Europe dès 1992 a permis aux britanniques d'identifier, dès 1994, puis d'annoncer en 1996, l'émergence d'une forme nouvelle de MCJ : la variante de la MCJ ou vMCJ (Will, Ironside et al. 1996). Des arguments d'ordre épidémiologique et expérimental ont permis d'établir le lien entre la vMCJ et l'épidémie d'ESB qui sévissait à l'époque au Royaume-Uni. Au niveau expérimental, des similitudes microbiologiques (même caractéristique de souche) et biochimiques entre les agents responsables des formes vMCJ et ESB ont été mises en évidence (Collinge, Sidle et al. 1996, Lasmezas, Deslys et al. 1996, Bruce, Will et al. 1997). Les arguments épidémiologiques résidaient dans l'apparition d'une forme nouvelle d'ESST, 10 ans après le début de l'ESB, dans le pays le plus touché par cette nouvelle maladie animale et dans le fait que les patients touchés étaient beaucoup plus jeunes que les cas habituels de sMCJ. Depuis l'annonce des premiers cas, 178 cas ont été recensés au Royaume-Uni. Parmi les autres pays touchés, c'est en France que l'on recense le plus de cas, avec 27 cas identifiés et aucun décès relevé depuis 2014. Dans les autres pays, le nombre de cas est inférieur à cinq, avec parfois un seul cas identifié (Japon, Arabie Saoudite et Taiwan). Un cas de vMCJ est par convention, attribué au pays dans lequel la maladie a débuté. Ainsi, on peut séparer les pays ayant recensé des cas en deux groupes. Les pays pour lesquels la contamination a bien eu lieu dans le pays où a commencé la maladie, c'est le cas pour les Pays-Bas, l'Italie, l'Espagne, le Portugal, l'Arabie Saoudite, le Japon et la France, à l'exception d'un cas (possible contamination au Royaume-Uni). Les pays pour lesquels la contamination a probablement eu lieu dans un autre pays (le plus souvent au Royaume-Uni) comme les Etats-Unis où 2 des 4 cas observés ont résidé au Royaume-Uni entre 1980 et 1996 pour une période de plus de 6 mois, le Canada (1 cas sur deux) et l'Irlande (pour 2 de leurs 4 cas). La contamination par voie alimentaire est l'hypothèse la plus probable. En admettant cette hypothèse, la répartition géographique des cas en dehors du Royaume-Uni plaide en faveur d'une contamination à partir de dérivés bovins provenant de ce pays via les exportations. L'ignorance de la date précise de l'exposition des patients à l'agent infectieux, probablement entre 1980 et 1995, a rendu difficile les essais de modélisation de la période d'incubation de la maladie qui a pu être

évaluée entre 1980 et 1995 (Cooper and Bird 2002). Des études de prédiction sur le nombre de cas ont été réalisées et ne prévoyaient pas plus de 600 cas pour le Royaume-Uni et, pour la France, au moment de l'étude, alors que seulement 6 cas avaient été observés, pas plus de 33 cas (d'Aignaux, Cousens et al. 2001, Valleron, Boelle et al. 2001, Cooper and Bird 2003, Chadeau-Hyam and Alperovitch 2005). Sur les 27 cas français, l'âge moyen au début de maladie est de 36,0 ans (extrêmes 17,9 et 57,4) et la durée moyenne de la maladie de 15,4 mois (SD=5,6). La vMCJ comme le Kuru, est liée à une contamination par voie orale. Pour le Kuru, les estimations de la période d'incubation avaient permis de conclure que 90% des cas étaient survenus 21 à 27 ans après l'exposition. Pour la vMCJ, l'exposition à l'agent bovin a eu lieu entre 1980 et 1996. Il est donc possible de penser qu'à ce jour, 21 ans après la fin de l'exposition, le nombre de cas à venir sera limité. La nette diminution du nombre de cas au Royaume-Uni depuis 1999 et le fait qu'aucun cas ne soit apparu, en France, depuis 2012 sont des arguments supplémentaires pour penser que le plus grand nombre de cas primaires de vMCJ a déjà été observé. Cependant, la vMCJ reste une inquiétude pour la santé publique, avec la découverte de 3 cas cliniques de vMCJ post-transfusionnels (2 cas en 2003 et un cas en 2004) au Royaume-Uni. La contamination s'est possiblement faite par le biais de transfusions de sang non déleucocyté (Llewelyn, Hewitt et al. 2004). En France, aucun cas n'a été observé, mais trois patients ayant débuté leur maladie en 2004, étaient donneurs de sang (Brandel 2006). De plus, les résultats d'une étude récente ayant examiné 32 441 appendices permettent d'estimer qu'une proportion non négligeable de la population britannique (1 personne sur 2000) pourrait être porteuse asymptomatique de l'agent de la vMCJ, (Hilton, Ghani et al. 2004, Gill, Spencer et al. 2013).



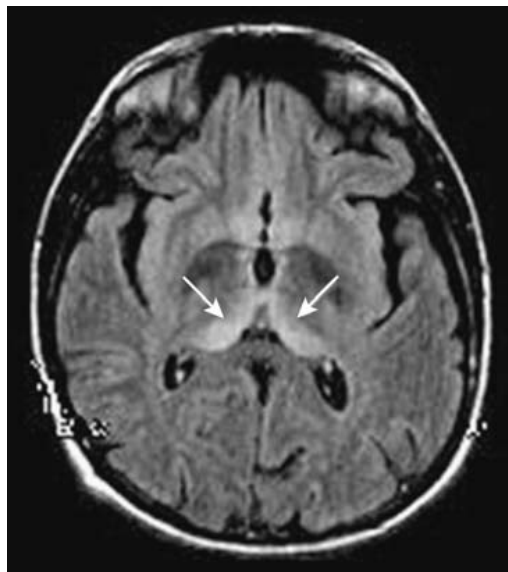
**Figure 14 : Représentation du nombre de cas de vMCJ en France de 1996 à 2017. Données du Réseau National de Surveillance des Maladies de Creutzfeldt-Jakob.**

### Clinique

La vMCJ a des caractéristiques particulières qui ont permis son identification (Will, Zeidler et al. 2000). Les patients atteints sont plus jeunes que dans la forme sporadique de la maladie. Les premiers symptômes, pouvant précéder de plusieurs mois les signes neurologiques, sont très peu spécifiques et rendent la suspicion diagnostique difficile. Deux types de symptômes peuvent être observés : des symptômes psychiatriques ou des symptômes douloureux. Les troubles du comportement d'allure psychiatrique sont pratiquement constants et souvent inauguraux. Il peut s'agir de symptômes anxieux ou dépressifs souvent sévères pouvant conduire à l'isolement, au retrait sur soi ou même à l'incurie. De véritables états délirants, des illusions ou des hallucinations ont été également observés. Moins fréquentes, les douleurs ou les dysesthésies sont de topographie variable pouvant toucher les membres ou le visage. Elles sont souvent pénibles et résistantes aux antalgiques et précèdent, suivent ou coïncident avec l'apparition des troubles comportementaux. Ces troubles apparaissent quelques mois avant les signes neurologiques. Les premiers signes neurologiques sont l'ataxie cérébelleuse et le syndrome pyramidal. D'autres anomalies apparaissent ensuite : syndrome extrapyramidal, mouvements involontaires et anomalies oculomotrices ainsi que la détérioration mentale. Les myoclonies sont discrètes ou absentes. L'évolution va ressembler

ensuite à celle des autres formes de maladies à prions avec aggravation des signes et apparition d'un état de mutisme akinétique.

L'aspect de l'IRM diffère de celui que l'on décrit dans la sMCJ avec l'observation d'hypersignaux thalamiques, en séquence T2, FLAIR ou de diffusion, siégeant dans le pulvinar (« pulvinar sign ») ou dans le pulvinar et le noyau dorsomédian (« hockey stick sign ») (Zeidler, Sellar et al. 2000) (Figure 13). Des hypersignaux du pulvinar peuvent coexister avec des hypersignaux striataux. Ils n'ont alors de valeur diagnostique pour une vMCJ que si l'intensité des hypersignaux dans le pulvinar est plus marquée que dans les striata (Haik, Brandel et al. 2002).



**Figure 15 : Aspects IRM au cours de la vMCJ.**

Sur la séquence FLAIR, un hypersignal typique des pulvinaires (pulvinar sign) est observé. Il est associé à un hypersignal des noyaux dorsomédians du thalamus donnant un aspect en « batte de hockey » (hockey stick sign).

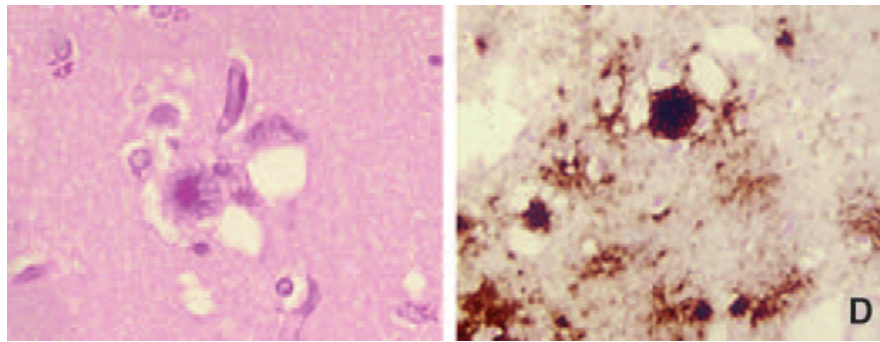
L'EEG est peu contributif pour le diagnostic positif de vMCJ : il n'y a pas de tracé périodique ni de complexes triphasiques en tous cas au début de l'évolution de la maladie ; le tracé est lent et s'appauvrit progressivement (Will, Zeidler et al. 2000).

Comme dans la forme sporadique de la maladie, l'examen du LCR est le plus souvent normal, la protéinorachie est inférieure à 1g/l et le nombre de cellules inférieur à 10 cellules/mm<sup>3</sup>. La détection de la protéine 14-3-3 est moins fréquente qu'en cas de sMCJ, avec une sensibilité égale de 50% (Green, Thompson et al. 2001).

L'agent de la vMCJ peut être identifié dans les tissus lymphoïdes tels que les amygdales pharyngées. La biopsie d'amygdale a donc une valeur diagnostique importante en cas de vMCJ puisque la PrP<sup>res</sup> peut être mise en évidence par immunocytochimie (marquage positif des follicules à centre clairs) ou par Western Blot après digestion à la protéinase K. Cependant, cet examen invasif n'est pas dénué de risque, dont les plus fréquents sont l'hémorragie et la pneumopathie d'inhalation.

### Neuropathologie

La lésion caractéristique de la vMCJ est la présence de plaques de type Kuru dans l'isocortex, les noyaux gris centraux et le cervelet dont certaines sont entourées de vacuoles donnant un aspect en marguerite (plaques florides) (Figure 14). Ces plaques ont parfois un aspect multicentrique ; elles sont associées à des dépôts synaptiques, granulaires, focaux et périvasculaires. Les lésions de gliose et spongiose sont diffuses et prédominent dans le cortex occipital, le striatum et le thalamus.



**Figure 16 : Plaques florides.**

A gauche : coloration à l'hématoxyline-éosine

A droite : immunomarquage de la PrP

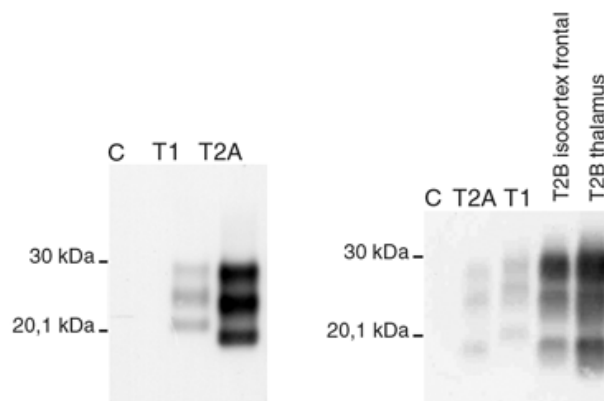
### Influence de la génétique

L'étude du gène *PRNP* chez les patients atteints de vMCJ avait jusqu'alors montré que tous les patients testés possédaient le même fond génétique. La vMCJ ne semblait toucher que les individus homozygotes MM au codon 129. Cette particularité est actuellement toujours vraie pour les cas français de vMCJ mais, récemment, un cas britannique hétérozygote MV est décédé d'une vMCJ certaine en début d'année 2016 (Mok, Jaunmuktane et al. 2017). Il se pourrait donc que ce cas hétérozygote annonce la deuxième vague de cas de vMCJ si, comme dans le cas du Kuru l'hétérozygotie au codon 129 s'associe à de plus longues périodes

d'incubation. Il est possible que les cas hétérozygotes apparaissent plus tardivement en France, puisque l'étude comparative des cas britanniques et français en fonction de l'année de début de maladie, a fait apparaître un décalage temporel d'environ cinq ans entre le pic d'incidence des cas homozygotes britanniques et français (Brandel 2006). Ce décalage est explicable par une exposition retardée, d'environ 5 ans, de la population française aux dérivés bovins contaminés (Chadeau-Hyam, Tard et al. 2003). Rappelons cependant que le premier cas français a été rapporté en 1996.

### Aspect moléculaire

L'uniformité des signes cliniques et évolutifs de la vMCJ sont en faveur d'une seule souche de prion, différente des autres souches humaines. L'étude de Collinge et al. en 1996 montre clairement un profil particulier en Western Blot en cas de vMCJ (Figure 15) : une bande biglycosylée prédominante par rapport aux bandes correspondant aux formes mono et non glycosylée (Collinge, Sidle et al. 1996).



**Figure 17 : Classification du profil de migration en Western Blot de la PrP<sup>res</sup>.**

Les types 1 et 2A sont retrouvés dans la MCJ sporadique, le type 2B uniquement dans la variante de la MCJ.

### ***3. Les maladies de Creutzfeldt-Jakob iatrogènes***

Les maladies de Creutzfeldt-Jakob iatrogènes (MCJ iatrogènes) sont, par définition, provoquées par une procédure médicale. On distingue deux groupes en fonction du site de contamination :

- MCJ iatrogènes liées à une contamination cérébrale directe ou de proximité cérébrale

- MCJ iatrogènes périphériques lors d'injections périphériques sous-cutanées ou intramusculaires

### Epidémiologie

#### **MCJ iatrogène d'inoculation cérébrale directe ou de proximité cérébrale.**

Le premier cas, publié en 1974, était celui d'une femme de 55 ans qui avait subi une greffe de cornée 18 mois avant le début des troubles (Duffy, Wolf et al. 1974). Le greffon avait été prélevé chez une patiente décédée d'une MCJ confirmée par autopsie. La receveuse développa la maladie après une incubation silencieuse de 18 mois et le décès survint 8 mois après le début des signes. L'autopsie reconnut la MCJ et l'inoculation d'un homogénat cérébral au chimpanzé confirma son caractère transmissible. Par la suite, deux autres cas de MCJ après greffe de cornée ont été rapportés (Lang, Heckmann et al. 1998). En 1977, une MCJ fut diagnostiquée chez deux patients épileptiques de 23 et 17 ans qui avaient eu 16 et 20 mois plus tôt un repérage stéréotaxique avec 8 électrodes. Deux des électrodes profondes avaient été utilisées respectivement deux et trois mois auparavant chez une patiente atteinte de MCJ en vue de localiser et traiter ses myoclonies. Les électrodes avaient été stérilisées, par les procédés de stérilisation usuelle à l'époque (benzène, alcool à 70° et vapeurs de formaldéhyde). Elles ont été conservées et implantées plus tard dans le cerveau d'un primate qui mourut d'une ESST typique 18 mois plus tard. Cette expérience apporte la preuve de la contamination et de la résistance de l'agent infectant. D'autres cas de contaminations par des instruments de neurochirurgie, avec des délais d'incubation de 15 à 20 mois ont été rapportés ensuite (Will and Matthews 1982). Cependant, la majorité des cas iatrogènes par contamination cérébrale ou de proximité cérébrale est secondaire à des greffes de dure-mère prélevée sur les cadavres. Des cas ont été rapportés dans le monde entier et en 2012 le nombre total de cas était de 228 avec une période d'incubation moyenne de 12 ans (extrêmes de 1,3 à 30 ans) (Brown, Brandel et al. 2012). C'est au Japon, où les greffes de dure-mère ont été le plus fréquemment utilisées, que l'on dénombre le plus grand nombre de patients atteints avec 132 cas (Update CJD dura matter Japan). En France, depuis 1992, 14 cas ont été recensés. La majorité des greffes provenaient de deux centres spécialisés en Allemagne : Lyodura® manufacturée par Braun (Melsungen) et Tutoplast® manufacturée par Biodynamics. Les dures-mères avaient été prélevées sur des cadavres, traitées au peroxyde d'hydrogène à 10% puis irradiées à la dose de 25 KGy avant d'être lyophilisées et conditionnées. En France, les greffes de dure-mère d'origine humaine ont été abandonnées en 1994 au profit des greffons synthétiques.



### **MCJ iatrogène d'inoculation périphérique.**

La contamination par voie périphérique est majoritairement due à l'injection d'hGH et pour 5 cas à l'injection de gonadotrophines pituitaires (hGN), elles aussi d'origine humaine.

Les hGN étaient administrées dans le but d'induire l'ovulation. Sur les 1589 personnes ayant reçu un traitement par gonadotrophines d'origine humaine entre 1967 et 1985, 5 cas sont apparus entre 1987 et 1991 et tous avaient été traités en Australie (parmi les 5 cas, un cas était britannique). Les périodes d'incubation observées s'échelonnaient entre 12,0 et 15,3 ans. Ces observations laissent penser qu'une seule et unique contamination est à l'origine de cette forme. De plus, le risque de contamination calculé pour les receveurs de gonadotrophines est faible (Boyd, Klug et al. 2010).

Le traitement par hGH était administré, dans la majorité des cas, à des patients atteints de nanisme hypophysaire. La France, le Royaume-Uni et les États-Unis sont les pays les plus touchés par la MCJ iatrogène liée à l'hGH, avec respectivement, actuellement, 119, 77 et 32 cas. Les premiers cas ont été identifiés aux États-Unis en 1984 puis au Royaume-Uni. C'est en 1989 que les premiers cas français furent identifiés. En France, la durée de la maladie est en moyenne de 17,2 mois (extrêmes 3 à 95 mois) et l'âge moyen au moment de l'apparition des premiers signes est 26,5 ans (9,9-45,5 ans). Une description détaillée du mode de fabrication de l'hGH, de son implication et relation avec la MCJ est effectuée dans la troisième section de l'introduction. Les aspects épidémiologiques de la cohorte française ont fait l'objet d'une publication (voir partie résultats).

### Clinique

#### **MCJ iatrogène d'inoculation cérébrale directe ou de proximité cérébrale.**

La symptomatologie est plus souvent marquée par une ataxie cérébelleuse inaugurale suivie rapidement par l'apparition des troubles intellectuels puis des autres signes neurologiques habituels: myoclonies, troubles visuels et de l'oculomotricité puis état de mutisme akinétique terminal (Brown, Preece et al. 2000).

#### **MCJ iatrogène d'inoculation périphérique.**

Le tableau clinique des formes iatrogènes par inoculation périphérique est stéréotypé, rappelant ce qui est observé dans le kuru. La maladie débute très souvent par une ataxie cérébelleuse, des troubles de l'oculomotricité et notamment un nystagmus. Il existe rapidement des troubles du comportement (euphorie, indifférence), un tremblement régulier, des céphalées, une polyphagie avec souvent une prise de poids (Billette de Villemeur, Deslys

et al. 1996). Après quelques mois d'évolution, la démence survient ainsi que les signes pyramidaux et les myoclonies quand elles sont présentes. La phase terminale de la maladie est marquée par un état grabataire et souvent de mutisme akinétique.

### Neuropathologie

#### **MCJ iatrogène d'inoculation cérébrale directe ou de proximité cérébrale.**

Les lésions neuropathologiques sont semblables à celles observées chez les cas de sMJC. Cependant, dans un tiers des cas japonais, il existe des caractéristiques atypiques : plaque de type kuru, signature moléculaire intermédiaire (entre le type 1 et 2) de la PrP en Western blot. Les expériences de transmission ont révélé que l'inoculation d'une souche VV2 ou MV2 à des souris knock-in induisaient deux phénotypes distincts en fonction du génotype au codon 129 du receveur. Lorsque le receveur était homozygote VV, il était observé des dépôts de type focaux (« plaques like ») et une accumulation de PrP<sup>Sc</sup> de type 2 comme ce qui est observé pour les cas sMCJ VV2. En revanche, lorsque le receveur était homozygote MM, des plaques amyloïdes de type kuru et un fragment de PrP intermédiaire (20kDa) entre le type 1 et le type 2 ont été retrouvés. Des différences au niveau du phénotype clinique étaient également observées entre les cas présentant des plaques et ceux n'en présentant pas (Kobayashi, Parchi et al. 2015).

#### **MCJ iatrogène d'inoculation périphérique.**

L'examen neuropathologique révèle les lésions habituelles des ESST, avec une perte neuronale importante, une spongiose et une gliose (Billette de Villemeur, Gelot et al. 1994, Fournier, Escaig-Haye et al. 1995, Billette de Villemeur, Deslys et al. 1996). L'élément le plus caractéristique est la présence de nombreuses plaques amyloïdes, soit isolées et unicentriques de type kuru, soit multacentriques de type SGSS (Billette de Villemeur, Gelot et al. 1994).

### Influence de la génétique

#### **MCJ iatrogène d'inoculation cérébrale directe ou de proximité cérébrale.**

La possible influence du génotype au codon 129 a été évaluée parmi les cas secondaires à une greffe de dure-mère. Sur 43 cas, provenant de 11 pays différents, aucune différence significative n'a été trouvée concernant la période d'incubation en fonction du génotype : la période d'incubation moyenne chez les huit hétérozygotes était de 94 mois (extrêmes de 34 à 197 mois) alors que chez les 35 homozygotes, elle était en moyenne de 108

mois (extrêmes de 16 à 195) (Brown, Preece et al. 2000). De plus, l'évaluation de l'influence de ce polymorphisme sur la population japonaise, population la plus touchée, n'est pas possible puisque le génotype MM est le plus largement répandu (plus de 97%) dans cette population, comparé aux populations européennes (Tableau 5).

Category	MM	VV	Homozygotes	Heterozygotes
Population				
Healthy Caucasian, %†	40	10	50	50
European, with sporadic CJD, %	67	17	84	16
Healthy Japanese, %	92	0	92	8
Japanese, with sporadic CJD, (%)	97	1	98	2

**Tableau 5 : Répartition du génotype au codon 129 parmi les populations européenne et japonaise saines ou atteintes de MCJ iatrogène secondaire à une greffe de dure-mère.**

D'après Brown et al.2012

#### **MCJ iatrogène d'inoculation périphérique.**

L'étude du codon 129 sur les 4 cas certains australiens secondaires à un traitement par hGN n'a pas permis de conclure quant à une possible influence du codon 129 ; 2 cas étaient homozygotes MM, un cas homozygotes VV et le quatrième cas était hétérozygote MV. En revanche, l'étude du codon 129 parmi les cas de MCJ iatrogène liés au traitement par hGH a permis de mettre en évidence le rôle du polymorphisme au codon 129 dans :

- la susceptibilité des individus homozygotes (MM et VV) (Deslys, Marce et al. 1994, Jaegly, Boussin et al. 1995, Billette de Villemeur, Deslys et al. 1996, Deslys, Jaegly et al. 1998, Brandel, Preece et al. 2003)
- la variabilité de la période d'incubation (Huillard d'Aignaux, Costagliola et al. 1999)

*Introduction*

ESST	Génotype	Age moyen (ans)	Evolution (mois)	Fréquence (%)	Prédominance de l'atteinte cérébrale	Type de dépôt de PrP	Signes cliniques
<b>sMCJ</b>				<b>80-90</b>			
	MM1	66	4	51	Cortex cérébral (lobe occipital)	Synaptique, périvacuolaire	Démence, myoclonies
	MV1	63	5	5	Cortex cérébral (lobe occipital)	Synaptique, périvacuolaire	Démence, myoclonies
	VV1	40	15	1	Cortex cérébral (lobe frontal), striatum	Synaptique	Démence
	MM2-C (cortical)	64	16	3	Cortex cérébral	Périvacuolaire	Démence
	MM2-T (thalamique)	52	16	3	Thalamus	Périvacuolaire	Ataxie, insomnie
	MV2	60	17	13	Cortex entorhinal, striatum, thalamus, hippocampe	Plaques de type kuru	Démence
	VV2	61	7	13	Cervelet, striatum, thalamus, hippocampe	Pré-plaques, dépôts focaux	Ataxie, démence
<b>Acquises</b>				<b>&lt; 1</b>			
vMCJ	MM2b	36	15	< 1	Thalamus, pulvinar, cortex cérébral (lobe occipital), cervelet	Plaques florides	Ataxie, démence, myoclonies, troubles psy.
MCJ Iatrogène (GH)	***	26	17	< 1	Cortex, cervelet, striatum	Plaques de type Kuru	Ataxie, démence, myoclonies
<b>Génétiques</b>				<b>10</b>			
MCJ génétiques	***	***	***	9	***	***	***
SGSS		55	66	1	Cervelet	Plaques amyloïdes	Ataxie, démence
IFF		50	14	1	Thalamus	Synaptique	Insomnie, troubles neurovégétatifs, démence, myoclonies

**Tableau 6 : Tableau résumé des différents sous-types et phénotypes clinico-pathologique des ESST humaines.**

Références tableau 6 :(Will, Ironside et al. 1996, Parchi, Giese et al. 1999, Collins, McLean et al. 2001, Ironside, Ritchie et al. 2005, Brandel, Heath et al. 2009, Gambetti, Cali et al. 2011)

#### d) Techniques de détection de la PrP

Deux techniques récentes de détection de la PrP, utilisant des modèles acellulaires, ont été mises au point : la Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) et la Real Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC).

##### 1. *Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)*

La PMCA a ouvert la voie à la production *in vitro* de protéines prions infectieuses (Castilla, Saa et al. 2005, Castilla, Saa et al. 2006). Cette technique consiste à soumettre un mélange contenant de très faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> (amorce) et un large excès de PrP<sup>c</sup> (substrat), à des cycles composés de phase d'incubation et de sonication (ultrasons). La source de PrP<sup>c</sup> utilisée comme matrice de la PMCA est généralement un extrait cérébral. Chaque cycle permet durant la phase d'incubation (30 min), une conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>, alors que la phase de sonication (30s) fragmente les agrégats de PrP<sup>sc</sup>, et multiplie le nombre d'unités de conversion. On obtient ainsi une amplification exponentielle de la PrP<sup>sc</sup>. La conséquence immédiate de ce système est de pouvoir amplifier de très faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> et donc d'augmenter considérablement la sensibilité de détection.

La PMCA est une technique prometteuse pour le diagnostic notamment pour les formes dans lesquelles de faibles quantités de PrP<sup>sc</sup> dans le sang circulant peuvent être détectées. Une étude récente, portant sur la détection de la PrP<sup>sc</sup> dans le plasma de patients atteints de vMCJ montre une sensibilité de détection de l'agent de 100% avec une détection également possible chez les patients en phase préclinique plusieurs années avant les premiers symptômes (Bougard, Brandel et al. 2016). Une autre étude utilisant également la PMCA a révélé la présence de PrP<sup>sc</sup> dans les urines de patients atteints de vMCJ avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 100% (Moda, Gambetti et al. 2014).

##### 2. *Quaking-Induced Conversion (QuIC) et Real Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC)*

La QuIC est une méthode d'amplification, dans laquelle la phase de sonication est remplacée par une phase d'agitation (Atarashi, Wilham et al. 2008). Elle utilise de la PrP

recombinante (rPrP<sup>c</sup>) comme substrat. Cette technique est capable de détecter une quantité aussi faible que 100ag de PrP<sup>sc</sup>,

La RT-QuIC permet une lecture en temps réel de l'agrégation de la rPrP<sup>c</sup> induite par la PrP<sup>sc</sup> en présence de thioflavine T par un suivi des variations de la fluorescence en microplaques (Wilham, Orru et al. 2010). Deux études ont montré que cette technique permet de discriminer, sur des prélèvements de LCR, avec une sensibilité de plus de 80 %, et une spécificité de 100 % pour l'une et, une sensibilité de 91% et une spécificité de 98% pour l'autre, les patients présentant une maladie à prions parmi des patients témoins ou atteints d'autres maladies (Atarashi, Satoh et al. 2011) (McGuire, Peden et al. 2012). Récemment, Zanusso et al. ont mis en évidence de la PrP<sup>sc</sup> dans les brossages de la muqueuses olfactive de patients atteints de sMCIJ avec une sensibilité de 77% et une spécificité de 100% (Orru, Bongianni et al. 2014).

### **III. L'hormone de croissance**

#### **A. Aspects historiques**

Les premiers travaux s'intéressant au rôle physiologique de l'hypophyse sont attribués à Pierre Marie en 1886, qui observa un élargissement de la glande pituitaire chez les patients atteints d'acromégalie. En 1887, Minkowski, endocrinologue allemand, suggère que cette glande est le lieu de production d'une hormone favorisant la croissance. Dans les années 1900, Cushing, mena les premières expériences visant à déterminer les fonctions de l'antéhypophyse sur la croissance chez l'homme, la souris et le chien. Il décrivit les relations entre l'hyperactivité hypophysaire et le gigantisme, et entre l'insuffisance hypophysaire et le nanisme (Cushing 1909, Crowe 1910). En 1921, Evans et Long montrèrent que la croissance des rats nourris avec des extraits d'hypophyse bovine était accélérée (Evans 1921). Peu après, Smith nota que l'administration d'extraits antéhypophysaires aux rats hypophysectomisés restaurait leur croissance (Smith 1927, Smith, Greenwood et al. 1927). Outre cet effet, les extraits d'hypophyses bovines avaient un effet anabolisant, se traduisant par une réduction de l'excrétion urinaire d'azote, de calcium et de phosphore (Cuthbertson, Webster et al. 1940, Cuthbertson, Shaw et al. 1941). L'entité responsable, l'hormone de croissance (« Growth hormone », GH) a été isolée pour la première fois en 1944, par Li et Evans, à partir d'hypophyses de bovins (Li and Evans 1944). La purification de la GH ouvrait la voie vers un traitement efficace contre le nanisme. Malheureusement, l'hormone de

croissance bovine ne fut pas efficace sur la croissance chez l'homme, soulignant le caractère spécifique d'espèce de l'effet de l'hormone (Bennett, Weinberger et al. 1950). L'isolation de l'hormone de croissance humaine fut alors entreprise, à l'aide d'hypophyses humaines obtenues après autopsie ou après hypophysectomie de patientes atteintes de cancer du sein (Li and Papkoff 1956, Li 1957, Raben 1957). C'est ainsi qu'à partir de 1957, l'hormone de croissance d'origine humaine fut utilisée comme traitement de substitution chez les enfants présentant un déficit en hormone de croissance.

## B. Synthèse et mode d'action

La GH est synthétisée par les cellules somatotropes du lobe antérieur de l'hypophyse sous la forme d'une pré-hormone contenant un peptide signal de 26 acides aminés à l'extrémité N-terminale qui est supprimé lors de la sécrétion (Seeburg, Shine et al. 1977, Martial, Hallewell et al. 1979, Seeburg 1982). La GH mature est un polypeptide composé d'une seule chaîne non glycosylée (Li and Dixon 1971, Niall, Hogan et al. 1971). Il existe deux isoformes de GH de 20 et 22 kDa générées selon un processus d'épissage alternatif. La GH de 22 kDa comporte 191 acides aminés et représente la forme majeure de l'hormone circulante. La forme de 20 kDa est quasi identique à celle de 22k Da, seule la délétion des résidus aminés 32-46 différencie les deux formes. Une fois produite, la GH est stockée dans les granules de sécrétion des cellules somatotropes. Après déclenchement du signal de sécrétion (entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule), la GH est sécrétée directement dans la circulation générale et agit au niveau de ses tissus cibles par le biais de son récepteur. La libération de l'hormone a lieu de manière pulsatile dans toutes les espèces et est sujette à un contrôle neuroendocrine différent en fonction de l'espèce et du sexe (Jansson, Eden et al. 1985, MacLeod, Pampori et al. 1991).

A l'âge adulte, chez l'homme, le rythme ultradien se traduit par 4 à 5 pics journaliers, les plus importants s'établissent lors des premières phases de sommeil. Chez la femme, les concentrations sériques moyennes sont plus élevées que chez l'homme avec des pics de sécrétion beaucoup plus fréquents. Lors de la puberté, l'amplitude des pics de sécrétion de GH s'élève sans augmentation de fréquence et sans changement de clairance de la GH. A cette période de la vie, la GH joue un rôle dans la maturation des gonades et le développement des caractéristiques sexuelles secondaires chez les garçons (Stanhope, Albanese et al. 1992, Zachmann 1992). Chez les filles, la sécrétion de GH est corrélée à l'augmentation de la sécrétion de l'œstradiol. Le rôle de l'œstradiol a été démontré chez les patientes atteintes du

syndrome de Turner (déficit en œstrogènes). Sans supplémentation en œstrogènes, ces femmes atteignaient rarement une taille adulte standard (Lyon, Preece et al. 1985). La sécrétion de la GH s'effectue tout au long de la vie, mais décline avec l'âge dans les deux sexes se traduisant par une diminution de l'amplitude des pics sans perturbation de leur fréquence (Rudman, Kutner et al. 1981, Corpas, Harman et al. 1993, Martin, Yeo et al. 1997). Cette diminution hormonale conduit à une augmentation de la masse grasseuse corporelle corrélée à une réduction de la masse musculaire, de la masse osseuse et de la synthèse protéique (D'Costa, Ingram et al. 1993). La diminution de l'amplitude des pics, sans réduction de leurs fréquences, a été également observée chez les patients présentant une insuffisance staturale (Strobl and Thomas 1994).

### C. Indication thérapeutique

#### a) Déficit isolé et idiopathique en hormone de croissance

Le déficit en GH isolé est la pathologie pour laquelle une supplémentation en hormone de croissance est le traitement le plus adapté puisque, comme son nom l'indique, la carence ne concerne que la GH et n'est accompagnée d'aucune autre carence en hormones hypophysaires (Frasier and Lippe 1990, Laron and Butenandt 1991, Wilson 1992, Lippe and Nakamoto 1993). Le diagnostic est évoqué durant l'enfance lorsque la taille est inférieure à 2 déviations standard (DS) de la moyenne pour l'âge et le sexe. Il est confirmé par la mise en évidence d'une sécrétion de GH subnormale (<4 à 7 ng/ml) en réponse à une stimulation pharmacologique (clonidine, arginine, insuline, L-DOPA). L'administration de doses d'hormone se fait par voie sous cutanée et la posologie varie de 0,5 à 0,7 UI/kg/semaine (Bouhours-Nouet, Gatelais et al. 2006). Les injections quotidiennes sont recommandées en raison de leur plus grande efficacité sur la vitesse de croissance (Kastrup, Christiansen et al. 1983, Flodh 1987, Kikuchi, Sudo et al. 1988, Kearns, Kemp et al. 1991). La réponse au traitement est maximale durant les deux premières années de traitement puis une diminution dans la vitesse de croissance est ensuite observée, elle reste cependant supérieure à ce qu'elle aurait été sans traitement. Le traitement se poursuit jusqu'à l'obtention de la taille cible ou jusqu'à ce que la vitesse de croissance diminue à moins de 2,5 cm/an. Le gain statural est optimal lorsque le traitement est débuté avant l'âge 10 ans (Strobl and Thomas 1994).



### b) Panhypopituitarisme

Le panhypopituitarisme est une anomalie congénitale qui se traduit par un déficit en hormone de croissance, hormone lutéinisante (gonadotrophine), hormone adrénocorticotrope (ACTH) et thyroïdostimuline (TSH). Le syndrome d'interruption de la tige pituitaire constitue l'anomalie morphologique la plus fréquente (80%) (Bouhours-Nouet, Gatelais et al. 2006). La supplémentation en hormone de croissance est indiquée et est associée à des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes (stimulation de la croissance et du développement psychomoteur) et à des gonadotrophines (stimulation de la croissance au cours de la puberté et du développement des caractères sexuels secondaires (Strobl and Thomas 1994).

### c) L'irradiation crânienne

L'irradiation crânienne à forte dose (>40 grays) pour une tumeur du système nerveux central (médulloblastome, germinome) entraîne quasi constamment un déficit somatotrope. Les doses les plus faibles (18-24 grays) utilisées dans les leucémies, sont à l'origine d'un déficit dans plus de 50 % des cas. L'infléchissement statural ne se manifeste que 2 ans après l'irradiation (Rappaport and Brauner 1989, Melin, Adan et al. 1998). Un traitement de deux ans en GH chez les enfants pré-pubères est recommandé (Richards, Silverman et al. 1991).

### d) Le syndrome de Turner

Le syndrome de Turner est une affection génétique qui ne concerne que les filles et qui résulte de la perte partielle ou totale d'un des deux chromosomes X (Palmer and Reichmann 1976). Le syndrome de Turner est caractérisé par un faible poids de naissance, une petite taille à l'âge adulte, une obésité, un développement incomplet des ovaires conduisant à un faible taux d'œstradiol et une faible expression des caractères sexuelles secondaires (Rappaport and Sauvion 1989). L'insuffisance staturale dans le syndrome de Turner est partiellement due au niveau d'œstradiol subnormal. L'œstradiol est essentiel à la poussée de croissance à la puberté et permet la sécrétion pulsatile de GH chez les filles. L'hormone de croissance est présente chez les patientes atteintes du syndrome de Turner, mais les études montrent que les niveaux de sécrétion sont insuffisants ; faible concentration en GH sur 24 heures, diminution de la sécrétion nocturne et faiblesse de réponse de sécrétion lors de stimulations provoquées (Brook 1978, Butenandt 1980, Rappaport and Sauvion 1989, Zadik, Landau et al. 1992). L'administration de GH permet chez ces patientes une stimulation de leur

croissance (Rosenfeld 1989). Cependant, malgré la supplémentation, la vitesse de croissance observée chez les patientes atteintes du syndrome de Turner est moindre que celle observée chez les patients atteints de déficit isolé en hormone de croissance. Un traitement combinant la GH et une hormone androgène est recommandé ; la combinaison GH/œstradiol n'est pas aussi efficace (Rosenfeld 1989).

#### e) Le syndrome de Down ou trisomie 21

Le syndrome de Down est une anomalie congénitale causée par la présence d'un chromosome surnuméraire sur la 21<sup>ème</sup> paire. Cette pathologie induit notamment un retard mental, une microcéphalie, un retard de croissance ainsi que des pathologies cardiaques. Ces patients présentent un retard de croissance de l'enfance à la puberté avec défaut de sécrétion de la GH (Castells, Torrado et al. 1992). Les données expérimentales montrent, que la supplémentation en hormone de croissance, est efficace sur la stimulation de la croissance. Cependant, la question de l'intérêt du traitement par GH a été posée, puisque l'augmentation de la taille n'améliore pas la qualité de vie chez les patients atteints du syndrome de Down (Allen 1992).

#### f) La petite taille idiopathique (« idiopathic short stature » ISS)

La petite taille idiopathique se définit par une taille inférieure à 2 déviations standard (DS) de la moyenne pour l'âge et le sexe chez un enfant présentant un poids et une taille normaux à la naissance, une absence de déficit endocrinien (en particulier absence de déficit objectivé en GH), de pathologie osseuse, génétique ou organique (Lee 2006). Ainsi aucun de ces patients ne répondent strictement aux critères de déficit en GH mais leur croissance est inférieure à la normale. Ce groupe de patients est très hétérogène, incluant les petites tailles familiales et non familiales ainsi que les retards pubertaires simples. Les causes précises ne sont pas connues, cependant une origine génétique est envisagée (Huber, Rosilio et al. 2006, Jorge, Souza et al. 2007, Wit, Clayton et al. 2008). Les études de Lesage et al, ont démontré que le traitement par GH permettait une normalisation de la taille chez des enfants à priori non déficitaire en GH (Strobl and Thomas 1994, Wit, Reiter et al. 2008).

### g) L'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique est associée à un retard pubertaire, une réduction de la croissance pubertaire et une diminution de la durée de la croissance. La taille des enfants n'est pas restaurée par l'hémodialyse et la transplantation rénale n'a qu'un effet transitoire sur la croissance (Kleinknecht, Broyer et al. 1980). Un traitement en GH est donc indiqué.

### h) Le craniopharyngiome

Le craniopharyngiome est une tumeur bénigne qui se développe dans une région proche de l'hypophyse (région sellaïre). Elle est découverte souvent entre 5 et 14 ans (Thomsett, Conte et al. 1980). Elle se manifeste par différents symptômes tels des troubles de la vision, maux de tête et perturbations endocriniennes résultant de la compression de l'hypophyse. Après exérèse chirurgicale, le déficit antéhypophysaire (cassure staturale et retard pubertaire) est constant et de fait, un traitement par GH doit être mis en place (Tanner 1972).

### i) L'hypoglycémie néonatale

La GH a un effet hyperglycémiant en stimulant la glycogénolyse hépatique et en inhibant la pénétration du glucose dans les cellules. L'hypoglycémie néonatale ou chez le tout petit (définies arbitrairement par une glycémie <45mg/dl) représente la manifestation amenant au diagnostic de déficit en GH dans plus de 80% des cas à cette période de la vie (Huet, Carel et al. 1999). La symptomatologie est variable (hypotonie, somnolence, hypothermie, bradycardie) et peut aller jusqu'aux convulsions et au coma. Les hypoglycémies prolongées peuvent être à l'origine d'un retard moteur et intellectuel définitif. Si le déficit en GH est avéré après enquête étiologique, un traitement est alors mis en place.

## D. Méthode de purification

### a) Extraction de la GH par Li et Evans

La méthode d'extraction de l'hormone suivie par Li et Evans, en 1945, comporte 6 étapes :

- (1) Les hypophyses sont broyées et séchées avec de l'acétone refroidie (-10°). A partir d'un kilogramme d'hypophyses fraîches, 250 grammes de poudre sont obtenus. Cette poudre peut être conservée indéfiniment sans perte d'activité.
- (2) Immersion de la poudre dans une solution d'hydroxyde de calcium à pH 11,5 pendant 24 heures, puis abaissement progressif du pH jusqu'à 8,7, par ajout de CO<sub>2</sub>. Les composés insolubles de cette solution sont éliminés par centrifugation.
- (3) Adjonction de sulfate d'ammonium à l'extrait soluble issu des deux premières étapes. De cette étape, un précipité est récupéré, appelé fraction globulaire (« globulin fraction »).
- (4) Dissolution de la fraction globulaire dans une solution de chlorure de sodium.
- (5) Fractionnement par le sulfate d'ammonium, changement du pH et dialyse.
- (6) Précipitation isoélectrique pour purification de la GH (Li, Evans et al. 1945).

#### b) Préparation Wilhelmi

L'inconvénient de la première méthode décrite est le faible rendement de produit obtenu (environ 60 mg par kilo d'hypophyse). En 1948, Wilhelmi et al. mirent au point une nouvelle méthode de purification de la GH (Wilhelmi, Fishman et al. 1948). Les deux premières étapes sont identiques à celles de Li et Evans (broyage des hypophyses et utilisation de la solution de d'hydroxyde de calcium). Les fractions obtenues sont alors solubilisées dans du chlorure de potassium puis des précipitations successives dans l'éthanol (commençant à pH 8,5 jusqu'au pH 8,7) sont réalisées. Le composé est ensuite purifié par dialyse et lyophilisé. Par ce procédé, le rendement est de 3g par kilo d'hypophyse.

#### c) Préparation Raben

La méthode d'extraction de la GH par Raben, mise au point en 1957, diffère des deux précédentes puisqu'après séchage à l'acétone, l'extraction est suivie d'une étape de dissolution à l'acide acétique glacial (Raben 1957). Les travaux de Lazo-Wasem et al. ont comparé la stabilité des produits issus des différentes méthodes d'extractions, par solvant alcalin (méthode Li et Wilhelmi) ou par solvant acide (méthode Raben). Chacun des composés avait été dissous dans une solution alcaline et acide. Les produits issus des méthodes Li et Wilhelmi montraient une diminution de leur activité lorsqu'ils étaient dissous et administrés en solution acide. Ceux préparés par la méthode Raben ne présentaient pas de

perte d'activité qu'ils soient dissous et administrés en solution acide ou alcaline (Lazo-Wasem and Graham 1958).

Trois autres méthodes d'extraction ont été utilisées, avant 1977, pour fabriquer les lots d'hormone de croissance dérivant des méthodes Wilhelmi et Raben. Il s'agit des méthodes Ross, Parlow et Hartree (Tableau 7). La méthode de Ross fut utilisée par l'Institut Pasteur et est détaillée au paragraphe intitulé « extraction de l'hormone de croissance ».

#### d) Préparation Lowry

A partir de 1977, cette nouvelle méthode a été utilisée avec pour avantage d'être plus respectueuse de la composition et de la qualité de l'hormone. Les hypophyses ne sont plus séchées à l'acétone mais congelées. Lors de la phase de purification, des étapes de chromatographie sur colonne échangeuse d'ions et de gel-filtration sont ajoutées (Tableau 6).

<b>Nom de la méthode</b>	<b>Raben</b>	<b>Raben modifiée par Parlow</b>	<b>Hartree</b>	<b>Lowry (ou Lumley-Jones)</b>
<b>Date d'utilisation</b>	A partir de 1958	1958 (?) jusqu'en 1977	A partir de 1972	A partir de 1977
<b>Hypophysés</b>	Dans l'acétone	Dans l'acétone	Dans l'acétone	Congelées lyophilisées
<b>Etape de broyage</b>	Broyage dans l'acétone	Broyage dans l'acétone	Broyage dans l'acétone	Broyage en tampon phosphate pH 6,0
<b>Extraction précipitation</b>	Extraction par l'acide acétique  Traitement à l'éther  Traitement à l'éthanol 95%	Précipitation au sulfate d'ammonium 50%  Purification sur colonnes en faisant varier le pH et la force ionique	Dissolution en milieu salé  Précipitation fractionnée à l'acétate d'ammonium ou au sulfate-éthanol	Précipitation pH 6,0  Centrifugation (20,000g)  Précipitation isoélectrique en tampon phosphate (pH 4,9)
<b>Etapes de purification</b>	Dialyse	Dialyse  Filtration stérile	Chromatographie CM et Séphadex G 100  Filtration stérile	Filtration (Hollow fiber)  Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions DEA cellulose et Séphadex G 100 Gel filtration
<b>Etape finale</b>	Lyophilisation	Lyophilisation		Stérilisation-lyophilisation

**Tableau 7 : Méthodes d'extraction de l'hormone de Croissance. Source : « Rapport sur l'hormone de croissance et la maladie de Creutzfeldt-Jakob », IGAS, Décembre 1992.**

## E. Une contamination mondiale

L'utilisation d'un traitement substitutif de l'insuffisance somatotrope hypophysaire par hormone de croissance d'origine extractive humaine (hGH) a été officialisée à l'issue de l'essai thérapeutique mené aux Etats-Unis par Raben en 1958. Le traitement par hGH s'est ensuite répandu dans un grand nombre de pays. Dans la plupart des pays, la production et la distribution des hormones étaient sous la responsabilité d'organismes publics et des programmes spéciaux ont été mis en place. Les hormones étaient donc fabriquées en grande partie par des laboratoires publics. Trois firmes pharmaceutiques, Kabivitrum, Ares Serono et Nordisk ont distribués des lots d'hGH à partir de 1971.

Le premier cas de MCJ lié à un traitement par hormone de croissance d'origine humaine est apparu aux Etats-Unis en 1984. Le lien entre MCJ et traitement par hGH a été rapidement confirmé par l'inoculation intracérébrale des échantillons d'hGH aux primates (Gibbs, Asher et al. 1993). On dénombre aujourd'hui 243 cas de MCJ liés à un traitement par hGH dans le monde (Tableau 7). Les Etats-Unis, le Royaume-Uni et la France sont les 3 pays les plus touchés avec respectivement 32, 77 et 119 cas.

Pays	Nombre de cas
<b>Australie</b>	1
<b>Autriche</b>	1
<b>Brésil</b>	2
<b>Etats-Unis</b>	32
<b>France</b>	119
<b>Irlande</b>	1
<b>Nouvelle Zélande</b>	6
<b>Pays-Bas</b>	2
<b>Royaume-Uni</b>	77
<b>Suède</b>	1
<b>Qatar</b>	1
<b>Total</b>	243

**Tableau 8 : Répartition mondiale des cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par hormone de croissance extractive d'origine humaine.**

Les cas néo-zélandais et brésiliens ont reçu de l'hormone produite aux Etats-Unis. La France, le Royaume-Uni et les Pays-Bas produisaient leurs propres hormones. Le cas recensé

au Qatar a reçu des hormones fabriquées en France ; le cas autrichien a été traité par des hormones issues de l'industrie pharmaceutique (Crescormon, Kabi pharma).

a) La cohorte américaine

**1. Organisation du système**

De 1963 à 1985, le « National Hormone and Pituitary Program » (NHPP) a été mis en place et financé par le ministère de la Santé et des services à la personne (Department of Health and Human Services (HHS)). Les hormones distribuées aux Etats-Unis proviennent de trois sources différentes, un laboratoire indépendant de New-York et les deux firmes pharmaceutiques Serono (Asellacrin) et Kabi pharma (Crescormon) (Fradkin, Schonberger et al. 1991). Les hormones produites par le laboratoire new-yorkais, étaient envoyées du NHPP aux médecins référents des patients, et ce à travers tout le pays. Les hormones commerciales étaient distribuées de manière indépendante du NHPP par les compagnies pharmaceutiques. Le NHPP colligeait le numéro des lots d'hormone envoyés à chaque médecin et les dates d'envoi. La distribution était sous la responsabilité des médecins, sans registre spécifique indiquant les lots de hGH reçus par chaque patient. Par conséquent, le NHPP n'a qu'une connaissance approximative (uniquement par la date de traitement) des préparations reçues par patient.

Les méthodes de préparation utilisées aux États-Unis sont les méthodes Raben et Parlow jusqu'en 1977 (Tableau 6). Après 1977, la production d'hGH fut transférée au laboratoire du Dr Parlow qui modifia le protocole de fabrication de l'hormone avec l'ajout de l'étape de chromatographie sur colonne (Brown, Preece et al. 2000). Le Dr Parlow rapporta que les hormones fabriquées étaient des monomères purs à 98% (Source : « Rapport sur l'hormone de croissance et la maladie de Creutzfeldt-Jakob », IGAS, Décembre 1992)

Le décès du premier malade, un jeune californien de 21 ans traité entre 1966 et 1980 par l'hormone de croissance extractive du NHPP, survint en novembre 1984 et les résultats de l'autopsie apportèrent la preuve de l'existence d'une MCJ en février 1985. En mars 1985, l'endocrinologue ayant traité le patient écrit à la Food and Drug Administration (FDA) pour évoquer le lien possible entre la maladie et le traitement par hGH. Une réunion entre le HSS, la FDA et les deux firmes pharmaceutiques présentes sur le marché américain, est organisée et la décision de suspension de distribution de l'hormone dans le cadre du NHPP est prise en avril 1985. L'interruption définitive de la délivrance prend effet en août 1985 pour le NHPP, en avril 1985 pour Kabi, et pour Serono en mai 1985 sauf pour les cas d'hypoglycémie



sévère. En octobre 1985, l'hormone biosynthétique fabriquée par Genentech (Somatrem) est mise sur le marché.

## **2. Epidémiologie**

Au total, 7700 enfants ont été traités via le NHPP, parmi lesquels 32 ont développés une MCJ, 6272 sont encore suivis par le HHS et 1396 sont perdus de vue (Mills, Schonberger et al. 2004). Le manque d'information relatif au traitement a limité les études portant sur les facteurs influençant la susceptibilité de développer la MCJ après traitement par hGH. Cependant, un facteur de risque a pu être rapidement identifié puisque l'ensemble des cas de MCJ secondaires à un traitement par hGH aux Etats-Unis a été traité ou a initié leur traitement avant 1977, aucun patient ayant débuté son traitement après 1977 n'a, à ce jour, développé de MCJ. Les données de surveillance ont permis à Abrams et al. de modéliser le nombre de cas attendus en supposant que le risque de développer la MCJ pour les patients traités après 1977 était égal à celui des receveurs d'hormone avant 1977 (Abrams, Schonberger et al. 2011). Les résultats de cette étude montrent que le nombre de cas observés est significativement plus faible que celui attendu (la densité de probabilité ayant été ajustée sur la durée de traitement) et permet donc de conclure que l'introduction de l'étape de chromatographie sur colonne a permis de réduire significativement le risque de transmission de la MCJ. Les auteurs ont également observé que la durée médiane de traitement des patients dont l'administration de hGH avait débuté avant 1977, était plus longue (4,7 ans) que pour les patients ayant débuté leur traitement après 1977 (2,4 ans). De plus, parmi les patients traités avant 1977, 47,9% ont une durée de traitement supérieure ou égale à 5 ans alors que dans le groupe traité après 1977, seulement 13,7% ont été traités pendant 5 ans ou plus. Une longue durée de traitement est donc associée à un risque accru de développer une MCJ iatrogène. Le polymorphisme au codon 129 semble également influencer la susceptibilité de développer la maladie. Parmi les patients atteints de MCJ, 73% des patients sont homozygotes (55% MM et 13% VV) et 27% hétérozygotes (Brown, Brandel et al. 2012). La période d'incubation moyenne est de 20 ans (10-30) pour l'ensemble de la cohorte et les homozygotes et de 23 ans pour les hétérozygotes (Brown, Preece et al. 2000, Brown, Brandel et al. 2012). Mais la modélisation de la période d'incubation, par un modèle de survie (modèle de Cox), a permis de conclure que le génotype au codon 129 n'influence pas la durée de la période d'incubation (Brown, Preece et al. 2000).

Deux études épidémiologiques ont été réalisées sur les patients ayant été traité par hGH mais n'ayant pas développé de MCJ. La première a analysé les risques de surmortalité

chez ces patients par rapport à la population générale et en particulier la surmortalité liée à une pathologie que l'on peut prévenir. Parmi les 6272 patients, les auteurs ont obtenu des informations pour 6107 d'entre eux. Parmi ces 6107 patients traités depuis 1963, 433 étaient décédés au 31 décembre 1996 toutes causes confondues contre 114 décès attendus en population générale. Le risque de décès pour les patients ayant reçu de l'hGH était donc 3,8 fois supérieur à la population générale. Le nombre de décès par hypoglycémie, tumeurs, insuffisance surrénale était significativement aussi plus élevé chez les patients traités par hGH (Mills, Schonberger et al. 2004). L'objectif général de la deuxième étude était de savoir si une transmission interhumaine de maladies neurodégénératives autres que la MCJ était envisageable (Irwin, Abrams et al. 2013). L'étude a comporté deux étapes. Dans la première étape, la présence des protéines tau, A $\beta$ ,  $\alpha$ -synucléine et TDP 43 dans les hypophyses de 34 patients (24 décédés de maladies neurodégénératives et 10 témoins) a été analysée par immunohistochimie. Cette analyse a révélé la présence de protéines tau, a $\beta$  et  $\alpha$ -synucléine suggérant que les patients traités par hGH ont possiblement été exposés, en plus de la PrP<sup>sc</sup>, aux autres protéines malconformées associées aux maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Les auteurs ont ensuite cherché parmi les patients traités par hGH n'ayant pas développé de MCJ lesquels étaient décédés de maladies neurodégénératives associées à des protéines malconformées. L'étude des certificats de décès de ces patients (avec les limites de fiabilité et d'exhaustivité que cela peut comporter) a révélé une fréquence plus élevée de cas de SLA qu'attendue chez ces patients particulièrement jeunes. En revanche, aucune mention de maladies d'Alzheimer ou de Parkinson n'a été retrouvée sur ces certificats de décès. Cette observation était contradictoire avec l'analyse immunohistochimique des hypophyses puisque les protéines TDP 43, FUS et l'ubiquitine n'avaient pas été mises en évidence chez les patients atteints de SLA.

## **b) La cohorte britannique**

### ***1. Organisation du système***

Le traitement par hGH au Royaume-Uni a débuté en 1959 par un essai clinique coordonné par un groupe de travail du Medical Research Council (MRC), le « Working Party on human growth hormone » (Milner, Russell-Fraser et al. 1979). Les objectifs de ce groupe de travail relevaient uniquement de la recherche et cherchaient à évaluer l'efficacité de la hGH pour en définir la meilleure utilisation. Cependant, les missions de ce groupe de travail ont évolué au fil du temps puisque la sélection des patients et la distribution de l'hGH a été

sous contrôle de ce groupe jusqu'en décembre 1976. Les hypophyses étaient fournies par les neuropathologistes du MRC. L'extraction de l'hGH était réalisée au laboratoire du Dr Hartree (Université de Cambridge) et le conditionnement en ampoules était réalisé au laboratoire du Dr Bangham (MRC). Chaque ampoule contenait 5 à 10 UI d'hGH biologiquement active (Milner, Russell-Fraser et al. 1979). La distribution de l'hGH se faisait via les 19 centres régionaux référents. La demande en hGH devenant de plus en plus importante et les missions du groupe de travail relevant de plus en plus du service que de la recherche fondamentale, il a été mis en place, en juillet 1977, le Health Services Human Growth Hormone Committee chargé de l'approvisionnement du traitement. Vingt centres régionaux composés de pédiatres et endocrinologues spécialisés dans les déficits hypophysaires liés à la GH ont été référencés. A l'échelle locale, les enfants présentant un retard de croissance étaient pris en charge par le District General Hospital, où les premiers tests (stimulation pharmacologique de la sécrétion de GH par la clonidine, l'arginine et le glucagon) étaient réalisés. Si le déficit en GH se confirmait, l'enfant était adressé au centre régional du Health Services Human Growth Hormone Committee en charge de son suivi et de la délivrance du traitement. Chaque enfant disposait d'une consultation trimestrielle et le traitement était dispensé par période de 3 mois au moment de la consultation. La posologie pouvait varier de 5 UI deux ou trois fois par semaine à 10 UI deux fois par semaine (Milner, Russell-Fraser et al. 1979, Swerdlow, Higgins et al. 2003). Plusieurs types d'hormones ont été distribués au cours du temps en se chevauchant. Ainsi les hormones fabriquées par la méthode Raben ont été délivrées de 1959 à 1976, la méthode Hartree appelée « Hartree modified Wilhelmi » de 1972 à 1982 et la méthode Lowry de 1978 à 1983. De 1982 à 1985, des hormones fabriquées par une méthode similaire aux hormones commerciales, avec une étape de purification par chromatographie sur colonnes échangeuses d'ion et exclusion de taille G100, ont été dispensées. Enfin, des hormones fabriquées par une méthode basée sur la méthode Lowry (Lowry modified) utilisant la chromatographie d'exclusion stérique, mais à partir d'hormone conservée dans l'acétone, ont été distribuées de 1981 à 1983. Dans de plus faible proportion, des hormones commerciales ont été distribuées de 1977 à 1985 (Swerdlow, Higgins et al. 2003).

Après l'annonce des cas américains et l'apparition du premier cas britannique en février 1985, les autorités décidèrent, en mai 1985, la suspension de la distribution de l'hormone de croissance produite par le Medical Research Council (Rudge, Jaunmuktane et al. 2015). Cette suspension qui ne devait être, dans un premier temps, que provisoire fut considérée définitive en juillet 1985. Les traitements par hormone de croissance furent poursuivis avec l'introduction de l'hormone recombinante en octobre de la même année.

## 2. *Epidémiologie*

Au Royaume-Uni, 1849 enfants ont été traités de 1959 à 1985 à travers le programme national. Les hommes représentent les deux tiers de la cohorte (n=1209) et 40% des enfants ont été traités avant 10 ans ; 60% entre 10 et 19 ans. La majorité a été traitée pour cause de déficit idiopathique en GH (53%) et de tumeurs solides intracrâniennes (26%) (Swerdlow, Higgins et al. 2003). Le suivi de la cohorte britannique jusqu'au 31 décembre 2000, a permis à l'équipe de Swerdlow d'étudier les facteurs de risque influençant la susceptibilité de développer une MCJ sur les 38 cas répertoriés à l'époque. La première observation est que le risque de développer une MCJ n'est pas significativement différent entre les sexes. En revanche, ce risque est très fortement associé à la préparation des hormones de type Wilhelmi (Hartree modified Wilhelmi). Tous les cas ont reçu ce type d'hormone et l'ont reçu en dose plus importante comparée à la distribution attendue de cette préparation dans toute la cohorte. Deux cas ont reçu uniquement les hormones Wilhelmi, pour le premier entre 1975 et 1979 et pour le second entre 1977 et 1978, ce qui est en faveur d'une contamination des préparations entre ces dates. Cependant, pour expliquer l'ensemble de leurs cas, les auteurs émettent l'hypothèse que les préparations Wilhelmi ont pu être contaminées d'avril 1972 à juillet 1981. L'âge de traitement semble influencer le risque de développer une MCJ. Les risques calculés à 8, 9 et 10 ans sont deux fois plus importants comparés aux cas n'ayant jamais été traités à ces âges. La durée totale de traitement ne semble pas influencer la susceptibilité.

Une autre étude portant sur la répartition du génotype au codon 129 parmi les cas MCJ britanniques et français a permis de conclure que (1) les homozygotes présentaient un risque plus élevé que les hétérozygotes ( $OR_{MM/MV} = 2,6$  ; IC à 95%, 1,6-4,4 ;  $OR_{VV/MV} = 5,7$  ; IC à 95%, 3,1-10,5), (2) que dans la cohorte britannique les cas de MCJ homozygotes VV étaient surreprésentés par rapport à la population générale et que (3) la répartition au codon 129 entre les cas de MCJ français et britanniques était différente (Brandel, Preece et al. 2003).

La modélisation de la période d'incubation par un modèle de Weibull a permis d'estimer que le risque maximum de développer une MCJ est atteint après une période d'incubation de 20 ans calculée à partir de la date du premier traitement jusqu'à l'apparition des premiers symptômes. Ce risque maximum survient 1 à 3 ans plus tôt si la période d'incubation est calculée à partir du milieu du traitement (Swerdlow, Higgins et al. 2003). Les calculs de risques maxima ont été également effectués en fonction de l'âge de traitement ; pour les patients dont l'âge de traitement est inférieur à 11 ans, le risque maximum de survenue de la MCJ est avancé de 3 ans. Les estimations de la période d'incubation par

génotype ont mis en évidence une légère différence entre homozygotes et hétérozygotes ; la période d'incubation chez les homozygotes étant plus courte (Swerdlow, Higgins et al. 2003).

A ce jour, le Royaume-Uni totalise 77 cas de MCJ secondaire à un traitement par l'hormone de croissance extractive. Parmi ces 77 cas, le statut au codon 129 est connu pour 56 cas, 33 sont hétérozygotes MV, 15 homozygotes VV et 8 homozygotes MM. Outre la faible proportion de cas MM, Rudge et al. ont observé que 14 des cas homozygotes VV sont apparus avant 1998 et que la majorité (7/8) des cas MM est apparue après 2004 (Rudge, Jaunmuktane et al. 2015). Selon les auteurs, il existe un phénomène de compatibilité entre le génotype de l'hôte et de l'inoculum. Dans cette hypothèse, la transmission de la maladie est facilitée et la période d'incubation est plus courte si la protéine prion de l'hôte est capable d'adopter facilement la conformation privilégiée par la souche de prion inoculée. Ainsi la répartition du génotype au codon 129 parmi les cas britanniques et l'origine de la contamination pourraient être expliquées :

- soit par l'inclusion malheureuse d'un donneur ayant présenté un phénotype clinique atypique, comme ce qui est plus souvent observé chez les cas VV et MV ;
- soit par l'inclusion de plusieurs donneurs, mais parmi lesquels un donneur de génotype VV ou MV présentait des titres infectieux élevés.

Cette hypothèse est appuyée par les données expérimentales chez les souris transgéniques. En effet, la transmission de la MCJ sporadique à des souris humanisées homozygotes VV est efficace, quel que soit le génotype de l'inoculum, tandis que, chez les souris MM au codon 129 inoculées avec un donneur VV, les taux d'attaques sont plus faibles et la période d'incubation est plus longue. L'inoculation de la MCJ d'un donneur MM chez les souris MM n'affecte pas la transmission de la maladie (Collinge, Palmer et al. 1995, Telling, Scott et al. 1995, Collinge, Sidle et al. 1996, Hill, Desbruslais et al. 1997, Korth, Kaneko et al. 2003, Kobayashi, Asano et al. 2007, Wadsworth, Joiner et al. 2008). Les auteurs concluent que la contamination des lots d'hormone de croissance s'est probablement faite à partir d'un donneur homozygote VV ou hétérozygote MV au codon 129 (Rudge, Jaunmuktane et al. 2015).

### c) L'organisation du système français

S'inspirant des systèmes américain et britannique, la structure française encadrant la mise à disposition du traitement par hormone de croissance extractive d'origine humaine s'est mise en place, en 1973, à l'initiative du Pr Royer. Le dispositif reposait sur la collaboration de

plusieurs organismes chargés respectivement de la production de l'hormone (Institut Pasteur), de son conditionnement et de sa distribution (Pharmacie centrale des hôpitaux (PCH) de l'Assistance Publique de Paris) et du financement (Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés). Ces activités étaient coordonnées par l'association France-Hypophyse, chargée également de la collecte des hypophyses et du contrôle de l'attribution de l'hormone (dont elle avait le monopole). Le contrôle de l'attribution de l'hormone était assuré par la « commission nationale de l'hormone de croissance », un comité d'expert composé de pédiatres, de représentant des médecins conseils des caisses nationales d'assurance maladie, d'un représentant de la direction de la sécurité sociale et d'un représentant de la direction de la pharmacie et du médicament. Sous l'égide de France-Hypophyse, ce comité se réunissait tous les trois mois pour établir les critères d'attribution de l'hormone, sélectionner les candidats après étude des dossiers médicaux envoyés par les médecins traitants et assurer le suivi périodique des traitements. Les critères cliniques et biologiques exigés par le comité d'experts n'ont d'abord concerné que le nanisme hypophysaire entendu comme :

- un retard statural d'au moins 2 déviations standard au-dessous de la moyenne sur la courbe de croissance de référence
- un retard de l'âge osseux par rapport à l'âge chronologique, évalué radiologiquement
- une vitesse de croissance ralentie, inférieure à la normale, qui est de l'ordre de 5 centimètres par an (de 4 ans à la puberté)
- un déficit hormonal complet mis en évidence par dosages plasmatiques effectués au cours de deux épreuves, au moins, de stimulations, permettant de déceler des taux inférieurs à 7ng/ml

A partir d'octobre 1983, l'attribution de traitement par hormone de croissance a été étendue aux déficits hormonaux partiels.

### ***1. Le prélèvement et la collecte des hypophyses***

L'activité de France-Hypophyse a consisté à assurer le prélèvement des hypophyses lors des autopsies effectuées dans les centres hospitaliers sur l'ensemble du territoire français, à contribuer à la conservation des hypophyses recueillies et à assurer leur transport vers le laboratoire national chargé de l'extraction des hormones. Un dispositif de collecte a donc rapidement été mis en place sous la direction du Pr J.C Job (secrétaire de l'association France-Hypophyse jusqu'en 1984 puis président de l'association après 1984). Ce dispositif

comprenait une action d'information et d'incitation auprès des CHU et grands centres hospitaliers, le paiement sur le budget de l'association, le prélèvement des hypophyses sur les cadavres, la mise à disposition dans certaines morgues de congélateurs pour le stockage des hypophyses et la rémunération des pédiatres vacataires chargés du ramassage périodique des hypophyses et de leur transport en emballage réfrigéré vers le laboratoire de l'Institut Pasteur. Ainsi, 167 établissements hospitaliers étaient autorisés à prélever des hypophyses. Dix hôpitaux parisiens ont cependant fourni, à eux seuls plus d'un tiers des hypophyses collectées en France entre 1974 et 1986. Afin de limiter la pénurie d'hypophyses françaises, l'importation d'hypophyses provenant des pays de l'Est (société d'Etat Maimex en Bulgarie) a été mise en place et gérée par l'Institut Pasteur de 1983 à 1988.

L'activité de collecte a été encadrée par la loi Caillavet stipulant que « des prélèvements peuvent être effectués à des fins thérapeutiques ou scientifiques sur le cadavre d'une personne n'ayant pas fait connaître de son vivant son refus d'un tel prélèvement ». La collecte des hypophyses était effectuée lors des autopsies sous l'autorité du chef de service d'anatomopathologie ou à défaut du médecin désigné par l'établissement dans les conditions suivantes :

- délai de prélèvement inférieur à 48 heures après le décès ;
- conservation des hypophyses à -20°C ;
- respect des critères d'exclusion des donneurs.

Le médecin devait donc procéder au prélèvement des hypophyses dans le respect strict des critères, à l'ensemble des vérifications anatomiques et établir un compte-rendu. Ce médecin disposait du dossier ou de renseignements cliniques sur le patient décédé.

Les conditions de collecte ont été définies selon des critères appliqués partout dans le monde (y compris en Bulgarie) et également par les firmes pharmaceutiques Kabi, Serono et Novo-Nordisk. Cependant, France-Hypophyse avait des critères d'exclusions moins strictes (Tableau 8).

Affections du patient décédé	Hypophyses bulgares	Hypophyses françaises
Hépatite	Exclus	Non exclus
Méningite	Exclus	Non exclus
Encéphalite	Exclus	Exclus
Affections neurologiques chroniques	Exclus (Sclérose en plaque)	Exclus (Sclérose en plaque, MCJ, démences progressives)
Maladie contagieuse	Exclus	Non exclus
Affection Maligne	Exclus	Exclus
Dialyses et transplantation	Exclus	Non exclus
Toxicomanie	Exclus	Non exclus

**Tableau 9 : Critère d'exclusion des donneurs d'hypophyses appliqués en Bulgarie et en France.**

L'efficacité du traitement par hGH a induit une demande croissante en hypophyses *si bien que certains prélèvements ont été réalisés, par les agents d'amphithéâtre, par voie trans-sphénoïdale sans autopsie* (Rapport sur l'hormone de croissance et la maladie de Creutzfeldt-Jakob », IGAS, Décembre 1992).

Les hypophyses étaient ensuite acheminées à l'Institut Pasteur via les médecins collecteurs. Les établissements devaient fournir, en principe, chaque hypophyse dans un flacon séparé avec le nom du sujet, la date de prélèvement et la cause de décès.

## **2. Extraction de l'hormone de croissance**

L'hormone de croissance extractive nationale, dite hormone « France-Hypophyse », a été préparée de juin 1973 à juin 1988 dans l'unité de radio-immunologie (URIA), sous la responsabilité du Pr Dray. A leur arrivée au laboratoire, les hypophyses (françaises et bulgares) étaient triées macroscopiquement puis stockées dans une pièce uniquement destinée à cet effet. En vue de l'extraction, les hypophyses étaient réparties en pools de 400 à 500 glandes pour le déroulement complet d'une manipulation, puis 2 à 3 pools étaient ensuite groupés pour constituer un lot comprenant donc 1000 à 1500 hypophyses. Il ne s'agit là que d'un chiffre moyen, une enquête plus approfondie, a montré que le nombre moyen d'hypophyse par lot a varié de 2217 en 1985 à 455 en 1988. Ce sont dans les années 1984 et



1985 que le nombre d'hypophyses par lots était le plus grand. L'Institut Pasteur assurait la préparation de l'hormone dans un délai de 15 jours à 4 mois (en moyenne 2 mois).

L'extraction de l'hormone était effectuée en chambre froide selon la méthode Lowry (Dray 1987). Les méthodes employées par Serono, Novo-Nordisk, Kabivitrum et Pasteur se sont toutes inspirées de la méthode Lowry mais avec des variantes et des ajouts propres (tableau 9). Ainsi Novo-Nordisk a introduit, dès 1978, le traitement par l'urée 6M après avoir introduit la chromatographie sur gel en 1973 et le traitement par polyéthylène glycol en 1976. L'Institut Pasteur, en octobre 1979, a ajouté une étape de chromatographie d'affinité sur concavalline A et sépharose fixant les glycoprotéines et à partir de juin 1985, une étape de traitement par l'urée 8M. Au terme de ces différentes étapes, l'Institut Pasteur produisait un mélange monomère/dimère (75%/25%), utilisé de 1977 à décembre 1984. La fraction dimère pouvant copurifier avec la PrP<sup>res</sup>, ce mélange pouvait donc augmenter le risque de contamination. A partir de décembre 1984 l'hormone de croissance extractive était préparée à partir des hypophyses françaises et étrangères et seule la fraction monomère a été utilisée. Les firmes pharmaceutiques, quant à elles ont fourni essentiellement du monomère, pour exemple, la préparation issue de la firme Serono contenait à 95 % de la fraction monomère et à 5% de la fraction dimère.

Des contrôles étaient effectués lors du processus de fabrication de l'hormone, pour en vérifier la pureté : dosage radio-immunologique (RIA), spectrophotométrie, et dosage du radio-récepteur (RRA). En fin de fabrication, différentes recherches d'antigènes étaient effectuées, notamment pour l'hépatite B et le VIH.

Nom de la méthode	Kabivitrum		Pasteur
Date d'utilisation	Avant 1982	Après 1982	D'octobre 1979 à avril 1985
Hypophysés	Congelées lyophilisées		Congelées lyophilisées
Etape de broyage	Broyage tampon phosphate pH 6,3	Broyage tampon phosphate pH 8,5	Broyage tampon phosphate pH 6,2
Extraction précipitation	Centrifugation 6,000g*1 40,000g*1	Centrifugation 6,000g*2	Homogénéisation Extraction en tampon phosphate pH 6,2 + trasytol + PMFS Pas d'étape de purification Agitation, centrifugation, décantation Reprise du surnageant 3 fois
Etapes de purification	Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions Précipitation au sulfate d'ammonium Séphadex G 100	DEAE Séphadex  Sulfate d'ammonium Séphadex G 100	Chromatographie sur colonne Chromatographie d'affinité sur concavoline A sépharose Concentration sur Hallow fiber Gel filtration Tamissage moléculaire ACA44
Dernière étape	Lyophilisation	Lyophilisation	Stérilisation-lyophilisation

**Tableau 10 : Méthode d'extraction de l'hormone de croissance suivies par le laboratoire Pasteur et Kabivitrum.**

### ***3. Conditionnement et distribution du produit final***

La PCH de l'Assistance publique de Paris est le troisième acteur du dispositif français. Ses activités l'ont conduite à assumer cinq types de responsabilités.

(1) La mise en forme pharmaceutique de l'hormone produite par l'Institut Pasteur de 1973 à 1988. La poudre d'hormone de croissance était livrée en vrac par l'Institut Pasteur par flacons de 5 grammes. La PCH y ajoutait des éléments tampons ou stabilisants (mannitol, lactose, glyco-colle) puis l'ensemble était alors conditionné en ampoules injectables de 1 ou 2 mg (unité de mesure abandonnée ultérieurement au profit des unités internationales (UI)),

auxquelles il était donné un numéro unique. Les quatre premiers chiffres correspondaient à l'année et mois de fabrication par l'Institut Pasteur. Les numéros de lots fournis aux malades n'ont été notés qu'à partir de 1982.

La PCH effectuait également divers contrôles, contrôles d'efficacité biologique (test de croissance pondérale d'Evans réalisé par le laboratoire national de la santé à Montpellier) et contrôles de pyrogènes.

(2) La distribution des hormones françaises et étrangères qui était effectuée selon deux modalités :

- La vente aux particuliers dans les locaux mêmes de la PCH pour les malades de la région parisienne
- L'approvisionnement régulier, pour trois mois de traitement, des pharmacies hospitalières réparties sur tout le territoire français. Cet approvisionnement se faisait sous forme de colis individualisé au nom des malades

Pour assurer la régularité de l'approvisionnement, la PCH a distribué parfois des hormones extractives commerciales.

(3) L'importation des hormones extractives dont elle a eu le monopole en 1977. La PCH pouvait donc négocier des marchés avec les laboratoires privés fabriquant de l'hormone extractive (Kabivitrin, Novo-Nordisk et Serono). Les deux dernières missions de la PCH étaient (4) la facturation des hormones à la caisse d'assurance maladie et (5) un appui à l'action de France hypophyse, notamment sur le plan administratif (secrétariat de la commission nationale de l'hormone de croissance).

#### ***4. Facteurs ayant probablement contribué à augmenter le risque de contamination***

Du recrutement des donneurs d'hypophyses à la distribution du produit final, le rapport de l'IGAS notamment souligne que des risques ont été pris. Le premier a été de collecter les hypophyses via des services hospitaliers spécialisés en neurologie (longs et moyens séjours), recevant beaucoup de personnes âgées pouvant être atteintes de démences ou de maladies infectieuses. Le prélèvement des hypophyses par ponction trans-sphénoïdale est un facteur important de contamination potentielle par le tissu cérébral. De plus, lorsque les prélèvements avaient été effectués par les agents d'amphithéâtre, c'est un bocal contenant toutes les hypophyses prélevées (dans la journée ou jusqu'à 6 mois auparavant) qui était collecté. Dans ce cas, le flacon n'était marqué que du nom de l'hôpital et de la date de passage

du médecin collecteur. D'autre part, une fois prélevées, le délai d'acheminement des hypophyses n'était pas systématiquement compatible avec le délai de retour des examens anatomopathologiques, nécessaires à un diagnostic précis, quand ils avaient été faits. La collecte des hypophyses humaines dans les pays de l'Est a été réalisée sans qu'un contrôle réel ait été exercé. En ce qui concerne l'extraction de l'hormone, le risque du mélange monomère/dimère était que le prion, de poids moléculaire intermédiaire (33-35 kDa) entre le monomère (20-22 kDa) et le dimère (40-44 kDa), copurifie et soit retenu avec lui.

Après 1985, les méthodes de Lowry, Serono, Novo-Nordisk et de l'Institut Pasteur ont été soumises à différentes techniques de validation. A l'aide de modèles animaux, ces techniques ont vérifié l'infectiosité résiduelle étape par étape au cours des méthodes d'extraction de la GH à partir d'un homogénat de tissu humain hypophysaire volontairement contaminé par l'agent de la tremblante expérimentale. En 1985, Taylor, Fraser et al. ont montré que l'infectiosité n'était plus retrouvée après les deux étapes de chromatographie de la méthode Lowry (Taylor, Dickinson et al. 1985). En 1989, Dormont, et al. ont cependant prouvé que l'infectiosité persistait, après le passage sur colonne échangeuse d'ions ainsi qu'après le passage sur colonne d'affinité concavoline A et sépharose (Dormont, Deslys et al. 1989). Un résultat analogue est mentionné par Pochiari, Pesano et al en 1993 (Pocchiari, Peano et al. 1991). Ces deux dernières publications ont en revanche mise en évidence une réduction des titres infectieux après traitement par l'urée 6 ou 8M d'un niveau identique mais peut-être pas totale. Ainsi les méthodes d'extraction utilisées avant juin 1985 n'éliminaient pas l'agent et rien ne permet de garantir que l'étape de traitement à l'urée utilisée par la suite ait éliminé l'agent infectieux de façon absolue.

Lors de la production des lots, des mélanges de matière première de différentes origines (française et étrangères) ont été effectués. A noter également que lorsqu'une quantité plus grande que celle immédiatement demandée par la PCH était fabriquée à l'Institut Pasteur (par exemple 30 grammes au lieu de 20 grammes), la quantité supplémentaire (10 grammes) était gardée et ajoutée au lot suivant. Ceci implique :

- que les lots n'étaient pas toujours clairement séparés et leur origine donc pas toujours clairement identifiable
- qu'un lot peut résulter de 2 procédures de fabrication séparées
- que des contaminations croisées ont pu se produire via la réutilisation des colonnes de chromatographie. Les trois colonnes étaient changées à des rythmes divers, dépendant de leur fragilité et ne dépassant pas une moyenne de 3 utilisations. Au laboratoire Serono, les colonnes étaient changées en moyenne après 8 utilisations.

Cependant, le niveau d'intensité et la fréquence de ce type d'événements est impossible à évaluer.

Au niveau de la PCH, à l'exception d'une manipulation, aucun mélange de lots n'a été effectué. Dans les pharmacies hospitalières de province, en cas de substitutions, la notation systématique de l'attribution d'un lot à un patient n'était pas réalisée.

L'étape d'inactivation à l'urée 8M a été mise en place par l'Institut Pasteur à partir de juin 1985. Cependant, la PCH n'a pas rappelé, au mois de juin 1985, les quatre lots d'hormone non traités à l'urée 8M qui avaient été envoyés aux pharmacies hospitalières de Paris et de province.

# Objectifs généraux

Une souche de prions est définie par 3 critères, la période d'incubation, la distribution des lésions cérébrales et celle de la PrP anormale. Chez l'homme, parmi les cas sporadiques de MCJ, 4 souches principales, définies à partir du profil électrophorétique de la PrP et du génotype au codon 129, ont été mises en évidence après transmission à l'animal. De plus, les expériences de « traceback phenomenon » où la concordance entre le génotype au codon 129 du gène *PRNP* de l'hôte et de l'inoculum influence la susceptibilité, ont permis d'émettre des hypothèses sur l'identité de la souche infectieuse des cas de MCJ secondaires à une greffe de dure-mère. La compréhension des facteurs qui gouvernent la susceptibilité, la variabilité de la période d'incubation, la sélection et la propagation des souches, en cas d'exposition à un prion exogène demeure chez l'homme très parcellaire.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de mieux comprendre ces phénomènes en exploitant la cohorte des patients français exposés à l'hormone de croissance potentiellement contaminée pendant la période à risque. Les cas de MCJ iatrogène après traitement par l'hormone de croissance sont la conséquence d'une contamination interhumaine par injection périphérique (voie sous cutanée ou intramusculaire) de doses d'hGH extractive.

Afin d'appréhender ces questions, ce travail a été divisé en plusieurs parties. Premièrement, l'étude de la cohorte de tous les patients traités par hormone de croissance extractive d'origine humaine nous a permis d'étudier les facteurs influençant la susceptibilité. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux facteurs modulant la période d'incubation de la MCJ iatrogène. Ensuite parmi les cas de MCJ iatrogène autopsiés, la distribution, la qualité des lésions et les propriétés biochimiques de la PrP pathologique ont été étudiées. La combinaison des résultats issus de ces analyses nous a permis de générer des hypothèses sur les différentes souches d'agents transmissibles à l'origine de la MCJ iatrogène et sur leur présence dans certains lots potentiellement contaminés. Afin de confirmer ces hypothèses, des inoculations d'homogénats de cerveaux de patients paraissant représentatifs des souches potentiellement présentes à des souris transgéniques sur-exprimant le gène de la PrP humaine ont été réalisées.

# Résultats



# **I. Article 1: Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France**

## **A. Introduction**

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés au lien entre le traitement par hormone de croissance, les caractéristiques propres du patient et le développement d'une MCJ iatrogène. La France, Le Royaume-Uni et les Etats-Unis ont été les 3 pays les plus touchés par la MCJ iatrogène secondaire à un traitement par l'hormone de croissance extractive. Le suivi épidémiologique et le nombre élevé des cas dans ces pays ont permis la réalisation d'études visant à identifier les facteurs ayant conduit au développement de la MCJ. Aux Etats-Unis, ces études ont montré qu'une longue durée de traitement avant 1977 était le facteur de risque majeur (Fradkin, Schonberger et al. 1991, Abrams, Schonberger et al. 2011). L'année 1977 a été marquée par l'introduction dans le processus de fabrication des hormones américaines d'une étape de chromatographie sur colonne. Au Royaume-Uni, un traitement par l'hormone de croissance fabriquée par la méthode Wilhelmi et un âge de traitement compris entre 8 et 10 ans sont deux facteurs associés à un risque accru de développer une MCJ (Swerdlow, Higgins et al. 2003). La méthode Wilhelmi n'inclut pas d'étape de chromatographie sur colonne pour la purification de l'hormone contrairement aux méthodes de purification utilisées au Royaume-Uni. Il semblerait donc que l'introduction de l'étape de chromatographie sur colonne ait réduit de manière efficace le risque de transmission de l'agent infectieux aux Etats-Unis comme au Royaume-Uni.

En France, les premières études épidémiologiques se sont focalisées sur la définition d'une période de traitement à risque et l'identification des lots potentiellement contaminés. Ces études ont montré que les lots produits de 1983 à 1985 étaient les plus probablement contaminés (Huillard d'Aignaux, Alperovitch et al. 1998, Huillard d'Aignaux, Costagliola et al. 1999). Cependant, la période de traitement des 119 cas de MCJ s'étend de janvier 1982 à décembre 1985. Décembre 1985 correspond à la date vraiment effective de la généralisation de la distribution des lots d'hormones traités à l'urée. L'étape de traitement à l'urée 8M a été introduite dans le processus de fabrication en mars 1985 et généralisée à partir de juin. La transmission accidentelle avec une période à risque bien définie et la disponibilité des données d'exposition pour chaque patient constitue un matériel sans équivalent pour étudier les facteurs qui gouvernent la transmission du prion chez l'homme.

L'évolution de la mortalité annuelle des cas de MCJ iatrogènes secondaires à un traitement par hGH, avec seulement un cas décédé depuis 2009 suggère que plus de 30 ans après l'exposition, la quasi-totalité des cas susceptibles de développer une MCJ est survenue en France. Cette évolution est en accord avec les études estimant que 95% des cas attendus surviennent après une exposition de 20 ans (Huillard d'Aignaux, Costagliola et al. 1999). Il nous a semblé possible d'initier l'étude des facteurs qui ont gouverné l'évolution de cette épidémie entre janvier 1982 et décembre 2015.

L'objectif de cette première étude a été d'identifier, par un modèle de Cox, les facteurs influençant la susceptibilité de développer une MCJ iatrogène en France. Les données utilisées dans notre étude sont issues des bases de données de France-Hypophyse et du Réseau national de surveillance des maladies de Creutzfeldt-Jakob, et les variables d'intérêts étaient :

- la survenue ou non de la maladie
- le statut diagnostique (probable ou certain)
- l'âge au début du traitement
- le sexe
- les lots reçus
- les doses d'hormone reçues pour chaque lot
- la dose totale d'hormone reçue (reflétant la durée totale de traitement)
- la maladie causale

Dans un premier temps, une régression logistique avait été envisagée. Cependant, ce type d'approche nécessite que les données ne soient pas censurées, c'est à dire que l'ensemble des cas soit apparu. Au moment où cette première partie de mon travail de thèse a été réalisée, nous ne pouvions pas affirmer cette hypothèse. Un modèle semi-paramétrique de Cox permettant de tenir compte des temps d'observations individuels et d'imposer une censure à droite au modèle a été choisi. Nous avons donc pu étudier le délai de survenue de notre évènement (MCJ iatrogène) en fonction de plusieurs covariables (l'âge de début de traitement, le sexe, les lots et doses reçues). De plus, le modèle de Cox a l'avantage de n'émettre aucune hypothèse sur la forme de la fonction de survie.

## B. Résultats

### Article 1 (Soumis)

Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France

Authors: Laurène Peckeu<sup>1</sup>, MSc, Jean-Philippe Brandel<sup>1,2</sup> MD, Arlette Welaratne<sup>1,2</sup>,  
\*Dominique Costagliola<sup>3</sup>, PhD, \*Stéphane Haïk<sup>1,2,4</sup>, MD, PhD.

<sup>1</sup> Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

<sup>2</sup> AP-HP, Cellule Nationale de Référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

<sup>3</sup> Sorbonne Universités, INSERM and UPMC Univ Paris 06, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMR\_S 1136), Paris, France

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Neuropathologie R Escourolle, F-75013 Paris, France

Title character count: 90

Number of references: 18

Number of tables: 3

Number of figures: 1

Word count abstract: 212

Word count paper: 2388

Supplemental Data: Figure e-1, Batches received by the 15 patients with hGH-iCJD who were not exposed to batches from category 1.

Corresponding Author:

Stéphane Haïk

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

47-83 Boulevard de l'hôpital

Paris 75013

Phone + 33 1 42 16 26 26

Fax +33 1 42 16 26 25

stephane.haik@upmc.fr

Statistical Analysis conducted by Dr Dominique Costagliola, PhD, Inserm, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 (UMR\_S 1136), Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique and Laurène Peckeu, Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013

Search Terms: Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, Susceptibility, human growth hormone, prions

\* These authors share senior authorship.

Author Contributions:

Laurène Peckeu, study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, critical revision of manuscript for intellectual content.

Jean-Philippe Brandel, study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, critical revision of manuscript for intellectual content.

Arlette Welaratne, acquisition of data.

Dominique Costagliola, study concept and design, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, critical revision of manuscript for intellectual content, study supervision.

Stéphane Haïk, study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript, critical revision of manuscript for intellectual content, study supervision.

Author Disclosures:

All authors -Report no disclosures

The research leading to these results has received funding from the program “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06 and Santé Publique France.

Abstract

Objective: to identify, among the available data concerning host characteristics and exposure, risk factors influencing the susceptibility for developing iatrogenic CJD (iCJD) in subjects treated with human cadaver-sourced growth hormone (hGH) in France.

Methods: This study included all 1443 individuals treated in France with hGH from January 1982 to December 1985, out of which, 119 cases of hGH-iCJD have been identified so far. We applied a three sequential step Cox analysis involving univariable, stepwise and non-

stepwise multivariable procedures. The variables studied were sex, age at hGH treatment initiation and treatment characteristics (batches and doses).

Results: While no effect of age at treatment initiation was observed, a significant effect of gender on disease susceptibility was unexpectedly evidenced with a two-fold increase of disease occurrence in males. This effect did not depend on differences of exposure between male and female. We identified four categories of hormone batches from high risk to no association with susceptibility. A relationship between the dose received from at risk hormone batches and the attack rate (number of patients developing the disease among exposed individuals) was demonstrated.

Conclusions: Studying the hGH-exposed patients in France provides first epidemiological evidence of a relationship between dose of inoculum and disease occurrence in humans and suggests an unexpected effect of gender on individual susceptibility.

## Introduction

Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease due to treatment with cadaver-sourced growth hormone (hGH-iCJD) was first reported in the US and the UK in 1985 [1, 2] and in 1991 in France [3]. To date, 243 cases have been identified. United Kingdom (n=77), US (n=32) and France (n=119) are the more affected countries. In the UK, it has been suggested that susceptibility to hGH-iCJD varies with age at treatment and the procedure used to prepare the hormone [4]. In the US, the number of cases and incomplete information about exposure impair a comprehensive analysis of the link between susceptibility and exposure [5, 6]. In contrast, the accidental transmission in France with a strictly defined period of exposure and the availability of data on hGH-treatment for all exposed subjects provides a unique opportunity to better understand the factors governing prion transmission in humans. The evolution of the annual mortality of the disease with only one case since 2009 suggests that most cases that

will ever develop hGH-iCJD have already occurred 30 years after the end of the period of exposure. This evolution is consistent with a previous study which estimated that 95% of cases should have been observed within 20 years after exposure [7, 8].

The objective of this work was to identify, among the available data concerning host characteristics (sex and age at treatment initiation) and the exposure (batches and doses), the risk factors influencing the susceptibility for developing hGH-iCJD. A first critical step was to define the minimal set of batches implicated in the transmission.

## Patients and Methods

### Study design

All French cases identified so far share a common period of hGH treatment from January 1982 to December 1985 despite the use of size-exclusion chromatography in hormone preparation procedure during the period. From March 1985 onwards, an inactivation step using urea 8 M was introduced yielding a 2 to 3 log reduction of potential prion infectivity [8]. However, the date for generalized delivery of urea-inactivated hGH and for the exhaustion of non-urea treated batches was the end of 1985. This study therefore included all 1443 individuals treated in France with cadaver-sourced growth hormone (hGH) from January 1982 to December 1985, out of which, 119 cases of hGH-iCJD have been identified so far. Data were obtained from the “France Hypophyse” database and the French national CJD surveillance network. The variables used for this study were sex, age at hGH treatment initiation and treatment characteristics (batches and doses). As the last death due to hGH-iCJD occurred in December 2015, the follow up period in our analysis was censored at the 31st of December 2015.

## Statistical analysis

### Batches and patient characteristics associated with susceptibility

First, we investigated the association between the susceptibility to develop hGH-iCJD and exposure to the 63 hGH batches distributed from 1982 to 1985 that were produced by a French research institute and pharmaceutical firms. This last category represented 20% of the batches distributed to the French subjects. Univariable and multivariable hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (CIs) were estimated using the Cox proportional hazards model. In the univariable analysis, we first evaluated the impact of exposure to each batch on the risk of developing hGH-iCJD. To limit the number of batches showing a false positive association with the susceptibility for developing hGH-iCJD, the criterion of significance was set to  $p \leq 0.005$ . Univariable analyses were also performed with patient sex and age at hGH treatment initiation. To enable the detection of non-linear effects, age at hGH treatment initiation was split into three groups corresponding to age terciles.

Then, a multivariable analysis with a stepwise procedure (exclusion  $p=0.10$ , inclusion  $p=0.05$ ) was performed including all batches with a univariable  $p\text{-value} \leq 0.005$  and patient characteristics with a  $p\text{-value} \leq 0.10$  in the univariable analysis. This analysis allowed grouping the 63 batches into four categories of risk levels. Batches selected by this stepwise procedure, define the first category. The second category contained the minimal set of batches common to at least two cases not previously explained by exposure to batches of the first category and significant in the univariable step ( $p \leq 0.005$ ). The third category contained the remaining batches with a significant HR in the univariable step ( $p \leq 0.005$ ). All the other batches formed category 4.

Following this analysis, a second multivariable analysis without the stepwise procedure was conducted including batches from categories 1, 2 and 3 and patient characteristics with a  $p\text{-value} \leq 0.10$  in the univariable analysis.



### Effect of the dose received from at risk batches on susceptibility

We then sought to evaluate the risk for developing hGH-iCJD related to the number of doses received from batches of categories 1, 2 and 3. We computed, for each patient, the number of doses received by summing on the number of doses received from each batch belonging to a category. In addition, we calculated the proportion of doses received from each category related to the total number of doses. Univariable and multivariable Cox proportional hazards models were used to assess the respective roles of baseline characteristics as selected in the previous analyses, and of the total amount of doses received together with the proportions of doses received from batches of the first three categories as defined in the previous step.

All statistical analyses were performed using STATA 14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP).

### Results

Of the 1443 patients included in this study, 119 developed hGH-iCJD during the observation period. Among the 119 hGH-iCJD cases, there were 95 males and 24 females. Mean age at treatment initiation was 11.1 years (SD=4.0) and mean number of doses received was 1611 IU (SD=750). Non-hGH-iCJD group includes 886 males and 436 females, aged in mean 11.6 years (SD=4.6). In this group the mean number of doses received was 1109 IU (SD=763).

Results from the Cox model evaluating the impact of exposure to batches, patient sex and age at hGH treatment initiation are shown in tables 1 and 2. For twenty-seven batches, p-values of the univariable Cox models were below 0.005. In the stepwise multivariable analysis, seven were found associated with the risk of developing hGH-iCJD (Batches 1, 2, 3, 4, 7, 21, and 26). These 7 batches defined risk category 1. One hundred and four patients out of the 119 hGH-iCJD cases were exposed to at least one of these seven batches. Among the remaining 15 cases, 14 were exposed to at least one batch from a group of five batches with a p-

value $\leq$ 0.005 in the univariable analysis; those batches (10, 12, 13, 18, 24) defined the category of risk 2 (see supplementary figure e-1). The remaining 15 batches with a p-value $\leq$ 0.005 in the univariable analysis included neither in category of risk 1 nor in category 2 defined category of risk 3. The 36 batches with univariable p-value $>$ 0.005 defined category of risk 4. No significant association was found for age at hGH treatment initiation in the univariable analysis. Our final multivariable model included patient sex (HR, 1.89 CI [1.21-2.96], women taken as the reference class) and batches from category of risk 1 to 3. All the batches from category 1 were significant (p $\leq$ 0.05) except batches 21 and 26. Batches from category 2 and 3 were not significantly associated with the risk of developing hGH-iCJD, however the quantity of doses from batches was not taken into account in this analysis.

Table 3 presents the results of the univariable and multivariable Cox models including the quantity of treatment from each category. The proportion of hGH-iCJD male (9.7%) was twice higher than the proportion of hGH-iCD female (5.2%) and risk was 73% higher for male (HR, 1.73 CI [1.10-2.72]). Significant association between the quantity of treatment and risk for developing hGH-iCJD was found (HR, 1.04 CI [1.03-1.05], for 50 IU). The association was higher for the number of doses received from category 1 batches (HR, 1.25; CI [1.18-1.32] p $<$ 0.0001, for 50 IU) (see Figure). In hGH-iCJD group, proportion of doses from batches of categories 1, 2 and 3 were significantly higher (respectively 18%, 19% and 26%) compared to non-hGH-iCJD group (respectively 9%, 15% and 17%). In the multivariable analysis, proportion of doses from category of risk 1 was strongly associated with the risk of developing hGH-iCJD (HR, 66.54 CI [23.23-190.60]). A significant association but with a lower risk was observed for proportion of doses from category of risk 2 and 3 (HR, 3.80; CI [1.00-14.68]; HR, 5.55; CI [2.18-14.16], respectively). All batches

belonging to categories 1 to 3, except one (batch 24, category 2), were produced by the French research institute.

## Discussion

In an attempt to identify factors that influence the risk of developing hGH-iCJD in France, no effect of the age at treatment initiation was observed. A significant association was found between disease occurrence and patient sex with a two-fold higher proportion of subjects developing the disease in male. Four categories of risk were defined for hGH batches. hGH-iCJD cases received, in total, more doses of treatment compared to the non-cases and, in proportion, their treatment was mostly composed of doses from categories 1 to 3.

Category 1 included seven batches, out of which two are consistent with a previous study that used logistic regression on data from the 51 first French patients [7]. Of note, these two batches correspond to batches 1 and 2 showing the highest risk association in the final multivariate analysis (Table 1). The seven batches from category 1 have been used to treat 104 cases. Batches 21 and 26 were found significantly associated with the risk of developing hGH-iCJD in the stepwise process, but this association did not persist in the final model. Removing these two batches from category 1 would reduce the number of explained cases to 100. One hundred eighteen cases were exposed to the 12 batches from categories 1 and 2.

These 12 batches constitute the minimal combination of putative contaminated batches. However, it does not rule out that category 3 could include additional infectious batches. The 12 batches and notably the 7 batches from category 1 were produced in different years; therefore, we can assume more than one contamination. Among the 1324 subjects who did not develop hGH-iCJD after 30-years of exposure, 400 were not exposed to batches from categories 1 and 2, and 273 received only batches from category 4. In the next decades, the

risk of developing hGH-iCJD for these patients can reasonably be considered as very low to negligible.

A strong effect of doses from at risk batches on susceptibility was observed. The relationship between infectious doses and attack rate is a well-known phenomenon in experimental infectious models of prion diseases including non-human primate [9]. To our knowledge, this is, however, the first evidence based on quantitative data that it also applies in humans. In mean, the total dose from category 1 batches received by patients who developed iCJD was 273 UI (corresponding to 18% of their treatment) and significantly higher to that observed in patients who did not developed iCJD. However, 9% of the treatment received by patients of this latter group was composed of category 1 batches (corresponding to an exposure to a mean of 94 UI). This is not a negligible exposure to such a high-risk category. One per-cent of batches from category 1 represents a week of treatment for an eight years old boy at a weekly dose of 0.5 UI per kilogramme. That subjects who did not develop the disease received a substantial amount of category 1 batches together with the fact that increasing the proportion of category 1 batches by 1% increases the risk of developing the disease by a 66-fold factor, suggest both a cumulative effect of prion doses and a threshold effect of exposure. A cumulative prion effect has already been convincingly demonstrated in an experimental study using repeated intra-peritoneal injections of sub-infectious doses in mice with a schedule resembling to that used in hGH treatment in humans. Remarkably, repeated injections were more efficient to transmit scrapie than the same total dose inoculated in a single challenge, even if the unfractionated total dose is not infectious [10]. Our study provides first data suggesting a prion dose effect in inter-human transmission during hGH-iCJD epidemics where the fractionation of the exposure may have fostered prion transmission.

One factor known to influence the susceptibility of sporadic and variant CJD is the methionine/valine polymorphism at codon 129 of the PRNP gene [11-13]. We could not investigate this aspect in our cohort because status at codon 129 is unknown for non hGH-iCJD subjects. Nevertheless, as previously published, we observed in our cohort of hGH-iCJD patients a significantly higher proportion of homozygous cases (70%) compared to 49% in the normal population ( $X^2_{\text{test}}=12.1$ ,  $p=0.0005$ ) [14].

The effect of gender on disease susceptibility could not be explained by a difference in exposure. Indeed, the total doses received by male or female were not statistically different ( $p=0.96$ ). This is in contrast with the effect of sex on individual susceptibility to Kuru that was due to a higher exposure of females to infectious materials [15]. To our knowledge, no previous experimental studies have reported an influence of sex on individual susceptibility to develop the disease after prion transmission. However, a few studies indicated a slight influence of sex on the incubation period, suggesting that hormonal factors could play a role in the pathophysiology of infectious prion diseases notably after a peripheral exposure [16-18]. We did not observe any differences on the distribution of the causative diseases leading to GH deficiency between male and female in hGH-iCJD patients. For instance, the proportion of patients with brain tumours, that could have durably altered the blood brain barrier, was not higher in males. Whether and how sexual hormones could impact the attack rate in experimental models of peripheral infection need to be further investigated.

No effect of age at the beginning of treatment was found, notably the susceptibility was not higher in the group of subjects with a treatment onset between 0 and 9 years of age. Investigations in British patients treated with human pituitary growth hormone showed a significantly increased risk for patients treated at ages 8 to 10 years [4]. This was not the case in our cohort (HR, 1.21; CI [0.78-1.87]  $p=0.39$ ).

To conclude, studying the French hGH-exposed patients provides first epidemiological evidence of a relationship between dose of inoculum and disease occurrence in a human prion disease and suggest an unexpected effect of gender on individual susceptibility.

## References

1. Brown, P., et al., Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N Engl J Med*, 1985. 313(12): p. 728-31.
2. Powell-Jackson, J., et al., Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human growth hormone. *Lancet*, 1985. 2(8449): p. 244-6.
3. Billette de Villemeur, T.B., et al., Creutzfeldt-Jakob disease in children treated with growth hormone. *Lancet*, 1991. 337(8745): p. 864-5.
4. Swerdlow, A.J., et al., Creutzfeldt-Jakob disease in United Kingdom patients treated with human pituitary growth hormone. *Neurology*, 2003. 61(6): p. 783-91.
5. Fradkin, J.E., et al., Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *JAMA*, 1991. 265(7): p. 880-4.
6. Abrams, J.Y., et al., Lower risk of Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients initiating treatment after 1977. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(10): p. E1666-9.
7. Huillard d'Aignaux, J., A. Alperovitch, and J. Maccario, A statistical model to identify the contaminated lots implicated in iatrogenic transmission of Creutzfeldt-Jakob disease among French human growth hormone recipients. *Am J Epidemiol*, 1998. 147(6): p. 597-604.
8. Huillard d'Aignaux, J., et al., Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France. *Neurology*, 1999. 53(6): p. 1197-201.
9. Comoy, E.E., et al., Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 11573.

10. Jacquemot, C., et al., High incidence of scrapie induced by repeated injections of subinfectious prion doses. *J Virol*, 2005. 79(14): p. 8904-8.
11. Palmer, M.S., et al., Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 1991. 352(6333): p. 340-2.
12. Laplanche, J.L., et al., Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Neurology*, 1994. 44(12): p. 2347-51.
13. Brandel, J.P., et al., Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann Neurol*, 2009. 65(3): p. 249-56.
14. Brandel, J.P., et al., Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK. *Lancet*, 2003. 362(9378): p. 128-30.
15. Huillard d'Aignaux, J.N., et al., The incubation period of kuru. *Epidemiology*, 2002. 13(4): p. 402-8.
16. Outram, G.W., The pathogenesis of scrapie in mice. *Front Biol*, 1976. 44: p. 325-57.
17. Kimberlin, R.H. and C. Walker, Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol*, 1977. 34(2): p. 295-304.
18. Loeuillet, C., et al., Sex effect in mouse and human prion disease. *J Infect Dis*, 2010. 202(4): p. 648-54.

Table 1. Impact of gender, age at hGH treatment initiation and exposure to 27 batches (with a p-value significant in the univariate step) on susceptibility (Cox model).

Variables	hGH-iCJD	non hGH-iCJD	Univariate analysis		Multivariate analysis	
			HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Gender						
Male (%)	95 (79.8)	886 (67.0)	1.89 [1.21-2.96]	0.005	1.84 [1.15-2.94]	0.01
Female (%)	24 (20.2)	436 (33.0)	1		1	
Age at GH treatment initiation of the treatment (in years)						
[0-10] (%)	39 (8.0)	447 (92.0)	1		-	-
[10-14] (%)	46 (9.1)	459 (90.9)	1.15 [0.75-1.76]	0.52	-	-
[14-28] (%)	34 (7.5)	418 (92.5)	0.94 [0.59-1.49]	0.80	-	-
Batch 27***	21 (17.6)	129 (9.7)	1.96 [1.22-3.13]	0.005	0.74 [0.45-1.22]	0.24
Batch 26*	29 (24.4)	195 (14.7)	1.82 [1.20-2.77]	0.005	1.33 [0.79-2.24]	0.28
Batch 25***	17 (14.3)	88 (6.65)	2.20 [1.32-3.67]	0.003	0.73 [0.26-2.05]	0.73
Batch 24**	64 (53.8)	525 (39.6)	1.73 [1.20-2.47]	0.003	1.29 [0.85-1.98]	0.23
Batch 23***	34 (28.6)	229 (17.3)	1.85 [1.24-2.76]	0.002	0.74 [0.45-1.22]	0.24
Batch 22***	20 (16.8)	100 (7.5)	2.33 [1.44-3.77]	0.001	1.33 [0.39-4.50]	0.64
Batch 21*	19 (16.0)	95 (7.2)	2.32 [1.42-3.79]	0.001	2.10 [0.60-7.31]	0.25
Batch 20***	21 (17.6)	114 (8.6)	2.19 [1.37-3.51]	0.001	1.27 [0.69-2.31]	0.44
Batch 19***	39 (32.8)	228 (17.2)	2.24 [1.52-3.28]	<0.0001	0.41 [0.71-2.42]	0.33
Batch 18**	39 (32.8)	227 (17.1)	2.25 [1.53-3.30]	<0.0001	3.12 [0.54-18.15]	0.20
Batch 17***	22 (18.5)	112 (8.5)	2.32 [1.46-3.69]	<0.0001	1.18 [0.68-2.05]	0.55
Batch 16***	22 (18.5)	110 (8.3)	2.38 [1.50-3.79]	<0.0001	1.04 [0.56-1.94]	0.90
Batch 15***	34 (28.6)	180 (13.6)	2.41 [1.62-3.59]	<0.0001	1.29 [0.76-2.19]	0.34
Batch 14***	23 (19.3)	113 (8.5)	2.43 [1.54-3.83]	<0.0001	0.88 [0.49-1.57]	0.67
Batch 13**	43 (36.1)	237 (17.9)	2.46 [1.69-3.57]	<0.0001	1.44 [0.93-2.21]	0.10
Batch 12**	24 (20.2)	115 (8.7)	2.52 [1.61-3.94]	<0.0001	1.25 [0.65-2.40]	0.50
Batch 11***	42 (35.3)	223 (16.8)	2.56 [1.76-3.72]	<0.0001	1.05 [0.60-1.86]	0.86
Batch 10**	59 (49.6)	343 (25.9)	2.70 [1.88-3.86]	<0.0001	1.20 [0.75-1.91]	0.45
Batch 9***	25 (21.0)	113 (8.5)	2.71 [1.74-4.21]	<0.0001	1.30 [0.66-2.59]	0.45
Batch 8***	27 (22.7)	120 (9.1)	2.77 [1.80-4.25]	<0.0001	1.01 [0.49-2.09]	0.97
Batch 7*	28 (23.5)	119 (9.0)	2.85 [1.86-4.35]	<0.0001	1.81 [1.09-3.00]	0.02
Batch 6***	48 (40.3)	233 (17.6)	2.96 [2.05-4.27]	<0.0001	0.87 [0.48-1.61]	0.66
Batch 5***	29 (24.4)	111 (8.4)	3.30 [2.17-5.01]	<0.0001	0.69 [0.41-1.18]	0.18
Batch 4*	28 (23.5)	102 (7.7)	3.46 [2.27-5.29]	<0.0001	2.01 [1.05-3.86]	0.04
Batch 3*	55 (46.2)	232 (17.5)	3.75 [2.61-5.38]	<0.0001	1.96 [1.21-3.16]	0.006
Batch 2*	43 (36.1)	122 (9.2)	4.99 [3.43-7.26]	<0.0001	3.77 [2.35-6.04]	<0.0001
Batch 1*	41 (34.4)	102 (7.7)	5.46 [3.74-7.98]	<0.0001	3.66 [2.21-6.05]	<0.0001



\*Batches category 1; \*\*Batches category 2; \*\*\*Batches category 3. Data are count (proportions). Abbreviations: hGH-iCJD: iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human cadaver-sourced growth hormone. GH: Growth Hormone

Table 2. Univariable Hazards ratios of the 36 batches not include in the multivariable analysis.

Variables	hGH-iCJD	non hGH-iCJD	Univariate analysis	p-value	Multivariate analysis	p-value
			HR (95% CI)		HR (95% CI)	
Batch 63	0	1	-	-	-	-
Batch 62	0	1	-	-	-	-
Batch 61	0	1	-	-	-	-
Batch 60	0	1	-	-	-	-
Batch 59	1	0	-	-	-	-
Batch 58	0	2 (0.002)	-	-	-	-
Batch 57	0	52 (3.9)	-	-	-	-
Batch 56	0	50 (3.8)	-	-	-	-
Batch 55	2 (1.7)	33 (2.5)	0.68 [0.17-2.76]	0.59	-	-
Batch 54	12 (10.1)	113 (8.5)	1.20 [0.66-2.18]	0.55	-	-
Batch 53	7 (5.9)	98 (7.4)	0.79 [0.37-1.69]	0.54	-	-
Batch 52	33 (27.7)	330 (24.9)	1.13 [0.76-1.69]	0.53	-	-
Batch 51	6 (5.0)	89 (6.7)	0.75 [0.33-1.70]	0.49	-	-
Batch 50	24 (20.2)	307 (23.2)	0.84 [0.53-1.31]	0.43	-	-
Batch 49	9 (7.6)	129 (9.7)	0.76 [0.39-1.50]	0.43	-	-
Batch 48	6 (5.0)	91 (6.9)	0.72 [0.32-1.64]	0.43	-	-
Batch 47	4 (3.4)	71 (5.4)	0.62 [0.23-1.68]	0.35	-	-
Batch 46	3 (2.5)	57 (4.3)	0.58 [0.18-1.82]	0.35	-	-
Batch 45	9 (7.6)	136 (10.3)	0.72 [0.36-1.42]	0.34	-	-
Batch 44	1 (0.008)	30 (0.02)	0.37 [0.05-2.68]	0.33	-	-
Batch 43	30 (25.2)	279 (21.1)	1.24 [0.82-1.88]	0.30	-	-
Batch 42	11 (9.2)	83 (6.3)	1.47 [0.79-2.74]	0.22	-	-
Batch 41	19 (16.0)	155 (11.7)	1.39 [0.85-2.27]	0.19	-	-
Batch 40	5 (4.2)	100 (7.5)	0.55 [0.22-1.34]	0.19	-	-
Batch 39	2 (1.7)	71 (5.4)	0.31 [0.08-1.26]	0.10	-	-
Batch 38	5 (4.2)	24 (1.8)	2.25 [0.92-5.51]	0.08	-	-
Batch 37	15 (12.6)	102 (7.7)	1.66 [0.97-2.85]	0.07	-	-
Batch 36	25 (21.0)	393 (29.7)	0.64 [0.41-1.00]	0.05	-	-
Batch 35	17 (14.3)	117 (8.8)	1.69 [1.01-2.83]	0.04	-	-
Batch 34	17 (14.3)	109 (8.3)	1.78 [1.06-2.97]	0.03	-	-
Batch 33	17 (14.3)	107 (8.1)	1.83 [1.09-3.05]	0.02	-	-
Batch 32	32 (27.0)	238 (18.0)	1.64 [1.09-2.46]	0.02	-	-
Batch 31	35 (29.4)	268 (20.2)	1.59 [1.07-2.36]	0.02	-	-
Batch 30	39 (32.8)	307 (23.2)	1.58 [1.08-2.31]	0.02	-	-
Batch 29	16 (13.4)	94 (7.1)	1.96 [1.16-3.32]	0.01	-	-
Batch 28	20 (16.8)	127 (9.6)	1.84 [1.14-2.98]	0.01	-	-

Table 3. Cox model (multivariable and univariable Hazard Ratios) of associations between hGH-iCJD occurrence, gender and proportions of doses received from batches of categories 1 to 4.

			Univariable analysis		Multivariable analysis	
Variables	hGH-iCJD	non hGH-iCJD	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Gender						
Male (%)	95 (9.7)	886 (90.3)	1.89 [1.21-2.96]	0.005	1.73 [1.10-2.72]	0.02
Female (%)	24 (5.2)	436 (94.8)	1			
Proportion of doses risk category 1 (Batches 1,2,3,4,7,21,26)	0.18 (0.11)	0.09 (0.13)	21.47 [9.64-47.83] (per %)	<0.0001	66.54 [23.23-190.60] (per %)	<0.0001
Proportion of doses risk category 2 (Batches 10,12,13,18,24)	0.19 (0.12)	0.15 (0.16)	4.31 [1.61-11.54] (per %)	0.004	3.80 [1.00-14.68] (per %)	0.05
Proportion of doses risk category 3 (Batches 5,6,8,9,11,14,15,16,17,19,20,22,23,25,27)	0.26 (0.15)	0.17 (0.22)	3.91 [1.99-7.69] (per %)	<0.0001	5.55 [2.18-14.16] (per %)	<0.0001
Proportion of doses risk category 4	0.37 (0.23)	0.59 (0.31)	-	-	-	-
Total number of doses	1610.82 (749.91)	1108.82 (763.50)	1.03 [1.02-1.04] (per 50 IU)	<0.0001	1.04 [1.03-1.05] (per 50 IU)	<0.0001

Data are count (proportions) and means (standard deviation).

Abbreviations: hGH-iCJD: iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after the administration of human cadaver-sourced growth hormone.

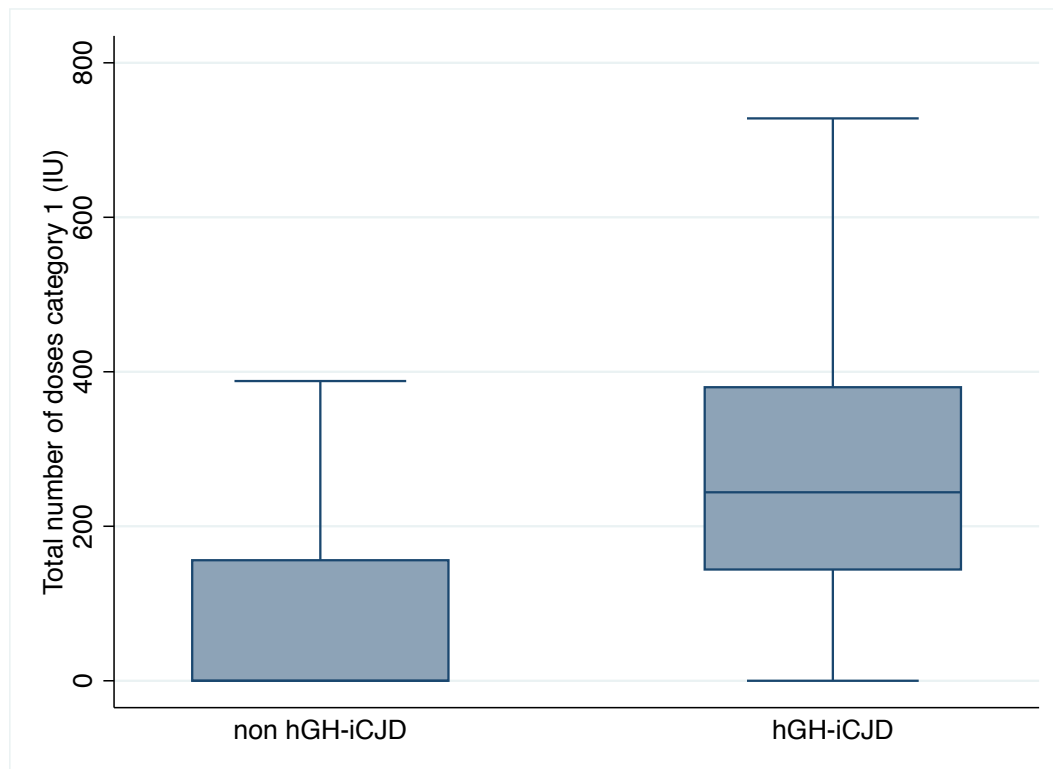


Figure 1: Box plots of the total number of doses received from category 1 batches by non-hGH-iCJD and hGH-iCJD patients. Cox model HR, 1.25; CI [1.18-1.32]  $p < 0.0001$ , for 50 IU. Median equals to 0 in the non hGH-iCJD group.

Supplementary Data

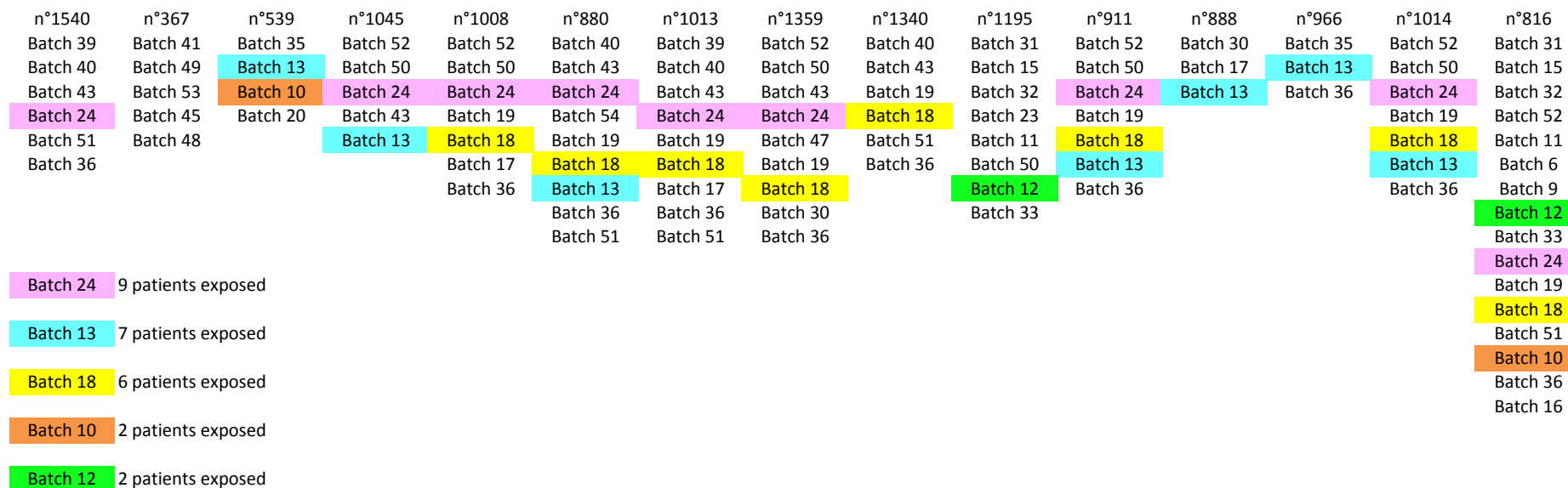
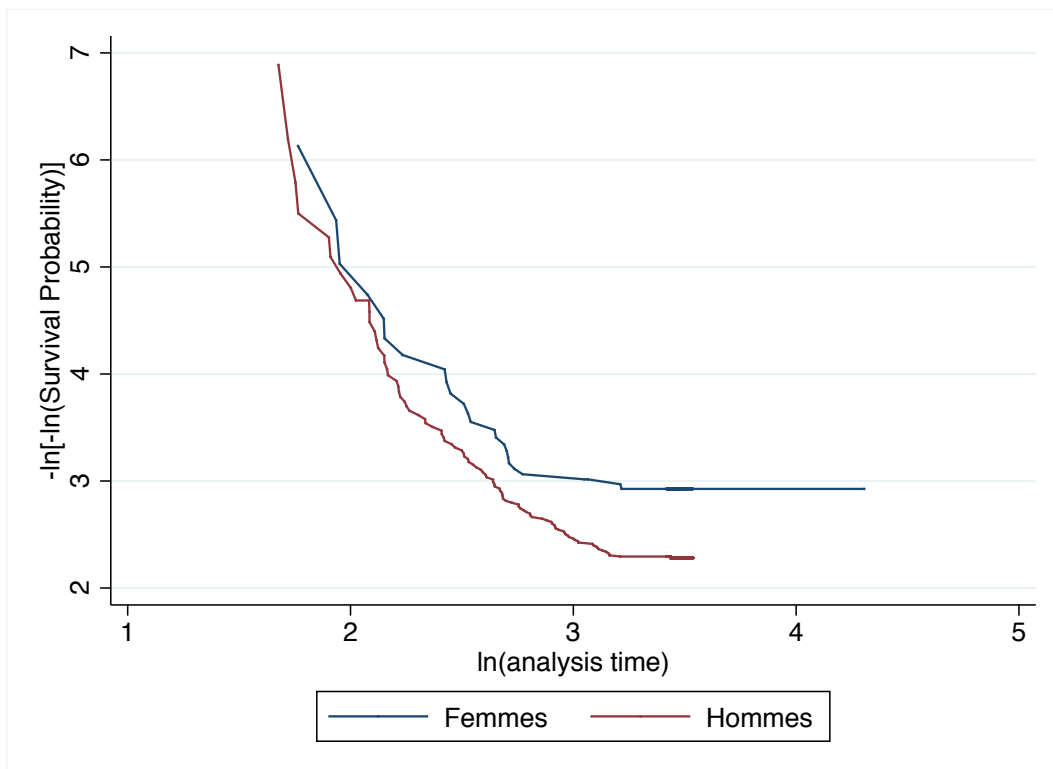


Figure e-1. Batches received by the 15 patients with hGH-iCJD who were not exposed to batches from category 1.

### Résultats complémentaires

Ce paragraphe présente les résultats de la vérification de l'hypothèse des risques proportionnels (hypothèse du modèle de Cox) par une représentation graphique et un test des résidus de Schoenfeld pour chaque variable et pour l'ensemble du modèle. Une courbe de survie de type Kaplan-Meier complète les résultats de notre article.

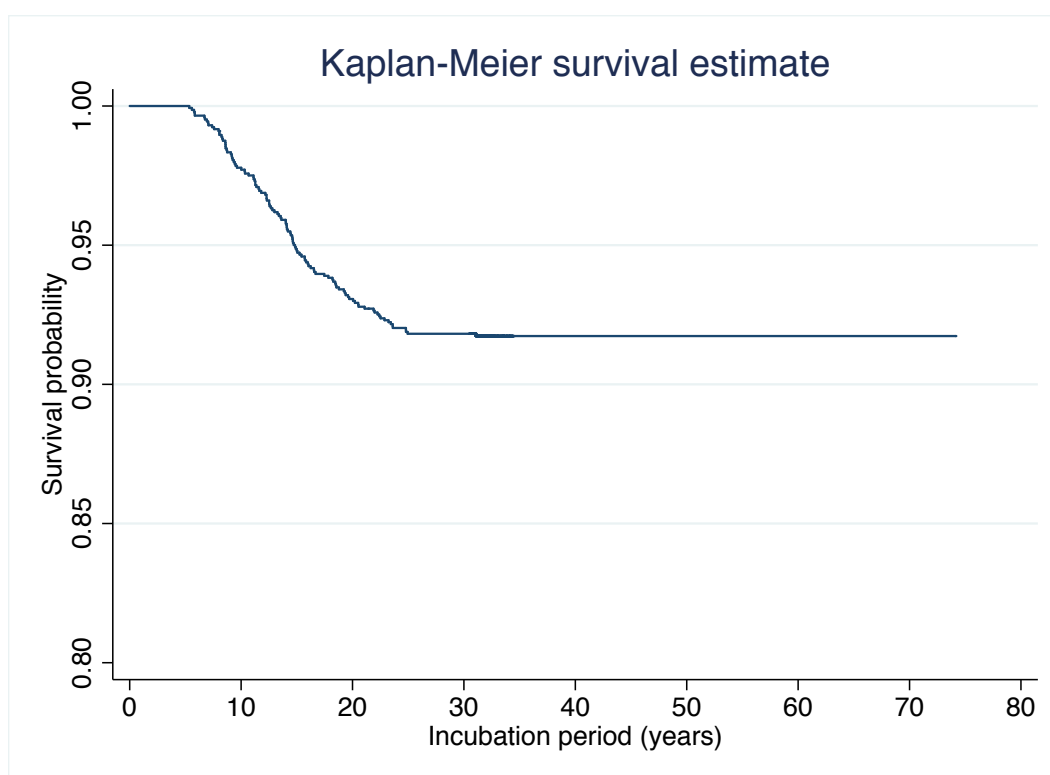


**Figure 18 : Représentation graphique de la fonction  $\ln(-\ln)$  de la fonction de survie chez les hommes et les femmes.**

Les tests utilisant les résidus de Schoenfeld nous permettent de conclure que l'hypothèse des risques proportionnels est respectée pour chaque variable et pour l'ensemble des variables contenues dans le deuxième modèle (Tableau 11). Les résultats de ces tests pour le premier modèle ne sont pas présentés mais la même procédure de vérification a été effectuée et nous permet également de conclure que l'hypothèse des risques proportionnels est respectée (test global  $\chi^2=25,46$ , p-value=0,6).

Variabes	$\chi^2$	p-value
Sexe	0,98	0,32
Proportion de doses niveau 1	0,10	0,75
Proportion de doses niveau 2	0,33	0,56
Proportion de doses niveau 3	1,29	0,26
Nombre total de doses	0,05	0,82
Test global	2,59	0,76

**Tableau 11 : Résultats des tests utilisant les résidus de Schoenfeld par chaque variable et pour l'ensemble des variables contenues dans le deuxième modèle final.**



**Figure 19 : Courbe de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour l'ensemble des 1443 patients ayant été traités par l'hormone de croissance entre janvier 1982 et décembre 1985.**

### C. Discussion

Grâce à cette première étude, nous avons pu conclure que l'âge au début du traitement n'influçait pas le risque de développer une MCJ iatrogène. Dans l'étude de Swerdlow et al, les patients britanniques ayant reçu un traitement à des âges compris entre 8 et 10 ans

présentaient un risque accru de développer une MCJ (Swerdlow, Higgins et al. 2003). Dans la cohorte française, ce résultat n'a pas été retrouvé. Un âge de traitement compris entre 8 et 10 ans ne semble pas influencer la susceptibilité de développer une MCJ (Cox model HR, 1.21; CI [0.78-1.87]  $p=0.39$ ).

En revanche, nous avons observé une proportion d'hommes deux fois plus importante parmi les cas de MCJ (Cox model HR, 1.84; CI [1.15-2.94]  $p=0.01$ ). Cet effet n'est pas expliqué par une différence d'exposition entre hommes et femmes puisque le nombre total de doses reçues dans ces deux groupes n'était pas statistiquement différent (Mann-Whitney test  $=-0.05$ ,  $p=0.96$ ). Cette proportion homme/femme non expliquée par une différence d'exposition contraste avec les résultats observés chez les patients atteints de Kuru ou de vMCJ. Dans le cas du Kuru, la susceptibilité féminine était due à des niveaux d'exposition plus élevés à l'agent infectieux. Pour rappel, lors des rites mortuaires cannibales des Foré, les femmes s'occupaient de la préparation des repas et consommaient plutôt les abats et notamment le cerveau s'exposant ainsi à des doses infectantes plus importantes que les hommes qui ne consommaient que les muscles. Pour les cas de vMCJ britanniques, aucune différence significative n'a été retrouvée sur la susceptibilité à développer la maladie entre les hommes et les femmes. Néanmoins, l'âge en début de maladie était plus précoce de 2 ans chez les femmes ce qui pourrait être lié à un régime alimentaire distinct entre les hommes et les femmes. Une autre explication possible pourrait être un âge d'entrée dans la puberté plus précoce chez les femmes. Cette dernière explication pourrait suggérer un rôle des facteurs hormonaux dans la physiopathologie des formes infectieuses de maladies à prions notamment après une inoculation en périphérie (Outram 1976, Kimberlin and Walker 1977, Loeuillet, Boelle et al. 2010). A notre connaissance, la susceptibilité à la MCJ selon le sexe n'a pas été rapportée dans les études expérimentales. Quelques publications rapportent une influence du sexe sur la période d'incubation lors des expériences de transmission de l'agent de la tremblante (souche ME-7) aux souris (C57/Bl6N). Nous avons également émis l'hypothèse que l'effet observé du sexe sur la susceptibilité de développer la MCJ pourrait être biaisé par une répartition différente des maladies ayant conduit au traitement par hGH selon le sexe. En effet les maladies causales sont diverses et peuvent, pour certaines d'entre elles comme les tumeurs cérébrales, altérer la barrière hémato-encéphalique (BHE) pouvant rendre les sujets plus susceptibles au développement de la MCJ, dans le cas d'une exposition périphérique et notamment en cas d'injections systémiques. Cependant, la distribution des maladies causales entraînant une altération de la BHE est identique entre les hommes/et les femmes.

Concernant les lots, 4 catégories de risque ont pu être définies. La catégorie 1 (catégorie où le risque associé à la susceptibilité est le plus élevé) est constituée de 7 lots parmi lesquels deux avaient été précédemment identifiés en tant que lots à risque par un modèle de régression logistique appliquée aux 51 premiers patients uniquement (Huillard d'Aignaux, Alperovitch et al. 1998). Ces deux lots correspondent aux lots pour lesquels les risques calculés étaient les plus élevés dans notre étude. L'ensemble des 7 lots de la catégorie 1 permet d'expliquer 104 des 119 patients. En ajoutant à ces 7 lots, les 5 lots constituant la catégorie de risque 2, nous pouvons expliquer 118 des 119 cas. Ces 12 lots pourraient donc former la combinaison minimale de lots potentiellement contaminés. Néanmoins, puisque tous les cas observés ne sont pas expliqués par cette combinaison de lots, il n'est pas exclu qu'un lot appartenant à la catégorie 3 puissent être contaminé. Les 12 lots ont été produits au cours de différentes années, nous pouvons donc supposer qu'il existe plusieurs contaminations. Parmi les 1324 patients n'ayant pas développé de MCJ après 30 ans d'exposition, 400 n'ont pas reçu de lots des catégories 1 et 2 et 273 n'ont reçu que des lots de la catégorie 4. Le risque de développer une MCJ iatrogène pour ces deux groupes de patients peut donc être considéré comme négligeable.

En ce qui concerne les doses de traitement distribuées, les cas de MCJ ont reçu un nombre plus important de doses (1610 UI versus 1109 pour les patients n'ayant pas développé de MCJ) et, en proportion, leurs traitements ont été majoritairement composés de lots appartenant aux catégories 1, 2 et 3. De plus, si l'on ne tient compte que de la catégorie 1, la dose moyenne reçue par les patients ayant développé une MCJ était de 273 UI (correspondant à 18% de leur traitement). Cette dose est significativement différente de celle reçue par les patients n'ayant pas développé une MCJ (94 UI correspondant à 9% de leur traitement). Une exposition à 94 UI provenant de la catégorie 1 n'est pas négligeable compte-tenu du risque associé à cette catégorie. Notons qu'1% du traitement total moyen représente une semaine de traitement pour un enfant de 8 ans traité à la dose de 0,5UI/semaine/kg. Les patients n'ayant pas développé de MCJ ont donc été exposés à une quantité substantielle de doses issues de la catégorie 1. Ceci ajouté au fait qu'1% supplémentaire de traitement de la catégorie 1 augmente le risque de développer la maladie de 66% suggère à la fois un effet cumulatif des doses de prions et l'existence d'un seuil d'exposition pour la survenue de la maladie. L'effet cumulatif des doses de prions a été précédemment montré chez la souris par des injections répétées, par voie intra péritonéale, de doses sub-infectieuses mimant le protocole de traitement suivi par les patients traités par hGH. Ainsi des injections répétées transmettaient plus efficacement la maladie que l'injection en une seule fois de la même dose infectieuse et



ceci même si cette dernière dose n'était pas infectante en une seule injection. Les résultats de notre étude apportent les premiers arguments en faveur d'un effet dose dans la transmission interhumaine de la MCJ, où le fractionnement de la dose d'exposition aurait pu contribuer à faciliter la transmission.

Un des facteurs de susceptibilité des formes sporadiques et variante de la MCJ est le polymorphisme au codon 129 (Palmer, Dryden et al. 1991, Laplanche, Delasnerie-Laupretre et al. 1994, Brandel, Heath et al. 2009), où les cas homozygotes sont prépondérants en comparaison avec la population générale. En comparant la répartition au codon 129 entre notre population de sujets atteints de MCJ et la population générale française, nous avons également observé une proportion plus élevée d'homozygotes parmi les cas de MCJ iatrogène ( $\chi^2$ test=12.1, p=0.0005). Ne disposant pas du statut génétique des patients traités et n'ayant pas développé de MCJ iatrogène, il n'a pas été possible de déterminer formellement si le polymorphisme au codon 129 pouvait être un facteur de risque de développer une MCJ iatrogène.

L'ensemble de ces analyses a donc permis de montrer pour la première fois, chez l'homme, une relation entre les doses d'inoculum et l'apparition de la maladie et, suggère, de manière inattendue, une influence du sexe sur la susceptibilité.

## D. Perspectives

Les perspectives de ce travail ciblent deux points d'étude.

Premièrement, il serait important d'étudier, à l'aide de modèles expérimentaux et par injection périphérique, si l'effet du sexe sur la susceptibilité peut être reproduit. Cet effet du sexe a été observé dans notre cohorte sur des patients ayant probablement été exposés à de faibles doses de PrP<sup>sc</sup>. Il faudrait pouvoir valider les rôles et les mécanismes des hormones sexuelles sur le taux d'attaque dans un modèle expérimental et d'en étudier les mécanismes. La susceptibilité masculine à la MCJ iatrogène ne semble pas être corrélée à des niveaux d'expression de la PrP<sup>c</sup> différents entre les sexes. Cesbron et al. ont montré que le niveau d'expression de la PrP<sup>sc</sup> dans le cerveau et dans la rate n'était pas différent dans des souris déficientes en récepteur androgène (Loeuillet, Boelle et al. 2010). Chez le rat et la souris, Velayos et al. ont montré que la PrP<sup>c</sup> est plus largement exprimée chez les mâles dans les aires préoptiques et de l'hypothalamus antérieur. En revanche, chez les femelles, la PrP<sup>c</sup> semble s'exprimer plus intensément dans le cortex frontal que chez les mâles (Cuadrado-Tejedor, Irujo et al. 2011).

Deuxièmement, parce que nous avons pu identifier par cette étude, quatre catégories de lots définis par leur niveau de risque associé à la susceptibilité de développer la MCJ et que nous disposons maintenant de techniques d'amplification ultrasensible comme la RT-QuIC nous allons pouvoir détecter la présence de la protéine prion anormale dans ces lots. En cas de détection positive, nous pourrions envisager à l'aide d'une approche de type RT-QuIC quantitative d'évaluer, au travers de la mesure de l'activité de pro-agrégative, le niveau relatif de contamination de chaque lot détecté. Le niveau de détection pourrait être corrélé au titre infectieux tel qu'il peut être mesuré dans des modèles de souris transgéniques sur-exprimant la PrP humaine à l'aide des souches de MCJ sporadique d'intérêt (voir chapitre IV de la partie résultats). Une demande d'autorisation d'utilisation de ces lots (levée de la mise sous scellés) à des fins de recherches scientifiques, compte-tenu de l'avancée des techniques de détection plus sensibles de la PrP<sup>sc</sup>, a été faite auprès du Ministère de la Justice. Cette demande est encore à l'étude.

## **II. Article 2: Factors influencing the incubation of Creutzfeldt-Jakob disease after growth hormone treatment**

### **A. Introduction**

Dans cette deuxième partie, notre travail s'est focalisé sur la cohorte des 119 patients décédés d'une MCJ iatrogène dans le but d'identifier les facteurs gouvernant la période d'incubation. Depuis l'émergence des premiers cas de MCJ iatrogènes secondaires à un traitement par hormone de croissance en novembre 1984, les Etats-Unis, le Royaume-Uni et la France sont les 3 pays les plus touchés, regroupant 94% des cas dans le monde. Des études portant sur les facteurs influençant la susceptibilité ont été réalisées dans ces 3 pays et, au Royaume-Uni, des estimations de la période d'incubation ont été faites et la recherche de facteurs pouvant expliquer sa variabilité entre sujets a été réalisée. Dans l'hypothèse d'un modèle de Weibull et d'une date d'infection correspondant au milieu du traitement, le mode de la période d'incubation a été estimé à 17,8 ans et les estimations suggèrent que 99,9% des cas devraient apparaître dans les 30 ans suivant l'exposition. Une légère différence a été retrouvée entre les périodes d'incubation des homozygotes et des hétérozygotes au codon 129, les homozygotes ayant une période d'incubation moyenne plus courte de 2 ans.

En France, Huillard d'Aignaux et al. ont étudié la période d'incubation en se basant sur les 55 premiers cas (Huillard d'Aignaux, Costagliola et al. 1999). Selon la distribution mathématique choisie, la période d'incubation moyenne était comprise entre 9 et 10 ans et le 95<sup>ème</sup> percentile entre 15 et 16 ans. Le même travail a été réalisé sur la cohorte des patients homozygotes au codon 129 (n=46), et il a été montré que la période d'incubation était plus courte chez ces patients homozygotes que celle de l'ensemble des 55 patients. Malheureusement, le faible nombre de cas hétérozygotes (n=6), au moment de cette étude, n'a pas permis d'estimer leur période d'incubation et donc la comparaison de ces paramètres estimés entre les différents génotypes au codon 129. Les données annuelles d'incidence des cas MCJ iatrogène après traitement par hormone de croissance (post-hGH) ont montré que les hétérozygotes apparaissaient plus tardivement que les homozygotes.

Depuis 2009, un seul cas de MCJ post-hGH est décédé, suggérant que, en accord avec les estimations faites dans ce premier travail, la plupart des cas ont été diagnostiqués et rapportés. Il nous a donc paru opportun d'actualiser des estimations d'incidence qui n'étaient basées que sur les 55 premiers cas, et d'étudier l'impact de l'âge au début de traitement, de la dose reçue et du sexe sur la période d'incubation. Ces variables ont été précédemment utilisées pour l'étude cherchant à identifier les facteurs associés à la susceptibilité de développer une MCJ iatrogène (première partie). De plus, depuis l'étude de Huillard d'Aignaux et al. de 1999, on dénombre, à ce jour, 33 cas hétérozygotes, ce qui permet désormais la réalisation d'une estimation de la période d'incubation dans ce groupe et de la comparer à celle du groupe des patients homozygotes.

## B. Résultats

### **Article 2 (En soumission)**

Factors influencing the incubation of Creutzfeldt-Jakob disease after growth hormone treatment

Authors: Laurène Peckeu<sup>1</sup>, MSc, Jean-Philippe Brandel<sup>1,2</sup> MD, Arlette Welaratne<sup>1,2</sup>, Jean-Louis Laplanche<sup>5</sup>, \*Dominique Costagliola<sup>3</sup>, PhD, \*Stéphane Haïk<sup>1,2,4</sup>, MD, PhD.

<sup>1</sup> Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

<sup>2</sup> AP-HP, Cellule Nationale de Référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

<sup>3</sup> Sorbonne Universités, INSERM and UPMC Univ Paris 06, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMR\_S 1136), Paris, France

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de Neuropathologie R Escourolle, F-75013 Paris, France

<sup>5</sup> UF de Génétique Moléculaire, pôle B2P, Hôpital Lariboisière, Paris, France

Title character count: 84

Number of references: 10

Number of tables: 1

Number of figures: 1

Word count abstract: 204

Word count paper: 1261

## Abstract

Objective: to examine the influence of host characteristics and exposure on the incubation period and updated the estimations of the incubation period in the French epidemic of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after treatment with cadaver-sourced human growth hormone (hGH-iCJD).

Methods: This study included all 119 hGH-iCJD cases identified up to December 2015 in France. We used a truncated Weibull distribution and maximum likelihood technics. The

variables studied were gender, genotype at codon 129 of the prion protein gene, age at treatment initiation and level of exposure (batches and doses).

Results: The mean incubation was estimated as 14.2 years. The 95th and 99th percentiles were respectively, 24.7 and 30.4 years. While no effect of gender was observed, the estimations of the incubation time varied significantly according to codon 129 genotype, age at the treatment initiation and amount of doses received from the French hormone batches that were associated with the highest risk of developing the disease in treated subjects.

Conclusions: Our findings indicate that 95% of hGH-iCJD cases already occurred in France. Heterozygous individuals showed a mean incubation time 5 years longer compare to the homozygous patients. We also provided first evidence in humans of an effect of the prion infectious dose on the incubation period.

## Introduction

Since the outbreak of iatrogenic CJD after the administration of cadaver-sourced growth hormone (hGH-iCJD) in 1984, 94% of the cases worldwide occurred in the United States, the United Kingdom and France. Studying hGH-iCJD epidemics provides a unique opportunity to better understand the factors that impact individual susceptibility [1-3] and duration of the incubation period after a peripheral exposure.

In the UK, the peak of the distribution was estimated using a Weibull model as 17.8 years after the midpoint of hGH treatment and 99.9% of cases should have occurred 30 years after exposure [1].

In France, an estimation on the 55 first cases suggested a median incubation period of 9 to 10 years and a 95<sup>th</sup> percentile of the cases distribution at 15 to 16 years [4]. By taking into account only patients homozygous at codon 129 of the prion protein gene, the estimated

incubation time was shorter than in the whole cohort. Due to the small number of heterozygous cases ( $n=6$ ), it was not possible to estimate the incubation period for that group. In France, the last death due to hGH-iCJD occurred in December 2015 suggesting that nearly all cases have been diagnosed. In this study, we updated the estimations of the incubation period on the basis of 119 hGH-iCJD cases identified in France up to December 2015, and examined the influence of gender, codon 129 genotype, age at treatment initiation and level of exposure on the incubation period.

## Patients and Methods

### Study design

We included all of the 119 probable and definite hGH-iCJD cases that were diagnosed and reported from February 1991 to December 2015 in France. All cases identified so far share a common period of hGH treatment from January 1982 to December 1985. This period was previously defined as the high-risk period of treatment. We assume no missing cases because each case of hGH-iCJD is systematically reported to the French National CJD Surveillance Network. Diagnosis was based on EuroCJD criteria. Individual data on hGH treatment history (batches and doses) and patient characteristics (sex and age at treatment initiation) were collected from the France Hypophyse database. The genotype at codon 129 was available for 111 patients. Date at disease onset and at death was provided by the CJD surveillance network.

### Statistical analysis

We estimated the incubation time (interval between the midpoint of treatment during the high-risk period and date of disease onset), using a truncated Weibull distribution and maximum likelihood technics as described in Lui et al [5]. The Weibull distribution was

previously used to estimate the size of variant CJD epidemics in the UK [1] and the incubation period of hGH-iCJD in France [4]. We assumed that all French cases had been reported since the occurrence of the disease in 1991 (no left censoring). As the last death due to hGH-iCJD occurred in December 2015, we decided to censor our data on the 31<sup>st</sup> December 2015 (right censoring). In addition of the two usual parameters of the Weibull distribution, our model took into account an additional parameter ( $\theta$ ) that represents the estimated minimal number of years after exposure before the onset of the disease. Likelihood ratio test was used to compare the Weibull parameters between groups. In a previous work, we defined three categories of hGH batches according to the level of risk (Peckeu 2017). The category 1 contains the seven batches with the highest associated risk of developing hGH-iCJD (HR: 66.54 95%, confidence interval (CI) [23.23-190.60]), which can explain 104 out of the 119 cases. In this study, we used the total number of doses from these 7 batches that were estimated as the most probably contaminated, divided according to the value terciles to define the dose. To enable the detection of non-linear effects, age at hGH treatment initiation was split into three groups corresponding to age terciles. STATA software was used for data management and analysis. A p-value  $\leq 0.05$  was considered significant.

## Results

Among the 119 cases, 20% were female and the median age at treatment initiation was 12 years. Of the 111 cases with available genetic data, 60 (54%) were methionine homozygotes at codon 129, 18 (16%) valine homozygotes and 33 (30%) heterozygotes. The median number of doses received from category 1 batches was 244 UI.

Overall, the mean incubation was estimated as 14.2 years (95%CI [13.1-15.3]) and median as 13.3 years (95%CI [12.3-14.4]). The 95<sup>th</sup> and 99<sup>th</sup> percentiles were respectively 24.7 (95%CI [21.8-27.6]) and, 30.4 years (95%CI [26.0-34.8]).

Table 2 presents the results of the estimated mean, median,  $\theta$  parameter, 95<sup>th</sup> percentile and 99<sup>th</sup> percentile according to the variables studied. No significant association was found with gender (likelihood ratio test=1.0, p-value=0.3). However, incubation time differed with age at treatment initiation. The shortest incubation period was estimated in the group that started the treatment between 10.0 and 13.7 years. The incubation time was influenced by status at codon 129 being, in mean, 12.6 (95%CI [11.4-13.9]) in homozygotes and 17.6 years 95%CI [15.5-19.6] in heterozygotes (Figure 1A). Moreover, the  $\theta$  parameter was estimated as 5.2 years for homozygous individuals and 11.0 years for heterozygous. Incubation time varies significantly according to the number of doses from category 1, the higher the number of doses from category 1 the shorter was the incubation period (Figure 1B).

## Discussion

The estimations of the incubation time varied according to codon 129 genotype, age at the treatment initiation and the number of category 1 doses, but wasn't significantly different according to gender.

Under the assumption of a Weibull distribution, we found that 95% of the cases would occurred within 24.7 years after exposure and varying from 22.9 to 27.1 years according to the groups. Patients with a treatment initiation between 10 and 14 years developed the disease earlier. This is consistent with results from the British series and with experimental data in mice [1, 6].

The mean estimated incubation time (14.2 years) was close to the observed one (14.1 (SD 5.3)) showing that the impact of censoring is now limited, given the length of observation. Of



note, the observed 95<sup>th</sup> percentile was equal to 23.6 years. For the first time, estimations restricted to heterozygous French patients were possible. Heterozygosity at codon 129 was associated with a five years increase in the mean incubation time and a shifted starting point of 6 years. This effect is consistent with a 2003 study of the French series and, stronger than that observed in the British cohort [1, 7], maybe due to difference in the received dose. Study on Kuru epidemic showed that heterozygous were older at death than homozygous patients and more frequent in patients with very long incubation periods [8]. In vCJD cases, all of the cases except one are homozygous methionine at codon 129. The only methionine-valine case was observed in 2016, 21 years after the first homozygous patients. These converging data support the role of the codon 129 genotype as a key factor influencing the incubation period after a peripheral exposure.

In addition, patients who received the higher number of doses from category 1 batches showed the shorter incubation period. This effect was also found when the analysis was restricted to homozygous individuals (likelihood ratio test=6.5, p-value=0.04). While the effect of infectious dose on the incubation period has been well documented in experimental prion models including non-human primates [9, 10], we provide first quantitative data showing that it also applies in humans.

In summary, our approach predicts that, in France, 95% of hGH-iCJD cases already occurred in homozygous subjects and most likely in heterozygous individuals with an estimated upper bound of the 95<sup>th</sup> percentile of 33.9 years and a mean incubation time 5 years longer. We also provided first evidence in humans of an effect of the prion infectious dose on the incubation period.

## References

1. Swerdlow, A.J., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease in United Kingdom patients treated with human pituitary growth hormone*. Neurology, 2003. **61**(6): p. 783-91.
2. Fradkin, J.E., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States*. JAMA, 1991. **265**(7): p. 880-4.
3. Peckeu, L., et al., *Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France*. Submitted, 2017.
4. Huillard d'Aignaux, J., et al., *Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France*. Neurology, 1999. **53**(6): p. 1197-201.
5. Lui, K.J., et al., *A model-based approach to characterize the incubation period of paediatric transfusion-associated acquired immunodeficiency syndrome*. Stat Med, 1988. **7**(3): p. 395-401.
6. Manolakou, K., et al., *Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7402-7.
7. Brandel, J.P., et al., *Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK*. Lancet, 2003. **362**(9378): p. 128-30.
8. Cervenakova, L., et al., *Phenotype-genotype studies in kuru: implications for new variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13239-41.
9. Dickinson, A.G., H. Fraser, and G.W. Outram, *Scrapie incubation time can exceed natural lifespan*. Nature, 1975. **256**(5520): p. 732-3.
10. Comoy, E.E., et al., *Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11573.

Table 1: Characteristics of the 119 hGH-iCJD cases reported from February 1991 to December 2015 to French National CJD Network.

Characteristics	Value n (%)
<b>Gender</b>	
Male	95 (80)
Female	24 (20)
<b>Age at treatment initiation (years)</b>	
[0.0-10.0]	39 (32)
[10.0-13.7]	40 (34)
[13.7-22.0]	40 (34)
<b>Codon 129 genotype</b>	
Methionine-Methionine	60 (50)
Valine-Valine	18 (15)
Methionine-Valine	33 (28)
Unknown	8 (7)
<b>Total number of doses risk category 1(UI)</b>	
[0.0-164.8]	39 (32)
[164.8-313.6]	40 (34)
[313.6-800.0]	40 (34)

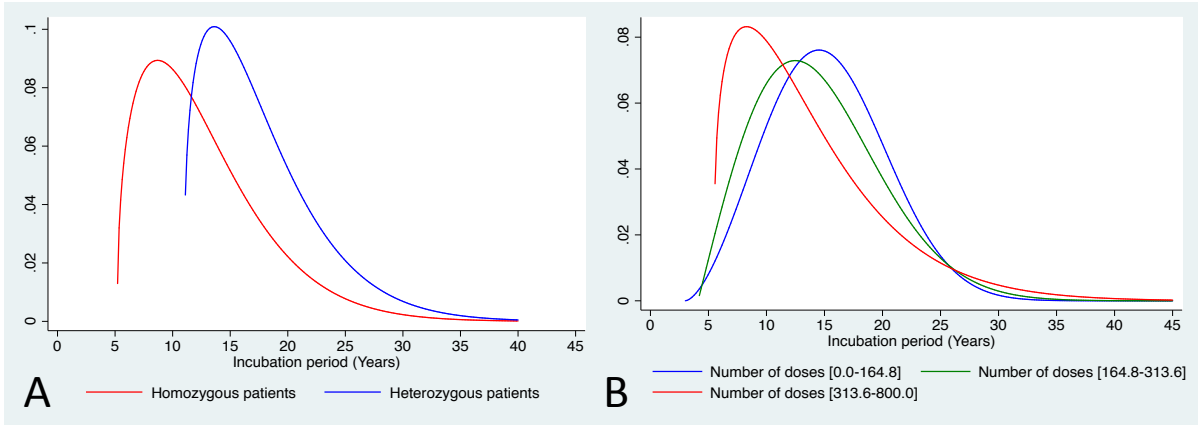
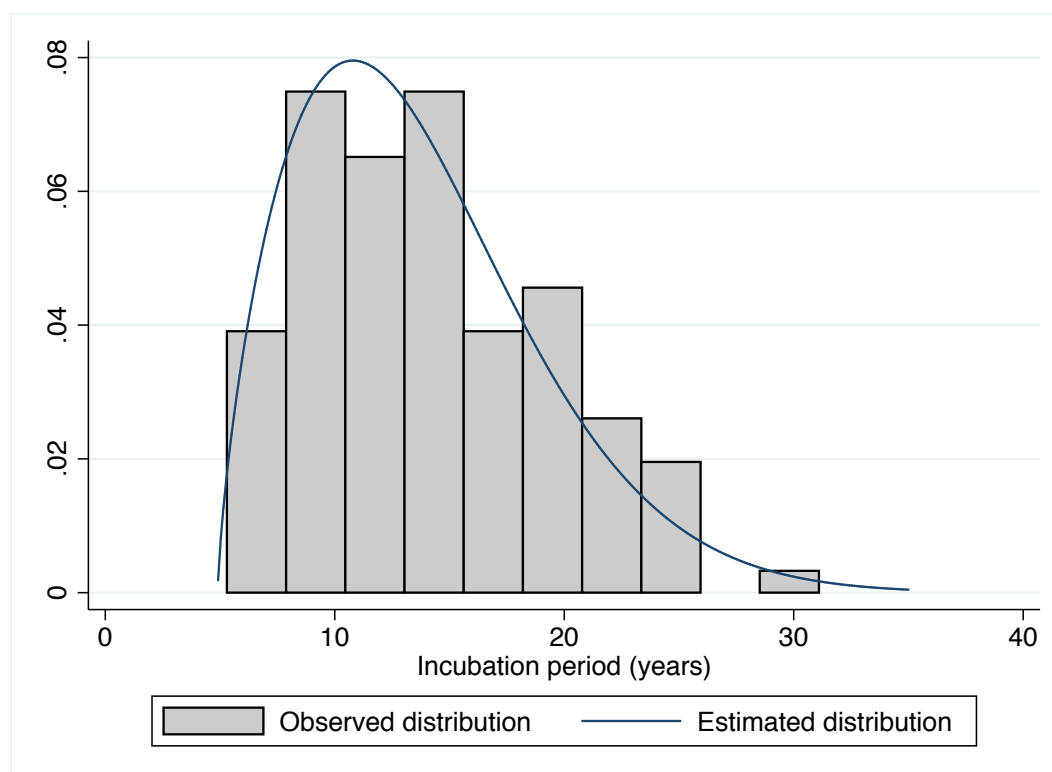


Figure 1: A.Estimated Weibull distributions of homozygous and heterozygous hGH-iCJD.  
B.Estimated Weibull distributions according to three terciles of the number of doses received from category 1.

Table 2: Estimates of the parameters of the incubation period distribution of hGH-iCJD using the truncated Weibull model

Variables		N	θ (years)	p-value	Mean (Years)	95% CI	Median (Years)	95%CI	95 <sup>th</sup> Percentile (Years)	95%CI	99 <sup>th</sup> Percentile (Years)	95%CI
hGH-iCJD		119	4.9	-	14.2	[13.1-15.3]	13.3	[12.3-14.4]	24.7	[21.8-27.6]	30.4	[26.0-34.8]
Gender	Male	95	5.1	0.31	14.5	[13.2-15.7]	13.5	[12.3-14.7]	25.4	[21.8-28.9]	31.3	[25.9-36.8]
	Female	24	5.7		13.2	[11.1-15.4]	12.3	[10.2-14.4]	23.2	[17.1-29.2]	28.9	[19.4-38.4]
Age at treatment initiation	[0.0-10.0]	39	3.5	0.02	15.2	[13.2-17.2]	14.5	[12.5-16.6]	26.1	[21.0-31.3]	31.4	[23.8-39.0]
	[10.0-13.7]	40	5.3		13.5	[11.6-15.4]	12.3	[10.6-14.1]	24.4	[18.6-30.1]	30.8	[21.6-40.0]
	[13.7-22.0]	40	6.6		14.0	[12.3-15.7]	13.0	[11.4-14.6]	23.7	[19.0-28.4]	29.4	[22.1-36.7]
Codon 129	Homozygous	78	5.2	$3.2 \times 10^{-20}$	12.6	[11.4-13.9]	11.5	[10.3-12.7]	22.9	[19.2-26.6]	29.2	[23.3-35.1]
	Heterozygous	33	11.0		17.6	[15.5-19.6]	16.4	[14.8-18.1]	27.1	[20.4-33.9]	33.2	[22.1-44.4]
Number of UI category 1	[0.0-164.8]	39	3.0	0.05	14.8	[13.3-16.3]	14.6	[12.9-16.2]	23.1	[20.3-26.0]	26.7	[22.7-30.7]
	[164.8-313.6]	40	4.1		14.4	[12.7-16.1]	13.8	[12.0-15.6]	24.2	[20.2-28.3]	29.0	[23.0-35.0]
	[313.6-800.0]	40	5.5		13.4	[11.2-15.7]	12.0	[10.1-13.8]	25.6	[18.2-32.9]	33.5	[21.4-45.6]

Le format de l'article (short communication) a limité le nombre de figure et données pouvant être incluses. Ainsi, la représentation graphique des distributions observées et estimées par notre modèle de Weibull n'a pas pu être intégrée ainsi que le test d'adéquation des données au modèle. Ces résultats complémentaires sont présentés ci-dessous.



**Figure 20 : Représentation des distributions observée et estimée de la période d'incubation pour l'ensemble des 119 cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par l'hormone de croissance.**

Un test du  $\chi^2$  a été réalisé afin d'évaluer l'adéquation de nos données à notre modèle. A l'issue de ce test, l'hypothèse n'est pas rejetée et nous pouvons donc conclure avec un risque d'erreur de 5%, que nos données observées et estimées ne sont pas issues de deux distributions différentes ( $\chi^2 = 4,33$ , p-value=0,74).

### C. Discussion

Cette deuxième étude nous permet de conclure que les estimations de la période d'incubation au cours des formes iatrogènes secondaire au traitement par hGH varient selon l'âge de début de traitement, le génotype au codon 129 et le nombre de doses reçues. La période d'incubation n'est pas significativement différente en fonction du sexe. Sous

l'hypothèse d'une distribution de Weibull, nous avons estimé que 95% des cas sont apparus après une exposition de 24,7 ans, variant de 22,9 à 27,1 ans selon la variable considérée. L'effet de l'âge de début de traitement suggère que les patients traités plus tardivement (10 à 14 ans) développent la maladie plus précocement que ceux ayant commencé le traitement avant 10 ans. Un effet semblable a été trouvé parmi la cohorte britannique et au cours d'expérience de transmission à la souris (Manolakou, Beaton et al. 2001, Swerdlow, Higgins et al. 2003). Un délai de 30 ans sépare la fin de la période à risque (décembre 1985) et la date de censure choisie dans ce modèle (décembre 2015). Grâce à cette période de recul, relativement longue, nous avons pu observer que la moyenne estimée (14,2 ans) par notre modèle et celle observée directement à partir de nos données (14,1 ans) étaient très similaires. Ces résultats suggèrent également que la censure à droite de nos données n'a pas eu d'incidence quant à l'estimation des paramètres de la période d'incubation. L'utilisation d'un tel modèle statistique et la génération d'hypothèses sur la distribution des cas de MCJ post-hGH, nous ont permis d'estimer les 95<sup>ème</sup> et 99<sup>ème</sup> percentiles.

Pour la première fois, sur la cohorte française, il a été possible d'estimer la période d'incubation chez les individus hétérozygotes au codon 129. Ces derniers ont une période d'incubation 5 ans plus longue en moyenne (17,6 ans) que les individus homozygotes (12,6 ans) et une différence estimée à 6 ans pour l'occurrence du cas index. Ces résultats concordent avec l'étude précédente réalisée en 2003 et l'étude faite sur la cohorte britannique (Brandel, Preece et al. 2003, Swerdlow, Higgins et al. 2003). Cependant, l'effet du codon 129 sur la période d'incubation semble plus marqué chez les patients français et pourrait être dû à une différence d'exposition.

Les études ayant porté sur les cas de Kuru, ont montré que les patients hétérozygotes au codon 129 étaient plus âgés, au moment de leurs décès, que les individus homozygotes et qu'ils étaient plus nombreux chez les cas identifiés entre 1996 et 2004 qui présentaient des très longues périodes d'incubation. Dans la forme variante de la MCJ, à l'exception d'un cas, tous les patients sont homozygotes au codon 129. L'unique patient hétérozygote a été diagnostiqué en 2016 soit 21 ans après le premier patient homozygote. L'ensemble de ces données conforte le rôle du codon 129 comme un facteur majeur contrôlant la période d'incubation chez l'homme après une contamination périphérique.

De plus, nous avons montré que de fortes doses, issues des lots identifiés comme les lots les plus à risque, lors de notre première étude, étaient associées à une période d'incubation plus courte. L'effet de la dose infectieuse sur la période d'incubation a été bien documenté dans différentes expériences de transmission à l'animal, incluant les primates non humains.

Cependant, notre analyse basée sur des données quantitative, montre pour la première fois que cet effet est également retrouvé chez l'homme.

En conclusion, cette approche statistique prédit que 95% des cas sont déjà apparus chez les individus homozygotes et très probablement chez les individus hétérozygotes où l'estimation de la borne supérieure du 95<sup>ème</sup> percentile est égale à 33,9 ans. Nous avons pu quantifier la différence de la période d'incubation moyenne entre les patients homozygotes et hétérozygotes et avons montré un effet dose sur la période d'incubation chez l'homme.

#### D. Perspectives

Les résultats obtenus, grâce à ce modèle, sur l'estimation de la période d'incubation des cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par hGH et sur les facteurs pouvant l'influencer pourraient servir pour l'étude du Kuru ou des porteurs asymptomatiques de la variante de MCJ.

La période d'incubation des cas atteints de Kuru a été estimée en utilisant une distribution log-normale, gamma et Weibull (Huillard d'Aignaux, Cousens et al. 2002). Cette étude a montré que la distribution de Weibull était la plus adaptée pour modéliser la période d'incubation des cas de Kuru. Ainsi, sous l'hypothèse d'une distribution de Weibull, la période d'incubation a été estimée en fonction de l'âge et du sexe. Sachant que, la période d'incubation des cas de MCJ iatrogène après traitement par hGH varie en fonction du génotype au codon 129 et que, l'homozygotie MM semble être un facteur de susceptibilité dans le Kuru, il serait intéressant de pouvoir modéliser et estimer les paramètres (médiane, moyenne, 95<sup>ème</sup> et 99<sup>ème</sup> percentile) de la période d'incubation des cas de Kuru en fonction du génotype au codon 129 par un modèle de Weibull semblable à celui utilisé dans notre étude.

Le devenir des porteurs asymptomatiques, pour lesquels la présence de PrP anormale a été identifiée parmi 16 des 32 441 appendices étudiés en Grande-Bretagne, est inconnu à l'heure actuelle (Gill, Spencer et al. 2013). Une étude a estimé que ces personnes avaient probablement été exposées à de faibles quantités d'agent infectieux pouvant expliquer qu'ils n'aient pas encore développé la maladie (Chen and Wang 2014). Ce point sera abordé dans la discussion générale.



### **III. Article 3: Iatrogenic CJD after growth hormone treatment in France: similarities and differences with the British epidemic**

#### **A. Introduction**

Le premier cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par l'hormone de croissance est apparu en 1991, en France. Dès lors, le réseau national de surveillance des maladies de Creutzfeldt-Jakob (RNS-MCJ) a été créé dans le but de recenser l'ensemble des cas de MCJ et en particulier les cas iatrogènes. Depuis 1991, tous les cas sont notifiés au RNS-MCJ grâce aux signalements effectués par les médecins hospitaliers directement ou par la recherche de la protéine 14-3-3 dans le LCR. La suspicion de MCJ entraîne un suivi du patient par le RNS-MCJ jusqu'à l'obtention du diagnostic final. C'est au cours de ce suivi que les données cliniques sont collectées auprès du clinicien en charge du patient. Dans le cas d'une suspicion de MCJ iatrogène après traitement par l'hormone de croissance, le RNS-MCJ vérifie la présence du patient dans le listing répertoriant tous les patients ayant été traités entre janvier 1982 et décembre 1985.

Les deux premiers articles se sont intéressés aux facteurs gouvernant la susceptibilité de développer une MCJ iatrogène et à l'identification de ceux influençant la période d'incubation. Dans cette troisième partie, nous avons effectué une description clinico-pathologique de l'ensemble des 119 cas de MCJ iatrogènes déclarés au RNS-MCJ depuis 1991.

Nos deux premières études ont permis de révéler à la fois des similitudes avec la cohorte britannique (période d'incubation plus courte chez les individus homozygotes et chez les patients traités à un âge plus tardif) et des différences significatives (un effet du sexe avec, dans la cohorte française, un pourcentage d'hommes deux fois plus atteints par la MCJ et une période d'incubation plus courte chez les patients ayant reçu un nombre élevé de doses fortement à risque d'être contaminées). La comparaison de notre cohorte avec la cohorte britannique à l'échelle clinique, neuropathologique et moléculaire, nous permettra de mieux définir les relations entre la souche de prions, l'hôte et la voie d'inoculation dans le cas d'une exposition à un prion exogène chez l'homme.

## B. Résultats

### Article 3 (En préparation)

#### Iatrogenic CJD after growth hormone treatment in France: similarities and differences with the British epidemic

Laurène Peckeu<sup>1</sup>, Véronique Sazdovitch<sup>2</sup>, Nicolas Privat<sup>1</sup>, Arlette Welaratne<sup>3</sup>, Jean-Louis Laplanche<sup>4</sup>, Danielle Seilhean<sup>2</sup>, Armand Perret-Liaudet<sup>5</sup>, Jean-Philippe Brandel<sup>1,2</sup>, Stéphane Haïk<sup>1,2,3</sup>

1) Inserm U1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

2) AP-HP, Laboratoire de Neuropathologie R Escourolle, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

3) AP-HP, Cellule Nationale de Référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

4) UF de Génétique Moléculaire, pôle B2P, Hôpital Lariboisière, Paris, France

5) Hospices Civils de Lyon–Laboratoire Diagnostic Maladies à Prions; CNRS, Inserm, UCB Lyon1, Centre de Recherche en Neurosciences, BioRan, France

#### Abstract

The acquired forms of prion diseases can result from a human-to-human contamination, such as in Kuru and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease (iCJD), or from a bovine to human transmission that was responsible for variant CJD. Cases of iCJD after administration of human cadaver-sourced growth hormone (hGH) were first reported in 1991 in France. Since then all suspected cases of were notified to the French National Surveillance Network of CJD. In this study, we analyzed the clinico-pathological phenotype and molecular data collected by the French National Surveillance Network in order to compare French and the British hGH-iCJD epidemics and to better understand the nature of such an accidental transmission and the factors modulating the phenotypical expression in affected individuals. From a clinical point of view (clinical manifestations, EEG, MRI and 14-3-3 detection protein), all the 119 French patients with hGH-iCJD were similar to those observed in a part of the UK cohort. However, with the highest attack rate in exposed subjects (8.2% as compared to 4.2% in the UK and

0.4% in the US) and the shortest mean incubation time in affected patients (14.1 years as compared to 29.3 years in the UK and 22.0 years in the US), we can conclude that French hormone preparation were contaminated at a highest level by infectious prion material. Lesion profiles observed in hGH-iCJD French cases was most similar to a VV2 sporadic CJD but taking into account that both MM and VV patients have a similar time distribution in France and knowledge from experimental transmission to mice, we hypothesized that source of infecting prion in French growth hormone originated from a case with the MV2 subtype of sporadic CJD.

### **Introduction**

Prion diseases are transmissible neurodegenerative diseases in humans and animals caused by misfolded isoforms of the cellular prion protein [1]. In humans, sporadic, genetic and acquired forms are observed [2]. The acquired forms of prion diseases can result from a human-to-human contamination, such as in Kuru and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease (iCJD), or from a bovine to human transmission that was responsible for variant CJD [3] [4] [5].

Cases of iatrogenic CJD after administration of human cadaver-sourced growth hormone (hGH-iCJD) were first reported in 1991 in France [6]. Since then, the French National Surveillance Network of CJD was established to initiate an active surveillance and to provide precise data on incidence of all forms of CJD and especially of hGH-iCJD. In France, all suspected cases of hGH-iCJD were notified to the surveillance network by the physicians of hospital departments or, from 1998, by the laboratories performing the detection of 14-3-3 protein in the CSF.

In a previous work on the 1443 patients treated in France during a period from 1982 to 1985, defined as the high-risk period of treatment, we identified factors governing the susceptibility of developing hGH-iCJD. By studying the 119 French patients who died of hGH-iCJD we determined factors influencing on the incubation period. Using the Weibull distribution, we estimated that 95% of the cases occurred within 24.7 years after exposure, suggesting that nearly all cases have been diagnosed more than 30 years after the end of the at risk period. In this study, by analyzing the data collected by the French National Surveillance Network since 1991, we determined the clinico-pathological phenotype and molecular data of patients died of hGH-iCJD. In addition, by studying similarities and differences of the French and British hGH-iCJD series we were able to formulate hypothesis to better delineate the role of prion strains, host characteristics and route of exposure on this iatrogenic disease resulting from an accidental exposure in humans.

## **Patients and Method**

### **“France Hypophyse” data base**

During a period from 1973 to 1988, the treatment with human cadaver-sourced growth hormone (hGH) was managed by the “France Hypophyse” association. Data on the hGH treatment were available for the patients treated from January 1982 to December 1985. All patients who developed the disease in France were treated during this period. Origin of hGH batches, start and end dates of treatment, number of doses administered from each batch and the gender status were available for all the 1443 patients. The hormone batches had two different origins: the pharmaceutical industry (Kabi, Serono, Novonordisk) and a research laboratory of the “Institut Pasteur” with manufacturing differences. The hormone produced by the pharmaceutical industry contained a monomer / dimer ratio of 95% / 5%, while for the hormone manufactured by the Institut Pasteur the ratio was 75% / 25%. The pharmaceutical firm Novonordisk has added a step of treatment with urea 6M as early as 1978. The France Hypophyse database was assigned to the French National Center of Reference for prion diseases by decision of the French ministry of health.

### **Clinical data, EEG, 14-3-3 and MRI**

All the patients were referred to the French National Surveillance Network for CJD from February 1991 to December 2015. Clinical symptoms were known for all patients, whereas EEG, cerebrospinal fluid and cerebral MRI were only available for some of them. All patients could be classified according to the EuroCJD criteria in definite or probable hGH-iCJD. A total of 49 cases were confirmed by autopsy. Clinical data and EEG results were provided by the local physician who was in charge of the patient. From 1998, protein 14-3-3 detection was performed in the CSF by western blot using a semi-quantitative method and the result expressed in positive or negative (Hsich et al., 1996; Zerr et al., 1998). In most cases, results of brain MRI, acquired and interpreted locally, were provided by the neurologists to the network. In some cases, MRI was sent for reviewing by the neurologists and the neuroradiologists of the network.

### **PRNP analysis**

DNA was extracted from buffy coat fraction of peripheral blood after obtaining written informed consent from patients or patients’ relative. Codon 129 methionine/valine (M/V)

polymorphism of the *PRNP* gene and the absence of mutation or insertion were determined as described elsewhere [7].

### **Post mortem brain study**

The patients' relatives gave informed consent for autopsy and neuropathological investigations and the study was designed in accordance with the relevant French legislation. Brain areas were sampled from 1-cm-thick coronal sections of brain tissue fixed in 10% formalin for at least two months, as previously described [8]. Specimens from different areas were removed and embedded in paraffin after formic acid treatment as described [9]. Seven-micron-thick sections were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff, Congo red or Bodian silver impregnation coupled to Luxol fast blue. Neuropathological changes were observed and scores were attributed to lesions in 10 brain areas (FC=frontal cortex; TC=temporal cortex; T5=occipito-temporal gyrus; OC=occipital cortex; Sub=CA1-subiculum; EC=entorhinal cortex; TH=thalamus; ST=striatum; SN=substantia nigra; CE=cerebellum), as previously described using a five-grade scale (0 to 4+) for spongiform change and astrogliosis and a two-grade scale (0 and 1+) for neuronal loss [8, 9]. A total score for lesions was established for each specimen by summing these scores. The lesion profiles of the autopsied hGH-iCJD patients were compared to those observed in patients with different subtypes of sporadic CJD, defined according to the genotype at codon 129 and the results of PrP<sup>res</sup> typing, collected in our laboratory during the same period of time (n=275). PrP immunohistochemistry was performed using the 12F10 mouse monoclonal antibody directed against amino acid residues 142-160 of human PrP as described [10].

### **Biochemical PrP<sup>res</sup> analysis**

PrP<sup>res</sup> analysis of the French cases involved systematic sampling of at least two brain regions (frontal isocortex and cerebellum) of frozen brain tissue and analysis of the biochemical type by Western blotting [8, 11]. Samples were homogenized at 20% (w/v) using a Ribolyser (Bio-Rad) in 5% sterile glucose. One volume of a 20% NaCl solution and one volume of a detergent solution (20% sarkosyl, 2% SB3-14 and Tris 20mM pH 7.4) were added to one volume of 20% brain homogenate. This mixture had a final pH of 7.6 and was digested with proteinase K at 10 µg/ml (diluted in Tris-HCl 50 mM pH 8, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) for 1h at 37°C. PrP<sup>res</sup> was then purified by centrifugation at 27500g for 2h at room temperature on 20% sucrose cushion [8, 11]. Samples were subjected to a 12% Tris-glycine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were electro-blotted onto

nitrocellulose membrane. Immunoblotting was performed using the mouse monoclonal antibody 3F4 [12] respectively 0.2µg IgG/ml and detected with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences, UK). For the biochemical classification of the cases, standard type 1 and 2A specimens, according to the classification of Cleveland, were included to ensure consistency and comparability [13].

### **Statistics**

Statistical analysis was performed using STATA 14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP). Data are described as mean (standard deviation) and percentage, and compared with Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test and Fisher's exact test. A p-value  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant.

### **Results**

#### **French cohort**

A total of 1443 patients were treated with pituitary-derived human growth hormone (hGH) between 1982 and 1985. In this cohort, 119 patients died with iCJD between February 1991 and December 2015. A total of 267 persons were treated only with hormone of pharmaceutical industry, 278 only with hormone of "Institut Pasteur", 897 with hormone coming from both sources and for one patient information about treatment was lacking. All but one patient who developed hGH-iCJD received hormone doses from at least one batch manufactured at the "Institut Pasteur".

A 49 years old patient with a diagnosis of probable iCJD and a disease onset in 2016 is still alive. The incubation period, calculated from the midpoint of the treatment, is 33.8 years. He was treated from 1982 to 1983 principally with hormones from pharmaceutical firms and only received very few batches from "Institut Pasteur." This patient is heterozygote at codon 129 of *PRNP*.

#### **Deceased Patients**

##### **Ages**

Among the 119 cases, mean age at onset was 26.5 years (SD 6.2) and ranged from 9.8 to 45.5 years. A significant difference was found between males (mean 27.1) and females (mean 24.1) (Mann-Whitney test=2.1, p-value=0.04).

Mean age at death was 27.9 years (SD 6.1) ranging from 11.2 to 45.8 years and a significant difference was also observed between males and females (Mann-Whitney test=1.9, p-value=0.05).

#### Duration of disease

Mean and median duration of disease were respectively 17.2 (range 3.0 to 95.0) and 15.0 months. No significant difference was detected between males and females. Median duration of disease was 13.0 months for MM patients, 11.5 months for VV patients and 19 months for heterozygotes with a significant difference between homozygous and heterozygous individuals (Mann-Whitney test=3.6, p-value=0.0003).

#### Incubation period

The range of maximum incubation periods calculated from time of first injection to onset of symptoms was 6.5 to 32.0 years (mean 15.6) and the range of minimum possible incubation times, calculated from the time of last injection to onset of symptoms was 4.0 to 30.1 years (mean 12.6). The range of incubation times from midpoint of treatment, to onset of symptoms was 5.3 to 31.1 years (mean 14.1). Incubation period from midpoint of treatment for the only case that did not receive any batches from the Institut Pasteur was 17.8 years.

The same calculation was done for the 18 patients who received only the hormone of “Institut Pasteur”. The range of maximum incubation periods was 7.1 to 26.1 years (mean 17.3), minimum incubation period was 4.5 to 23.8 years (mean 14.7) and the range of incubation periods from the midpoint of injections was 5.8 to 24.9 years (mean 16.0) years.

Estimation of incubation period using a Weibull distribution didn't show any influence of the gender on the incubation time (Peckeu et al., in preparation). However, the incubation period showed a significant difference between homozygous and heterozygous individuals with a mean incubation time 5 years longer for heterozygous individuals. On the observed data, the same difference in mean incubation time (interval between the midpoint of treatment during the high-risk period and date of disease onset) was noticed, being 17.3 years for heterozygous patients and 12.5 years for homozygous ones (Figure 3). Consistently with this result, the patient still alive who developed hGH-iCJD in 2016 is heterozygous at codon 129 of PRNP.

#### Average and median age at the treatment initiation

For males, the average and median age at treatment was 11.5 (0.8 to 22.0) years and 12.7 years. For females, it was 9.6 (2.2 to 14.6) years and 10.4 years. Significant difference

between males and females was found (Mann-Whitney test=2.3,  $p=0.02$ ). Among the 63 patients treated for idiopathic GH deficiency, age at treatment initiation was range from 0.8 to 22 years (mean=11.2). On average, patients with a craniopharyngioma ( $n=13$ ) started the hGH treatment at 12.9 years (5.3 to 16.9). The mean age at treatment initiation was 11.2 years for patients treated after a retinoblastoma ( $n=3$ ) or a medulloblastoma ( $n=4$ ), 10.8 years (7.6 to 13.7) for patients treated for another tumor ( $n=5$ ), 10.7 years (2.2 to 14.5) for the 5 patients with panhypopituitarism and 11.1 years (3.2 to 15.7) for six patients treated for short stature. Only one case received hGH after hypoglycemia at 2.7 years. The causative disease leading to hGH supplementation was unknown for 4 patients and the mean age at treatment initiation was 10.0 years (5.0 to 14.8). No significant difference for the age at treatment initiation was found between these groups of causative diseases (Kruskal-Wallis test=7.2,  $p$ -value=0.6).

### **Clinical phenotype**

Initial symptoms (first and second) are summarized in table 1. Ataxia and behavioral disorders were the two firsts major symptoms, respectively observed in 67 (56.3%) and 20 (16.8%) patients. Other initial symptoms were tremor, dizziness, visual symptoms, limb pain and amyotrophy. Memory decline was only noticed in 1 patient. Weight gain was the first symptom for 3 patients but was found in 56 patients (47.1%) in the time course of the disease. Neurological signs at first examination and at the end of disease are shown in table 3. The majority of the patients had an inaugural cerebellar syndrome (81%). Among this group of patients, 52% did not have an associated dementia at disease onset. This stereotypical clinical manifestation was independent of sex and codon 129 genotype (Fisher exact test for sex=1.82,  $p$ -value=0.18 and codon 129=0.85,  $p$ -value=0.76). At the last examination, dementia was observed in 87% of the patients with hGH-iCJD. Several other symptoms were detected such as myoclonus, pyramidal and extrapyramidal syndrome. A state of akinetic mutism occurred in 54% of patients (table 3).

### **Electroencephalography**

EEGs data were available for 101 patients. A total of 69 patients had slow activity, 16 patients showed pseudoperiodic bursts and only 2 patients had a characteristic EEG with periodic sharp wave complexes. For 14 patients, the EEG recording was considered as nearly normal.



### **Brain Magnetic resonance imaging**

MRI brain scans were performed in 81 patients with a disease onset comprised between 1991 and 2015. Sixty four percent of MRI was performed after 1999. For 36 patients MRI was considered abnormal. Among them, 21 patients showed striatal high signal. These alterations were associated with thalamic high signal in 2 patients, cortical high signal in 1 and lenticular high signal in 4. Isolated cortical abnormalities were observed in one patient. Atrophy was noticed in 11/36 (31%) patients. Five cases with cortical/sub-cortical atrophy, 4 cases with cerebellar atrophy, one case with both cortical and cerebellar atrophy and one case with brain stem atrophy.

A typical example of MRI alterations that could be observed in the course of hGH-iCJD is illustrated in figure 1.

### **Cerebrospinal fluid**

Sixty-six patients had a lumbar puncture to detect 14-3-3 protein in the CSF. All CSF were a-cellular with occasional increase of protein level. Detection of 14-3-3 protein was positive in 37 (56%) patients, 8.2 months, in mean, after disease onset.

### **Prion protein gene sequencing**

All but 8 patients have had sequencing of the entire open reading frame of *PRNP* gene. No mutation or insertion was observed. There were 33 heterozygotes (MV; 30%), 60 homozygotes methionine (MM; 54%) and 18 homozygotes valine (VV; 16%). Homozygote patients were overrepresented in the hGH-iCJD group compared to the French population ( $\chi^2$ test=12.1, p=0.0005; Table 2).

### **Disease-related prion protein analysis by immunoblotting**

Frozen tissue was available for 27 patients and PrP<sup>res</sup> typing was performed in frontal and occipital cortex, striatum and cerebellum samples in most cases. All cases but one showed PrP<sup>sc</sup> types that were similar to those seen in sporadic CJD. We observed an intermediate size type i PrP<sup>res</sup> in a MM patient. According to the molecular classification of Cleveland, 11 cases were MM1, 1MMi, 1 MM2, 1 MV1, 8 MV2, 2 MV1+2 and 1 VV2. Two patients without genotyping of codon 129 polymorphism had a PrP<sup>sc</sup> type 2.

## Neuropathology

Forty-eight patients were autopsied from 1991 to 2009. In only 27 cases, available brain samples were sufficient to establish a lesion profile. All of these cases showed variably prominent microvacuolar degeneration associated with gliosis in the hemispheric cortex, deep grey nuclei and cerebellar cortex. Immuno-staining of PrP revealed synaptic labelling in all grey matter areas examined.

The presence of amyloid plaques of the Kuru type was systematically searched in all patients. In 100% (16/16) of the MM patients, kuru plaques were observed in both isocortex and cerebellum. None of the three VV patients had kuru plaques. All the MV patients showed plaques in the cerebellum (n=8) whereas only a half showed cortical plaques (Table 4).

Brain lesion profiles were established in the hGH-iCJD group and compared to sCJD controls. Total lesion scores were obtained in sCJD cases with MM1 (n=141), MM2 (n=13), MV1 (n=28), MV2 (n=31), VV 1 (n=5) and VV2 (n=57) subtypes, and in patients with hGH-iCJD with MM1 and MMi (n=11) and MV2 (n=7) molecular subtype. The distribution of lesions in the hGH-iCJD groups (both MM1 and MV2) resembled to that observed in sCJD VV2 subtype (Figure 3). Significant differences in the total lesion score between MM1 and MV2 hGH-iCJD and VV2 sCJD groups were only found in the frontal cortex, CA1-subiculum and cerebellum (respectively, Kruskal-Wallis test=10.1, p-value=0.006; Kruskal-Wallis test=9.6, p-value=0.008; Kruskal-Wallis test=16.7, p-value=0.0002). Lesions were the most intense in the thalamus, the entorhinal cortex and the striatum.

## Discussion

The iCJD epidemic provides an opportunity to study, in humans, the impact of exposure and host genotype on the incidence, the incubation period and the clinical phenotype of a transmitted form of CJD. In this study, we analysed the clinico-pathological phenotype and molecular data to complete our two previous works concerning factors controlling the susceptibility to hGH-iCJD and the incubation period of the disease.

According to the estimations of the incubation period in France and UK, 95% of hGH-iCJD cases have already occurred. Therefore, it can be concluded that French hormone preparations, leading to the highest attack rate in exposed subjects (8.2% as compared to 4.2% in the UK and 0.4% in the US) and the shortest mean incubation time in affected patients (14.1 years as compared to 29.3 years in the UK and 22.0 years in the US) [14-16], were contaminated at a highest level by infectious prion material. The reasons for this are not clear

and could involve differences in the procedure of donor recruitment and in hormone preparation in academic laboratories.

The clinical manifestations of French patients with hGH-iCJD were similar to those observed in the UK cohort, with an inaugural ataxia and a relatively late dementia in most cases. However, weight gain associated with polyphagia observed in 47% of the French cases was not mentioned in the British series. This symptom was already reported in 19 out of the first 34 patients described by Billette de Villemeur et al [17]. In both cohorts, brain MRI was useful to the diagnosis. Striatal high signals in T2-weighted sequences and DWI were the most frequent alterations and atrophy was found in 30% of the studied cases. Periodic sharp wave complexes on EEG were rarely observed: only in 2 cases out of 119 in France and in one out of 21 in the UK. The detection of 14-3-3 protein in the CSF yielded positive results in only 47% and 56% of the cases in the UK and France respectively. Therefore, from a clinical point of view, the general relatively stereotyped presentation of this specific form of CJD (inaugural ataxia, late dementia, no PSWCs at EEG) resembles that observed in two other infectious forms of human prion diseases also due to a peripheral exposure: variant CJD [18] and kuru [19].

In our series, the lesion profile observed in hGH-iCJD cases was most similar to a VV2 sporadic CJD. Surprisingly, a VV2 profile was also observed in MM patients that showed type 1 or type 2A PrP<sup>res</sup>. This may suggest that contamination was caused, in France, by a sCJD V2 strain. Taking into account that both MM and VV iCJD patients have a similar time distribution in France and that experimental transmission of various French VV2 sCJD isolates to a host mouse model overexpressing only human M129-PrP results in a moderately prolonged incubation time as compared to MV2 sCJD isolates, we hypothesized that this V2 strain could provide from a MV2 sCJD case [20]. In addition, MV2 strain inoculated to host mouse MV results in a prolonged incubation time, which is consistent with the time distribution of the heterozygous French cases [21]. That all MM and MV French cases showed kuru type plaques is consistent with this hypothesis, MV2 sCJD usually harbouring prion plaques in both cerebellum and isocortex. Therefore, a contamination by type 2 PrP<sup>sc</sup> that includes both genotypes (M and V at codon 129) would better explain the observed kinetics in the various genotypes observed in France and the differences observed with the British epidemics. In the UK, while a contamination by a sCJD V2 strain is also suspected, MM cases are rare and occurred lately. This is consistent with a contamination with a sCJD

VV2 in the UK as also suggested by experimental transmission [15, 22-24]. This was further confirmed by a mass spectrometry study of PrP<sup>Sc</sup> in the brain of British MV patients with hGH-iCJD where a predominance of PrP<sup>Sc</sup>-V129 was regularly detected suggesting an exposure to infectious PrP<sup>Sc</sup> containing V at residue 129 [25]. According to our hypothesis, a similar study in French MV patients should lead to a different result with an equal distribution of PrP<sup>Sc</sup>-V129 and PrP<sup>Sc</sup>-M129.

It is however worth noting that sequential contaminations by distinct sCJD subtypes may have occurred in the involved countries as previously suggested by risk analysis of GH batches in France. In addition, co-occurrence of type 1 and 2 are not uncommon in sCJD and whether this corresponds to the presence of more than one strain is not clear. Finally, the role of the route of exposure on strain selection and the clinico-pathological phenotype itself in this specific modality of transmission is unknown. To note, variation in the inoculation site of 127S prions can profoundly alter the neuropathological presentation in Tg338 mice [26]. The impact of hormone preparation process on human strain selection is also unknown. It should be emphasized that most of the human strain typing experiments in mice and monkeys used intra-cerebral injection (and not subcutaneous or intramuscular injections) of relatively crude brain homogenates. Of special interest, because of the peripheral route of prion transmission, is the kuru epidemics. As already observed in kuru, our data confirm the role of codon 129 homozygosity as a central factor governing both individual susceptibility (MV subjects are less susceptible) and duration of the incubation period (longer in MV patients) during inter-human transmission of prions. Since kuru is also thought to result from a contamination with a sCJD V2 strain, it is of interest to note that in both kuru and French hGH-iCJD, kuru plaques are observed in MM and MV patients. However, plaques were also regularly observed in VV cases with kuru while it seems rare in French VV cases with hGH-iCJD [27]. Thus, it cannot be excluded that in the case of another peripheral exposure, i.e. an oral contamination by the bovine agent, patients of the VV genotype who might developed variant CJD could lack typical plaques of the florid type.

This is the first comprehensive analysis of the French iCJD series after GH treatment. Our results underline the central role of codon 129 genotype of *PRNP* in the duration of the incubation period and of the clinical phase, and, probably, in individual susceptibility. The clinical phenotype and the pattern of brain lesions are closed to those observed in the British series, despite a different frequency and kinetics in the occurrence of MM cases. Taking into

account the phenotype also observed in kuru and, in some aspects, in vCJD, both being due to a peripheral contamination, these results support a major role of the route of exposure in the special targeting of the cerebellum.

## References

1. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.
2. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
3. Gajdusek, D.C. and V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population*. N Engl J Med, 1957. **257**(20): p. 974-8.
4. Brown, P., et al., *Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium*. Neurology, 2000. **55**(8): p. 1075-81.
5. Will, R.G., et al., *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. Lancet, 1996. **347**(9006): p. 921-5.
6. Billette de Villemeur, T.B., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease in children treated with growth hormone*. Lancet, 1991. **337**(8745): p. 864-5.
7. Peoc'h, K., 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. **15**(5): p. 482.
8. Brandel, J.P., et al., *14-3-3 protein cerebrospinal fluid detection in human growth hormone-treated Creutzfeldt-Jakob disease patients*. Ann Neurol, 2001. **49**(2): p. 257-60.
9. Haik, S., et al., *Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects*. Neurology, 2004. **63**(12): p. 2413-5.
10. Privat, N., et al., *Human prion diseases: from antibody screening to a standardized fast immunodiagnosis using automation*. Mod Pathol, 2008. **21**(2): p. 140-9.
11. Levavasseur, E., et al., *Detection and partial discrimination of atypical and classical bovine spongiform encephalopathies in cattle and primates using real-time quaking-induced conversion assay*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0172428.
12. Kascak, R.J., et al., *Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins*. J Virol, 1987. **61**(12): p. 3688-93.

13. Parchi, P., et al., *Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Ann Neurol, 1996. **39**(6): p. 767-78.
14. Abrams, J.Y., et al., *Lower risk of Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients initiating treatment after 1977*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(10): p. E1666-9.
15. Rudge, P., et al., *Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years*. Brain, 2015. **138**(Pt 11): p. 3386-99.
16. Brown, P., et al., *Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(6): p. 901-7.
17. Billette de Villemeur, T., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France*. Neurology, 1996. **47**(3): p. 690-5.
18. Brandel, J.P., et al., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain*. Ann Neurol, 2009. **65**(3): p. 249-56.
19. Alpers, M., *Epidemiology and clinical aspects of kuru*. Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease (eds SB Prusiner & MP McKinley), 1987: p. 451-465.
20. Jaumain, E., et al., *Absence of Evidence for a Causal Link between Bovine Spongiform Encephalopathy Strain Variant L-BSE and Known Forms of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in Human PrP Transgenic Mice*. J Virol, 2016. **90**(23): p. 10867-10874.
21. Bishop, M.T., R.G. Will, and J.C. Manson, *Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 12005-10.
22. Asante, E.A., et al., *BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein*. EMBO J, 2002. **21**(23): p. 6358-66.
23. Korth, C., et al., *Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4784-9.
24. Kobayashi, A., et al., *Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain*. J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30022-8.

25. Moore, R.A., et al., *The Distribution of Prion Protein Allotypes Differs Between Sporadic and Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients*. PLoS Pathog, 2016. **12**(2): p. e1005416.
26. Langevin, C., et al., *Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model*. Neurobiol Dis, 2011. **41**(1): p. 219-25.
27. McLean, C.A., et al., *Comparative neuropathology of Kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host*. Brain Pathol, 1998. **8**(3): p. 429-37.

Table 1. Summary of the main patient characteristics

		Codon 129 genotype (n=111)				All hGH-iCJD (n=119)
	Variables	Met-Met (n=60)	Val-Val (n=18)	Met-Val (n=33)	Unknown (n=8)	
Gender	Male (%)	46 (76.7)	17 (94.4)	26 (78.8)	6 (75.0)	95 (80)
	Female (%)	14 (23.3)	1 (5.6)	7 (21.2)	2 (25.0)	24 (20)
Causative diseases	Idiopathic GH deficiency	32	12	15	4	63
	Craniopharyngioma	10	1	1	1	13
	Medulloblastoma	1	1	1	1	4
	Retinoblastoma	3	0	0	0	3
	Other tumor	1	3	1	0	5
	Panhypopituitarism	1	0	3	1	5
	Short stature	2	0	4	0	6
	Hypoglycaemia	0	0	1	0	1
	Other	10	1	4	0	15
	Unknown	0	0	3	1	4
	Mean treatment duration (SD)	2.7 (1.0)	3.0 (0.8)	3.1 (0.9)	3.3 (1.1)	2.9 (0.95)
	Mean age at treatment initiation (SD)	11.6 (3.9)	11.1 (4.3)	10.1 (4.1)	11.7 (3.3)	11.1 (4.0)
	Mean number of doses received (UI) (SD)	1570.3 (691.4)	1591.3 (777.6)	1630.8 (836.2)	1876.0 (829.7)	1610.8 (749.9)
	Mean incubation period (SD)	12.9 (4.8)	11.3 (5.8)	17.3 (4.1)	15.8 (6.4)	14.1 (5.3)
First symptoms	Unsteady	36	11	16	4	67
	Tremor	7	0	7	0	14
	Behavioral disorder	9	1	8	3	21
	Dizzy	2	2	1	1	6
	Visual disorder	2	1	0	0	3
	Weight gain	3	0	0	0	3
	Limb pain	1	1	0	0	2
	Amyotrophia	0	2	0	0	2
	Memory decline	0	0	1	0	1
Second symptoms	Unsteady	18	6	14	3	41
	Tremor	5	0	3	0	8
	Behavioral disorder	4	1	2	1	8
	Dizzy	3	0	0	0	3
	Visual disorder	12	6	6	3	27
	Somnolence	1	0	1	0	2
	Limb pain	3	0	2	0	5
	Myoclonus	2	3	1	0	6
	Cognitive disorder	3	0	0	1	4
	Motor disorder	1	1	1	0	3
	Sleeping disorder	2	1	3	0	6
	Urinary disorder	3	0	0	0	3
	Dysarthria	2	0	0	0	2



	General alteration	1	0	0	0	1
	Mean age at clinical onset (SD)	25.7 (5.8)	23.7 (7.8)	28.8 (5.6)	29.0 (4.9)	26.5 (6.2)
	Mean disease duration (SD)	14.5 (6.8)	13.9 (7.9)	24.3 (18.3)	16.5 (13.1)	17.2 (12.3)

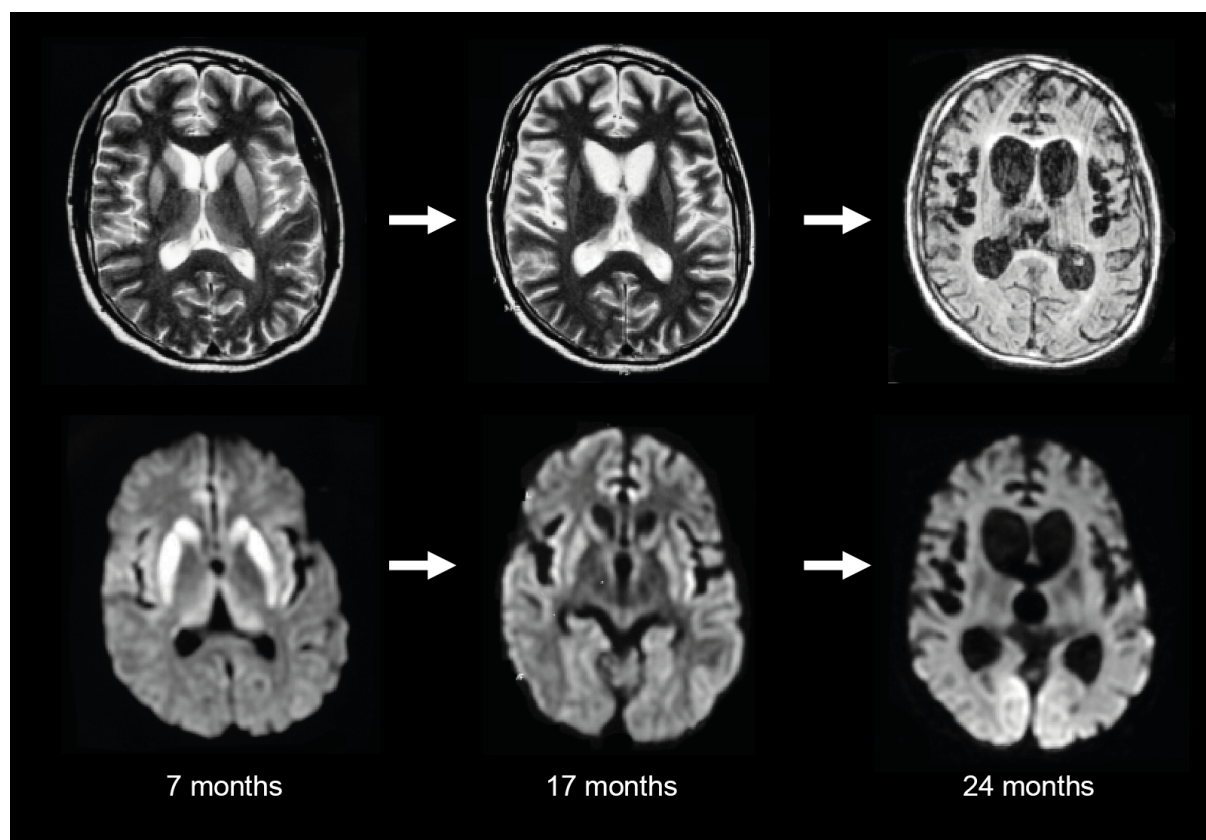


Figure 1. Three MRI performed over the clinical course in a patient who died with hGH-iCJD at 33 years after a disease duration of 28 months. T2/FLAIR (top) and DWI acquisitions (bottom). Initial MRI shows a pattern similar to sCJD, with high signal in the striatum and, to a lesser extent the pulvinar and dorso-medial nuclei of the thalamus. Follow-up examinations show a progressive disappearance of these hypersignal and concomitant appearance of a striking cortical/sub cortical atrophy.

Table 2. Distribution of codon 129 genotype in the French population and hGH-iCJD.

	Met-Met n (%)	Met-Val n (%)	Val-Val n (%)	Total
French population*	63 (39)	82 (51)	16 (10)	161
hGH-iCJD group	60 (54)	33 (30)	18 (16)	111

\*Enginrel-Unaltuna N et al, Eur J Hum Genet, 2001.

Table 3. Clinical manifestations at the onset and the end of the disease among the 119 hGH-iCJD.

Clinical manifestations at onset of the disease	Number of cases (%)	Clinical manifestations at the end of the disease	Number of cases (%)
Dementia	42 (35)	Dementia	104 (87)
Cerebellar syndrome	96 (81)	Cerebellar syndrome	100 (84)
Myoclonus	34 (29)	Myoclonus	91 (76)
Visual disorders	41 (35)	Visual disorders	86 (72)
Pyramidal syndrome	40 (34)	Pyramidal syndrome	12 (10)
Extrapyramidal syndrome	4 (3)	Extrapyramidal syndrome	30 (25)
Akinetic mutism	1 (1)	Akinetic mutism	64 (54)

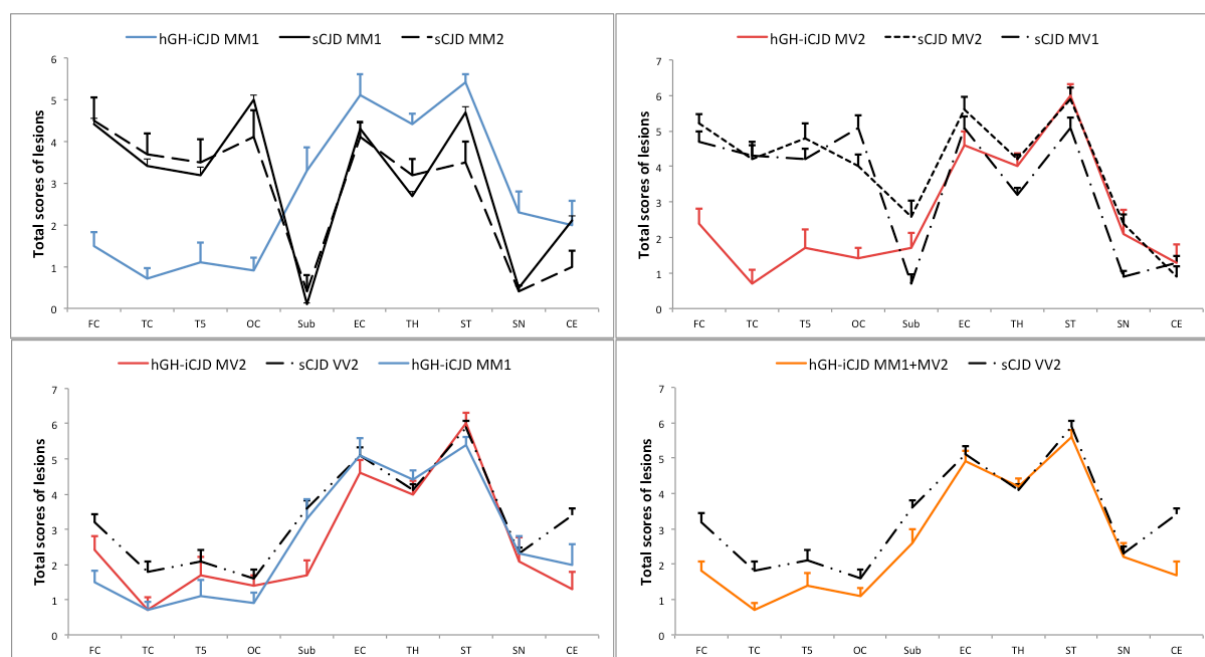


Figure 2. Profiles brain lesions in sCJD and hGH-iCJD classified according to *PRNP* polymorphism at codon 129. The mean and SEM of total score is given for each region. Total score assessed the overall degree of spongiform change (scale: 0 to 4), astrogliosis (scale: 0 to 4) and neuronal loss (scale: 0 to 1). *FC*=frontal cortex; *TC*=temporal cortex; *T5*=occipitotemporal gyrus; *OC*=occipital cortex; *Sub*=CA1-subiculum; *EC*=entorhinal cortex; *TH*=thalamus; *ST*=striatum; *SN*=substantia nigra; *CE*=cerebellum.

Table 4. Distribution of Kuru plaques in frontal cortex or cerebellum in hGH-iCJD according to codon 129 genotypes.

Genotype	Frontal cortex		Cerebellum	
	Kuru plaques	No Kuru plaques	Kuru plaques	No Kuru plaques
Met-Met	15	0	16	0
Met-Val	4	4	8	0
Val-Val	0	3	0	3

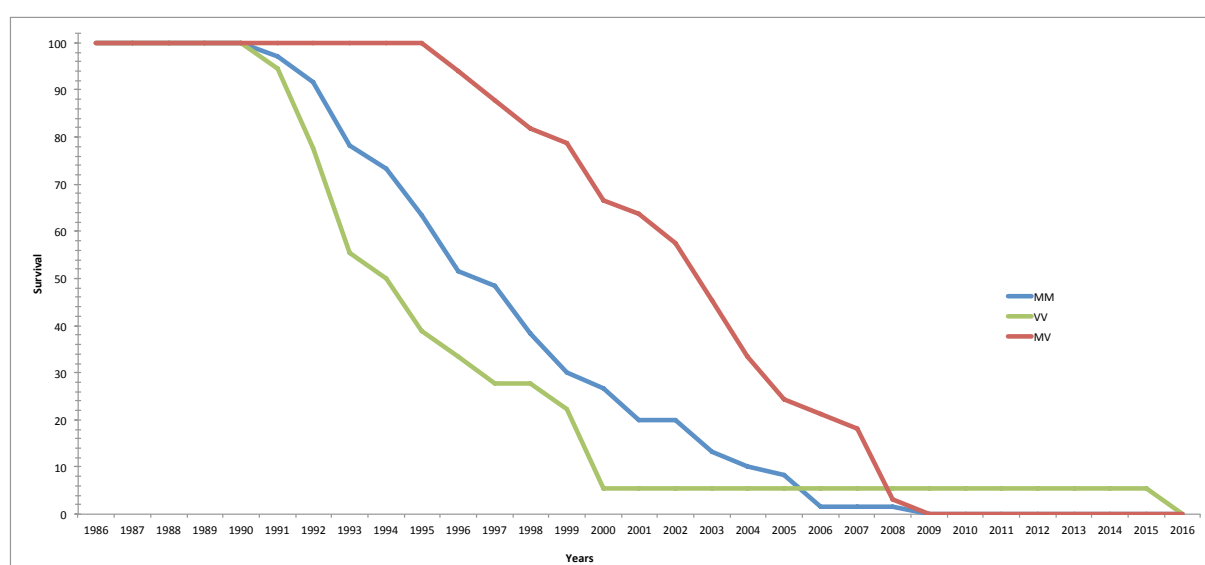


Figure 3. Survival of patients treated with growth hormone that developed iatrogenic CJD according to the codon 129 genotype of *PRNP* (n=111).

### C. Discussion

L'analyse des patients décédés d'une MCJ après traitement par hormone de croissance, nous a permis d'étudier l'impact du génotype de l'hôte et de l'inoculum sur l'incidence, la période d'incubation et le phénotype clinique. Nous avons étudié ici les caractéristiques clinico-pathologiques et moléculaires dans le but de compléter nos deux précédentes analyses ayant porté sur les facteurs influençant la susceptibilité et ceux gouvernant la période d'incubation. Selon nos précédentes estimations, 95 % des cas sont déjà apparus. Nous pouvons donc conclure, que les lots d'hormone de croissance entraînant le plus fort taux d'attaque en France (8,2%) comparé au Royaume-Uni (4,2%) et aux Etats-Unis (0,4%) et la

plus courte période d'incubation moyenne (14,1 ans) (29,3 ans au Royaume-Uni et 22,0 ans aux Etats-Unis) ont été contaminés par une quantité de prions infectieux plus importante (Abrams, Schonberger et al. 2011, Brown, Brandel et al. 2012, Rudge, Jaunmuktane et al. 2015). L'explication de cette situation française particulière pourrait provenir de la façon dont étaient organisés la collecte des hypophyses et le recrutement des donneurs ou des méthodes de préparation utilisées en France.

Les manifestations cliniques observées chez les patients français étaient semblables à celles des patients britanniques, marqués par syndrome cérébelleux inaugural et une démence tardive. Cependant, une prise de poids associée à une hyperphagie a été observée dans 47% des cas en France et n'a pas été mentionnée parmi les cas britanniques. Ce symptôme avait été rapporté dans 19 des 34 premiers cas de MCJ post-hGH décrit par Billette de Villemeur et al. ((Billette de Villemeur, Deslys et al. 1996). Dans les cohortes britanniques et françaises, l'IRM a contribué au diagnostic positif, montrant essentiellement des hypersignaux localisés dans les noyaux gris centraux ou le cortex en séquence pondérée T2 et DWI. L'aspect périodique de l'EEG a été rapporté dans 1 cas sur 21 au Royaume-Uni et 2 cas sur 119 en France. La recherche de la protéine 14-3-3 dans le LCR était positive dans 47% des cas britanniques et 56% des cas français. Les données cliniques stéréotypées et les résultats des examens complémentaires dans la MCJ iatrogène secondaire à un traitement par hormone de croissance rappellent ce qui a été observé dans les deux autres formes infectieuses de la maladie à prions secondaire à une contamination périphérique : la variante de la MCJ et le Kuru.

L'étude neuropathologique de la série française a révélé un profil lésionnel semblable aux cas sporadiques de type VV2. De manière surprenante, ce profil a été également observé à la fois pour les cas iatrogènes MM de type 1 et de type 2. Ces résultats suggèrent une contamination ayant pour origine une souche de type V2. Cependant, la distribution temporelle simultanée des cas MM et VV et les résultats des expériences de transmissions des cas français sporadiques de type VV2 à la souris M129 sur-exprimant la PrP humaine montant une période d'incubation modérément plus longue que celle observée après transmission d'isolats MV2, conduisent à supposer que la souche V2 provient d'un cas sporadique MV2 (Jaumain, Quadrio et al. 2016). D'autre part, après transmission d'une souche MV2 à des souris hétérozygotes MV, des temps d'incubation plus long sont observés, ce qui concorde avec l'apparition retardée des cas hétérozygotes français. L'observation constante de plaques de type Kuru chez les patients français MM et MV au codon 129 est accord avec notre hypothèse précédente. En effet, les cas sporadiques MV2 présentent généralement ce type de

plaques à la fois dans le cervelet et l'isocortex. Par conséquent, une contamination par une PrP<sup>sc</sup> de type 2 incluant les deux génotypes (M et V au codon 129) serait cohérente avec la distribution génotypique des cas en France et l'occurrence précoce des cas britanniques homozygotes valine. Au Royaume-Uni, l'apparition tardive des cas MM fait présumer une contamination par une souche VV2. Cette hypothèse a été renforcée par les expériences de transmission à la souris, et a été également confirmée par une analyse par spectrométrie de masse de la PrP<sup>sc</sup> présente dans le cerveau des patients où la PrP<sup>sc</sup>-V129 est prédominante (Moore, Head et al. 2016). Selon notre hypothèse, une étude similaire sur les patients français devrait mener à des résultats différents que ceux des britanniques, avec une distribution équivalente de PrP<sup>sc</sup>-V129 et PrP<sup>sc</sup>-M129.

Cependant il n'est pas impossible que la contamination des lots d'hormone de croissance ait eu pour origine plusieurs souches de prions comme le suggère notre analyse des lots. De plus, la co-occurrence de type 1+2 n'est pas rare en cas de MCJ sporadique et la prépondérance d'une ou de l'autre souche ne peut pas être clairement définie. Finalement, le rôle de la voie d'inoculation sur la sélection des souches et son influence sur le phénotype clinico-pathologique, reste méconnu. A noter que l'utilisation de voies d'inoculation différentes peut modifier le phénotype neuropathologique des souris Tg338 (Langevin, Andreoletti et al. 2011). L'impact de la méthode de préparation des lots d'hormone sur la sélection des souches de prions humains est inconnu. Nous pouvons souligner que la plupart des expériences de typage de souches chez la souris et le singe utilise l'injection intracérébrale (et non la voie sous-cutanée ou intramusculaire) d'homogénats de cerveau.

En raison de la contamination par voie périphérique la comparaison avec le Kuru est particulièrement intéressante. Comme observé chez les patients atteints de Kuru, nos données confirment le rôle central du codon 129 sur la susceptibilité de développer une MCJ (les individus hétérozygotes sont moins sensibles) et la période d'incubation (plus longue chez les hétérozygotes) lors d'une transmission interhumaine. Une contamination par une souche de type V2 est également supposée pour le Kuru et il est intéressant de noter qu'à la fois les cas de Kuru et les cas de MCJ post-hGH français MM et MV présentent des plaques de type Kuru dans le cortex et le cervelet. Cependant, ces plaques sont souvent observées chez les patients VV atteints de Kuru, ce qui ne sembla pas être le cas chez les cas de MCJ post-hGH français (McLean, Ironside et al. 1998). Ainsi, il n'est pas exclu que lors d'une autre contamination périphérique, comme la contamination par voie orale par l'agent bovin, les patients de génotype VV pourraient développer une vMCJ marquée par l'absence de plaques de type floride.

En conclusion, cette étude est la première analyse portant sur l'ensemble de la cohorte des cas français de MCJ post-hGH. Nos résultats soulignent le rôle central du génotype au codon 129 sur la durée de la période d'incubation et de la phase clinique et probablement sur la susceptibilité individuelle. Le phénotype clinique et les caractéristiques lésionnelles sont similaires à ceux observés dans la cohorte britannique, bien que des différences aient été observées entre la fréquence et l'occurrence des cas MM. Compte-tenu de ces similarités phénotypiques, également observées chez les cas de Kuru et, sous certains aspects chez les cas atteints de vMCJ, tous deux dus à une contamination par voie périphérique, ces résultats supposent un rôle prépondérant de la voie d'exposition dans l'atteinte ciblée du cervelet.

## **IV. Inoculation des cas représentatifs à la souris transgénique sur-exprimant la PrP humaine**

### **A. Introduction**

Les résultats combinés de nos analyses épidémiologiques (recherche des facteurs influençant la susceptibilité et ceux modulant la période d'incubation), de l'étude de la distribution et de la qualité des lésions (profils lésionnels), et de l'étude des propriétés biochimiques de la PrP pathologique chez les cas autopsiés, nous ont permis de générer des hypothèses sur les souches présentes dans les tissus des patients ayant développé une MCJ et donc potentiellement présentes dans les lots contaminés. Nous avons vu dans l'introduction générale que, par « *traceback phenomenon* », l'équipe de Kobayashi et al. avait émis des hypothèses sur l'identité de la souche infectieuse des cas de MCJ iatrogène secondaire à une greffe de dure-mère. Pour rappel dans ces expériences, la transmission primaire d'un inoculum possédant un génotype donné, génère chez l'hôte des prions « intermédiaires ». Lors de la transmission de ces prions de taille intermédiaire à un nouvel hôte présentant le même fond génétique que l'inoculum de départ, le type de PrP observé est celui de l'inoculum initial.

La dernière partie de ce projet de thèse s'est donc inspirée de ces expériences de transmission expérimentale réalisée par l'équipe japonaise, dans le but de pouvoir identifier les prions « parentaux » présents dans les lots contaminés.

Nous avons mis en place une expérience d'inoculation intracérébrale d'homogénats de cerveaux de patients ayant développé une MCJ chez des souris transgéniques Tg650 et Tg340

sur-exprimant respectivement la PrP humaine M129 et V129. L'inoculation d'homogénats de cerveaux se fait classiquement à partir d'homogénats issus de la partie frontale du cortex. Cependant, nous avons vu que les patients atteints de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par hGH, débutaient leur maladie par un syndrome cérébelleux et qu'une formation de plaques de type Kuru dans le cervelet était retrouvée dans la très grande majorité des cas. Nous avons donc décidé d'inoculer également des homogénats issus du cervelet de ces patients.

## B. Matériel et méthode

### a) Sélection des patients

Parmi les 119 cas de MCJ, 49 patients ont été autopsiés. Les échantillons congelés de tissus cérébraux étaient disponibles pour 24 patients. Pour ces 24 patients, nous nous sommes basés sur leur exposition aux lots de la catégorie 1 uniquement. Les patients ont été répartis en 15 groupes en fonction des lots reçus et de leurs risques associés et du génotype au codon 129. En fonction des autorisations de recherche obtenues et de la disponibilité du matériel (2 zones cérébrales), nous avons isolé 8 patients (Tableau 11).

<b>Patient</b>	<b>Génotype</b>	<b>Type PrP</b>	<b>Exposition catégorie 1</b>
<b>Patient 1</b>	Met-Met	Type 1	Uniquement exposé au lot 26
<b>Patient 2</b>	Met-Val	Type 2A	Uniquement exposé au lot 2
<b>Patient 3</b>	Met-Met	Type 1	Exposé aux lots 7 et 21
<b>Patient 4</b>	Met-Val	Type 2A	Uniquement exposé au lot 7
<b>Patient 5</b>	Met-Val	Type 2A	Uniquement exposé au lot 3
<b>Patient 6</b>	Non connu	Type 2A	Uniquement exposé au lot 2
<b>Patient 7</b>	Met-Met	Type 1	Exposé aux lots 1 et 7
<b>Patient 8</b>	Met-Met	Type 1	Exposé aux lots 2 et 3

**Tableau 12 : Tableau représentatif des cas inoculés en fonction du génotype, type de PrP et de l'exposition aux lots de la catégorie 1.**

Dans cette expérience, en plus des cas de MCJ iatrogène, des homogénats issus de patients atteints de la forme sporadique (2 patients MM1 et 2 patient VV2) et des homogénats

témoins « normal brain » ont été préparés. Les homogénats de cerveau témoin proviennent d'un patient décédé à 32 ans d'un état de mal épileptique.

### b) Inoculation des animaux

Au total, 500 souris ont été inoculées, 250 Tg650 et 250 Tg340, avec une répartition équivalente entre mâles et femelles :

- 320 animaux pour les 8 patients atteints de MCJ iatrogènes : 2 zones cérébrales (cortex frontal et cervelet) avec 10 souris Tg650 et 10 souris Tg340 par inoculum (4x10 souris/patient)
- 80 animaux pour les 2 patients atteints de MCJ sporadique de type MM1 : 2 zones cérébrales (cortex frontal et cervelet) avec 10 souris Tg650 et 10 souris Tg340 (4x10 souris/patient)
- 80 animaux pour les 2 patients atteints de MCJ sporadique de type VV2
- 20 animaux correspondant au témoin.

Les inoculations intracérébrales ont été réalisées selon le protocole en vigueur dans le laboratoire.

#### 1. Anesthésie et expérimentation animale

Vingt microlitres d'un homogénat à 10% de cerveau humain (MCJ iatrogène, sporadique et « normal brain ») ont été inoculés par voie intracrâniale sous anesthésie générale aux souris âgées de 7 à 8 semaines. Le mélange anesthésique était composé de Kétamine Imalgène® 1000 (100mg/kg) & Xylazine Rompun® 2% (10mg/kg) et injecté par voie intra-péritonéale afin d'induire une anesthésie de 30-45 min. Pour un volume de 10ml :

- 1ml Imalgène® 1000
- 0.5ml Rompun® 2%
- 8.5ml H<sub>2</sub>O PPI

La quantité de produit anesthésique injecté est de 100µl/10g de souris.

La surveillance des animaux a été effectuée 2 fois par semaine puis 5 fois par semaine pendant la phase clinique. Les critères choisis pour l'évaluation des manifestations cliniques étaient principalement neurologiques. Une cotation (0: aucune; 1: discrète; 2: faible; 3: moyenne ; 4: forte), permettant l'évaluation de l'état clinique a été effectuée sur les paramètres suivant :



- ataxie cérébelleuse
- paraparésie
- épilepsie
- cyphose
- état de prostration

L'animal était sacrifié dès qu'il atteignait le stade 4 pour l'ensemble des signes clinique ou lorsqu'une perte de poids supérieur à 20% était observée.

### ***2. Autopsie***

Les animaux sont sacrifiés isolément sous hotte après anesthésie.

### ***3. Récupération des organes***

Les organes et les fluides biologiques d'intérêt (cerveaux, rate, sang) ont été rapidement prélevés sous le PSM.

### ***4. Broyat d'organes infectés***

Les homogénats des différents organes ont été préparés en tampon PBS-glucose 5% dans un broyeur de type Fastprep (MP Biomedicals).

## **C. Résultats**

L'inoculation des animaux a été conduite entre la fin du mois de janvier et septembre 2017. Au moment de la rédaction de ce manuscrit, certains lots d'animaux étaient toujours en cours d'incubation. Un premier bilan des résultats obtenus, en terme de survie, sera fourni au moment de la soutenance.

# Discussion générale et perspectives

Les maladies à prions affectent aussi bien l'homme que l'animal et font partie du groupe des maladies neurodégénératives avec comme particularité, une évolution rapidement fatale. Leur caractère transmissible a eu comme conséquence l'émergence des formes iatrogènes. La contamination accidentelle liée à un traitement par hormone de croissance extractive d'origine humaine, particulièrement dramatique en France par le grand nombre de cas recensés, nous a permis d'aborder la question de la sélection et de la propagation des souches de prions lors d'une exposition à un prion exogène chez l'homme. Afin de mieux caractériser ces phénomènes, nous avons orienté notre travail selon différentes approches : descriptive, épidémiologique et expérimentale.

Notre première étude épidémiologique a porté sur l'identification des facteurs pouvant influencer la susceptibilité de développer une MCJ parmi l'ensemble des 1443 patients ayant été traités par hormone de croissance extractive d'origine humaine entre 1982 et 1985. Nos résultats ont montré qu'une proportion deux fois plus importante d'hommes a été atteinte par la MCJ. L'analyse des données d'exposition par lot a permis de classer les 63 lots distribués entre 1982 et 1985 en 4 catégories en fonction de leurs risques associés à la maladie. La catégorie 1 contenant les 7 lots ayant les risques associés les plus élevés. Le calcul de la proportion de dose reçue selon les catégories précédemment définies, du nombre total de doses issues des lots du groupe 1 et de leur impact sur la susceptibilité, nous a permis de montrer, à partir de données quantifiées et pour la première fois chez l'homme, une relation entre la dose d'exposition et l'apparition de la maladie.

Dans un deuxième temps, nous avons modélisé la période d'incubation des 119 cas français de MCJ post-hGH et avons estimé les paramètres de cette distribution (moyenne, médiane, 95<sup>ème</sup> et 99<sup>ème</sup> percentile) sur l'ensemble de la cohorte, puis en fonction des variables étudiées : âge au début du traitement, sexe, génotype au codon 129 et nombre total de doses reçues de la catégorie 1. Sous l'hypothèse d'une distribution de Weibull, l'estimation du 95<sup>ème</sup> percentile était de 24,7 ans et variait de 22,9 ans à 27,1 ans selon la variable considérée. Nous pouvons donc estimer que 95% des cas de MCJ post-hGH sont déjà apparus. Nos résultats ont montré que la période d'incubation moyenne était réduite de 5 ans chez les homozygotes, comparée aux hétérozygotes, et que les patients ayant débuté leur traitement entre 10 et 14 ans semblaient développer la maladie plus précocement que ceux traités avant l'âge de 10 ans. D'autre part, plus le nombre de doses du groupe 1 était élevé plus la période d'incubation moyenne estimée était courte. La relation entre dose infectieuse et durée de la période

d'incubation est connue et bien documentée dans les modèles expérimentaux, y compris chez les primates non-humains, mais c'est la première fois qu'un tel phénomène peut être rapporté chez l'homme (Dickinson, Fraser et al. 1975, Comoy, Mikol et al. 2015).

Une limite de ces deux premières études est que, pour les variables concernant le nombre de doses, nous avons émis l'hypothèse que la quantité de prions infectieux contenue dans chaque lot d'un même groupe était équivalente. L'effet dose mesuré sur la susceptibilité et son impact sur la période d'incubation ont été calculés pour des doses possédant des niveaux d'infection équivalents. La prise en compte d'une infectiosité différentielle pourrait être entreprise selon deux approches :

- l'utilisation d'un modèle permettant l'estimation des poids à affecter à chaque lot
- la pondération de l'infectiosité du lot par la valeur du hazard-ratio calculé dans notre première étude

En raison du faible nombre de cas (n=119), la première approche n'était pas réalisable. L'approche utilisant le hazard-ratio aurait pu être envisagée si les hazard-ratio calculés étaient significativement différents entre eux, ce qui ne s'est pas avéré dans notre analyse. Néanmoins, une estimation de l'infectiosité relative de chaque lot pourrait être entreprise expérimentalement à l'aide de la technique RT-QuIC quantitative, comme énoncé dans le paragraphe « perspectives » de notre première étude.

Lors des expériences de transmission, le taux d'attaque dépend également de la concordance entre le génotype de l'inoculum et celui de l'hôte (Prusiner, Scott et al. 1990, Korth, Kaneko et al. 2003). Il pourrait donc être envisagé que pour certains lots, la transmission de la MCJ ait été facilitée par cette concordance. Nous n'avons pas été en mesure de tester cette hypothèse puisque nous ne disposions pas du génotype au codon 129 pour les individus n'ayant pas développé de MCJ.

Dans la troisième partie de ce travail, une description clinico-pathologique des 119 cas de MCJ post-hGH a été réalisée. Il en résulte que la France présente le taux d'attaque le plus important (8,2%) comparé au Royaume-Uni (4,2%) et aux Etats-Unis (0,4%) et la plus courte période d'incubation en moyenne (14,1 ans) (29,3 ans au Royaume-Uni et 22,0 ans aux Etats-Unis). Nous pouvons donc supposer que les lots d'hormone de croissance ont été plus fortement contaminés que dans les autres pays. En revanche, le phénotype clinique présenté par les cas français était similaire aux cas britanniques, marqué par un syndrome cérébelleux

inaugural et une démence tardive. Des manifestations cliniques identiques ont été observées dans les deux autres formes infectieuses de la MCJ : la variante de la MCJ et le Kuru. La combinaison des résultats de l'étude neuropathologique, et la survenue concomitante des cas MM et VV font supposer que l'origine de la contamination des cas français de MCJ iatrogène après traitement par hormone de croissance est une souche de type V2 et plus probablement un cas sporadique MV de type 2.

Les résultats de notre premier article suggèrent que plusieurs contaminations auraient eu lieu et donc possiblement une exposition à plus d'une souche humaine. Cependant, dans notre troisième article, l'étude neuropathologique montre un profil lésionnel commun à l'ensemble des cas étudiés. Afin de concilier ces résultats, une première explication serait d'émettre l'hypothèse que chaque contamination ait pour origine un (ou plusieurs) cas de MCJ sporadique de type V2. Cette explication peut être appuyée par le fait que la prévalence des souches de type V2 est élevée (la deuxième fréquence) parmi les cas de sMCJ (Collins, Sanchez-Juan et al. 2006) et peut occasionner des formes cliniques à longue durée d'évolution et dont la présentation peut être atypique. Cela aurait pu favoriser leur inclusion dans le pool de donneurs. Il faut néanmoins souligner qu'une contamination par une souche de type V2 a été proposée dans toutes les formes transmises par la voie périphérique (MCJ iatrogène britannique, kuru) mais aussi par la voie cérébrale ou de proximité cérébrale (MCJ iatrogène après greffe de dure-mère) (Nonno, Di Bari et al. 2006, Parchi, Cescatti et al. 2010, Kobayashi, Matsuura et al. 2014, Rudge, Jaunmuktane et al. 2015). Les modes de préparation des hormones ou des greffons, bien que différents, pourraient avoir favorisé la sélection de certaines souches. La voie d'exposition pourrait également jouer un rôle dans ces phénomènes.

La partie expérimentale de ce projet a porté sur l'inoculation d'homogénats de patients à des souris transgéniques sur-exprimant la PrP humaine. Huit patients ont été sélectionnés en fonction du génotype et de leur exposition spécifique aux lots de la catégorie 1. En s'appuyant sur les expériences de « traceback phenomenon », nous espérons à partir des taux d'attaque, de la période d'incubation, des phénotypes clinico-pathologique et des profils biochimiques des animaux, émettre des hypothèses sur la nature des prions « parentaux », c'est-à-dire l'identité des souches présentes dans les lots potentiellement contaminés (Asano, Mohri et al. 2006).

Dans notre étude relative aux facteurs influençant la susceptibilité, nous avons trouvé une proportion deux fois plus importante d'hommes ayant développé une MCJ. Cependant, une étude, spécifique utilisant des doses d'exposition intermédiaires injectées par la voie périphérique serait nécessaire pour tenter de reproduire l'effet du sexe sur la susceptibilité.

Les homogénats de cerveaux sont issus de 2 régions cérébrales (cortex frontal et le cortex cérébelleux). L'atteinte cérébelleuse précoce des patients atteints de MCJ iatrogène fait supposer un tropisme initial de la souche incriminée vers cette région cérébrale. Bien que, dans la quasi-totalité des cas, le typage de la PrP<sup>res</sup> soit homogène dans les différentes régions examinées, il sera intéressant de vérifier si la même souche est bien retrouvée dans le cortex frontal.

L'étude des formes iatrogènes secondaire à un traitement par hormone de croissance nous permet également d'aborder un aspect essentiel dans les maladies à prions : leur impact en termes de santé publique.

La période d'exposition, dite période à risque, s'étend en France de janvier 1982 à décembre 1985. Les résultats de notre analyse, estimant que 95% des cas sont déjà apparus, sont concordants avec les données de surveillance, où le dernier décès a été relevé en décembre 2015. Ces résultats, combinés à un recul de 30 ans, nous permettent de considérer que le risque de développer une MCJ, pour les 1324 patients ayant été traités par l'hormone de croissance dans la période à risque et n'ayant pas développé la maladie, est désormais négligeable même pour ceux ayant été exposés à des lots dont le risque associé était élevé. En 2013, l'étude britannique portant sur 32 441 appendices collectées dans la population générale entre 2000 et 2012, révèle la présence de PrP anormale chez 16 individus. Les auteurs estiment donc qu'une proportion non négligeable (1/2000) de la population britannique est porteuse de l'agent de la vMCJ de manière asymptomatique (Gill, Spencer et al. 2013). Notre étude sur les facteurs influençant la susceptibilité de développer une MCJ, nous a permis de mettre en évidence un effet seuil. La population britannique a été majoritairement exposée à l'agent de l'ESB dans années 1980 à 1990 (Gill, Spencer et al. 2013). Nous pouvons donc présumer que ces personnes non malades, en moyenne 25 ans après le pic d'exposition, ont été exposées à de très faibles niveaux de prions, suffisants pour permettre une réplication périphérique mais peut-être insuffisants pour franchir le seuil de déclenchement de la neuro-invasion et de la maladie. Soulignons, cependant que au-delà de la simple dose infectieuse, des cofacteurs tissu-spécifiques jouent probablement aussi un rôle dans cette dissociation

entre réplication périphérique et atteinte du SNC observée chez les porteurs asymptomatiques britanniques (Beringue, Herzog et al. 2012).

La transmission expérimentale de la pathologie A $\beta$  a été possible chez le primate de manière très partielle et chez la souris à la fois par voie intracérébrale ou périphérique (Baker, Ridley et al. 1994, Meyer-Luehmann, Coomaraswamy et al. 2006, Eisele, Bolmont et al. 2009, Eisele, Obermuller et al. 2010, Hamaguchi, Eisele et al. 2012, Heilbronner, Eisele et al. 2013). En 2013, l'étude d'Irwin et al. portant sur la cohorte des patients traités par hGH aux Etats-Unis avait pour objectif de déterminer si une transmission interhumaine de maladies neurodégénératives autres que la MCJ était envisageable (Irwin, Abrams et al. 2013). L'étude immunohistochimique d'hypophyses de 34 patients (24 décédés de maladies neurodégénératives et 10 témoins) a révélé la présence de lésions tau (neurites dystrophiques), A $\beta$  (dépôts extra-cellulaires) et  $\alpha$ -synucléine (pathologie de type Lewy) suggérant que les patients traités par hGH ont possiblement été exposés, en plus de la PrP<sup>Sc</sup>, aux autres formes d'agrégats protéiques associés aux maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Cependant, sur les certificats de décès des presque 800 patients traités par hGH n'ayant pas développé de MCJ aucun diagnostic de maladies d'Alzheimer ou de Parkinson n'était mentionné. En 2015, l'étude neuropathologique approfondie de 8 patients décédés de MCJ post-hGH a permis de en mettre évidence des dépôts A $\beta$  dans le cortex cérébral (6/8) et les vaisseaux sanguins (4/8), marqueurs respectifs de la maladie d'Alzheimer et de l'angiopathie amyloïde. Aucune mutation de l'allèle APOE  $\epsilon$ 4 ou des autres allèles à risque de pathologie A $\beta$  précoce n'a été trouvée chez les patients examinés. D'autre part, la fréquence et la sévérité des dépôts A $\beta$  chez ces patients étaient significativement plus élevées que celles observées chez des patients appariés pour l'âge et décédés de MCJ sporadique. Les auteurs concluaient que les résultats étaient en faveur d'une transmission iatrogène des pathologies A $\beta$  (Jaunmuktane, Mead et al. 2015). Une étude récente sur une plus large série de cas britanniques a confirmé ces résultats. Des dépôts A $\beta$  similaires étaient détectés chez 18 des 33 cas étudiés. De manière plus intéressante, une accumulation de peptides A $\beta$  a été mise en évidence chez 5 des 12 patients traités par hormone de croissance mais décédés d'autres causes qu'une MCJ (Ritchie, Adlard et al. 2017). Ce dernier résultat démontre que la pathologie A $\beta$  chez les patients traités par hGH n'est pas liée à la survenue d'une maladie à prion. A noter que la présence de plaques A $\beta$  et d'angiopathie amyloïde a également été décelée chez les patients atteints de MCJ iatrogène secondaire à une greffe de dure-mère (Kovacs 2016, Kovacs, Lutz et al. 2016) suggérant, là encore une contamination A $\beta$  de l'hôte par le greffon.

Compte-tenu des prévalences élevées des maladies d'Alzheimer (et autres démences) (22 cas pour 1000 habitants âgés de plus de 40 ans) et de Parkinson (2-3 cas pour 1000 habitants) (source : Santé Publique France) et de la très faible proportion probable de cas qui pourraient être dus à une transmission iatrogène, la mise en place d'études épidémiologiques visant à identifier un lien entre pathologies amyloïdes et exposition à un risque de transmission dans la population générale est difficile (effectifs pléthoriques, durée de suivi inconnue, ...). Ainsi, afin d'évaluer le risque de transmissibilité de ces maladies à l'homme, le suivi des populations à risque semble plus pertinent. En raison de leur exposition potentielle via le traitement par l'hormone de croissance, aux protéines responsables des autres protéinopathies, les patients ayant été traité par hGH mais n'ayant pas développé de MCJ constituent une population qu'il paraît pertinent de surveiller à long terme. Les modalités et les aspects éthiques de cette surveillance, chez des personnes n'ayant aucun symptôme et devant déjà gérer individuellement les risques associés à la transmission de la MCJ, restent à définir. Dans ce contexte et en fonction des résultats qui seront apportés par cette surveillance et par l'étude neuropathologique des cas de MCJ post-hGH français actuellement en cours (Stéphane Haïk, communication personnelle), les approches qui ont été développées dans ce travail de thèse (incrimination des lots, facteurs contrôlant la période d'incubation, effet souche...) pourront trouver, à moyen ou long terme, des applications nouvelles.



# Annexe

Au cours de cette thèse, nous avons publié un article portant sur l'impact de l'introduction de la détection de la protéine 14-3-3 dans les critères diagnostiques de la sMCJ. Cet article a été publié le 12 octobre 2017 dans le journal Eurosurveillance.

www.eurosurveillance.org – Peckeu et al.

## Accuracy of diagnosis criteria in patients with suspected diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and detection of 14-3-3 protein, France, 1992 to 2009

Laurene Peckeu<sup>1,2,3,4,5</sup>, Nicole Delasnerie-Lauprêtre<sup>1,2,3,4,5</sup>, Jean-Philippe Brandel<sup>1,2,3,4</sup>, Dominique Salomon<sup>6</sup>, Véronique Sazdovitch<sup>1,2,3,7</sup>, Jean-Louis Laplanche<sup>8</sup>, Charles Duyckaerts<sup>1,2,3,7</sup>, Danielle Seilhean<sup>1,2,3,7</sup>, Stéphane Haïk<sup>1,2,3,4,7</sup>, Jean-Jacques Hauw<sup>9</sup>

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), U1127, Paris, France
2. Sorbonne Universités, UPMCUniv Paris 06,UMRS 1127, Paris, France
3. Institut du cerveau et de la moelle épinière (ICM), Paris, France
4. Assistance publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Cellule nationale de référence des maladies de Creutzfeldt-Jakob, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France
5. These authors contributed equally to this study and share first authorship
6. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1153, Paris, France
7. Assistance publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Laboratoire de Neuropathologie Raymond Escourolle, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France
8. Assistance publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière; Université Paris Descartes, Paris, France
9. Académie Nationale de Médecine, Paris, France

Correspondence: Jean-Jacques Hauw (j.hauw@academie-medecine.fr)

Keywords: Creutzfeldt-Jakob disease, prion, surveillance, diagnosis criteria, biomarkers

Diagnostic criteria of Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), a rare and fatal transmissible nervous system disease with public health implications, are determined by clinical data, electroencephalogram (EEG), detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid (CSF), brain magnetic resonance imaging and prion protein gene examination. The specificity of protein

14-3-3 has been questioned. We reviewed data from 1,572 autopsied patients collected over an 18-year period (1992–2009) and assessed whether and how 14-3-3 detection impacted the diagnosis of sporadic CJD in France, and whether this led to the misdiagnosis of treatable disorders. 14-3-3 detection was introduced into diagnostic criteria for CJD in 1998.

Diagnostic accuracy decreased from 92% for the 1992–1997 period to 85% for the 1998–2009 period. This was associated with positive detections of 14-3-3 in cases with negative EEG and alternative diagnosis at autopsy. Potentially treatable diseases were found in 163 patients (10.5%). This study confirms the usefulness of the recent modification of diagnosis criteria by the addition of the results of CSF real-time quaking-induced conversion, a method based on prion seed-induced misfolding and aggregation of recombinant prion protein substrate that has proven to be a highly specific test for diagnosis of sporadic CJD.

## Background

Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease (sCJD) is the most common form of human prion disease, a group of rapidly fatal untreatable and transmissible encephalopathies. Clinical diagnosis of sCJD has relied on criteria revised over time to incorporate the detection of 14-3-3 protein in the cerebro-spinal fluid (CSF) in 1998 [1] and the results of brain magnetic resonance imaging (MRI) in 2009 [2]. As a marker of acute neuronal injury that does not directly detect abnormal prion propagation, the specificity of 14-3-3 detection has been questioned [3]. This may lead to overdiagnosis of sCJD, and to misdiagnosis of potentially treatable forms of neurological disorders [4]. The introduction of this test into the diagnosis criteria for CJD has considerably impacted the organisation of CJD surveillance in France. Since 1998, patient referral for autopsy to the French National Network for CJD surveillance has relied mainly on the report of 14-3-3 detection performed in five affiliated laboratories.

In a series of 1,572 autopsied patients collected over an 18-year period, we assessed whether there was overdiagnosis of sCJD in France and how the 14-3-3 detection impacted on this, and could lead to the misdiagnosis of treatable disorders.

## Methods

### Cohort study

We reviewed clinical, laboratory, electroencephalographic (EEG) and pathological data for 1,572 patients who were referred to the French neuropathology CJD network for autopsy between 1992 and 2009, and were included in the CJD National Reference Centre register [5-11].

### Diagnostic assessment

Data provided by physicians to the CJD National Reference Centre register and to the neuropathologists for autopsy request were analysed (ND-L, J-PB, J-JH), distinguishing between possible and probable cases according to the World Health Organization (WHO) criteria (Table 1). For EEG data (available for 1,266 cases: 888 sCJD and 378 non-CJD), periodic (or pseudo-periodic) sharp wave complexes considered to be typical of CJD by the referring physicians, were recorded (EEGs were not systematically reviewed). CSF 14-3-3 protein immunoreactivity was available in 1,123 cases (749 sCJD and 374 other diagnoses). Analysis for the prion protein gene (*PRNP*) was performed in 871 cases (705 sCJD and 166 non-CJD).

**TABLE 1.** World Health Organization criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, 1992–2009

1992–1998		1999–2009	
- <b>Definite CJD:</b> neuropathological diagnosis - <b>Probable CJD:</b> I + 2 from column II + III - <b>Possible CJD:</b> I + 2 from column II + disease duration < 2 years		- <b>Definite CJD:</b> neuropathological diagnosis - <b>Probable CJD:</b> I + 2 from column II + III, or possible CJD + CSF 14-3-3 detection - <b>Possible CJD:</b> I + 2 from column II + disease duration < 2 years	
I	Rapidly progressive dementia	I	Rapidly progressive dementia
II	A Myoclonus	II	A Myoclonus
	B Cerebellar or visual signs		B Cerebellar or visual signs
	C Pyramidal or extrapyramidal signs		C Pyramidal or extrapyramidal signs
	D Akinetic mutism		D Akinetic mutism
III	Typical EEG	III	Typical EEG

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease; CSF: cerebrospinal fluid; EEG: electroencephalogram.

### Prion protein gene, Western blotting and neuropathological studies

PRNP analysis was performed as described [5,6] when informed consent was obtained from either the patient or the next of kin. Western blotting and neuropathology were performed following established methods [8-10]: after gross examination, one hemi-brain (left or right at random) was frozen at autopsy for PrPsc displaying (Western blot), the other fixed in formalin for 1 month. Hemi-brains were kept in the brain bank. At least eight formalin-fixed samples included: (i) transverse sections of cerebral cortex (middle frontal and superior temporal gyri, medial temporal gyrus including hippocampal formation and parahippocampal region, and cuneus); (ii) transverse sections of basal ganglia (head of caudate nucleus and anterior putamen, thalamic centromedian nucleus and mammillary bodies); (iii) sections perpendicular to the axis of the brains stem (cerebellar vermis including the nucleus dentatus; brain stem including the substantia nigra). After partial inactivation by 96% formic acid for 1 hour and paraffin embedding, 4 µm-thick sections were stained with haematein-eosin and periodic acid-Schiff techniques. Since 1998, a minimum of two sections (cerebral and cerebellar cortices) have been immunolabelled with PrP antibodies, using 12F10 monoclonal antibody (Bertin, Montigny le Bretonneux, France) [10]. Each specimen was examined by at least two neuropathologists (VS, DS, CD, J-JH), and, in most cases, neuropathologists from other centres of the French neuropathology network of Creutzfeldt-Jakob disease). Combined disorders were classified considering both therapeutic possibilities and prion diseases unique infection control problem. For example, a case with lesions of

Wernicke's encephalopathy associated with a few Alzheimer lesions was classified as encephalopathy. However, when lesions of Wernicke's encephalopathy were associated with CJD, the case was classified as CJD.

## Ethics

No autopsy can be performed in France unless the patient's next of kin can testify that the deceased did not object to autopsy. The national computerised registry of objection to autopsy is systematically consulted. Another specific consent is needed for genetic studies. The Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés allows the surveillance register to publish anonymised data [11].

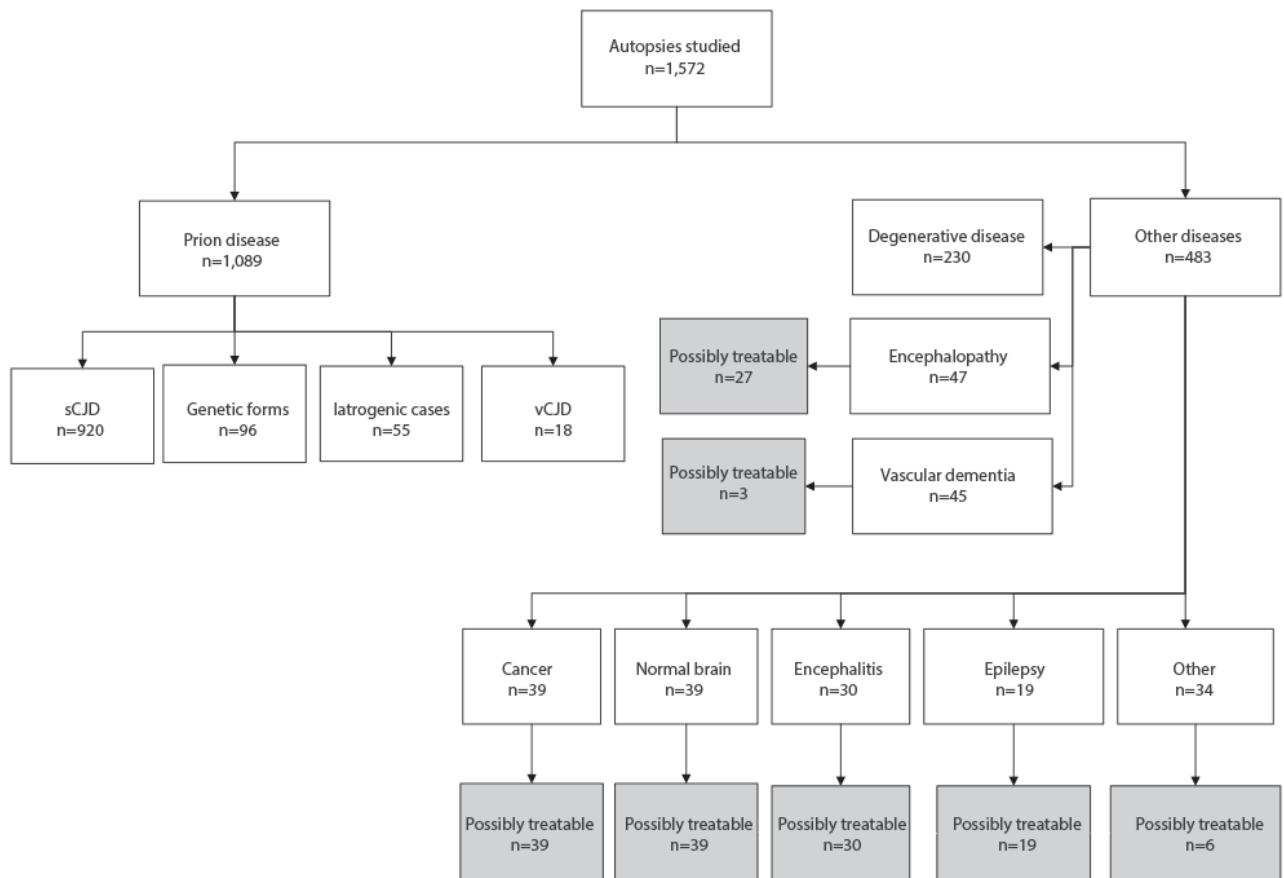
## Statistics

Statistical analysis was performed using STATA 12.1 (StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, Texas: StataCorp LP). Data are described as mean (standard deviation) and percentage, and compared with means comparison test and Fisher's exact test. A p value  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

Data from 1,572 autopsies, performed between January 1992 and December 2009, were studied. This corresponds to 11.8% of the 13,384 patients referred to the CJD surveillance network. Excluding genetic (n=96), iatrogenic (n=55), and variant CJD (vCJD) (n=18), there were 920 sCJD cases and 483 cases of non-prion diseases (Figure 1).

**FIGURE 1.** Number of patients with autopsy-proven prion diseases and alternative diagnoses, including possibly treatable diseases, France, 1992–2009



sCJD: sporadic Creutzfeldt-Jakob disease; vCJD: variant Creutzfeldt-Jakob disease.

Among these cases there were 230 patients with neurodegenerative diseases (47.6%). As detailed in [Table 2](#), these were mainly Alzheimer’s disease (74.8%), Lewy body dementia and Parkinson’s disease (14.8%), and fronto-temporal lobar degeneration (5.7%). There were 47 cases of non-prion anoxic/metabolic/toxic encephalopathy (9.7%), 45 cases of vascular dementia (9.3%), 39 cases of cancer-related disorder (8.1%), 30 cases of encephalitis (6.2%) and 19 cases of non-convulsive status epilepticus with no cause found at autopsy (3.9%). In 39 patients, no history of dementia and no histopathological lesions were found and we categorised them as ‘normal brain’. In 28 patients, there was a history of dementia and no typical histopathological lesions were found. We categorised them as ‘unspecified dementia after clinicopathological correlation’ ([Table 2](#)). A total of 163 patients with potentially treatable diseases had been suspected of having CJD. Of these, 36 patients fulfilled criteria for probable sCJD ([Table 3](#)).

**TABLE 2.** Alternative diagnoses in autopsied patients referred to the national Creutzfeldt-Jakob disease surveillance network, France, 1992–2009 (n=483)

Classification of disease	Alternative diagnosis	n
<b>Degenerative diseases</b> (n = 230)	Alzheimer's disease	172
	Lewy body dementia and Parkinson's disease	34
	Frontotemporal lobar degeneration	13
	Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia	7
	Olivopontocerebellar atrophy	2
	Argyrophylic grain disease	1
	Unspecified degenerative disease	1
<b>Encephalopathies</b> (n = 47)	Metabolic encephalopathy	17
	Anoxic encephalopathy	15
	Vitamin B deficiency	13
	Unspecified encephalopathy	2
<b>Vascular dementia</b> (n = 45)	Multi-infarct and/or microangiopathy dementia	35
	Mixed dementia	7
	Horton disease/ Wegener disease	2
	Unspecified vasculitis	1
<b>Cancer</b> (n = 39)	Primary intra-cranial tumour	26
	Intracerebral metastases	4
	Paraneoplastic encephalitis	7
	Leukoencephalopathy with thymoma	1
	Radiotherapy related grade I astrocytoma	1
<b>Normal brain</b> (n = 39)	NA	39
<b>Others</b> (n = 34)	Unspecified dementia after clinicopathological correlation	28
	Heterotopia	2
	Multiple sclerosis	2
	Malignant neuroleptic syndrome	1
	Cavernoma of brain stem	1
<b>Encephalitis</b> (n = 30)	Viral encephalitis	11
	Unspecified encephalitis	5
	Meningoencephalitis	9
	Fungal infection (candidiasis or cryptococcosis)	2
	Rasmussen's encephalitis	3
<b>Status epilepticus</b> (n = 19)	NA	19
<b>Total</b>		<b>483</b>

NA: not applicable.



**TABLE 3.** Ante-mortem classification of patients with potentially treatable diseases and definite diagnosis in patients with a diagnosis of probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease before and after introduction of 14-3-3 detection, France, 1992–2009

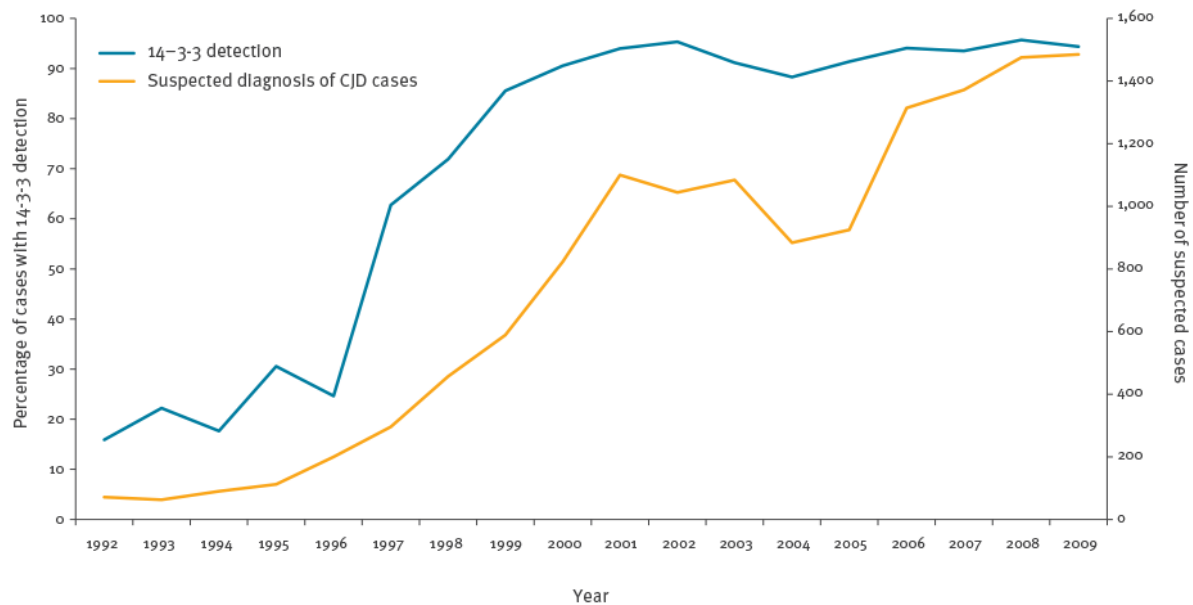
Period of time	Ante-mortem classification of patients with potentially treatable diseases					Definite diagnosis among patients with a probable diagnosis of sCJD				
	Probable sCJD		Possible sCJD		Total	sCJD		Other diagnosis		Total
1992–1997	1	4%	21	96%	<b>22</b>	151	92%	13	8%	<b>164</b>
1998–2009	35	26%	102	74%	<b>137</b>	586	85%	100	15%	<b>686</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>23%</b>	<b>123</b>	<b>77%</b>	<b>159</b>	<b>737</b>	<b>87%</b>	<b>113</b>	<b>13%</b>	<b>850</b>

sCJD: sporadic Creutzfeldt-Jakob disease.

### **Impact of 14-3-3 detection on the activity of surveillance network**

In 1992 14-3-3 detection was performed in under 20% of patients referred to the French neuropathology CJD network for autopsy, but by 1999 it was performed for 85% of such patients, and for over 90% after 2000 (Figure 2). Simultaneously, surveillance was reorganised to integrate this test: all patients in whom 14-3-3 was detected were referred to the French network and their diagnostic status was systematically analysed according to the WHO criteria (Table 1). This was associated with an important increase of the number of suspected cases between 1997 and 2001 (Figure 2).

**FIGURE 2.** Evolution of the number of suspected cases of Creutzfeldt-Jakob disease and of the percentage of cases with 14-3-3 detection, France, 1992–2009



CJD: Creutzfeldt-Jakob disease

### Accuracy of diagnosis criteria in suspected Creutzfeldt-Jakob disease cases and detection of 14-3-3 protein

From January 1992 to December 1997, the proportion of definite CJD among patients classified as probable CJD (diagnosis accuracy) was 92%. This proportion significantly decreased to 85% from January 1998 to December 2009 ( $p = 0.014$ ) (Table 3). This was due to the detection of 14-3-3 protein in cases with negative EEG and alternative diagnosis at autopsy. Among 686 autopsied patients classified as probable CJD, 36 were false probable CJD cases due to CSF 14-3-3 detection only (Table 4).

**TABLE 4.** Alternative diagnoses of treatable diseases in autopsied patients classified as probable sporadic CJD while alive on account of 14-3-3 detection only, France, 1992–2009 (n=36)

Alternative diagnosis		n
Encephalopathies (n = 6)	Metabolic encephalopathy <sup>a</sup>	3
	Vitamin B deficiency	3
Vascular dementia (n = 1)	Unspecified vasculitis	1
Cancer (n = 12)	Primary Intracranial tumour	9
	Paraneoplastic encephalitis	2
	Leukoencephalopathy with thymoma	1
Normal brain (n = 6)	NA	6
Others (n = 1)	Malignant neuroleptic syndrome	1
Encephalitis (n = 7)	Viral encephalitis	3
	Unspecified encephalitis	2
	Meningoencephalitis	1
	Rasmussen's encephalitis	1
Status epilepticus n = 3	NA	3
<b>Total</b>		<b>36</b>

<sup>a</sup> One patient with a metabolic encephalopathy was the only probable CJD case in the period 1992–1997.

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease; NA: not applicable.

### Alternative diagnoses found in patients with probable sCJD and detection of 14-3-3 protein

Since the introduction of 14-3-3 detection in 1998, the present study reveals a decrease in the proportion of neurodegenerative diseases and an increase of the proportion of cancers, vascular diseases, encephalitides and epilepsy among patients with an alternative diagnosis (Table 5). In those patients with non-neurodegenerative diseases, 14-3-3 was detected in 50 cases (44%) of the total of 114 cases. In neurodegenerative diseases, 49 (31%) of the total of 160 patients had positive 14-3-3 detection.

**TABLE 5.** Evolution of alternative diagnoses for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, France, 1992–2009 (n=483)

Non-CJD cases	1992–1997		1998–2009		Total
	n	%	n	%	
Degenerative diseases	39	53.4	191	46.6	230
Encephalopathies	7	9.6	40	9.8	47
Cancer	2	2.7	37	9.0	39
Vascular diseases	4	5.5	41	10.0	45
Normal brain	11	15.1	28	6.8	39
Encephalitides	2	2.7	28	6.8	30
Epilepsy	1	1.4	18	4.4	19
Others	7	9.6	27	6.6	34
Total	73	100	410	100	483

CJD: Creutzfeldt-Jakob disease.

### Potentially treatable diseases with positive detection of 14-3-3 protein

Possibly treatable cases (163, 33.7% of non-CJD cases) included 39 cancer-related disorders, 27 encephalopathies (Wernicke’s encephalopathy or pellagra), 30 encephalitides (some viral diseases, such as subacute sclerosing panencephalitis, have poor outcomes, but may benefit from therapeutic trials), 39 normal brains (e.g. unrecognised delirium, drug abuse, withdrawal syndrome, psychiatric disease), 19 non-convulsive status epilepticus with no cause found at autopsy and a number of other disorders (Figure 1). Interestingly, with the introduction of 14-3-3 detection, the number of patients classified as probable sCJD with a final diagnosis of potentially treatable diseases significantly increased from 1 to 35 ( $p = 0.01$ ) (Table 3). Among these 35 patients, 26 showed positive detection of 14-3-3 and 17 were classified as probable sCJD according to positive 14-3-3 only without periodic sharp wave complexes on EEG.

The mean age at death in sCJD and non-CJD cases were similar: (age  $\pm$  standard deviation (SD) = 68.7 years  $\pm$  9.5, vs 68.9 years  $\pm$  14.7). However, before the age of 50 and after the age of 80 years, misdiagnoses were more numerous than between 50 and 80 years ( $p < 0.0001$ ). Regarding specifically treatable diseases, 68% (111/163) of the cases were aged 60 years and older.

The distribution of the *PRNP* genotypes at codon 129 in 705 sCJD and 166 non-CJD cases revealed significant differences. Among sCJD patients, the genotype was: Met-Met (421/705) (59.7%), Met-Val (139/705) (19.7%), Val-Val (145/705) (20.6%). Among the other

cases, it was Met-Met (75/166) (45.2%), Met-Val (73/166) (44.0%), Val-Val (18/166) (10.8%); ( $p < 0.002$ ).

## Discussion

As compared with the other European countries belonging to the EuroCJD network, France shows one of the highest number of 14-3-3 protein referrals. This largely contributed to the high incidence of sCJD in France and is regarded as a marker of high surveillance intensity [12]. An intensive surveillance fits well with the primary aim of the EuroCJD network which is to identify vCJD cases among the CJD population. However, while the highest sensitivity of diagnosis criteria is commendable, the present study shows that the introduction of 14-3-3 detection in the definition of probable cases coincided with a loss of specificity leading to the misdiagnosis of potentially treatable diseases. Without 14-3-3, the diagnostic sensitivity in probable cases was 56.1% and the specificity 95.6%. With 14-3-3 detection, the sensitivity was 82.4%, and the specificity 75.6%.

Other factors may be responsible for the high number of misdiagnoses. In all European countries, special attention was paid to CJD from March 1996 onwards, when vCJD was first reported in the United Kingdom [13], introducing a public health motivation for diagnosis coinciding with the introduction of CSF 14-3-3 in the diagnostic criteria. Specific to our research, another possible bias may be the study of autopsy cases only. Medical staff may ask for an autopsy to be performed because there is doubt about the CJD diagnosis. As a consequence, other diagnostic alternatives may have been discussed before the patient's death without formal report to the neuropathologist. Also, it may be pointed out that in France, in case of suspicion of CJD, any medical device that has come into contact with the patient should be destroyed unless autopsy dismisses the diagnosis. An increase in the use of CSF 14-3-3 and in the percentage of probable sCJD solely with positive CSF 14-3-3 is not specific to France, however, as shown by the study of national databases of 11 members of EURO-CJD-Consortium, including nine European countries, Australia and Canada during the period 1993–2002 [14].

The 14-3-3 proteins are a group of 30-kDa proteins involved in signal transduction and apoptosis and are normally expressed by brain neurons. Their detection in CSF is regarded as a marker of subacute neuronal suffering. It thus can be observed in various neurological

diseases including epilepsy, cancer, and paraneoplastic encephalitis. In our series, during the 1998–2009 period, when performed, 14-3-3 protein was detected in 15/18 cases of epilepsy, 15/37 cases of cancer and 7/28 cases with encephalitis, all potentially treatable diseases. Because of its lack of specificity, interpretation of 14-3-3 detection results must be performed within the context of the patient's clinical history and must not result in potentially useful therapies being dismissed. Importantly, a positive 14-3-3 may be drug-induced [15], which could explain some of the 'normal brains' found at autopsy.

The potentially treatable alternative diagnoses in France are similar to those of other national series reported in Europe [14,16-19] and in various other countries: the United States [20,21], Japan [22], Argentina [23] and China [24]. In the Dutch series that included suspicions between 1998 and 2009, a substantial group (ca 14.0%) suffered from potentially treatable disorders such as infectious disease, cancer-associated disease, or toxic/metabolic disorders. The authors pointed out that many of these patients were referred to the Netherlands National Prion Disease Registry based on a positive 14-3-3 test in cerebrospinal fluid [19]. We confirm these data in the present large series: the frequency of the most common potentially treatable alternative diagnoses increased with the introduction of 14-3-3 protein detection, to reach values like those observed in the Dutch study.

In 2009, the presence of high signals of the striatum on T2-weighted sequences and diffusion-weighted imaging in brain MRI was introduced among the major criteria of probable sCJD [2]. It is too early to assess the impact of this improvement on the accuracy of these criteria. However, since these MRI alterations are rarely observed in most of the treatable alternative diagnoses, an increase in specificity should be expected.

Among the various researches for newer, more predictive, and informative biomarkers [25], a direct method for the diagnostic of sCJD that detects the seeding activity of abnormal PrP assemblies in the CSF has been proposed [26]. Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) showed a specificity of 99 to 100% and a sensitivity similar to that of 14-3-3 detection [27,28]. Its validation using large series in European countries is pending. According to the results and to the reliability and the robustness of the method [27], RT-QuIC results in CSF or other tissues were recently added to the diagnosis criteria for sCJD by the EuroCJD consortium [28,29]. In the event that a specificity of 100% should be confirmed,

especially in series including treatable alternative diagnoses, this method should contribute to considerably improve the diagnosis of CJD and other disorders leading to rapidly progressive dementia, including treatable diseases.

## Acknowledgements

We thank all members of the Cellule nationale de référence de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, and the French neuropathology network of Creutzfeldt-Jakob disease: H Sevestre (Amiens), F Dubas †, F Letournel (Angers), G Viennet (Besançon), A Vital, C Vital (Bordeaux), F Chapon (Caen), JL Kémény (Clermont-Ferrand), F Labrousse, JM Vallat (Limoges), CA Maurage, MM Ruchoux (Lille), A Jouvét, N Kopp, D Meyronnet, N Streichenberger, F Thivolet-Béjui (Lyon), D Figarella-Branger, A Maues de Paula, JF Pellissier (Marseille), J Floquet, JM Vignaud (Nancy), JF Michiels, F Vandebost (Nice), A Heitzmann (Orléans), F Gray, D Hénin, C Lacroix-Jousselin, J Mikol (Paris), P Baldet, V Rigau (Montpellier), P Levillain (Poitiers), MD Diébold, P Fornes, M Pluot (Reims), D Chiforeanu, N Rioux-Leclerc, S Saikaili (Rennes), A Laquerrière (Rouen), M Prévost (Saint-Pierre, La Réunion), J-P Bellocq, B Lannes, M Mohr (Strasbourg), B Delisle, E Uro-Coste (Toulouse) for providing the clinical data and sections, and all physicians who notified the cases to the Surveillance Register. We also thank the patients who gave their consent for autopsy and genetic studies.

Funding: This study was supported by Santé Publique France.

## Conflict of interest

None declared

## Authors' contributions

Conceived and designed the study: ND-L, J-PB, SH, J-JH. Collected and analysed data provided by the physicians: LP, ND-L, J-PB, DS, SH. Performed 14-3-3 detection: J-LL. Examined neuropathological specimen: VS, CD, DS, J-JH. Wrote the paper: LP, J-PB, SH, J-JH.

## References

1. Brandel JP, Delasnerie-Lauprêtre N, Laplanche JL, Hauw JJ, Alperovitch A. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: effect of clinical criteria on incidence estimates. *Neurology*. 2000;54(5):1095-9. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.54.5.1095> PMID:10720280
2. Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, et al. Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*. 2009;132(Pt 10):2659-68. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awp191> PMID:19773352
3. Burkhard PR, Sanchez JC, Landis T, Hochstrasser DF. CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology*. 2001;56(11):1528-33. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.56.11.1528> PMID:11402110
4. Chitras N, Jung RS, Kofsky DM, Blevins JE, Gambetti P, Leigh RJ, et al. Treatable neurological disorders



- misdiagnosed as Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 2011;70(3):437-44.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.22454> PMID:21674591
5. Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alperovitch A, et al.; French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. Molecular genetics of prion diseases in France. *Neurology.* 1994;44(12):2347-51. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.44.12.2347> PMID:7991124
  6. Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 1999;353(9165):1673-4.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01342-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01342-2) PMID:10335789
  7. Privat N, Sazdovitch V, Seilhean D, LaPlanche JL, Hauw JJ. PrP immunohistochemistry: different protocols, including a procedure for long formalin fixation, and a proposed schematic classification for deposits in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Microsc Res Tech.* 2000;50(1):26-31.  
[http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029\(20000701\)50:1<26::AID-JEMT5>3.0.CO;2-S](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0029(20000701)50:1<26::AID-JEMT5>3.0.CO;2-S) PMID:10871545
  8. Hauw JJ, Sazdovitch V, Laplanche JL, Peoc'h K, Kopp N, Kemeny J, et al. Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology.* 2000;54(8):1641-6.  
<http://dx.doi.org/10.1212/WNL.54.8.1641> PMID:10762506
  9. Levavasseur E, Laffont-Proust I, Morain E, Faucheux BA, Privat N, Peoc'h K, et al. Regulating factors of PrP glycosylation in Creutzfeldt-Jakob disease--implications for the dissemination and the diagnosis of human prion strains. *PLoS One.* 2008;3(7):e2786. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002786> PMID:18665216
  10. Privat N, Laffont-Proust I, Faucheux BA, Sazdovitch V, Frobert Y, Laplanche JL, et al. Human prion diseases: from antibody screening to a standardized fast immunodiagnosis using automation. *Mod Pathol.* 2008;21(2):140-9. PMID:18084251
  11. Brandel JP, Peckeu L, Haïk S. The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide. *Transfus Clin Biol.* 2013;20(4):395-7.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2013.02.029> PMID:23587616
  12. Klug GM, Wand H, Simpson M, Boyd A, Law M, Masters CL, et al. Intensity of human prion disease surveillance predicts observed disease incidence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(12):1372-7.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2012-304820> PMID:23965290<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2012-304820>
  13. Court L, Hauw JJ. Le docteur Françoise Cathala Pagesy et l'histoire des maladies à prions. *Rev Neurol (Paris).* 2015;171(12):805-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2014.02.003> PMID:24703683
  14. de Pedro-Cuesta J, Glatzel M, Almazán J, Stoeck K, Mellina V, Puopolo M, et al. Human transmissible spongiform encephalopathies in eleven countries: diagnostic pattern across time, 1993-2002. *BMC Public Health.* 2006;6(1):278. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-6-278> PMID:17096829
  15. Zanusso G, Fiorini M, Farinazzo A, Gelati M, Benedetti MD, Ferrari S, et al. Phosphorylated 14-3-3zeta protein in the CSF of neuroleptic-treated patients. *Neurology.* 2005;64(9):1618-20.  
<http://dx.doi.org/10.1212/01.WNL.0000160397.81314.84> PMID:15883327

16. Van Everbroeck B, Dobbeleir I, De Waele M, De Deyn P, Martin JJ, Cras P. Differential diagnosis of 201 possible Creutzfeldt-Jakob disease patients. *J Neurol*. 2004;251(3):298-304. <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-004-0311-9> PMID:15015009
17. Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Vargas D, Kallenberg K, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Creutzfeldt-Jakob disease in Germany: a prospective 12-year surveillance. *Brain*. 2007;130(Pt 5):1350-9. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awm063> PMID:17472986
18. Gelpi E, Heinzl H, Hoftberger R, Unterberger U, Strobel T, Voigtlander T, et al. Creutzfeldt-Jakob disease in Austria: an autopsy-controlled study. *Neuroepidemiology*. 2008;30(4):215-21. <http://dx.doi.org/10.1159/000126915> PMID:18424902 <http://dx.doi.org/10.1159/000126915>
19. Jansen C, Parchi P, Capellari S, Ibrahim-Verbaas CA, Schuur M, Strammiello R, et al. Human prion diseases in the Netherlands (1998-2009): clinical, genetic and molecular aspects. *PLoS One*. 2012;7(4):e36333. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036333> PMID:22558438 PMID:22558438
20. Barash JA, West JK, DeMaria A Jr. Accuracy of administrative diagnostic data for pathologically confirmed cases of Creutzfeldt-Jakob disease in Massachusetts, 2000-2008. *Am J Infect Control*. 2014;42(6):659-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2014.02.002> PMID:24721779
21. Paterson RW, Torres-Chae CC, Kuo AL, Ando T, Nguyen EA, Wong K, et al. Differential diagnosis of Jakob-Creutzfeldt disease. *Arch Neurol*. 2012;69(12):1578-82. <http://dx.doi.org/10.1001/2013.jamaneurol.79> PMID:23229042
22. Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, Noguchi-Shinohara M, Sakai K, Nakamura Y, et al. Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain*. 2010;133(10):3043-57. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awq216> PMID:20855418
23. Begué C, Martinetto H, Schultz M, Rojas E, Romero C, D'Giano C, et al. Creutzfeldt-Jakob disease surveillance in Argentina, 1997-2008. *Neuroepidemiology*. 2011;37(3-4):193-202. <http://dx.doi.org/10.1159/000331907> PMID:22067221
24. Gao C, Shi Q, Tian C, Chen C, Han J, Zhou W, et al. The epidemiological, clinical, and laboratory features of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients in China: surveillance data from 2006 to 2010. *PLoS One*. 2011;6(8):e24231. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024231> PMID:21904617
25. Soomro S, Mohan C. Biomarkers for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3(6):465-72. <http://dx.doi.org/10.1002/acn3.304> PMID:27547775
26. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*. 2011;17(2):175-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2294> PMID:21278748
27. McGuire LI, Peden AH, Orrú CD, Wilham JM, Appleford NE, Mallinson G, et al. Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 2012;72(2):278-85. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.23589> PMID:22926858
28. McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol*. 2016;80(1):160-5. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.24679>

[PMID:27130376](#)

29. Zanusso G, Monaco S, Pocchiari M, Caughey B. Advanced tests for early and accurate diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(6):325-33.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.65> [PMID:27174240](#)

# Bibliographie

Abrams, J. Y., L. B. Schonberger, E. D. Belay, R. A. Maddox, E. W. Leschek, J. L. Mills, D. K. Wysowski and J. E. Fradkin (2011). "Lower risk of Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients initiating treatment after 1977." J Clin Endocrinol Metab **96**(10): E1666-1669.

Acevedo-Morantes, C. Y. and H. Wille (2014). "The structure of human prions: from biology to structural models-considerations and pitfalls." Viruses **6**(10): 3875-3892.

Aguzzi, A., F. Baumann and J. Bremer (2008). "The prion's elusive reason for being." Annu Rev Neurosci **31**: 439-477.

Aguzzi, A., M. Heikenwalder and M. Polymenidou (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 552-561.

Allen, D. B. (1992). "Growth hormone therapy for children with Down syndrome." J Pediatr **120**(2 Pt 1): 332-333.

Alpers (1964). "Kuru: Age and Duration Studies (mimeographed)." Papua New Guinea: Department of Medicine, University of Adelaide: 1-12.

Alpers, M. (1987). "Epidemiology and clinical aspects of kuru." Prions: novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease (eds SB Prusiner & MP McKinley): 451-465.

Alpers, M. P. and T. Kuru Surveillance (2005). "The epidemiology of kuru in the period 1987 to 1995." Commun Dis Intell Q Rep **29**(4): 391-399.

Andreoletti, O., N. Morel, C. Lacroux, V. Rouillon, C. Barc, G. Tabouret, P. Sarradin, P. Berthon, P. Bernardet, J. Mathey, S. Lugan, P. Costes, F. Corbiere, J. C. Espinosa, J. M. Torres, J. Grassi, F. Schelcher and F. Lantier (2006). "Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep." J Gen Virol **87**(Pt 4): 1043-1046.

Aronoff-Spencer, E., C. S. Burns, N. I. Avdievich, G. J. Gerfen, J. Peisach, W. E. Antholine, H. L. Ball, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and G. L. Millhauser (2000). "Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy." Biochemistry **39**(45): 13760-13771.

Asano, M., S. Mohri, J. W. Ironside, M. Ito, N. Tamaoki and T. Kitamoto (2006). "vCJD prion acquires altered virulence through trans-species infection." Biochem Biophys Res Commun **342**(1): 293-299.

Atarashi, R., K. Satoh, K. Sano, T. Fuse, N. Yamaguchi, D. Ishibashi, T. Matsubara, T. Nakagaki, H. Yamanaka, S. Shirabe, M. Yamada, H. Mizusawa, T. Kitamoto, G. Klug, A. McGlade, S. J. Collins and N. Nishida (2011). "Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion." Nat Med **17**(2): 175-178.

Atarashi, R., J. M. Wilham, L. Christensen, A. G. Hughson, R. A. Moore, L. M. Johnson, H. A. Onwubiko, S. A. Priola and B. Caughey (2008). "Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking." Nat Methods **5**(3): 211-212.

- Bahn, M. M. and P. Parchi (1999). "Abnormal diffusion-weighted magnetic resonance images in Creutzfeldt-Jakob disease." Arch Neurol **56**(5): 577-583.
- Baker, H. F., R. M. Ridley, L. W. Duchon, T. J. Crow and C. J. Bruton (1994). "Induction of beta (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. Comparison with transmission of spongiform encephalopathy." Mol Neurobiol **8**(1): 25-39.
- Barillet, F., Andreoletti, O., Palhière, I., Aguerre, X., Arranz, J., Minery, S., Soulas, C., Belloc, J., Briois, M., Frégeat, P., Teinturier, P., Amigues, Y., Astruc, J., Boscher, M. et Schelcher, F (2002). "Breeding for scrapie resistance using PrP genotyping in the French dairy sheep breeds." 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: 19-23.
- Barmada, S., P. Piccardo, K. Yamaguchi, B. Ghetti and D. A. Harris (2004). "GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice." Neurobiol Dis **16**(3): 527-537.
- Baron, T., A. G. Biacabe, J. N. Arzac, S. Benestad and M. H. Groschup (2007). "Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants." Vaccine **25**(30): 5625-5630.
- Baron, T. G., A. G. Biacabe, A. Bencsik and J. P. Langeveld (2006). "Transmission of new bovine prion to mice." Emerg Infect Dis **12**(7): 1125-1128.
- Bartz, J. C., C. Dejoia, T. Tucker, A. E. Kincaid and R. A. Bessen (2005). "Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection." J Virol **79**(18): 11858-11863.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46**(3): 417-428.
- Baylis, M., C. Chihota, E. Stevenson, W. Goldmann, A. Smith, K. Sivam, S. Tongue and M. B. Gravenor (2004). "Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype." J Gen Virol **85**(Pt 9): 2735-2740.
- Baylis, M. and W. Goldmann (2004). "The genetics of scrapie in sheep and goats." Curr Mol Med **4**(4): 385-396.
- Bazan, J. F., R. J. Fletterick, M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1987). "Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein." Protein Eng **1**(2): 125-135.
- Bendheim, P. E., H. R. Brown, R. D. Rudelli, L. J. Scala, N. L. Goller, G. Y. Wen, R. J. Kascsak, N. R. Cashman and D. C. Bolton (1992). "Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein." Neurology **42**(1): 149-156.
- Benestad, S. L., P. Sarradin, B. Thu, J. Schonheit, M. A. Tranulis and B. Bratberg (2003). "Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98." Vet Rec **153**(7): 202-208.
- Bennett, L. L., H. Weinberger, R. Escamilla, S. Margen, C. H. Li and H. M. Evans (1950). "Failure of hypophyseal growth hormone to produce nitrogen storage in a girl with

- hypophyseal dwarfism." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **10**(5): 492-495.
- Beringue, V., A. Bencsik, A. Le Dur, F. Reine, T. L. Lai, N. Chenais, G. Tilly, A. G. Biacabe, T. Baron, J. L. Vilotte and H. Laude (2006). "Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy." PLoS Pathog **2**(10): e112.
- Beringue, V., L. Herzog, E. Jaumain, F. Reine, P. Sibille, A. Le Dur, J. L. Vilotte and H. Laude (2012). "Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue." Science **335**(6067): 472-475.
- Besnoit C, M. C. (1898). "Note sur les lésions nerveuse de la tremblante du mouton." Rev Vet **23**(397-400).
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). "Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy." J Virol **68**(12): 7859-7868.
- Biacabe, A. G., J. L. Laplanche, S. Ryder and T. Baron (2004). "Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases." EMBO Rep **5**(1): 110-115.
- Billette de Villemeur, T., J. P. Deslys, A. Pradel, C. Soubrie, A. Alperovitch, M. Tardieu, J. L. Chaussain, J. J. Hauw, D. Dormont, M. Ruberg and Y. Agid (1996). "Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France." Neurology **47**(3): 690-695.
- Billette de Villemeur, T., A. Gelot, J. P. Deslys, D. Dormont, C. Duyckaerts, L. Jardin, J. Denni and O. Robain (1994). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease in three growth hormone recipients: a neuropathological study." Neuropathol Appl Neurobiol **20**(2): 111-117.
- Bishop, M. T., R. G. Will and J. C. Manson (2010). "Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 12005-12010.
- Borchelt, D. R., V. E. Koliatsos, M. Guarnieri, C. A. Pardo, S. S. Sisodia and D. L. Price (1994). "Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems." Journal of Biological Chemistry **269**(20): 14711-14714.
- Bougard, D., J. P. Brandel, M. Belondrade, V. Beringue, C. Segarra, H. Fleury, J. L. Laplanche, C. Mayran, S. Nicot, A. Green, A. Welaratne, D. Narbey, C. Fournier-Wirth, R. Knight, R. Will, P. Tiberghien, S. Haik and J. Coste (2016). "Detection of prions in the plasma of presymptomatic and symptomatic patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease." Sci Transl Med **8**(370): 370ra182.
- Bouhours-Nouet, N., F. Gatelais and R. Coutant (2006). "L'enfant petit avec déficit en hormone de croissance." Médecine thérapeutique/Pédiatrie **9**(4): 220-230.
- Bounhar, Y., Y. Zhang, C. G. Goodyer and A. LeBlanc (2001). "Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis." J Biol Chem **276**(42): 39145-39149.
- Boyd, A., G. M. Klug, L. B. Schonberger, A. McGlade, J. P. Brandel, C. L. Masters and S. J. Collins (2010). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease in Australia: time to amend infection control measures for pituitary hormone recipients?" Med J Aust **193**(6): 366-369.

- Brandel, J. P., C. A. Heath, M. W. Head, E. Levavasseur, R. Knight, J. L. Laplanche, J. P. Langeveld, J. W. Ironside, J. J. Hauw, J. Mackenzie, A. Alperovitch, R. G. Will and S. Haik (2009). "Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain." Ann Neurol **65**(3): 249-256.
- Brandel, J. P., L. Peckeu and S. Haik (2013). "The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide." Transfus Clin Biol **20**(4): 395-397.
- Brandel, J. P., M. Preece, P. Brown, E. Croes, J. L. Laplanche, Y. Agid, R. Will and A. Alperovitch (2003). "Distribution of codon 129 genotype in human growth hormone-treated CJD patients in France and the UK." Lancet **362**(9378): 128-130.
- Brandel, J. P., Salomon D, Alpérovitch A (2006). "Epidémiologie de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob en France." Transfus Clin Biol **13**: 304-306.
- Brook, C. G. (1978). "Growth hormone deficiency in Turner's syndrome." N Engl J Med **298**(21): 1203-1204.
- Brown, D. R., R. S. Nicholas and L. Canevari (2002). "Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress." J Neurosci Res **67**(2): 211-224.
- Brown, D. R., K. Qin, J. W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P. E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway and H. Kretzschmar (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." Nature **390**(6661): 684-687.
- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt and H. A. Kretzschmar (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." Exp Neurol **146**(1): 104-112.
- Brown, D. R., B. S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S. J. Haswell and I. M. Jones (1999). "Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase." Biochem J **344 Pt 1**: 1-5.
- Brown, H. R., N. L. Goller, R. D. Rudelli, G. S. Merz, G. C. Wolfe, H. M. Wisniewski and N. K. Robakis (1990). "The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells." Acta Neuropathol **80**(1): 1-6.
- Brown, P. and R. Bradley (1998). "1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy." BMJ **317**(7174): 1688-1692.
- Brown, P., J. P. Brandel, T. Sato, Y. Nakamura, J. MacKenzie, R. G. Will, A. Ladogana, M. Pocchiari, E. W. Leschek and L. B. Schonberger (2012). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment." Emerg Infect Dis **18**(6): 901-907.
- Brown, P., M. Preece, J. P. Brandel, T. Sato, L. McShane, I. Zerr, A. Fletcher, R. G. Will, M. Pocchiari, N. R. Cashman, J. H. d'Aignaux, L. Cervenakova, J. Fradkin, L. B. Schonberger and S. J. Collins (2000). "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium." Neurology **55**(8): 1075-1081.
- Bruce, M. E., Dickinson, A. G., & Fraser, H (1976). "Cerebral amyloidosis in scrapie in the mouse: effect of agent strain and mouse genotype." Neuropathology and applied Neurobiology **2**(6): 417-478.



- Bruce, M. E. and H. Fraser (1991). "Scrapie strain variation and its implications." Curr Top Microbiol Immunol **172**: 125-138.
- Bruce, M. E., P. A. McBride and C. F. Farquhar (1989). "Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie." Neurosci Lett **102**(1): 1-6.
- Bruce, M. E., I. McConnell, H. Fraser and A. G. Dickinson (1991). "The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis." J Gen Virol **72 ( Pt 3)**: 595-603.
- Bruce, M. E., R. G. Will, J. W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser and C. J. Bostock (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**(7): 1339-1347.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**(6370): 577-582.
- Buschmann, A., A. Gretschel, A. G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone and M. H. Groschup (2006). "Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization." Vet Microbiol **117**(2-4): 103-116.
- Butenandt, O. (1980). "Growth hormone deficiency and growth hormone therapy in Ullrich-Turner-syndrome." Klin Wochenschr **58**(2): 99-101.
- Cali, I., R. Castellani, A. Alsheklee, Y. Cohen, J. Blevins, J. Yuan, J. P. Langeveld, P. Parchi, J. G. Safar, W. Q. Zou and P. Gambetti (2009). "Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: its effect on the phenotype and prion-type characteristics." Brain **132**(Pt 10): 2643-2658.
- Carleton, A., P. Tremblay, J. D. Vincent and P. M. Lledo (2001). "Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus." Pflugers Arch **442**(2): 223-229.
- Casalone, C., G. Zanusso, P. Acutis, S. Ferrari, L. Capucci, F. Tagliavini, S. Monaco and M. Caramelli (2004). "Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3065-3070.
- Castells, S., C. Torrado, W. Bastian and K. E. Wisniewski (1992). "Growth hormone deficiency in Down's syndrome children." J Intellect Disabil Res **36 ( Pt 1)**: 29-43.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz and C. Soto (2005). "In vitro generation of infectious scrapie prions." Cell **121**(2): 195-206.

- Castilla, J., P. Saa, R. Morales, K. Abid, K. Maundrell and C. Soto (2006). "Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies." Methods Enzymol **412**: 3-21.
- Chadeau-Hyam, M. and A. Alperovitch (2005). "Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease in France." Int J Epidemiol **34**(1): 46-52.
- Chadeau-Hyam, M., A. Tard, S. Bird, S. Le Guennec, N. Bemrah, J. L. Volatier and A. Alperovitch (2003). "Estimation of the exposure of the French population to the BSE agent: comparison of the 1980-95 consumption of beef products containing mechanically recovered meat in France and the UK, by birth cohort and gender." Stat Methods Med Res **12**(3): 247-260.
- Chen, C. C. and Y. H. Wang (2014). "Estimation of the exposure of the UK population to the bovine spongiform encephalopathy agent through dietary intake during the period 1980 to 1996." PLoS One **9**(4): e94020.
- Chen, S. G. and P. Gambetti (2002). "A journey through the species barrier." Neuron **34**(6): 854-856.
- Chesebro, B. (1998). "BSE and prions: uncertainties about the agent." Science **279**(5347): 42-43.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, J. M. Keith and et al. (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." Nature **315**(6017): 331-333.
- Clark, W. W., J. L. Hourrigan and W. J. Hadlow (1995). "Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent." Am J Vet Res **56**(5): 606-612.
- Cohen, F. E., K. M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R. J. Fletterick and S. B. Prusiner (1994). "Structural clues to prion replication." Science **264**(5158): 530-531.
- Colling, S. B., M. Khana, J. Collinge and J. G. Jefferys (1997). "Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice." Brain Res **755**(1): 28-35.
- Collinge, J. and A. R. Clarke (2007). "A general model of prion strains and their pathogenicity." Science **18**(5852): 930-936.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey and P. L. Lantos (1995). "Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein." Nature **378**(6559): 779-783.
- Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside and A. F. Hill (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." Nature **383**(6602): 685-690.
- Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, J. Beck, S. Mead, D. J. Thomas and M. P. Alpers (2006). "Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods." Lancet **367**(9528): 2068-2074.

- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke and J. G. Jefferys (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**(6487): 295-297.
- Collins, S., M. G. Law, A. Fletcher, A. Boyd, J. Kaldor and C. L. Masters (1999). "Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study." Lancet **353**(9154): 693-697.
- Collins, S., C. A. McLean and C. L. Masters (2001). "Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies." J Clin Neurosci **8**(5): 387-397.
- Collins, S. J., P. Sanchez-Juan, C. L. Masters, G. M. Klug, C. van Duijn, A. Poggi, M. Pocchiari, S. Almonti, N. Cuadrado-Corrales, J. de Pedro-Cuesta, H. Budka, E. Gelpi, M. Glatzel, M. Tolnay, E. Hewer, I. Zerr, U. Heinemann, H. A. Kretschmar, G. H. Jansen, E. Olsen, E. Mitrova, A. Alperovitch, J. P. Brandel, J. Mackenzie, K. Murray and R. G. Will (2006). "Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Brain **129**(Pt 9): 2278-2287.
- Comoy, E. E., J. Mikol, S. Luccantoni-Freire, E. Correia, N. Lescoutre-Etcheagaray, V. Durand, C. Dehen, O. Andreoletti, C. Casalone, J. A. Richt, J. J. Greenlee, T. Baron, S. L. Benestad, P. Brown and J. P. Deslys (2015). "Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period." Sci Rep **5**: 11573.
- Cooper, J. D. and S. M. Bird (2002). "UK dietary exposure to BSE in beef mechanically recovered meat: by birth cohort and gender." J Cancer Epidemiol Prev **7**(2): 59-70.
- Cooper, J. D. and S. M. Bird (2003). "Predicting incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease from UK dietary exposure to bovine spongiform encephalopathy for the 1940 to 1969 and post-1969 birth cohorts." Int J Epidemiol **32**(5): 784-791.
- Corpas, E., S. M. Harman and M. R. Blackman (1993). "Human growth hormone and human aging." Endocr Rev **14**(1): 20-39.
- Cortelli, P., P. Gambetti, P. Montagna and E. Lugaresi (1999). "Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics." J Sleep Res **8 Suppl 1**: 23-29.
- Creutzfeldt, H. G. (1920). "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems (vorläufige Mitteilung)." Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie **57**(1): 1-18.
- Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, B. Conti, J. L. Giacchino, D. N. Wills, S. J. Henriksen, R. Race, J. C. Manson, B. Chesebro and M. B. Oldstone (2005). "Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons." Neurobiol Dis **19**(1-2): 255-265.
- Crowe, s. J., Cushing, H, and Homans, J (1910). "Experimental hypophysectomy." Bull Johns Hopkins Hosp **21**: 127-169.
- Cuadrado-Tejedor, M., A. Irujo, B. Paternain, M. J. Madrid and J. L. Velayos (2011). "Cellular Prion Protein and Sexual Dimorphic Areas in Rodents. Correlates with Alzheimer Disease." Neuroscience and Medicine **2**(04): 384.

- Cuillé, J., and P. L. Chelle (1936). "La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?" C. R. Acad. Sci. Paris **203**: 1552-1554.
- Cuillé, J., and P. L. Chelle (1936). "La tremblante du mouton est bien inoculable." C. R. Acad. Sci. Paris **206**: 78-79.
- Cushing, H. (1909). "The hypophysis cerebri: clinical aspects of hyperpituitarism and of hypopituitarism." JAMA **53**: 249-255.
- Cushing, H. (1909). "III. Partial Hypophysectomy for Acromegaly: With Remarks on the Function of the Hypophysis." Ann Surg **50**(6): 1002-1017.
- Cuthbertson, D., G. Shaw and F. Young (1941). "The anterior pituitary gland and protein metabolism. 2. The influence of anterior pituitary extract on the metabolic response of the rat to injury." Journal of Endocrinology **2**: 468-474.
- Cuthbertson, D., T. Webster and F. Young (1940). "The anterior pituitary gland and protein metabolism." Journal of Endocrinology **2**(2): 459-467.
- d'Aignaux, J. N., S. N. Cousens and P. G. Smith (2001). "Predictability of the UK variant Creutzfeldt-Jakob disease epidemic." Science **294**(5547): 1729-1731.
- D'Costa, A. P., R. L. Ingram, J. E. Lenham and W. E. Sonntag (1993). "The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during normal ageing." J Reprod Fertil Suppl **46**: 87-98.
- Davanipour, Z., M. Alter, E. Sobel, D. M. Asher and D. C. Gajdusek (1985). "A case-control study of Creutzfeldt-Jakob disease. Dietary risk factors." Am J Epidemiol **122**(3): 443-451.
- Depaz, R., S. Haik, K. Peoc'h, D. Seilhean, D. Grabli, S. Vicart, M. Sarazin, B. DeToffol, C. Remy, C. Fallet-Bianco, J. L. Laplanche, B. Fontaine and J. P. Brandel (2012). "Long-standing prion dementia manifesting as posterior cortical atrophy." Alzheimer Dis Assoc Disord **26**(3): 289-292.
- Deslys, J.-P., A. Jaegly, J. H. d'Aignaux, F. Mouthon, T. B. de Villemeur and D. Dormont (1998). "Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jakob." The Lancet **351**: 1251.
- Deslys, J. P., D. Marce and D. Dormont (1994). "Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." J Gen Virol **75 ( Pt 1)**: 23-27.
- Detwiler, L. A. and M. Baylis (2003). "The epidemiology of scrapie." Rev Sci Tech **22**(1): 121-143.
- Dickinson, A. G. (1975). "Host-pathogen interactions in scrapie." Genetics **79 Suppl**: 387-395.
- Dickinson, A. G., H. Fraser and G. W. Outram (1975). "Scrapie incubation time can exceed natural lifespan." Nature **256**(5520): 732-733.

- Dickinson, A. G., V. M. Meikle and H. Fraser (1968). "Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice." J Comp Pathol **78**(3): 293-299.
- Diringer, H. (1995). "Proposed link between transmissible spongiform encephalopathies of man and animals." Lancet **346**(8984): 1208-1210.
- Dormont, D., J. Deslys and F. Bouissin (1989). "Inactivation of unconventional slow viruses and HIV in human extractive biological products used in human therapy." Biotechnol Plasma Proteins **175**: 355-364.
- Dray, F. (1987). "Rapport 10.5.85." Ped Adolesc Endocr **16**: 176-181.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten and D. Cowen (1974). "Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **290**(12): 692-693.
- Eisele, Y. S., T. Bolmont, M. Heikenwalder, F. Langer, L. H. Jacobson, Z. X. Yan, K. Roth, A. Aguzzi, M. Staufenbiel, L. C. Walker and M. Jucker (2009). "Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A $\beta$  inoculation." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12926-12931.
- Eisele, Y. S., U. Obermuller, G. Heilbronner, F. Baumann, S. A. Kaeser, H. Wolburg, L. C. Walker, M. Staufenbiel, M. Heikenwalder and M. Jucker (2010). "Peripherally applied A $\beta$ -containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis." Science **330**(6006): 980-982.
- Evans, H. M., Long, J.A (1921). "The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrus cycles of the rat." Anat Rec **21**: 62-65.
- Flodh, E. (1987). "Diagnosis and treatment of Impaired growth hormone secretion." Acta Paediatr **337** (suppl): 1-171.
- Ford, M. J., L. J. Burton, H. Li, C. H. Graham, Y. Frobert, J. Grassi, S. M. Hall and R. J. Morris (2002). "A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS." Neuroscience **111**(3): 533-551.
- Foster, J. D. and A. G. Dickinson (1988). "The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie." Vet Rec **123**(1): 5-8.
- Fournier, J. G., F. Escaig-Haye, T. Billette de Villemeur and O. Robain (1995). "Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus." C R Acad Sci III **318**(3): 339-344.
- Fradkin, J. E., L. B. Schonberger, J. L. Mills, W. J. Gunn, J. M. Piper, D. K. Wysowski, R. Thomson, S. Durako and P. Brown (1991). "Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States." JAMA **265**(7): 880-884.
- Fraser, H. and A. G. Dickinson (1973). "Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation." J Comp Pathol **83**(1): 29-40.
- Frasier, S. D. and B. M. Lippe (1990). "Clinical review 11: The rational use of growth hormone during childhood." J Clin Endocrinol Metab **71**(2): 269-273.

Gajdusek, D. C. (1977). "Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru." Science **197**(4307): 943-960.

Gajdusek, D. C. and V. Zigas (1959). "Kuru; clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea." Am J Med **26**(3): 442-469.

Gambetti, P., I. Cali, S. Notari, Q. Kong, W. Q. Zou and W. K. Surewicz (2011). "Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases." Acta Neuropathol **121**(1): 79-90.

Gibbs, C. J., Jr., D. M. Asher, P. W. Brown, J. E. Fradkin and D. C. Gajdusek (1993). "Creutzfeldt-Jakob disease infectivity of growth hormone derived from human pituitary glands." N Engl J Med **328**(5): 358-359.

Gill, O. N., Y. Spencer, A. Richard-Loendt, C. Kelly, R. Dabaghian, L. Boyes, J. Linehan, M. Simmons, P. Webb, P. Bellerby, N. Andrews, D. A. Hilton, J. W. Ironside, J. Beck, M. Poulter, S. Mead and S. Brandner (2013). "Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey." BMJ **347**: f5675.

Goldfarb, L. G., P. Brown, W. R. McCombie, D. Goldgaber, G. D. Swergold, P. R. Wills, L. Cervenakova, H. Baron, C. J. Gibbs, Jr. and D. C. Gajdusek (1991). "Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10926-10930.

Goldmann, W., N. Hunter, T. Martin, M. Dawson and J. Hope (1991). "Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon." J Gen Virol **72** ( Pt 1): 201-204.

Goldmann, W., N. Hunter, G. Smith, J. Foster and J. Hope (1994). "PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie." J Gen Virol **75** ( Pt 5): 989-995.

Gordon (1946). "Louping-ill, tick-born fever, and scrapie." Vet Rec **58**: 516-518.

Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner and F. E. Cohen (2004). "Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8342-8347.

Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, V. R. Martins, D. G. Jay and R. R. Brentani (2000). "Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein." FEBS Lett **482**(3): 257-260.

Green, A. J., E. J. Thompson, G. E. Stewart, M. Zeidler, J. M. McKenzie, M. A. MacLeod, J. W. Ironside, R. G. Will and R. S. Knight (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.

Groschup, M. H., C. Lacroux, A. Buschmann, G. Luhken, J. Mathey, M. Eiden, S. Lugan, C. Hoffmann, J. C. Espinosa, T. Baron, J. M. Torres, G. Erhardt and O. Andreoletti (2007).

- "Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France." Emerg Infect Dis **13**(8): 1201-1207.
- Group, E. (2001). "Genetic epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe." Revue neurologique **157**(6-7): 633.
- Haik, S. and J. P. Brandel (2011). "Biochemical and strain properties of CJD prions: complexity versus simplicity." J Neurochem **119**(2): 251-261.
- Haik, S., J. P. Brandel, C. Oppenheim, V. Sazdovitch, D. Dormont, J. J. Hauw and C. Marsault (2002). "Sporadic CJD clinically mimicking variant CJD with bilateral increased signal in the pulvinar." Neurology **58**(1): 148-149.
- Haik, S., D. Galanaud, M. G. Linguraru, K. Peoc'h, N. Privat, B. A. Faucheux, N. Ayache, J. J. Hauw, D. Dormont and J. P. Brandel (2008). "In vivo detection of thalamic gliosis: a pathoradiologic demonstration in familial fatal insomnia." Arch Neurol **65**(4): 545-549.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-1658.
- Hamaguchi, T., Y. S. Eisele, N. H. Varvel, B. T. Lamb, L. C. Walker and M. Jucker (2012). "The presence of Abeta seeds, and not age per se, is critical to the initiation of Abeta deposition in the brain." Acta Neuropathol **123**(1): 31-37.
- Hannaoui, S., L. Maatouk, N. Privat, E. Levavasseur, B. A. Faucheux and S. Haik (2013). "Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type." J Virol **87**(5): 2535-2548.
- Harris, D. A. (2003). "Trafficking, turnover and membrane topology of PrP." Br Med Bull **66**: 71-85.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and V. R. Lingappa (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." Science **279**(5352): 827-834.
- Hegde, R. S., P. Tremblay, D. Groth, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and V. R. Lingappa (1999). "Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration." Nature **402**(6763): 822-826.
- Heilbronner, G., Y. S. Eisele, F. Langer, S. A. Kaeser, R. Novotny, A. Nagarathinam, A. Aslund, P. Hammarstrom, K. P. Nilsson and M. Jucker (2013). "Seeded strain-like transmission of beta-amyloid morphotypes in APP transgenic mice." EMBO Rep **14**(11): 1017-1022.
- Herms, J. W., H. A. Kretschmar, S. Titz and B. U. Keller (1995). "Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice." Eur J Neurosci **7**(12): 2508-2512.
- Hill, A. F. and J. Collinge (2003). "Subclinical prion infection in humans and animals." Br Med Bull **66**: 161-170.

- Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey and P. Lantos (1997). "The same prion strain causes vCJD and BSE." Nature **389**(6650): 448-450, 526.
- Hill, A. F., S. Joiner, J. Linehan, M. Desbruslais, P. L. Lantos and J. Collinge (2000). "Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10248-10253.
- Hilton, D. A., A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, D. Ritchie, M. Penney, D. Hegazy and J. W. Ironside (2004). "Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples." J Pathol **203**(3): 733-739.
- Holscher, C., H. Delius and A. Burkle (1998). "Overexpression of nonconvertible PrP<sup>c</sup> delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation." J Virol **72**(2): 1153-1159.
- Hornshaw, M. P., J. R. McDermott, J. M. Candy and J. H. Lakey (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides." Biochem Biophys Res Commun **214**(3): 993-999.
- Huber, C., M. Rosilio, A. Munnich, V. Cormier-Daire and S. G. M. French (2006). "High incidence of SHOX anomalies in individuals with short stature." J Med Genet **43**(9): 735-739.
- Huet, F., J. C. Carel, J. L. Nivelon and J. L. Chaussain (1999). "Long-term results of GH therapy in GH-deficient children treated before 1 year of age." Eur J Endocrinol **140**(1): 29-34.
- Huillard d'Aignaux, J., A. Alperovitch and J. Maccario (1998). "A statistical model to identify the contaminated lots implicated in iatrogenic transmission of Creutzfeldt-Jakob disease among French human growth hormone recipients." Am J Epidemiol **147**(6): 597-604.
- Huillard d'Aignaux, J., D. Costagliola, J. Maccario, T. Billette de Villemeur, J. P. Brandel, J. P. Deslys, J. J. Hauw, J. L. Chaussain, Y. Agid, D. Dormont and A. Alperovitch (1999). "Incubation period of Creutzfeldt-Jakob disease in human growth hormone recipients in France." Neurology **53**(6): 1197-1201.
- Huillard d'Aignaux, J. N., S. N. Cousens, J. Maccario, D. Costagliola, M. P. Alpers, P. G. Smith and A. Alperovitch (2002). "The incubation period of kuru." Epidemiology **13**(4): 402-408.
- Hunter, N. (1997). "PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE." Trends Microbiol **5**(8): 331-334.
- Ironside, J. W., D. L. Ritchie and M. W. Head (2005). "Phenotypic variability in human prion diseases." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(6): 565-579.
- Irwin, D. J., J. Y. Abrams, L. B. Schonberger, E. W. Leschek, J. L. Mills, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2013). "Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone." JAMA Neurol **70**(4): 462-468.



- Jaegly, A., F. Boussin, J. P. Deslys and D. Dormont (1995). "Human growth hormone-related iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: search for a genetic susceptibility by analysis of the PRNP coding region." Genomics **27**(2): 382-383.
- Jakob, A. (1921). "Über eine eigenartige Erkrankung des Zentral-nervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische pseudosklerotische Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)." Dtsch Z Nervenheilk **70**(132-46).
- Jansson, J. O., S. Eden and O. Isaksson (1985). "Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion." Endocr Rev **6**(2): 128-150.
- Jaumain, E., I. Quadrio, L. Herzog, F. Reine, H. Rezaei, O. Androletti, H. Laude, A. Perret-Liaudet, S. Haik and V. Beringue (2016). "Absence of Evidence for a Causal Link between Bovine Spongiform Encephalopathy Strain Variant L-BSE and Known Forms of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in Human PrP Transgenic Mice." J Virol **90**(23): 10867-10874.
- Jaunmuktane, Z., S. Mead, M. Ellis, J. D. Wadsworth, A. J. Nicoll, J. Kenny, F. Launchbury, J. Linehan, A. Richard-Loendt, A. S. Walker, P. Rudge, J. Collinge and S. Brandner (2015). "Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy." Nature **525**(7568): 247-250.
- Jeffrey, M., W. G. Halliday, J. Bell, A. R. Johnston, N. K. MacLeod, C. Ingham, A. R. Sayers, D. A. Brown and J. R. Fraser (2000). "Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus." Neuropathol Appl Neurobiol **26**(1): 41-54.
- Jones, E. M. and W. K. Surewicz (2005). "Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids." Cell **121**(1): 63-72.
- Jones, M., A. H. Peden, D. Wight, C. Prowse, I. Macgregor, J. Manson, M. Turner, J. W. Ironside and M. W. Head (2008). "Effects of human PrPSc type and PRNP genotype in an in-vitro conversion assay." Neuroreport **19**(18): 1783-1786.
- Jorge, A. A., S. C. Souza, M. Y. Nishi, A. E. Billerbeck, D. C. Liborio, C. A. Kim, I. J. Arnhold and B. B. Mendonca (2007). "SHOX mutations in idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability." Clin Endocrinol (Oxf) **66**(1): 130-135.
- Kanaani, J., S. B. Prusiner, J. Diacovo, S. Baekkeskov and G. Legname (2005). "Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro." J Neurochem **95**(5): 1373-1386.
- Kastrup, K. W., J. S. Christiansen, J. K. Andersen and H. Orskov (1983). "Increased growth rate following transfer to daily sc administration from three weekly im injections of hGH in growth hormone deficient children." Acta Endocrinol (Copenh) **104**(2): 148-152.
- Katamine, S., N. Nishida, T. Sugimoto, T. Noda, S. Sakaguchi, K. Shigematsu, Y. Kataoka, A. Nakatani, S. Hasegawa, R. Moriuchi and T. Miyamoto (1998). "Impaired motor coordination in mice lacking prion protein." Cell Mol Neurobiol **18**(6): 731-742.

- Kearns, G. L., S. F. Kemp and J. P. Frindik (1991). "Single and multiple dose pharmacokinetics of methionyl growth hormone in children with idiopathic growth hormone deficiency." J Clin Endocrinol Metab **72**(5): 1148-1156.
- Kikuchi, K., M. Sudo, A. Miyamoto, T. Ohie, C. Mori and H. Mikawa (1988). "Growth response to daily subcutaneous administration of growth hormone." Acta Paediatr Jpn **30**(5): 557-563.
- Kim, B. H., H. G. Lee, J. K. Choi, J. I. Kim, E. K. Choi, R. I. Carp and Y. S. Kim (2004). "The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation." Brain Res Mol Brain Res **124**(1): 40-50.
- Kim, Y. S., R. I. Carp, S. M. Callahan and H. M. Wisniewski (1987). "Incubation periods and survival times for mice injected stereotaxically with three scrapie strains in different brain regions." J Gen Virol **68 ( Pt 3)**: 695-702.
- Kimberlin, R. H. and C. Walker (1977). "Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster." J Gen Virol **34**(2): 295-304.
- Kleinknecht, C., M. Broyer, M. Gagnadoux, C. Martihenneberg, A. Dartois, C. Kermanach, M. Pouliquen, P. Degoulet, M. Usberti and M. Roy (1980). "Growth in children treated with long-term dialysis. A study of 76 patients." Advances in nephrology from the Necker Hospital **9**: 133.
- Kobayashi, A., M. Asano, S. Mohri and T. Kitamoto (2007). "Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain." J Biol Chem **282**(41): 30022-30028.
- Kobayashi, A., Y. Matsuura, S. Mohri and T. Kitamoto (2014). "Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems." Acta Neuropathol Commun **2**: 32.
- Kobayashi, A., P. Parchi, M. Yamada, P. Brown, D. Saverioni, Y. Matsuura, A. Takeuchi, S. Mohri and T. Kitamoto (2015). "Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology?" J Virol **89**(7): 3939-3946.
- Kobayashi, A., N. Sakuma, Y. Matsuura, S. Mohri, A. Aguzzi and T. Kitamoto (2010). "Experimental verification of a traceback phenomenon in prion infection." J Virol **84**(7): 3230-3238.
- Korth, C., K. Kaneko, D. Groth, N. Heye, G. Telling, J. Mastrianni, P. Parchi, P. Gambetti, R. Will, J. Ironside, C. Heinrich, P. Tremblay, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2003). "Abbreviated incubation times for human prions in mice expressing a chimeric mouse-human prion protein transgene." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4784-4789.
- Kovacs, G. G. (2016). "Can Creutzfeldt-Jakob disease unravel the mysteries of Alzheimer?" Prion **10**(5): 369-376.
- Kovacs, G. G., M. I. Lutz, G. Ricken, T. Strobel, R. Hoftberger, M. Preusser, G. Regelsberger, S. Honigschnabl, A. Reiner, P. Fischer, H. Budka and J. A. Hainfellner (2016). "Dura mater is a potential source of Abeta seeds." Acta Neuropathol **131**(6): 911-923.

- Kovacs, G. G., G. Trabattoni, J. A. Hainfellner, J. W. Ironside, R. S. Knight and H. Budka (2002). "Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum." J Neurol **249**(11): 1567-1582.
- Kretzschmar, H. A., L. E. Stowring, D. Westaway, W. H. Stubblebine, S. B. Prusiner and S. J. Dearmond (1986). "Molecular cloning of a human prion protein cDNA." DNA **5**(4): 315-324.
- Laine, J., M. E. Marc, M. S. Sy and H. Axelrad (2001). "Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum." Eur J Neurosci **14**(1): 47-56.
- Lang, C. J., J. G. Heckmann and B. Neundorfer (1998). "Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants." J Neurol Sci **160**(2): 128-139.
- Langevin, C., O. Androletti, A. Le Dur, H. Laude and V. Beringue (2011). "Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model." Neurobiol Dis **41**(1): 219-225.
- Laplanche, J. L., N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, J. Chatelain, P. Beaudry, A. Alperovitch and J. M. Launay (1994). "Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies." Neurology **44**(12): 2347-2351.
- Laplanche, J. L., N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, M. Dussaucy, J. Chatelain and J. M. Launay (1995). "Two novel insertions in the prion protein gene in patients with late-onset dementia." Hum Mol Genet **4**(6): 1109-1111.
- Laron, Z. and O. Butenandt (1991). "Optimum use of growth hormone in children." Drugs **42**(1): 1-8.
- Lasmezaz, C. I., J. P. Deslys, R. Demaimay, K. T. Adjou, F. Lamoury, D. Dormont, O. Robain, J. Ironside and J. J. Hauw (1996). "BSE transmission to macaques." Nature **381**(6585): 743-744.
- Laude, H. and V. Beringue (2009). "[Newly discovered forms of prion diseases in ruminants]." Pathol Biol (Paris) **57**(2): 117-126.
- Lazo-Wasem, E. A. and C. E. Graham (1958). "Comparative potency of growth hormone preparations in alkali or acid." Endocrinology **62**(2): 108-111.
- Lee, H. S., P. Brown, L. Cervenakova, R. M. Garruto, M. P. Alpers, D. C. Gajdusek and L. G. Goldfarb (2001). "Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype." J Infect Dis **183**(2): 192-196.
- Lee, M. M. (2006). "Clinical practice. Idiopathic short stature." N Engl J Med **354**(24): 2576-2582.
- Li, C. H. (1957). "Properties of and structural investigations on growth hormones isolated from bovine, monkey and human pituitary glands." Fed Proc **16**(3): 775-783.
- Li, C. H. and J. S. Dixon (1971). "Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision." Arch Biochem Biophys **146**(1): 233-236.

- Li, C. H. and H. M. Evans (1944). "The Isolation of Pituitary Growth Hormone." Science **99**(2566): 183-184.
- Li, C. H., H. M. Evans and M. E. Simpson (1945). "Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone." Journal of Biological Chemistry **159**(2): 353-366.
- Li, C. H. and H. Papkoff (1956). "Preparation and properties of growth hormone from human and monkey pituitary glands." Science **124**(3235): 1293-1294.
- Li, J., S. Browning, S. P. Mahal, A. M. Oelschlegel and C. Weissmann (2010). "Darwinian evolution of prions in cell culture." Science **327**(5967): 869-872.
- Linsell, L., S. N. Cousens, P. G. Smith, R. S. Knight, M. Zeidler, G. Stewart, R. de Silva, T. F. Esmonde, H. J. Ward and R. G. Will (2004). "A case-control study of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of clustering." Neurology **63**(11): 2077-2083.
- Lippe, B. M. and J. M. Nakamoto (1993). "Conventional and nonconventional uses of growth hormone." Recent Prog Horm Res **48**: 179-235.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie and R. G. Will (2004). "Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion." Lancet **363**(9407): 417-421.
- Loeuillet, C., P. Y. Boelle, C. Lemaire-Vieille, M. Baldazza, P. Naquet, P. Chambon, M. F. Cesbron-Delauw, A. J. Valleron, J. Gagnon and J. Y. Cesbron (2010). "Sex effect in mouse and human prion disease." J Infect Dis **202**(4): 648-654.
- Lopes, M. H., G. N. Hajj, A. G. Muras, G. L. Mancini, R. M. Castro, K. C. Ribeiro, R. R. Brentani, R. Linden and V. R. Martins (2005). "Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways." J Neurosci **25**(49): 11330-11339.
- Lyon, A. J., M. A. Preece and D. B. Grant (1985). "Growth curve for girls with Turner syndrome." Arch Dis Child **60**(10): 932-935.
- MacLeod, J. N., N. A. Pampori and B. H. Shapiro (1991). "Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice." J Endocrinol **131**(3): 395-399.
- Mallucci, G. R., T. A. Campbell, A. Dickinson, J. Beck, M. Holt, G. Plant, K. W. de Pauw, R. N. Hakin, C. E. Clarke, S. Howell, G. A. Davies-Jones, M. Lawden, C. M. Smith, P. Ince, J. W. Ironside, L. R. Bridges, A. Dean, I. Weeks and J. Collinge (1999). "Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene." Brain **122** ( Pt 10): 1823-1837.
- Manolakou, K., J. Beaton, I. McConnell, C. Farquar, J. Manson, N. D. Hastie, M. Bruce and I. J. Jackson (2001). "Genetic and environmental factors modify bovine spongiform encephalopathy incubation period in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7402-7407.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman and J. Hope (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-122.

- Manson, J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell and J. Hope (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**(2-3): 121-127.
- Manson, J. C., J. Hope, A. R. Clarke, A. Johnston, C. Black and N. MacLeod (1995). "PrP gene dosage and long term potentiation." Neurodegeneration **4**(1): 113-114.
- Marsh, R., Hanson RP (1979). "On the origin of the transmissible mink encephalopathy." Slow transmissible disease of the nervous system. Ed. Prusiner SB, Hardlow WJ, Acad Press (NY) **1**: 451-460.
- Marsh, R. F. (1990). "Bovine spongiform encephalopathy in the United States." J Am Vet Med Assoc **196**(10): 1677.
- Marsh, R. F., R. A. Bessen, S. Lehmann and G. R. Hartsough (1991). "Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy." J Gen Virol **72 ( Pt 3)**: 589-594.
- Marsh, R. F. and R. P. Hanson (1969). "Transmissible mink encephalopathy: neuroglial response." Am J Vet Res **30**(9): 1637-1642.
- Martial, J. A., R. A. Hallewell, J. D. Baxter and H. M. Goodman (1979). "Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria." Science **205**(4406): 602-607.
- Martin, F. C., A. L. Yeo and P. H. Sonksen (1997). "Growth hormone secretion in the elderly: ageing and the somatopause." Baillieres Clin Endocrinol Metab **11**(2): 223-250.
- Masters, C. L., J. O. Harris, D. C. Gajdusek, C. J. Gibbs, Jr., C. Bernoulli and D. M. Asher (1979). "Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering." Ann Neurol **5**(2): 177-188.
- Mathiason, C. K., J. G. Powers, S. J. Dahmes, D. A. Osborn, K. V. Miller, R. J. Warren, G. L. Mason, S. A. Hays, J. Hayes-Klug, D. M. Seelig, M. A. Wild, L. L. Wolfe, T. R. Spraker, M. W. Miller, C. J. Sigurdson, G. C. Telling and E. A. Hoover (2006). "Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease." Science **314**(5796): 133-136.
- Mays, C. E., C. Kim, T. Haldiman, J. van der Merwe, A. Lau, J. Yang, J. Grams, M. A. Di Bari, R. Nonno, G. C. Telling, Q. Kong, J. Langeveld, D. McKenzie, D. Westaway and J. G. Safar (2014). "Prion disease tempo determined by host-dependent substrate reduction." J Clin Invest **124**(2): 847-858.
- McGuire, L. I., A. H. Peden, C. D. Orru, J. M. Wilham, N. E. Appleford, G. Mallinson, M. Andrews, M. W. Head, B. Caughey, R. G. Will, R. S. Knight and A. J. Green (2012). "Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **72**(2): 278-285.
- McKinley, M. P., B. Hay, V. R. Lingappa, I. Lieberburg and S. B. Prusiner (1987). "Developmental expression of prion protein gene in brain." Dev Biol **121**(1): 105-110.

- McKinley, M. P., R. K. Meyer, L. Kenaga, F. Rahbar, R. Cotter, A. Serban and S. B. Prusiner (1991). "Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis." J Virol **65**(3): 1340-1351.
- McLean, C. A., J. W. Ironside, M. P. Alpers, P. W. Brown, L. Cervenakova, R. M. Anderson and C. L. Masters (1998). "Comparative neuropathology of Kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host." Brain Pathol **8**(3): 429-437.
- McLennan, N. F., P. M. Brennan, A. McNeill, I. Davies, A. Fotheringham, K. A. Rennison, D. Ritchie, F. Brannan, M. W. Head, J. W. Ironside, A. Williams and J. E. Bell (2004). "Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage." Am J Pathol **165**(1): 227-235.
- Meissner, B., K. Kallenberg, P. Sanchez-Juan, D. Collie, D. M. Summers, S. Almonti, S. J. Collins, P. Smith, P. Cras, G. H. Jansen, J. P. Brandel, M. B. Coulthart, H. Roberts, B. Van Everbroeck, D. Galanaud, V. Mellina, R. G. Will and I. Zerr (2009). "MRI lesion profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Neurology **72**(23): 1994-2001.
- Melin, A. E., L. Adan, G. Leverger, J. C. Souberbielle, G. Schaison and R. Brauner (1998). "Growth hormone secretion, puberty and adult height after cranial irradiation with 18 Gy for leukaemia." Eur J Pediatr **157**(9): 703-707.
- Merz, P. A., R. A. Somerville, H. M. Wisniewski and K. Iqbal (1981). "Abnormal fibrils from scrapie-infected brain." Acta Neuropathol **54**(1): 63-74.
- Meyer-Luehmann, M., J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, A. Neuenschwander, D. Abramowski, P. Frey, A. L. Jaton, J. M. Vigouret, P. Paganetti, D. M. Walsh, P. M. Mathews, J. Ghiso, M. Staufenbiel, L. C. Walker and M. Jucker (2006). "Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host." Science **313**(5794): 1781-1784.
- Miller, M. W. and E. S. Williams (2004). "Chronic wasting disease of cervids." Curr Top Microbiol Immunol **284**: 193-214.
- Mills, J. L., L. B. Schonberger, D. K. Wysowski, P. Brown, S. J. Durako, C. Cox, F. Kong and J. E. Fradkin (2004). "Long-term mortality in the United States cohort of pituitary-derived growth hormone recipients." The Journal of pediatrics **144**(4): 430-436.
- Milner, R. D., T. Russell-Fraser, C. G. Brook, P. M. Cotes, J. W. Farquhar, J. M. Parkin, M. A. Preece, G. J. Snodgrass, A. S. Mason, J. M. Tanner and F. P. Vince (1979). "Experience with human growth hormone in Great Britain: the report of the MRC Working Party." Clin Endocrinol (Oxf) **11**(1): 15-38.
- Mironov, A., Jr., D. Latawiec, H. Wille, E. Bouzamondo-Bernstein, G. Legname, R. A. Williamson, D. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and P. J. Peters (2003). "Cytosolic prion protein in neurons." J Neurosci **23**(18): 7183-7193.
- Moda, F., P. Gambetti, S. Notari, L. Concha-Marambio, M. Catania, K. W. Park, E. Maderna, S. Suardi, S. Haik, J. P. Brandel, J. Ironside, R. Knight, F. Tagliavini and C. Soto (2014). "Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **371**(6): 530-539.

- Moda, F., S. Suardi, G. Di Fede, A. Indaco, L. Limido, C. Vimercati, M. Ruggerone, I. Campagnani, J. Langeveld, A. Terruzzi, A. Brambilla, P. Zerbi, P. Fociani, M. T. Bishop, R. G. Will, J. C. Manson, G. Giaccone and F. Tagliavini (2012). "MM2-thalamic Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological, biochemical and transmission studies identify a distinctive prion strain." *Brain Pathol* **22**(5): 662-669.
- Mok, T., Z. Jaunmuktane, S. Joiner, T. Campbell, C. Morgan, B. Wakerley, F. Golestani, P. Rudge, S. Mead, H. R. Jager, J. D. Wadsworth, S. Brandner and J. Collinge (2017). "Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129." *N Engl J Med* **376**(3): 292-294.
- Montagna, P., P. Gambetti, P. Cortelli and E. Lugaresi (2003). "Familial and sporadic fatal insomnia." *Lancet Neurol* **2**(3): 167-176.
- Moore, R. A., M. W. Head, J. W. Ironside, D. L. Ritchie, G. Zanusso, Y. P. Choi and S. A. Priola (2016). "The Distribution of Prion Protein Allotypes Differs Between Sporadic and Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients." *PLoS Pathog* **12**(2): e1005416.
- Moore, R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood and D. Westaway (1999). "Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel." *J Mol Biol* **292**(4): 797-817.
- Morales, R., K. Abid and C. Soto (2007). "The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features." *Biochim Biophys Acta* **1772**(6): 681-691.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay and O. Kellermann (2000). "Signal transduction through prion protein." *Science* **289**(5486): 1925-1928.
- Moya, K. L., R. Hassig, C. Creminon, I. Laffont and L. Di Giamberardino (2004). "Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrP<sup>C</sup> in peripheral nerve." *J Neurochem* **88**(1): 155-160.
- Moya, K. L., N. Sales, R. Hassig, C. Creminon, J. Grassi and L. Di Giamberardino (2000). "Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain." *Microsc Res Tech* **50**(1): 58-65.
- Nguyen, J. T., H. Inouye, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and D. A. Kirschner (1995). "X-ray Diffraction of Scrapie Prion Rods and PrP Peptides." *J Mol Biol* **252**: 412-422.
- Niall, H. D., M. L. Hogan, R. Sauer, I. Y. Rosenblum and F. C. Greenwood (1971). "Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 866-870.
- Nonno, R., M. A. Di Bari, F. Cardone, G. Vaccari, P. Fazzi, G. Dell'Omo, C. Cartoni, L. Ingrosso, A. Boyle, R. Galeno, M. Sbriccoli, H. P. Lipp, M. Bruce, M. Pocchiari and U. Agrimi (2006). "Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles." *PLoS Pathog* **2**(2): e12.

- Norstrom, E. M. and J. A. Mastrianni (2005). "The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrP<sup>Sc</sup>-PrP<sup>C</sup> complex that leads to prion propagation." J Biol Chem **280**(29): 27236-27243.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood and et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-746.
- Orru, C. D., M. Bongiani, G. Tonoli, S. Ferrari, A. G. Hughson, B. R. Groveman, M. Fiorini, M. Pocchiari, S. Monaco, B. Caughey and G. Zanusso (2014). "A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings." N Engl J Med **371**(6): 519-529.
- Outram, G. W. (1976). "The pathogenesis of scrapie in mice." Front Biol **44**: 325-357.
- Paitel, E., C. Sunyach, C. Alves da Costa, J. C. Bourdon, B. Vincent and F. Checler (2004). "Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels." J Biol Chem **279**(1): 612-618.
- Palmer, C. G. and A. Reichmann (1976). "Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome." Hum Genet **35**(1): 35-49.
- Palmer, M. S., A. J. Dryden, J. T. Hughes and J. Collinge (1991). "Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Nature **352**(6333): 340-342.
- Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). "Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **39**(6): 767-778.
- Parchi, P., M. Cescatti, S. Notari, W. J. Schulz-Schaeffer, S. Capellari, A. Giese, W. Q. Zou, H. Kretschmar, B. Ghetti and P. Brown (2010). "Agent strain variation in human prion disease: insights from a molecular and pathological review of the National Institutes of Health series of experimentally transmitted disease." Brain **133**(10): 3030-3042.
- Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti and H. Kretschmar (1999). "Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects." Ann Neurol **46**(2): 224-233.
- Pattison, I. H. (1965). "Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease." Slow, latent and temperate virus infections, NINDB Monograph **2**: 249-257.
- Peckeu, L., et al. (2017). "Susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease after human growth hormone treatment in France." Submitted.
- Peoc'h, K., E. Levavasseur, E. Delmont, A. De Simone, I. Laffont-Proust, N. Privat, Y. Chebaro, C. Chapuis, P. Bedoucha, J. P. Brandel, A. Laquerriere, J. L. Kemeny, J. J. Hauw, M. Borg, H. Rezaei, P. Derreumaux, J. L. Laplanche and S. Haik (2012). "Substitutions at residue 211 in the prion protein drive a switch between CJD and GSS syndrome, a new



mechanism governing inherited neurodegenerative disorders." Hum Mol Genet **21**(26): 5417-5428.

Peretz, D., R. A. Williamson, G. Legname, Y. Matsunaga, J. Vergara, D. R. Burton, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and M. R. Scott (2002). "A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain." Neuron **34**(6): 921-932.

Pocchiari, M., S. Peano, A. Conz, A. Eshkol, F. Maillard, P. Brown, C. J. Gibbs, Jr., Y. G. Xi, E. Tenham-Fisher and G. Macchi (1991). "Combination ultrafiltration and 6 M urea treatment of human growth hormone effectively minimizes risk from potential Creutzfeldt-Jakob disease virus contamination." Horm Res **35**(3-4): 161-166.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-144.

Prusiner, S. B. (1998). "Prions." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13363-13383.

Prusiner, S. B. (2001). "Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions." N Engl J Med **344**(20): 1516-1526.

Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth and G. G. Glenner (1983). "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." Cell **35**(2 Pt 1): 349-358.

Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Miranda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson and et al. (1990). "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." Cell **63**(4): 673-686.

Raben, M. S. (1957). "Preparation of growth hormone from pituitaries of man and monkey." Science **125**(3253): 883-884.

Race, R., K. Meade-White, A. Raines, G. J. Raymond, B. Caughey and B. Chesebro (2002). "Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages." J Infect Dis **186** Suppl 2: S166-170.

Radovanovic, I., N. Braun, O. T. Giger, K. Mertz, G. Miele, M. Prinz, B. Navarro and A. Aguzzi (2005). "Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC." J Neurosci **25**(19): 4879-4888.

Rappaport, R. and R. Brauner (1989). "Growth and endocrine disorders secondary to cranial irradiation." Pediatric research **25**(6): 561-567.

Rappaport, R. and S. Sauvion (1989). "Possible mechanism for the growth retardation in Turner's syndrome." Acta Paediatr Scand Suppl **356**: 82-86.

Richards, G. E., B. L. Silverman, R. J. Winter and D. V. Edidin (1991). "Dose dependency of time of onset of radiation-induced growth hormone deficiency." J Pediatr **119**(3): 502-503.

Rieger, R., F. Edenhofer, C. I. Lasmezas and S. Weiss (1997). "The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells." Nat Med **3**(12): 1383-1388.

- Riesner, D. (2003). "Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc)." Br Med Bull **66**: 21-33.
- Ritchie, D. L., P. Adlard, A. H. Peden, S. Lowrie, M. Le Grice, K. Burns, R. J. Jackson, H. Yull, M. J. Keogh, W. Wei, P. F. Chinnery, M. W. Head and J. W. Ironside (2017). "Amyloid-beta accumulation in the CNS in human growth hormone recipients in the UK." Acta Neuropathol **134**(2): 221-240.
- Rodriguez, M. M., K. Peoc'h, S. Haik, C. Bouchet, L. Vernengo, G. Manana, R. Salamano, L. Carrasco, M. Lenne, P. Beaudry, J. M. Launay and J. L. Laplanche (2005). "A novel mutation (G114V) in the prion protein gene in a family with inherited prion disease." Neurology **64**(8): 1455-1457.
- Rongyan, Z., L. Xianglong, L. Lanhui, L. Xiangyun and F. Fujun (2008). "Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species." J Hered **99**(6): 647-652.
- Rosenfeld, R. G. (1989). "Update on growth hormone therapy for Turner's syndrome." Acta Paediatr Scand Suppl **356**: 103-108; discussion 109-110.
- Roucou, X., M. Gains and A. C. LeBlanc (2004). "Neuroprotective functions of prion protein." J Neurosci Res **75**(2): 153-161.
- Roucou, X., Q. Guo, Y. Zhang, C. G. Goodyer and A. C. LeBlanc (2003). "Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons." J Biol Chem **278**(42): 40877-40881.
- Roucou, X. and A. C. LeBlanc (2005). "Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases." J Mol Med (Berl) **83**(1): 3-11.
- Rudge, P., Z. Jaunmuktane, P. Adlard, N. Bjurstrom, D. Caine, J. Lowe, P. Norsworthy, H. Hummerich, R. Drueyeh, J. D. Wadsworth, S. Brandner, H. Hyare, S. Mead and J. Collinge (2015). "Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years." Brain **138**(Pt 11): 3386-3399.
- Rudman, D., M. H. Kutner, C. M. Rogers, M. F. Lubin, G. A. Fleming and R. P. Bain (1981). "Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity." J Clin Invest **67**(5): 1361-1369.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." Nat Med **4**(10): 1157-1165.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto and T. Noda (1996). "Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene." Nature **380**(6574): 528-531.
- Sakurai-Yamashita, Y., S. Sakaguchi, D. Yoshikawa, N. Okimura, Y. Masuda, S. Katamine and M. Niwa (2005). "Female-specific neuroprotection against transient brain ischemia observed in mice devoid of prion protein is abolished by ectopic expression of prion protein-like protein." Neuroscience **136**(1): 281-287.

- Sales, N., R. Hassig, K. Rodolfo, L. Di Giamberardino, E. Traiffort, M. Ruat, P. Fretier and K. L. Moya (2002). "Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons." Eur J Neurosci **15**(7): 1163-1177.
- Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyn'ska and M. Schachner (2005). "Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth." J Cell Biol **169**(2): 341-354.
- Schmitt-Ulms, G., S. Ehsani, J. C. Watts, D. Westaway and H. Wille (2009). "Evolutionary descent of prion genes from the ZIP family of metal ion transporters." PLoS One **4**(9): e7208.
- Schmitt-Ulms, G., G. Legname, M. A. Baldwin, H. L. Ball, N. Bradon, P. J. Bosque, K. L. Crossin, G. M. Edelman, S. J. DeArmond, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (2001). "Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein." J Mol Biol **314**(5): 1209-1225.
- Schroter, A., I. Zerr, K. Henkel, H. J. Tschampa, M. Finkenstaedt and S. Poser (2000). "Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease." Arch Neurol **57**(12): 1751-1757.
- Scott, M. R., D. Peretz, H. O. Nguyen, S. J. Dearmond and S. B. Prusiner (2005). "Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice." J Virol **79**(9): 5259-5271.
- Scott, P. R., B. M. Aldridge, M. Clarke and R. Will (1989). "Bovine spongiform encephalopathy in a cow in the United Kingdom." J Am Vet Med Assoc **195**(12): 1745-1747.
- Seeburg, P. H. (1982). "The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone." DNA **1**(3): 239-249.
- Seeburg, P. H., J. Shine, J. A. Martial, J. D. Baxter and H. M. Goodman (1977). "Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone." Nature **270**(5637): 486-494.
- Sforza, E., P. Montagna, P. Tinuper, P. Cortelli, P. Avoni, F. Ferrillo, R. Petersen, P. Gambetti and E. Lugaresi (1995). "Sleep-wake cycle abnormalities in fatal familial insomnia. Evidence of the role of the thalamus in sleep regulation." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **94**(6): 398-405.
- Sheila, B. L. (1997). "Molecular and chemical basis of prion-related diseases." Chemical Society Reviews **26**(6): 425-432.
- Shmerling, D., I. Hegyi, M. Fischer, T. Blattler, S. Brandner, J. Gotz, T. Rulicke, E. Flechsig, A. Cozzio, C. von Mering, C. Hangartner, A. Aguzzi and C. Weissmann (1998). "Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions." Cell **93**(2): 203-214.
- Simoneau, S., S. Haik, C. Leucht, D. Dormont, J. P. Deslys, S. Weiss and C. Lasmezas (2003). "Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP." Biol Chem **384**(2): 243-246.

- Smith, P. E. (1927). "The disabilities caused by hypophysectomy and their repair: the tuberal (hypothalamic) syndrome in the rat." Journal of the American Medical Association **88**(3): 158-161.
- Smith, P. E., C. F. Greenwood and G. L. Foster (1927). "A Comparison in Normal, Thyroidectomized and Hypophysectomized Rats of the Effects upon Metabolism and Growth Resulting from Daily Injections of Small Amounts of Thyroid Extract." Am J Pathol **3**(6): 669-687.
- Soto, C. (2011). "Prion hypothesis: the end of the controversy?" Trends Biochem Sci **36**(3): 151-158.
- Soto, C. and G. P. Saborio (2001). "Prions: disease propagation and disease therapy by conformational transmission." Trends Mol Med **7**(3): 109-114.
- Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C. L. Bassetti and D. M. Hermann (2005). "Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1." Neurobiol Dis **20**(2): 442-449.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.
- Stanhope, R., A. Albanese, P. Hindmarsh and C. G. Brook (1992). "The effects of growth hormone therapy on spontaneous sexual development." Horm Res **38 Suppl 1**: 9-13.
- Strobl, J. S. and M. J. Thomas (1994). "Human growth hormone." Pharmacol Rev **46**(1): 1-34.
- Swerdlow, A. J., C. D. Higgins, P. Adlard, M. E. Jones and M. A. Preece (2003). "Creutzfeldt-Jakob disease in United Kingdom patients treated with human pituitary growth hormone." Neurology **61**(6): 783-791.
- Taguchi, Y., S. Mohri, J. W. Ironside, T. Muramoto and T. Kitamoto (2003). "Humanized knock-in mice expressing chimeric prion protein showed varied susceptibility to different human prions." Am J Pathol **163**(6): 2585-2593.
- Tanner, J. (1972). "Human growth hormone." Nature **237**(5356): 433-439.
- Taraboulos, A., A. J. Raeber, D. R. Borchelt, D. Serban and S. B. Prusiner (1992). "Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells." Mol Biol Cell **3**(8): 851-863.
- Taylor, D. M., A. G. Dickinson, H. Fraser, P. A. Robertson, P. R. Salacinski and P. J. Lowry (1985). "Preparation of growth hormone free from contamination with unconventional slow viruses." Lancet **2**(8449): 260-262.
- Telling, G. C., P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti and S. B. Prusiner (1996). "Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity." Science **274**(5295): 2079-2082.

- Telling, G. C., M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (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.
- Telling, G. C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." Cell **83**(1): 79-90.
- Thomsett, M. J., F. A. Conte, S. L. Kaplan and M. M. Grumbach (1980). "Endocrine and neurologic outcome in childhood craniopharyngioma: Review of effect of treatment in 42 patients." J Pediatr **97**(5): 728-735.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-642.
- Uro-Coste, E., H. Cassard, S. Simon, S. Lugan, J. M. Bilheude, A. Perret-Liaudet, J. W. Ironside, S. Haik, C. Basset-Leobon, C. Lacroux, K. Pech, N. Streichenberger, J. Langeveld, M. W. Head, J. Grassi, J. J. Hauw, F. Schelcher, M. B. Delisle and O. Andreoletti (2008). "Beyond PrP<sup>Res</sup>) type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease." PLoS Pathog **4**(3): e1000029.
- Valleron, A. J., P. Y. Boelle, R. Will and J. Y. Cesbron (2001). "Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom." Science **294**(5547): 1726-1728.
- van Duijn, C. M., N. Delasnerie-Laupretre, C. Masullo, I. Zerr, R. de Silva, D. P. Wientjens, J. P. Brandel, T. Weber, V. Bonavita, M. Zeidler, A. Alperovitch, S. Poser, E. Granieri, A. Hofman and R. G. Will (1998). "Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)." Lancet **351**(9109): 1081-1085.
- Vanik, D. L., K. A. Surewicz and W. K. Surewicz (2004). "Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions." Mol Cell **14**(1): 139-145.
- Wadsworth, J. D., E. A. Asante, M. Desbruslais, J. M. Linehan, S. Joiner, I. Gowland, J. Welch, L. Stone, S. E. Lloyd, A. F. Hill, S. Brandner and J. Collinge (2004). "Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype." Science **306**(5702): 1793-1796.
- Wadsworth, J. D., S. Joiner, J. M. Linehan, M. Desbruslais, K. Fox, S. Cooper, S. Cronier, E. A. Asante, S. Mead, S. Brandner, A. F. Hill and J. Collinge (2008). "Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3885-3890.
- Ward, H. J., D. Everington, S. N. Cousens, B. Smith-Bathgate, M. Gillies, K. Murray, R. S. Knight, P. G. Smith and R. G. Will (2008). "Risk factors for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **63**(3): 347-354.

- Ward, H. J., D. Everington, E. A. Croes, A. Alperovitch, N. Delasnerie-Laupretre, I. Zerr, S. Poser and C. M. van Duijn (2002). "Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and surgery: a case-control study using community controls." Neurology **59**(4): 543-548.
- Watts, J. C. and D. Westaway (2007). "The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction." Biochim Biophys Acta **1772**(6): 654-672.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson and R. Bradley (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Vet Rec **121**(18): 419-420.
- Wientjens, D. P., Z. Davanipour, A. Hofman, K. Kondo, W. B. Matthews, R. G. Will and C. M. van Duijn (1996). "Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies." Neurology **46**(5): 1287-1291.
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell and J. B. Ryan (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." Vet Rec **123**(25): 638-644.
- Wilham, J. M., C. D. Orru, R. A. Bessen, R. Atarashi, K. Sano, B. Race, K. D. Meade-White, L. M. Taubner, A. Timmes and B. Caughey (2010). "Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays." PLoS Pathog **6**(12): e1001217.
- Wilhelmi, A. E., J. B. Fishman and J. A. Russell (1948). "A new preparation of crystalline anterior pituitary growth hormone." J Biol Chem **176**(2): 735-745.
- Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman and P. G. Smith (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." Lancet **347**(9006): 921-925.
- Will, R. G. and W. B. Matthews (1982). "Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **45**(3): 235-238.
- Will, R. G., M. Zeidler, G. E. Stewart, M. A. Macleod, J. W. Ironside, S. N. Cousens, J. Mackenzie, K. Estibeiro, A. J. Green and R. S. Knight (2000). "Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **47**(5): 575-582.
- Wille, H., M. D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F. E. Cohen, D. A. Agard and S. B. Prusiner (2002). "Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3563-3568.
- Williams, A., A. M. Van Dam, D. Ritchie, P. Eikelenboom and H. Fraser (1997). "Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations." Brain Res **754**(1-2): 171-180.
- Wilson, D. M. (1992). "Clinical actions of growth hormone." Endocrinol Metab Clin North Am **21**(3): 519-537.
- Wilson, K., V. Zigas and D. C. Gajdusek (1959). "New tremor syndromes occurring sporadically in natives of the Wabag-Laiagam-Kundep region of the Western Highlands of Australian New Guinea." Lancet **2**(7105): 699-702.

Wit, J. M., P. E. Clayton, A. D. Rogol, M. O. Savage, P. H. Saenger and P. Cohen (2008). "Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation." Growth Horm IGF Res **18**(2): 89-110.

Wit, J. M., E. O. Reiter, J. L. Ross, P. H. Saenger, M. O. Savage, A. D. Rogol and P. Cohen (2008). "Idiopathic short stature: management and growth hormone treatment." Growth Horm IGF Res **18**(2): 111-135.

Wong, B. S., T. Liu, R. Li, T. Pan, R. B. Petersen, M. A. Smith, P. Gambetti, G. Perry, J. C. Manson, D. R. Brown and M. S. Sy (2001). "Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein." J Neurochem **76**(2): 565-572.

WS, G. (1946). "Louping-ill, tick-born fever, and scrapie." Vet Rec **58**: 516-518.

Ye, J., J. Han, Q. Shi, B. Y. Zhang, G. R. Wang, C. Tian, C. Gao, J. M. Chen, C. J. Li, Z. Liu, X. Z. Li, L. Z. Zhang and X. P. Dong (2008). "Human prion disease with a G114V mutation and epidemiological studies in a Chinese family: a case series." J Med Case Rep **2**: 331.

Zachmann, M. (1992). "Interrelations between growth hormone and sex hormones: physiology and therapeutic consequences." Horm Res **38 Suppl 1**: 1-8.

Zadik, Z., H. Landau, M. Chen, Y. Altman and E. Lieberman (1992). "Assessment of growth hormone (GH) axis in Turner's syndrome using 24-hour integrated concentrations of GH, insulin-like growth factor-I, plasma GH-binding activity, GH binding to IM9 cells, and GH response to pharmacological stimulation." J Clin Endocrinol Metab **75**(2): 412-416.

Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. Lopez Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider and K. Wuthrich (2000). "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 145-150.

Zanusso, G., R. B. Petersen, T. Jin, Y. Jing, R. Kanoush, S. Ferrari, P. Gambetti and N. Singh (1999). "Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein." J Biol Chem **274**(33): 23396-23404.

Zeidler, M., R. J. Sellar, D. A. Collie, R. Knight, G. Stewart, M. A. Macleod, J. W. Ironside, S. Cousens, A. C. Colchester, D. M. Hadley and R. G. Will (2000). "The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **355**(9213): 1412-1418.

## Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la protéine prion humaine. ....	3
Figure 2 : Structure tertiaire de la PrP <sup>c</sup> . ....	4
Figure 3 : Représentation des monomères de PrP <sup>sc</sup> (A et B) et de leur assemblage en trimères (C et D). ....	12
Figure 4 : Modèle de l'assemblage fibrillaire construit sur l'assemblage de trimères. ....	12
Figure 5 : Modèle autocatalytique de conversion de la PrP <sup>c</sup> en de PrP <sup>sc</sup> (a) et modèle de nucléation-polymérisation de la PrP <sup>c</sup> en de PrP <sup>sc</sup> (b). ....	14
Figure 6 : Exemple caractéristique de deux souches d'ESST. ....	20
Figure 7 : Phénomène de barrière d'espèce. ....	22
Figure 8 : Représentation du nombre de cas de MCJ sporadique selon l'âge au décès. Données du Réseau National de Surveillance des Maladies de Creutzfeldt-Jakob. ....	32
Figure 9 : Aspects IRM au cours de la MCJ sporadique. ....	34
Figure 10 : Electroencéphalogramme au cours de la MCJ sporadique. ....	34
Figure 11 : Lésions neuropathologiques de MCJ sporadique. ....	36
Figure 12 : Classification du profil de migration en Western Blot de la PrP <sup>res</sup> . ....	37
Figure 13 : Plaques multicentriques dans le cervelet d'un patient atteint de SGSS. ....	41
Figure 14 : Représentation du nombre de cas de vMCJ en France de 1996 à 2017. Données du Réseau National de Surveillance des Maladies de Creutzfeldt-Jakob. ....	47
Figure 15 : Aspects IRM au cours de la vMCJ. ....	48
Figure 16 : Plaques florides. ....	49
Figure 17 : Classification du profil de migration en Western Blot de la PrP <sup>res</sup> . ....	50
Figure 18 : Représentation graphique de la fonction ln(-ln) de la fonction de survie chez les hommes et les femmes. ....	104
Figure 19 : Courbe de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour l'ensemble des 1443 patients ayant été traités par l'hormone de croissance entre janvier 1982 et décembre 1985. ....	105
Figure 20 : Représentation des distributions observée et estimée de la période d'incubation pour l'ensemble des 119 cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par l'hormone de croissance. ....	121



## Table des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la PrP <sup>c</sup> versus la PrP <sup>sc</sup> .....	11
Tableau 2 : Tableau récapitulatif suggérant un nombre limité de souches dans la forme sporadique de la MCJ.....	18
Tableau 3 : Susceptibilité à la tremblante classique en fonction des différents génotypes ovins. ....	25
Tableau 4 : Critères de classement et de diagnostic de la forme sporadique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	32
Tableau 5 : Répartition du génotype au codon 129 parmi les populations européenne et japonaise saines ou atteintes de MCJ iatrogène secondaire à une greffe de dure-mère. .	54
Tableau 6 : Tableau résumé des différents sous-types et phénotypes clinico-pathologique des ESST humaines. ....	55
Tableau 7 : Méthodes d'extraction de l'hormone de Croissance. Source : « Rapport sur l'hormone de croissance et la maladie de Creutzfeldt-Jakob », IGAS, Décembre 1992.	65
Tableau 8 : Répartition mondiale des cas de MCJ iatrogène secondaire à un traitement par hormone de croissance extractive d'origine humaine.....	66
Tableau 9 : Critère d'exclusion des donneurs d'hypophyses appliqués en Bulgarie et en France.....	75
Tableau 10 : Méthode d'extraction de l'hormone de croissance suivies par le laboratoire Pasteur et Kabivitrum. ....	77
Tableau 11 : Résultats des tests utilisant les résidus de Schoenfeld par chaque variable et pour l'ensemble des variables contenues dans le deuxième modèle final. ....	105
Tableau 12 : Tableau représentatif des cas inoculés en fonction du génotype, type de PrP et de l'exposition aux lots de la catégorie 1.....	146

## **Physiopathologie des formes infectieuses de maladies à prions humaines : étude des formes iatrogènes secondaires à un traitement par hormone de croissance**

### Résumé :

Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives et transmissibles. Elles sont à l'origine de formes infectieuses comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène secondaire à un traitement par hormone de croissance d'origine humaine (MCJ post-hGH). La compréhension des facteurs gouvernant la physiopathologie de ces formes demeure parcellaire. Notre objectif a été de les étudier en analysant la cohorte des patients français exposés à l'hGH. Les analyses épidémiologiques, ont montré, à partir de données quantifiées, pour la première fois chez l'homme, une relation entre la dose d'exposition et le risque de développer la maladie d'une part et la durée de la période d'incubation d'autre part. La modélisation de la période d'incubation, a permis d'estimer que 95% des cas sont déjà apparus et d'évaluer l'influence du polymorphisme au codon 129 du gène codant la protéine prion sur la période d'incubation. L'étude descriptive a montré des similarités clinico-pathologiques entre tous les cas de maladies à prion humaines par contamination périphérique laissant supposer un rôle important de la voie d'exposition. Les expériences de transmission à la souris transgénique devraient permettre de valider les hypothèses que nous avons émises sur l'identité des souches présentes dans les lots contaminés. Ce travail a donc permis de mieux caractériser les facteurs impliqués dans la transmission des maladies à prions chez l'homme et de fournir un cadre méthodologique et des informations qui pourraient être utiles pour évaluer le risque de transmission potentielle des autres protéinopathies du système nerveux central pour lesquelles un mécanisme « prion like » a été proposé.

### **Physiopathology of the infectious forms of human prion diseases: A study of iatrogenic forms after human cadaver-sourced growth hormone treatment in France**

#### Abstract:

Prion diseases are fatal and transmissible neurodegenerative disorders. Infectious forms include iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after human cadaver-sourced growth hormone treatment (hGH-iCJD). Our understanding of the factors governing the pathophysiology of infection, upon exposure to an exogenous prion, remains very limited in humans. The aim of this study was to better understand these phenomena using data from the French cohort of patients who were exposed to this at risk treatment. Using Cox hazards model, we provided the first epidemiological evidence of a relationship between dose of exposure and disease occurrence on one hand and incubation time on the other hand. Incubation period modelling by Weibull distribution estimated that 95% of the cases have already occurred. In a descriptive study, we showed that clinical and neuropathological features resembled other forms of infectious prion diseases after a peripheral contamination supporting a major role of the route of exposure. We also performed experimental transmission to transgenic mice expressing human PrP to test our hypotheses about the infecting prion strain that were transmitted to French hGH-iCJD patients. To conclude, we identified factors implicated in human prion transmission and provided a methodological frame and useful information that could help to evaluate the transmission risk associated with other brain proteinopathies such as Alzheimer and Parkinson's diseases for which a prion-like mechanism has been proposed.