

Nouvelles contributions histopathologiques à l'étude des souches d'agents responsables des maladies à prions à l'aide de la méthode de PET Blot différentiel

Anna A Bencsik, Julie Buffa

▶ **To cite this version:**

Anna A Bencsik, Julie Buffa. Nouvelles contributions histopathologiques à l'étude des souches d'agents responsables des maladies à prions à l'aide de la méthode de PET Blot différentiel. Biochimie [q-bio.BM]. 2009. anses-00471156

HAL Id: anses-00471156

https://anses.hal.science/anses-00471156

Submitted on 7 Apr 2010

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.

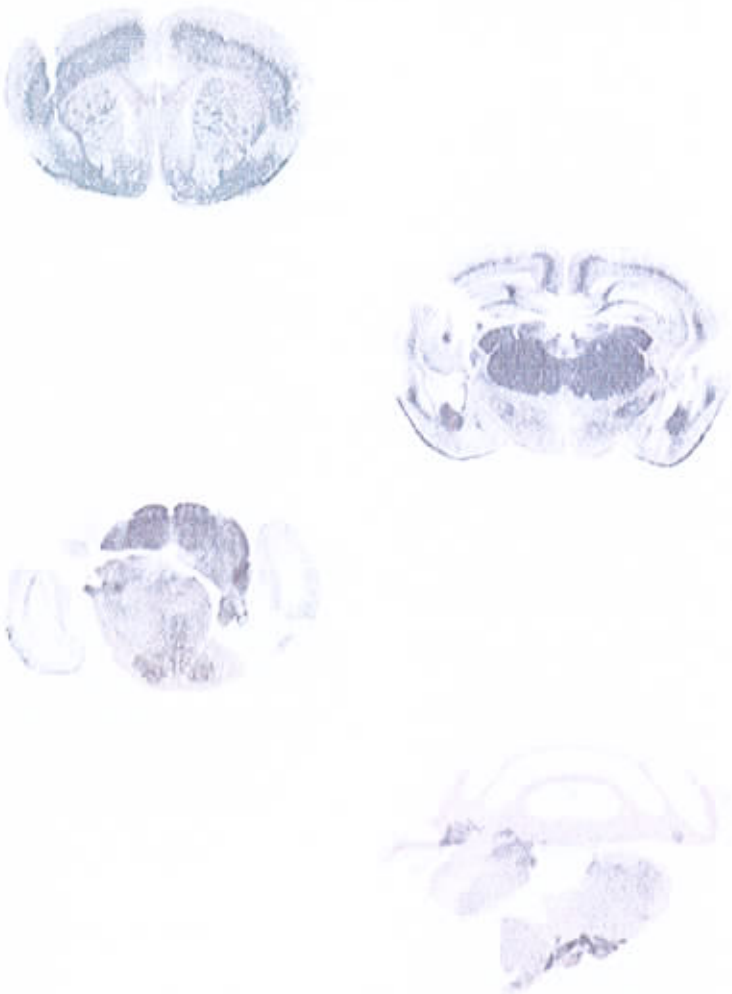
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

BUFFA Julie

AFSSA - Lyon
№ 983

Nouvelles contributions histopathologiques à l'étude des souches d'agents responsables des maladies à prions à l'aide de la méthode du PET Blot différentiel

Du 2 mars au 30 juin 2009



Université de Nice
Licence professionnelle de biotechnologies
Génie Biologique, Microscopie et Qualité

Lieu de stage :
AFSSA - Site de Lyon
Unité ATNC – Secteur Histologie
31 avenue Tony Garnier
69364 Lyon cedex 07

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante qu'elles m'ont fait vivre durant ces quatre mois :

Didier CALAVAS, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie à l'AFSSA de Lyon.

Thierry BARON, chef de l'unité ATNC, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité.

Anna BENCSIK, ma responsable de stage, pour m'avoir intégrée rapidement au sein de l'entreprise et m'avoir accordé sa confiance ; pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de cette période ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Et enfin Mikaël LEBOIDRE, technicien du secteur histologie, pour son aide et ses précieux conseils.

Abréviations

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ATNC : Agent Transmissible Non Conventionnel

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

DAB : Diaminobenzidine

ESST : Encéphalopathie Spongiforme Subaiguë Transmissible

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine

IHC : Immunohistochimie

KO : Knock Out

NBT/BCIP : Nitroblue tetrazolium/5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate

PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)

PBST : Phosphate Buffered Saline + Tween (Tampon phosphate salin + Tween)

PET Blot : Paraffin-Embedded Tissue Blot

PK : Protéinase K

PrP : Protéine prion

PrP^{c} : Protéine prion cellulaire

PrP^{res} : Protéine prion résistante

PrP^{sc} : Protéine prion scrapie

TA : Température ambiante

TBST : Tris Buffered Saline + Tween (Tampon Tris salin + Tween)

SOMMAIRE

Présentation de l'entreprise **5**
L'AFSSA 5
Le site de Lyon 5
L'unité ATNC 6
Le système qualité à l'AFSSA de Lyon 6

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles **7**
Généralités 7
Les ESST animales 7
Les ESST humaines 7
Les agents transmissibles non conventionnels 8

Sujet et objectifs du stage **9**

Matériel et méthodes **10**
Animaux et agents infectieux 10
Préparation des prélèvements 10
Immunohistochimie 10
Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET Blot) 11

Résultats **13**
Contrôles et validations 13
Détection différentielle de la PrP^{res} 16
Distribution neuro-anatomique de la PrP^{res} 20
Détection de la PrP^{sc} par immunohistochimie 21

Discussion **22**

Conclusion et perspectives **25**

Bibliographie **26**

Glossaire **27**

Annexes **28**

Présentation de l'entreprise

L'AFSSA

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a été créée en avril 1999 suite à la loi du 1er juillet 1998 relative au renforcement de la veille et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'Homme.

Il s'agit d'un établissement public à caractère administratif placé sous la tutelle des ministères de la Santé, de l'Agriculture et de la Consommation.

L'AFSSA compte à ce jour 11 laboratoires regroupant environ 1100 personnes.

Ses missions consistent :

- en des missions d'évaluation des risques sanitaires et nutritionnels des aliments : l'AFSSA propose des mesures visant à préserver la santé publique, sous forme d'avis ou de recommandations rendus publics.
- en des missions de recherche, d'appui scientifique et technique dans le domaine de la sécurité et de l'hygiène des aliments, et de la santé animale
- en des missions relatives au médicament vétérinaire : l'AFSSA délivre, suspend ou retire des autorisations de mises sur le marché et assure le contrôle de ces médicaments

L'AFSSA contribue ainsi à la protection et à l'amélioration de la santé publique, de la santé des animaux et des végétaux, et de la qualité sanitaire de l'environnement.

Le site de Lyon



Dénommé « Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes » depuis 2001, le site de Lyon est aujourd'hui sous la direction de Didier CALAVAS.

Réunissant environ 80 personnes, l'AFSSA de Lyon est composée de quatre unités :

- L'unité épidémiologie bovine : épidémiosurveillance de l'antibiorésistance et des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST)
- L'unité bactériologie bovine et sécurité des viandes : étude des bactéries pathogènes susceptibles de contaminer les viandes et étude de leur résistance aux antibiotiques
- L'unité mycoplasmologie
- L'unité ATNC (Agent Transmissible Non Conventionnel)

Une cinquième unité concernant la protection des végétaux est en train d'être mise en place.

L'AFSSA de Lyon est laboratoire national de référence pour les ESST animales (encéphalopathie spongiforme bovine et tremblante du mouton et de la chèvre) et pour l'agalaxie contagieuse des petits ruminants. Elle est également laboratoire de référence OIE (Office International des Epizooties) pour la péripneumonie contagieuse bovine.

L'unité ATNC

Dirigée par le Dr Thierry BARON, l'unité ATNC effectue des confirmations de diagnostics d'ESST : lorsque les tests réalisés dans les laboratoires vétérinaires départementaux donnent un résultat non négatif, les prélèvements (provenant initialement de l'équarrissage ou de l'abattoir) sont envoyés à l'AFSSA pour vérification et validation.
Parallèlement, l'unité ATNC mène des activités de recherche, en particulier dans le domaine du typage des souches de prions impliqués dans les diverses formes de ces maladies.
Ces différentes activités sont réparties en quatre secteurs :

- Expérimentation animale (avec une animalerie classée A3, d'une capacité de 8500 rongeurs)
- Biologie moléculaire - transgénèse
- Biochimie (avec des zones P2 et P3)
- Histologie (avec une zone P3 d'environ 60 m²)

C'est dans ce dernier secteur, dirigé par le Dr Anna BENCSIK, que j'ai effectué mon stage.

Le système qualité à l'AFSSA de Lyon

Afin de mener à bien les missions de l'AFSSA, une déclaration de politique qualité a été rédigée. Elle précise notamment les actions réalisées en vue d'assurer la fiabilité des méthodes et résultats, ainsi que la crédibilité des avis rendus.
Dans le cadre de ses activités de références, l'AFSSA de Lyon doit répondre à certains critères inscrits dans le décret n°2006-7 du 4 janvier 2006 : la satisfaction des exigences énoncées dans les normes internationales en vigueur, ainsi que l'accréditation par le COFRAC (Comité Français d'Accréditation).
L'AFSSA de Lyon s'attache ainsi à satisfaire les exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025[1] (pour les activités d'analyse et pour les essais en vue du contrôle des réactifs) et du référentiel COFRAC LAB CIL REF02 (pour les activités d'organisation de comparaisons inter-laboratoires d'aptitude).
Concernant l'unité ATNC, les objectifs qualité pour 2011 consistent à déposer des dossiers de demande d'accréditation pour les activités de référence : confirmation de diagnostics d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de tremblante (Programme n°167 du COFRAC : Analyses de dépistage par tests rapides des ESST) et typage des ESST chez les petits ruminants. Des dossiers seront également déposés pour les contrôles de réactifs et pour l'organisation de campagnes d'essais inter-laboratoires d'aptitude sur les tests rapides de dépistage des ESST.
La mise en œuvre de cette politique qualité est assurée par le responsable qualité (également chargé de la métrologie) et par les correspondants qualité et métrologie présents dans chaque unité.
Un manuel qualité a été rédigé et des audits internes sont effectués régulièrement afin de vérifier la mise en application de la norme. En cas d'écart par rapport à celle-ci, des fiches de non conformité sont constituées et des actions correctives sont mises en place.
Ainsi, toutes ces démarches contribuent à l'amélioration continue du système qualité.

[1] ISO 17025 : « Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais »

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles

Généralités

Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST), ou maladies à prions, sont des maladies neurodégénératives rares, toujours fatales, caractérisées par des périodes d'incubation longues (jusqu'à plusieurs dizaines d'années) et une atteinte ciblée du système nerveux central [1].

Lors d'une analyse histopathologique du cerveau, on observe en effet une perte neuronale, une gliose réactionnelle essentiellement astrocytaire, ainsi que des lésions de vacuolisation (spongiose). De plus, on peut parfois constater la présence de dépôts amyloïdes [2]. La distribution de ces dépôts et lésions, ainsi que la durée des périodes d'incubation permettent de distinguer différentes souches de l'agent infectieux responsable des ESST. La nature de ces souches détermine les possibilités de transmission inter-espèces [3, 4].

Ces maladies, encore incurables aujourd'hui, touchent aussi bien l'homme que l'animal.

Les ESST animales

Chez l'animal, les ESST se caractérisent par des troubles de la motricité (tremblements, perte d'équilibre), de la sensibilité (réactions exagérées au contact ou au bruit) et du comportement (crainte ou agressivité) [5].

La plus ancienne et la plus répandue des ESST est la tremblante (scrapie en anglais), apparue au milieu du XVIII^{ème} siècle. Il s'agit d'une maladie à transmission horizontale touchant le mouton et la chèvre [6]. Il semblerait cependant qu'elle ne soit pas transmissible à l'homme puisqu'un tel cas n'a jamais été rapporté jusqu'à présent [7].

Plus récemment, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la vache folle, détectée en 1986, a également eu des répercussions conséquentes, même si elle n'est pas contagieuse. En effet, l'agent de l'ESB est capable de passer la barrière d'espèce relativement facilement : la maladie a pu être transmise expérimentalement au mouton, à la chèvre, à la souris, au vison et aux petits primates. De plus, contrairement à la tremblante, elle est transmissible à l'homme [8].

Un autre cas est en train de devenir un problème majeur aux Etats-Unis. Il s'agit de la maladie du dépérissement chronique des cervidés. Cette ESST ne semble pas transmissible à l'homme, mais a néanmoins pu être transmise à la vache [9].

Il existe également d'autres ESST animales, cependant moins répandues : l'encéphalopathie spongiforme du vison et l'encéphalopathie spongiforme féline.

Les ESST humaines

Elles se caractérisent généralement par des altérations comportementales, des troubles moteurs et une démence progressive [10].

La plus répandue est la maladie de Creutzfeldt-Jakob, décrite pour la première fois en 1920, et dont il existe plusieurs formes. La plus commune est la forme sporadique (90 % des cas), mais il existe également des formes génétiques et iatrogènes [1]. Ces dernières sont principalement acquises lors d'interventions neurochirurgicales

réalisées avec des instruments insuffisamment décontaminés, lors de greffes de dure-mère ou de cornée [11]. Enfin, apparu plus tardivement (en 1996), le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est considéré comme étant lié à une contamination par l'agent de l'ESB [12].

Le kuru, une autre forme d'ESST humaine, s'est quant à lui répandu dans les années 50 en Papouasie-Nouvelle-Guinée, où il était transmis par les pratiques anthropophages des tribus lors des rites mortuaires [13].

Enfin, on distingue aussi parmi ces maladies le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker et les insomnies fatales familiales qui sont des formes génétiques.

Les agents transmissibles non conventionnels

Au début des années 1980, l'équipe de Stanley Prusiner s'attela à isoler et à caractériser l'agent infectieux responsable des ESST, à partir de cerveaux de hamsters. Ses études montrèrent que ces maladies étaient associées à l'accumulation d'une protéine anormale, la protéine prion (PrP) pathologique, et que celle-ci constituait tout ou partie de l'agent infectieux [14]. Mais à ce jour, sa nature exacte ainsi que sa physiopathologie ne sont pas complètement élucidées. Deux grandes caractéristiques ont néanmoins pu être dégagées. Tout d'abord, cet agent présente une résistance inhabituelle à de nombreux traitements d'inactivation classiquement utilisés en microbiologie, qu'ils soient chimiques ou physiques (Annexe 1). De plus, on peut noter que sa taille est inférieure à celle des virus [1]. Pour ces raisons, le prion est qualifié d'agent transmissible non conventionnel (ATNC).

En réalité, on distingue deux isoformes de protéine prion : la PrP cellulaire (PrP^{c}), physiologique, et la PrP scrapie (PrP^{sc}), pathologique (également appelée PrP^{res} en raison de ses propriétés de résistance aux protéases).

Ces deux protéines ont des structures primaires identiques, mais des structures secondaires et tertiaires différentes, ce qui explique que leurs propriétés physico-chimiques et biologiques diffèrent [10] :

PrP^{c}	PrP^{sc}
Ubiquitaire	Accumulation dans le cerveau
Structure secondaire riche en hélices α	Structure secondaire riche en feuillets β
Absence de propriétés d'agrégation	Propriétés d'agrégation
Complètement digérée par les protéases	Partiellement digérée par les protéases
Destruction facile	Résistance à de nombreux traitements d'inactivation

De plus, la PrP^{c} semble indispensable au développement d'une ESST. En effet, il a été démontré que des souris déficientes pour le gène prnp (gène de la protéine prion) sont insensibles à ces maladies [15]. Il semblerait également que la PrP^{sc} soit capable d'induire un changement de conformation de la PrP^{c}, la convertissant ainsi en PrP pathologique. Ainsi, l'hôte receveur synthétise une protéine prion pathologique issue de sa propre production de protéine prion, ce qui expliquerait l'absence de réaction immunitaire [16].

Ces propriétés atypiques font qu'il n'existe quasiment pas de test de dépistage non invasif. C'est pourquoi le diagnostic ante mortem est uniquement basé sur les signes cliniques et confirmé par un examen biochimique et histologique post mortem du cerveau.

Sujet et objectifs du stage

Depuis que la transmission de l'agent de l'ESB à l'homme a été démontrée, une importance particulière est accordée à l'étude des différentes souches d'ATNC. En effet, la nature de ces souches déterminant la transmissibilité intra- et inter-espèces, il est important de pouvoir les distinguer. De plus, la possibilité que l'agent de l'ESB soit hébergé au sein du cheptel ovin et caprin renforce la nécessité d'étudier aussi systématiquement les cas de tremblante.

L'identification des souches est basée sur différents critères biologiques et biochimiques, étudiés généralement chez des souris expérimentalement infectées. Cependant, la barrière d'espèce étant parfois un obstacle à la transmission aux souris conventionnelles, des modèles transgéniques ont dû être développés. C'est le cas, par exemple, des souris TgOvPrP4 qui expriment la PrP ovine : la barrière d'espèce étant partiellement levée, des cas de tremblante naturelle ont pu être transmis à ces souris, contrairement à des souris sauvages (pour lesquelles la transmission était négative ou très peu efficace).

Ainsi, les différentes souches d'ATNC peuvent être comparées, en se basant notamment sur la durée de la période d'incubation (délai entre la date d'inoculation et l'euthanasie en phase terminale de la maladie) et sur les caractéristiques histopathologiques du cerveau. En effet, l'intensité des lésions de spongiose au sein du système nerveux central (quantifiées dans neuf sites de substance grise de référence) permet de construire un graphe de lésion appelé profil lésionnel. L'allure de ce dernier caractérise une souche donnée dans une lignée de souris donnée. De même, la cartographie des dépôts de protéine prion pathologique PrP^{sc} (marqueur le plus spécifique de la maladie) ainsi que le type de dépôt de cette PrP contribuent également à caractériser les souches. Mise en évidence par des techniques d'immunohistochimie ou de Western Blot, la forme résistante (PrP^{res}) à une digestion enzymatique poussée est aussi étudiée *in situ* grâce à une approche originale de PET Blot (Paraffin-Embedded Tissue Blot). Cette technique consiste à recueillir des coupes histologiques issues de blocs de paraffine sur des membranes de nitrocellulose (au lieu de lames de verre), à faire agir une digestion forte des protéines par une enzyme (protéinase K) puis à visualiser la seule protéine potentiellement présente après ce traitement drastique, la protéine prion pathologique. Cette visualisation s'effectue après des étapes d'immunohistochimie à l'aide de différents anticorps spécifiques dirigés contre la protéine prion. L'analyse des données s'effectue ensuite de façon macroscopique en comparant les résultats obtenus avec les différents anticorps entre les différents lots expérimentaux.

Dans ce contexte, l'objectif de mon stage est de contribuer à l'étude des souches des agents prions grâce aux nouvelles approches histopathologiques développées au laboratoire. Plus précisément, il s'agit de participer au développement de la méthode du PET Blot différentiel, appliqué à des cerveaux de souris expérimentalement infectées par diverses souches de tremblante, en utilisant des anticorps reconnaissant différents épitopes de la PrP^{res}. Les résultats seront également comparés à ceux obtenus par la technique classique d'immunohistochimie.

Matériels et méthodes

Animaux et agents infectieux

Différentes souches de tremblante (79A, 87V, C506M3 et Chandler) sont transmises à des souris TgOvPrP4 âgées de quatre à six semaines. Elles subissent tout d'abord une injection intracrânienne d'un homogénat de cerveau de mouton atteint par la tremblante, puis un second passage est effectué. Les souris sont euthanasiées au stade terminal de la maladie, puis les cerveaux sont prélevés. Toutes ces expériences sont menées en conformité avec le comité d'éthique régional (CREEA[2] n°98), le comité d'éthique français (décret 87-848) et la directive européenne 86/609/EEC. Ainsi, tous les efforts sont faits pour minimiser le plus possible la souffrance et le nombre d'animaux utilisés. En parallèle, des cerveaux de moutons (région de l'obex) sont également utilisés comme témoins positifs et négatifs. De même, des souris TgOvPrP4 non inoculées (saines) ainsi que des souris KO pour le gène de la PrP murine sont utilisés comme témoins négatifs.

Préparation des prélèvements

Les cerveaux prélevés sont tout d'abord fixés à l'aide d'une solution tamponnée de formol 10 % pendant au moins 48 heures. Après enregistrement des identifiants et dates de prélèvement sur le formulaire correspondant, les cerveaux sont recoupés (sous un PSM dédié) en cinq sections coronales standardisées à l'aide d'un moule en acrylique servant de matrice. Ces coupes sont placées dans des cassettes compartimentées et identifiées qui sont ensuite plongées dans un bain d'acide formique 99 % pendant une heure à température ambiante afin d'inactiver l'ATNC. Puis les cassettes sont placées dans un automate (*Thermo Electron*) pour la déshydratation, l'imprégnation et l'inclusion en paraffine. Une station d'enrobage permet ensuite de réaliser la mise en blocs, à partir desquels des rubans de paraffine de 6 µm d'épaisseur seront confectionnés, grâce à un microtome. A ce stade, les rubans sont récupérés soit sur lames de verres (pour l'immunohistochimie et les colorations), soit sur membranes de nitrocellulose (pour le PET Blot).

Immunohistochimie

Cette technique, basée sur la détection immunologique de la protéine prion pathologique, permet de visualiser les morphotypes et la localisation des dépôts de PrP^{Sc} dans le cerveau.
Les lames blanches sont tout d'abord déparaffinées et réhydratées grâce à un automate (*Medite*) (Annexe 2).
Des lames témoins sont également traitées en parallèle afin de pouvoir valider la technique.
Des prétraitements sont ensuite effectués en vue de démasquer les sites antigéniques de la PrP^{Sc}. Pour cela, les lames sont plongées dans un bain d'acide formique 99 % pendant 5 à 10 minutes, puis placées en immersion dans un autoclave de paillasse à 121°C pendant 20 minutes. Ces prétraitements contribuent également à la dégradation de la PrP^{C} (qu'on ne souhaite pas mettre en évidence).

[2] CREEA : comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale

L'étape suivante consiste à bloquer les peroxydases endogènes (qui seraient à l'origine d'un signal non spécifique lors de la révélation) avec de l'eau oxygénée à 3 % (5 minutes).

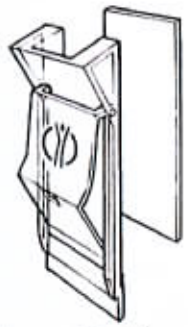


Figure 1 Système Coverplate

La suite de la technique s'effectue grâce à la méthode du Coverplate (*Thermo Shandon*) (Figure 1) : l'assemblage avec la lame se fait dans un bécher rempli de PBST (Tampon phosphate salin + Tween : 100 mM, pH 7.4, 9 % NaCl ; 0.1 % Tween 20) afin d'éviter la formation de bulles, puis l'ensemble est placé dans un rack. Ce système permet de réduire la manipulation des lames et limite la consommation de réactifs (150 µl suffisent), tout en favorisant le contact homogène des réactifs avec le tissu. De plus, le liquide ajouté entre la lame et le Coverplate reste dans la cavité jusqu'à l'ajout du réactif suivant, ce qui évite le dessèchement de l'échantillon, même lors de longues incubations.

Dans le cas d'une utilisation de l'anticorps primaire SAF84, une étape supplémentaire a pour but de parfaire le démasquage antigénique de la PrP^{Sc} et la dégradation de la PrP^{c} grâce à l'ajout de protéinase K (PK) à 20 µg/ml (37°C, 15 min).

Après rinçage avec du PBST, l'ajout de réactif bloquant (Kit EnVision, *Dako*) permet le blocage des sites non spécifiques (10 minutes).

L'incubation avec l'anticorps primaire monoclonal de souris : SAF84 (2 µg/ml, *SPI Bio*) ou P4 (1 µg/ml, *R-Biopharm*), se fait ensuite à 37°C pendant une heure.

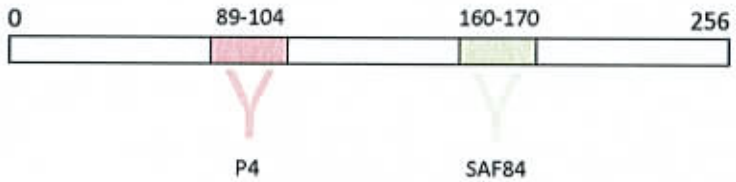


Figure 2 Schéma de la protéine prion ovine et sites de reconnaissance des anticorps primaires P4 et SAF84.

Puis, après rinçage avec du PBST, l'anticorps secondaire est ajouté (Kit EnVision, *Dako*) et laissé au contact de la lame pendant 30 minutes à température ambiante. Un polymère fixé à cet anticorps et couplé à la peroxydase conduit à une amplification du signal obtenu lors de la révélation. Le substrat utilisé, la diaminobenzidine (DAB), permet d'obtenir une coloration brune en présence de PrP^{Sc}. Le signal est intensifié par l'ajout de chlorure de nickel (kit *Vector Laboratories*) : on obtient ainsi des dépôts noirâtres. La révélation est stoppée en plongeant les lames dans un bain d'eau ultrapure.

Une coloration à l'hématoxyline aqueuse permet ensuite de visualiser la structure des tissus : les lames sont plongées dans l'hématoxyline pendant une à deux secondes, puis elles sont rincées dans l'eau ultrapure, placées dans du PBS, et à nouveau dans de l'eau afin de rincer les sels. On observe ainsi les noyaux colorés en bleu foncé et le cytoplasme en bleu pâle.

Pour terminer, les lames sont déshydratées par l'automate et montées sous lamelles grâce à une colleuse.

On peut ensuite faire l'observation et l'analyse des résultats grâce à un microscope couplé à une station d'analyse d'images (logiciel Morpho Expert, Explora Nova).

Paraffin-Embedded Tissue Blot (PET Blot)

Il s'agit d'une technique permettant de visualiser *in situ* la PrP^{res} à partir de coupes histologiques recueillies sur membranes de nitrocellulose.

La première étape consiste à préparer les membranes : celles-ci doivent tout d'abord être recoupées suivant la taille de l'échantillon, puis déposées dans de l'eau distillée chauffée (40°C). Les coupes histologiques sont recueillies sur ces membranes qui sont ensuite placées à l'étuve pour séchage (55°C, 1h). A ce stade, les membranes peuvent être conservées à plat, à l'abri de la poussière et de la lumière, jusqu'à leur utilisation.

Avant de réaliser le PET Blot proprement dit, les membranes doivent être déparaffinées (Annexe 3). L'automatisation n'étant pas possible dans ce cas, et pour des raisons d'Hygiène et Sécurité, le xylène est substitué par du Clearify (40°C, 2 x 10 min), puis on effectue deux bains d'isopropanol 100° (2 x 10 min) pour la déshydratation. Les membranes sont laissées à sécher pendant une nuit à température ambiante.

Le lendemain, elles sont humidifiées dans du TBST tiède (Tampon Tris salin + Tween : 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl ; 0.05 % Tween 20) pendant 10 minutes. Une digestion enzymatique à la PK (250 µg/ml) est effectuée dans un four à hybridation (55°C, 8h) en présence d'un tampon constitué de 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.1 % Brij 35. Suite à ce traitement drastique, la seule protéine encore détectable est la PrP^{res}, que l'on souhaite mettre en évidence. Des contrôles PK négatifs seront également effectués pour vérifier la validité de la méthode vis-à-vis de la spécificité de détection de la PrP^{res} par rapport à la PrP^{c}.

Après rinçage avec du TBST (2 x 10 min), les protéines présentes sur les membranes sont dénaturées par du thiocyanate de guanidium 4M (10 min). Un nouveau rinçage est effectué avec du TBST (5 x 5 min) avant d'ajouter l'anticorps primaire monoclonal de souris : SAF84 (1/2500) ou P4 (1/1000), dilué dans la solution bloquante (lait déshydraté 0,2 % dans du TBST). Suite à l'incubation d'une nuit à température ambiante, trois lavages sont effectués dans du TBST (3 x 10 min), puis l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline (*SouthernBiotech*) est ajouté (37°C, 1h). Cet anticorps est dilué au 1/500 dans la solution bloquante.

Les membranes sont rincées dans du TBST (5 x 10 min), puis plongées dans du tampon NTM (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) deux fois 5 minutes, afin d'ajuster le pH qui doit être alcalin pour permettre l'activité de la phosphatase alcaline.

Enfin, la révélation est effectuée grâce à un kit (*Vector Laboratories*) : le NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium/5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate), substrat de la phosphatase alcaline, est laissé au contact de la membrane pendant 20 à 30 minutes, puis il est rincé dans de l'eau ultrapure.

Une fois sèches, les membranes sont placées entre deux plaques de verre et sont observées à l'aide d'un stéréomicroscope couplé à une station d'analyse d'images (logiciel Visiolab 2000, *Biocom*). On observe ainsi des dépôts bleus foncés correspondant à la présence de PrP^{res}.

Résultats

Afin de contribuer à l'étude des maladies à prions, la méthode du PET Blot a été appliquée à des cerveaux de souris expérimentalement infectées par diverses souches de tremblante. De façon originale, cette technique permet de visualiser facilement la distribution de la PrP pathologique *in situ* dans sa forme résistante à une digestion enzymatique.

Contrôles et validations

➢ Choix de l'anticorps secondaire

Au laboratoire, deux types d'anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline étaient disponibles : un anticorps anti-souris IgG2b produit chez la chèvre et un anticorps anti-souris IgG (H+L) produit chez le lapin. Une première série de PET Blot, réalisée sur des témoins positifs ovins, a eu pour but de vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire vis à vis de l'anticorps primaire (SAF84 ou P4). Ces deux anticorps monoclonaux anti-prion sont produits chez la souris. Le premier à partir de scrapie associated fibrils (SAF) isolés de cerveaux de hamsters infectés par une souche de tremblante (263K), le deuxième à partir d'un peptide de synthèse. Les résultats obtenus avec l'anticorps P4 sont représentés dans la figure 3 qui confirme l'importance du choix de l'anticorps secondaire. On constate en effet que l'anticorps secondaire IgG2b ne permet pas de mettre en évidence la PrP^{res} lorsque l'anticorps primaire utilisé est P4, puisqu'aucun marquage n'a pu être détecté dans ce cas. A l'inverse, l'utilisation de l'anticorps secondaire IgG (H+L) conduit à une forte positivité. En conséquence, l'anticorps IgG (H+L) est retenu dans le cas de P4, et l'anticorps IgG2b reste utilisé, comme validé préalablement, avec SAF84.



IgG2b IgG (H+L)

Figure 3 Choix de l'anticorps secondaire (dans le cas de l'utilisation de l'anticorps primaire P4) à partir de témoins positifs ovins (région de l'obex)

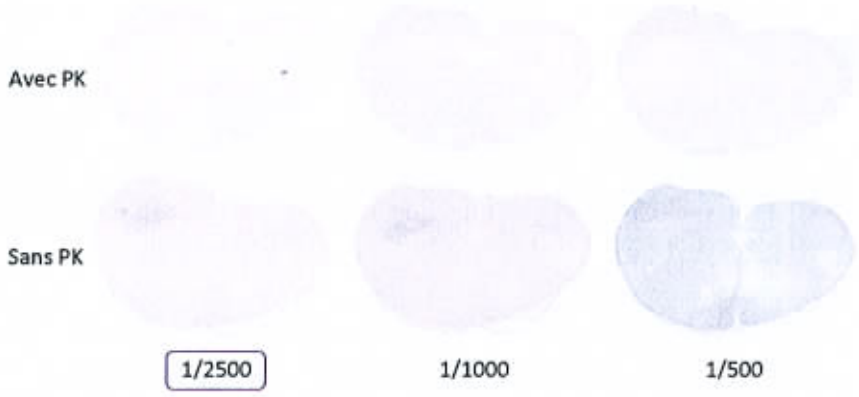
➢ Choix de la dilution de l'anticorps primaire

Pour chacun des deux anticorps primaires à disposition, plusieurs essais de dilutions ont été réalisés sur des coupes successives issues d'un même bloc.

Ainsi, l'anticorps SAF84 a été testé sur des témoins négatifs et positifs ovins, aux dilutions suivantes : 1/2500, 1/1000 et 1/500, en présence ou en absence de PK (Figure 4). En présence de PK, aucun marquage n'est visualisé pour les témoins négatifs sains, tandis que pour les moutons atteints de tremblante, une positivité croissante est observée au fur et à mesure que l'on abaisse la dilution de SAF84. Cependant, les dilutions 1/1000 et 1/500 semblent conduire à un marquage non spécifique en raison d'une saturation du signal. De ce fait, la dilution choisie pour SAF84 est la dilution 1/2500 qui permet d'obtenir une intensité de marquage suffisante, sans générer de marquage non spécifique. En absence de PK, les témoins négatifs présentent un marquage qui correspond en théorie à la détection de la PrP^{c} (puisque celle-ci n'a pas été digérée). Ce marquage est très intense à la dilution

1/500, mais on peut penser qu'il s'agit d'un marquage non spécifique étant donné la forte différence d'intensité par rapport aux deux autres dilutions. Les témoins positifs présentent quant à eux un marquage plus faible pour les trois dilutions alors qu'on aurait pu s'attendre à une forte positivité du fait de l'absence de digestion. Une interprétation de ce résultat sera donnée dans la partie discussion.

Témoins négatifs ovins :



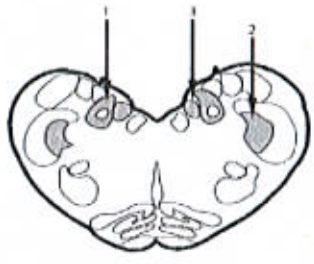


Schéma de l'obex

1 : noyau du tractus solitaire ; 2 : noyau du tractus spinal du nerf trijumeau ; 3 : noyau dorsal du nerf vague

Témoins positifs ovins :

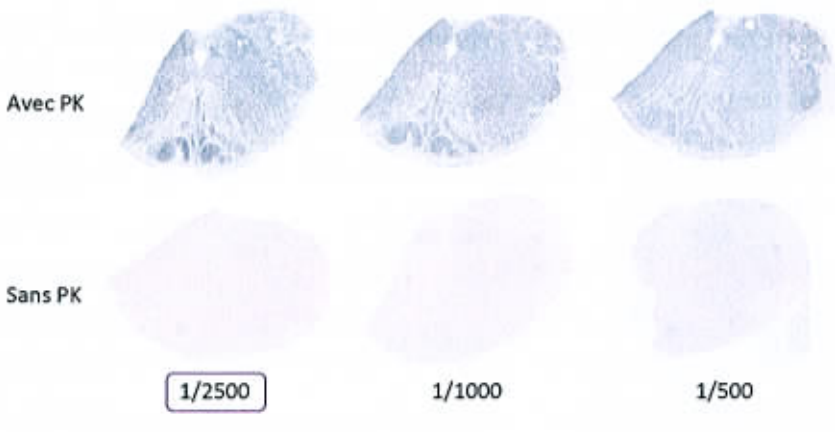


Figure 4 Choix de la dilution de l'anticorps primaire monoclonal anti-prion SAF84. Détection, par la méthode du PET Blot, de la PrP^{c} et de la PrP^{res} dans des cerveaux de moutons (région de l'obex) atteints ou non de tremblante.

Concernant l'anticorps P4, les dilutions 1/2000, 1/1000 et 1/500 ont été testées sur des cerveaux de souris infectées par la souche de tremblante C506M3 (Figure 5). La dilution 1/500 semble conduire à un marquage légèrement plus intense, cependant la différence est faiblement notable, d'où la difficulté d'interprétation de cette expérience. Toutefois, la dilution utilisée par la suite a été la dilution intermédiaire 1/1000.



Figure 5 Choix de la dilution de l'anticorps primaire monoclonal anti-prion P4. Détection, par la méthode du PET Blot, de la PrP^{res} dans le tronc cérébral et le cervelet d'une souris TgOvPrP4 infectée par la souche de tremblante C506M3.

➢ Analyse de cerveaux de souris saines et de souris KO

Hormis les témoins négatifs ovins, deux autres types de témoins négatifs murins ont été étudiés : des cerveaux de souris saines et des cerveaux de souris KO (Knock Out) pour le gène de la PrP. Ces témoins ont été analysés avec chaque anticorps primaire (SAF84 et P4), et ont également fait l'objet d'analyses avec et sans PK (Figure 6). Ainsi, en présence de PK, le résultat est négatif à la fois pour les souris saines (A et B) et pour les souris KO (D et E), quel que soit l'anticorps primaire utilisé. En revanche, en absence de PK, on observe une réaction colorée : la souris KO n'exprimant pas le gène de la PrP, on peut en déduire que le marquage visualisé est non spécifique (F). Il est en fait dû au chromogène (précipités de NBT/BCIP) resté piégé par le tissu non digéré. Il en est de même pour le marquage observé dans le cas des souris saines (C), même si dans ce cas on détecte également en théorie la PrP^c.

Cerveaux de souris TgOvPrP4 saines :

A
SAF84
Avec PK

B
P4
Avec PK

C
P4
Sans PK

Cerveaux de souris KO :

D
SAF84
Avec PK

E
P4
Avec PK

F
P4
Sans PK



Figure 6 Analyse par PET Blot de cerveaux de souris saines (A, B et C) et de cerveaux de souris KO (D, E et F)

➢ Effet durée de la digestion à la PK

Pour chaque anticorps primaire, une cinétique de digestion de la PrP par la PK a été réalisée. En effet, la résistance à la digestion par la PK dépend de la durée d'action de l'enzyme à une concentration donnée.

Avec l'anticorps SAF84 (Figure 7), on constate peu de différences entre 2h, 4h et 6h de digestion, tandis qu'au bout de 8h l'intensité du marquage est réduite de façon notable. Cela laisse penser qu'une digestion de 8h est « trop poussée » et qu'une digestion de 4 à 6h serait plus adaptée pour mettre en évidence un maximum de PrP^{res} à l'aide de cet anticorps reconnaissant la partie C-terminale de la PrP.



Figure 7 Tronc cérébral et cervelet d'une souris TgOvPrP4 infectée par la souche de tremblante 87V (lot n°1 du deuxième passage). Anticorps SAF84 (1/2500).

Cette cinétique a ensuite été réalisée avec l'anticorps P4 (Figure 8). Cette fois-ci, seule la coupe placée en absence de PK présente un marquage (qui correspond à la détection de la PrP^{c}). En effet, en présence de PK, on n'observe aucun marquage quelle que soit la durée de digestion testée. L'anticorps P4 ne semble donc pas permettre la détection de la PrP^{res} pour cette souche de tremblante.

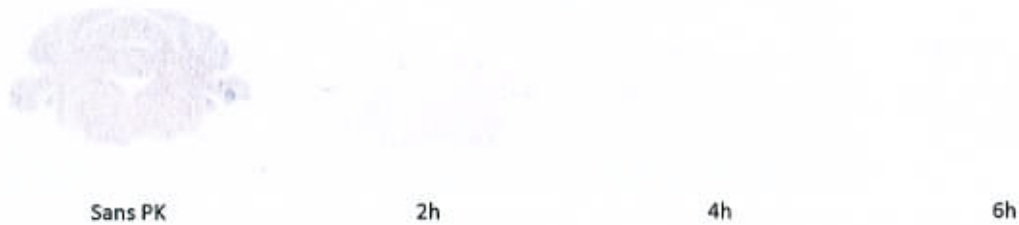


Figure 8 Cerveau d'une souris TgOvPrP4 infectée par la souche de tremblante 87V (lot n°1 du deuxième passage). Anticorps P4 (1/1000).

Détection différentielle de la PrP^{res}

➢ Résultats du deuxième passage de la souche 87V (lot n°1)

La figure 9 représente les résultats obtenus par PET Blot pour les cerveaux de deux souris infectées par la souche de tremblante 87V (lot n°1 du deuxième passage). Chaque cerveau a été analysé de trois manières différentes : une première fois avec l'anticorps SAF84 en présence de PK, puis avec l'anticorps P4 en présence de PK et enfin avec l'anticorps P4 en absence de PK. Ainsi, en présence de PK, on obtient un marquage très intense avec l'anticorps SAF84, alors qu'avec l'anticorps P4 le résultat est négatif quel que soit le niveau de coupe. A l'inverse, avec ce même anticorps, mais en absence de PK, on parvient à détecter la PrP^{c}.

Cerveau de la souris n°1 :

SAF84
Avec PK

P4
Avec PK

P4
Sans PK

Cerveau de la souris n°3 :

SAF84
Avec PK

P4
Avec PK

P4
Sans PK

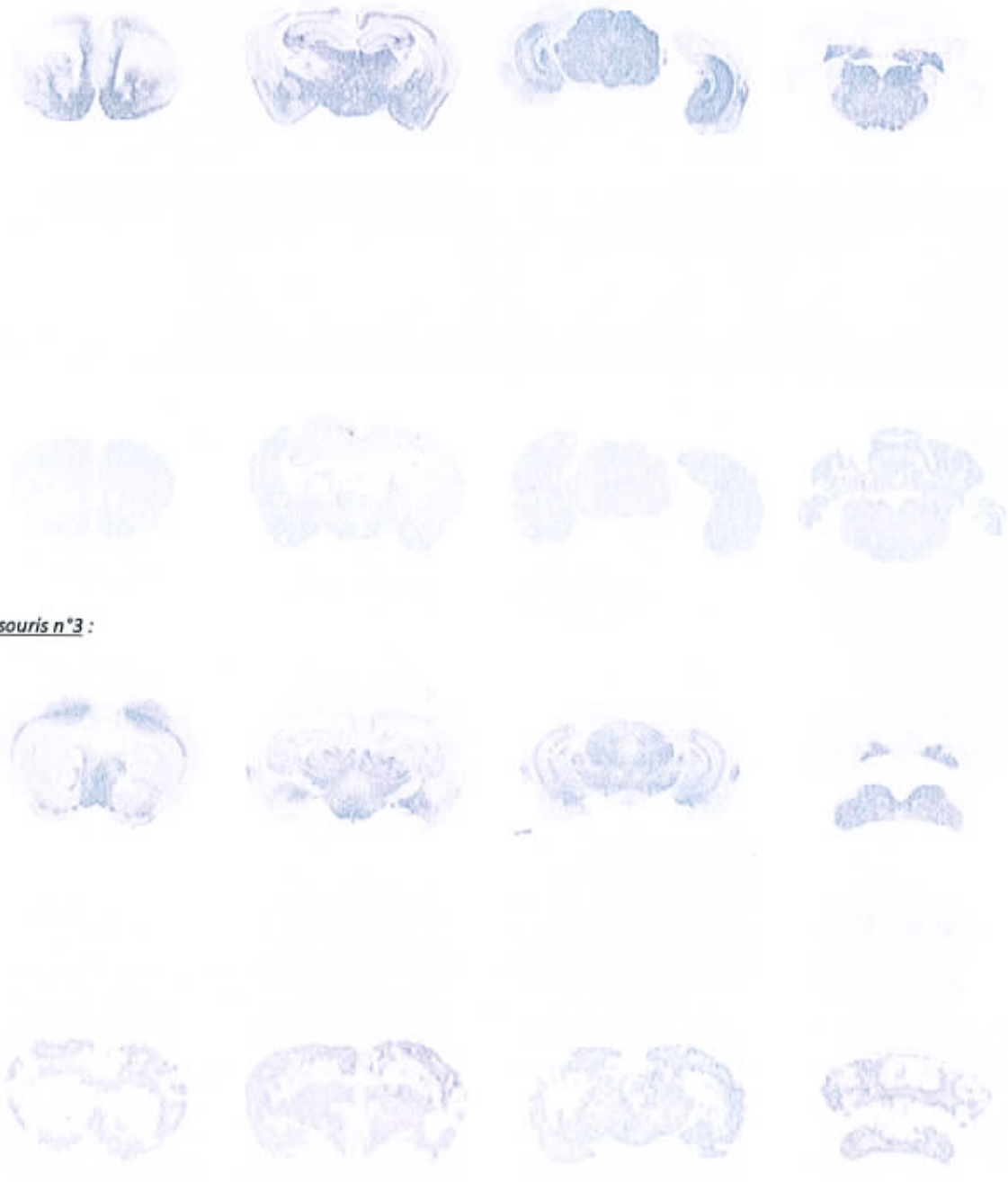


Figure 9 Détection différentielle de la PrP^{res} dans des cerveaux de souris TgOvPrP4 infectées par la souche de tremblante 87V (lot n°1 du deuxième passage).

➢ Résultats du deuxième passage de la souche 87V (lot n°2)

De la même façon que précédemment, les cerveaux de deux souris infectées par la souche de tremblante 87V (lot n°2 du deuxième passage) ont été analysés à trois reprises par PET Blot (Figure 10). De façon similaire au lot n°1, le marquage obtenu en présence de PK avec l'anticorps SAF84 est très intense, en particulier pour la souris n°8. Par ailleurs, avec l'anticorps P4 le résultat est négatif en présence de PK et positif en absence de PK du fait de la non digestion de la PrP^{c}.

Cerveau de la souris n°5 :

SAF84
Avec PK



P4
Avec PK

P4
Sans PK

Non
disponible

Cerveau de la souris n°8 :

SAF84
Avec PK



P4
Avec PK

P4
Sans PK



Figure 10 Détection différentielle de la PrP^{res} dans des cerveaux de souris TgOvPrP4 infectées par la souche de tremblante 87V (lot n°2 du deuxième passage).

➢ Résultats du premier passage de la souche 87V

Suite aux résultats obtenus pour le deuxième passage de la souche 87V, des cerveaux de souris issues du premier passage de cette même souche ont été analysés (Figure 11) afin de vérifier si des différences étaient observables entre les deux passages. En effet, dans le cas du deuxième passage, la PrP^{res} n'était pas détectée par l'anticorps P4.

A l'inverse, pour le premier passage, on observe un marquage en utilisant ce même anticorps. Ce marquage reste néanmoins plus faible que celui obtenu à l'aide de l'anticorps SAF84.

SAF84

P4



Figure 11 Détection différentielle de la PrP^{res} dans des cerveaux de souris TgOvPrP4 infectées par la souche de tremblante 87V (premier passage).

Distribution neuro-anatomique de la PrP^{res}

La figure 12 représente les résultats obtenus par PET Blot pour des cerveaux de souris infectées par la souche de tremblante 87V (deuxième passage). On visualise ainsi la distribution de la PrP^{res} au niveau des différents sites anatomiques du cerveau. En comparant les cerveaux de souris entre eux, on peut donc déterminer s'il existe des variations interindividuelles au sein d'une même expérimentation. De cette façon, on remarque que la localisation des dépôts de PrP^{res} est relativement similaire, cependant l'intensité du marquage varie. En effet, pour chaque cerveau, on détecte un marquage au niveau du cortex, de l'hippocampe, du thalamus, de l'hypothalamus et du tronc cérébral. On observe cependant un léger marquage dans le cervelet de la souris n°5 du lot n°1 contrairement aux autres souris.

Souris du lot n°1 :

Souris n°1

Souris n°3

Souris n°5

Non disponible

Souris n°9

Souris du lot n°2 :

Souris n°5

Souris n°8

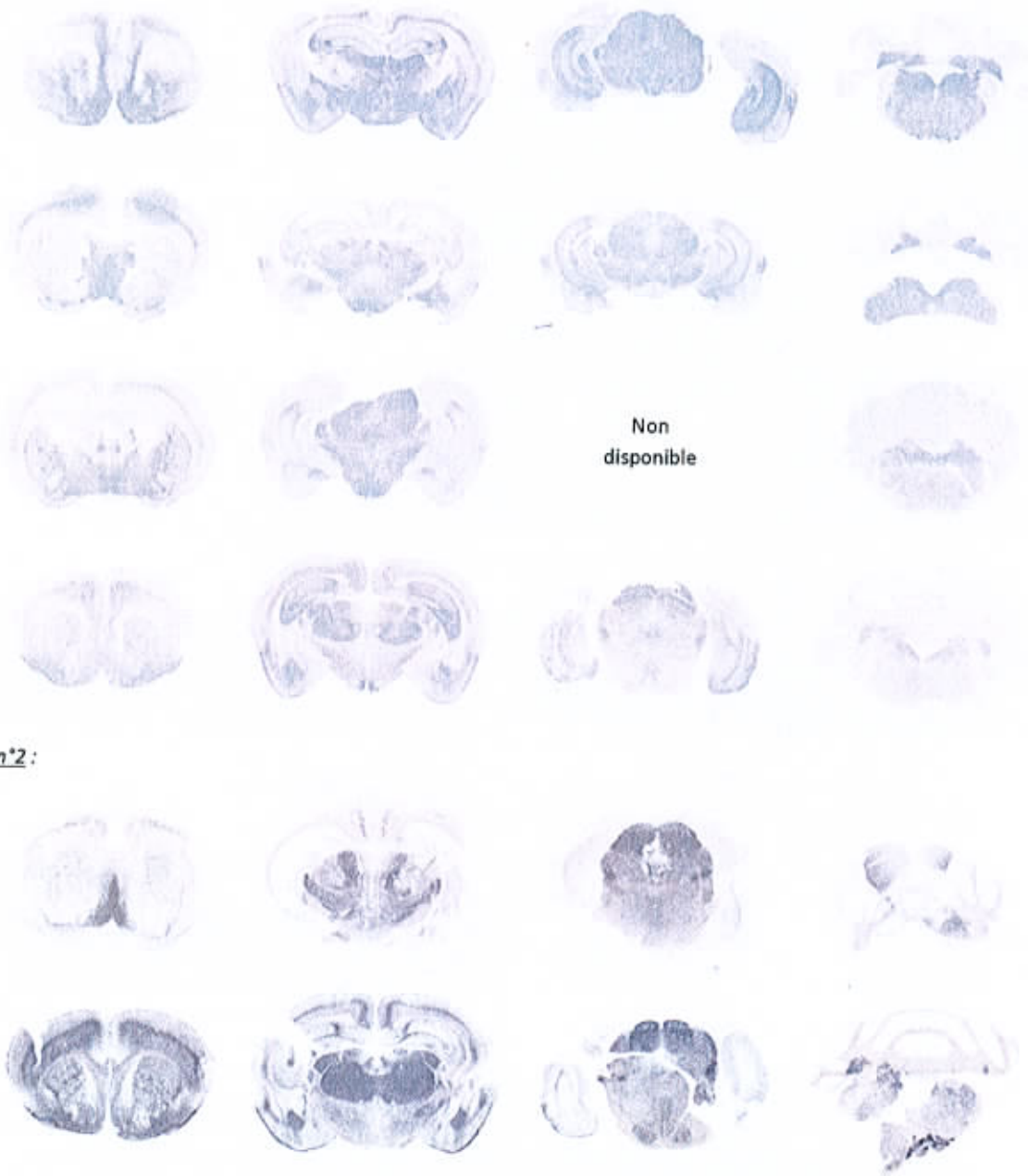


Figure 12 Distribution neuro-anatomique de la PrP^{res} dans des cerveaux de souris TgOvPrP4 infectées par la souche de tremblante 87V (lot n°1 et 2 du deuxième passage). Anticorps SAF84 (1/2500).

Détection de la PrP^{sc} par immunohistochimie

Dans la figure 13 sont représentés les résultats obtenus par immunohistochimie, à l'aide de l'anticorps P4, pour diverses souches de tremblante, dont la souche 87V. Par cette technique, on parvient à distinguer les différents morphotypes de dépôts de PrP^{sc} (linéaire, intraneuronal ou en grains).

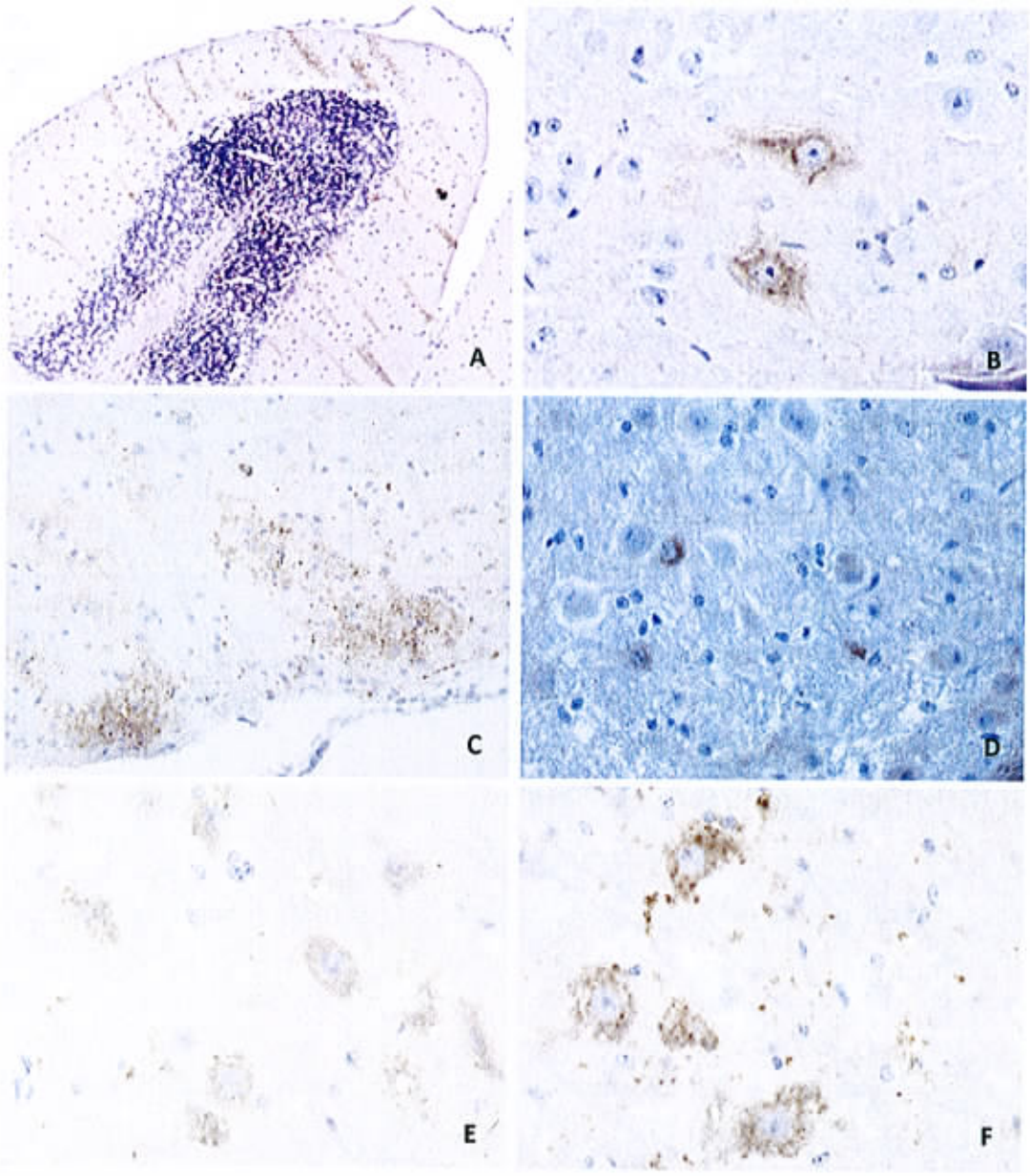


Figure 13 Détection de la PrP^{sc} par immunohistochimie (anticorps P4, dilution 1/1000) dans des cerveaux de souris expérimentalement infectées par diverses souches de tremblante. A. Cervelet de souris infectée par la souche de tremblante Chandler, marquage linéaire (kit ABC Vector) ; B. Cerveau de souris infectée par la souche de tremblante Chandler, marquage intraneuronal (kit ABC Vector) ; C. Cerveau de souris infectée par la souche de tremblante C506M3, marquage en grains (kit ABC Vector) ; D. Cerveau de souris infectée par la souche de tremblante 87V lot n°1, marquage intraneuronal (kit ABC Vector) ; E. Cerveau de souris infectée par la souche de tremblante 79A, marquage intraneuronal (kit ABC Vector) ; F. Cerveau de souris infectée par la souche de tremblante 79A, marquage intraneuronal (kit Envision).

Utilisation de l'anticorps P4 dans les analyses par PET Blot

Dans le cadre des études d'identification des souches d'ATNC, la méthode du PET Blot a été utilisée au laboratoire sur des cerveaux de souris expérimentalement infectées, à l'aide de l'anticorps anti-prion SAF84. Dans le présent mémoire, un des objectifs a été d'étudier la possibilité d'appliquer la méthode du PET Blot avec un autre anticorps (P4) reconnaissant un autre épitope de la PrP^{res}. En effet, des études biochimiques de la PrP^{res}, marqueur le plus spécifique de ces maladies, ont montré qu'il était possible de distinguer différentes souches d'ATNC sur la base d'une reconnaissance différente par ces deux anticorps [17, 18].

Pour cela, dans une première partie, nous avons « revisité » les conditions d'application du PET Blot en validant les dilutions et les temps d'application de la PK. De façon inattendue, nous avons constaté dans le premier test la nécessité de choisir un anticorps secondaire différent de celui habituellement utilisé avec l'anticorps SAF84.

Puis l'analyse des témoins positifs et négatifs a permis d'établir le fait d'utiliser les anticorps SAF84 et P4 aux dilutions respectives de 1/2500 et 1/1000. Cependant l'expérience ayant pour but de choisir la dilution la plus adaptée pour l'anticorps P4 a été particulièrement difficile à interpréter. En effet, les analyses réalisées avec l'anticorps P4 conduisent à un signal régulièrement faible, malgré la forte présence de PrP^{res} détectée par SAF84. L'hypothèse qui peut être formulée suite à ce constat est que le site antigénique reconnu par P4 serait entièrement digéré par la PK, rendant ainsi la PrP^{res} non détectable. Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs essais de durées d'application de la PK ont été effectués sur la souche de tremblante 87V (deuxième passage) afin d'aménager la digestion. Mais dans le cas de cette souche, même la réduction de la durée de digestion enzymatique n'a pas permis de détecter la PrP^{res}, suggérant l'absence de l'épitope reconnu par P4, avant même l'application de PK.



La faiblesse du taux de PrP^{res} détectée avec l'anticorps P4 semble confirmée par les analyses immunohistochimiques pour lesquelles on observe un marquage plutôt limité, de type intraneuronal. Ainsi, on peut penser que la souche 87V en deuxième passage conduit à l'accumulation d'une PrP pathologique naturellement et majoritairement tronquée[3] au niveau de la séquence 89-104.

En effet, l'importance de la résistance à une digestion par la PK peut varier en fonction de la souche comme l'indique par exemple dans nos analyses, la transmission de la souche C506M3 à la souris TgOvPrP4. Mais cela peut également être lié au passage considéré. En effet, lors de l'analyse du premier passage de 87V, on a pu observer

[3] Par des digestions métaboliques endogènes, comme cela a pu être décrit dans la littérature [19]

une plus grande réactivité par rapport au deuxième passage. Ainsi, l'adaptation de la souche 87V entre le premier et le deuxième passage peut se traduire par une digestion endogène plus importante.
Mais dans tous les cas, on constate qu'on détecte beaucoup moins de PrP^{res} avec P4 comparativement à SAF84. Ce qui ne semble pas être le cas dans les analyses biochimiques. Ainsi, il pourrait malgré tout être utile de travailler sur la détectabilité de l'anticorps P4 en introduisant par exemple un système d'amplification ou en améliorant le démasquage antigénique (par exemple en faisant varier la concentration de thiocyanate de guanidium).

Contrôles sans PK

Bien qu'il ne s'agisse pas du cœur du sujet, des contrôles sans PK ont été réalisés en parallèle lors des différentes séries de PET Blot. En effet, dans les maladies à prions, la forme pathologique de la PrP, qui s'accumule chez l'hôte infecté, se distingue de la forme physiologique cellulaire par ses propriétés biochimiques, en particulier une résistance partielle à la dégradation par des protéases. Alors que la PrP^{c} est totalement digérée par ces enzymes, la PrP^{res} n'est qu'en partie dégradée, la partie N-terminale étant la plus sensible. Ainsi, les analyses réalisées dans cette situation (sans PK) devraient en théorie nous permettre de détecter la présence de PrP^{c}. De façon inattendue, ces analyses ont souligné une hétérogénéité des résultats : dans le cas des cerveaux de souris, le marquage est très intense (certainement du fait de la présence de PrP^{c}), tandis que les témoins positifs ovins analysés avec l'anticorps SAF84 présentent un faible marquage (alors qu'on aurait également pu s'attendre à une forte positivité). Souvent, les marquages intenses apparaissent comme non spécifique, ce qui est démontré par les signaux détectés chez les souris KO pour le gène de la PrP. Pour expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Dans le cas de signaux intenses, il est vraisemblable qu'ils résultent de la non digestion des coupes, le chromogène (NBT/BCIP) restant piégé sous les tissus soulevés au cours du processus. Dans le cas des signaux plus faibles mais identifiables dans des régions précises, tout porte à croire qu'il s'agit bien de PrP^{c}. Pour cependant favoriser la détection de PrP^{c}, il pourrait être utile de réaliser un démasquage antigénique semblable à celui effectué au cours d'une analyse par IHC. Pour vérifier cela, il suffirait d'appliquer une courte digestion enzymatique (1h par exemple) afin de voir si un marquage plus important est obtenu dans ces conditions. Un autre élément inattendu est celui d'une détection de PrP^{c} moins importante dans le témoin ovin positif. Une hypothèse possible est celle basée sur la physiopathologie des maladies à prions, c'est à dire que chez l'animal malade, la PrP^{sc} s'accumulerait aux dépends de la PrP^{c}. Celle-ci ne serait donc visualisée qu'en faible quantité, tandis que la PrP^{sc}, dont les sites antigéniques n'ont pas été démasqués, ne serait pas détectable.

Atouts et limites du PET Blot

Comme le montrent les résultats obtenus, le PET Blot présente de nombreux atouts. En effet, il permet de visualiser directement la distribution de la protéine prion pathologique dans le cerveau, contrairement à l'IHC qui nécessite une retranscription sur papier à partir de l'observation microscopique. De plus, la méthode du PET Blot semble plus spécifique puisque, suite à l'importante digestion enzymatique, seule la PrP^{res} reste détectable. Enfin, cette technique présente également l'avantage de pouvoir s'appliquer à des blocs de paraffine archivés, contrairement à l'histoblot dont le principe est similaire mais qui s'effectue uniquement à partir de tissu non fixé et congelé.

Cependant on peut noter quelques limites : la méthode du PET Blot requiert une certaine rigueur dans la préparation des coupes qui doivent s'effectuer exactement au niveau des sites de référence afin que les résultats des différentes analyses soient comparables. Par conséquent, cela limite également le nombre de membranes par expérimentation. De plus, l'utilisation de membranes entraine certaines contraintes de manipulations (fragilité des membranes, manipulation uniquement avec des pinces, nécessité d'éviter tout chevauchement, pas d'automatisation possible). De ce fait, la standardisation et la reproductibilité des analyses sont moins aisées. Enfin, même si le PET Blot permet une visualisation rapide de la distribution de la PrP pathologique *in situ*, il présente une résolution cellulaire pauvre, qui nécessite d'effectuer en parallèle une analyse par IHC.

Le PET Blot constitue donc un outil complémentaire important dans la recherche histologique et biochimique des caractéristiques de la PrP pathologique.

Conclusion

Le sujet de cette étude comportait deux objectifs : le premier était de développer la mise en place d'un outil de détection de la protéine prion pathologique, la méthode du PET Blot, en étudiant l'impact de différents paramètres sur la sensibilité et la spécificité de la détection. Les résultats collectés au cours de ce stage, notamment ceux des différents contrôles réalisés, ont ainsi contribué à renforcer la valeur de l'apport de la méthode du PET Blot dans la thématique des maladies à prions. En particulier, la cinétique de digestion à la PK a permis de réduire la durée de mise en œuvre de la technique (4 à 6h de digestion au lieu de 8h), tout en améliorant la sensibilité de détection de la PrP^{res}.

Si cette étude a conforté de façon très satisfaisante l'intérêt de cette approche avec l'anticorps SAF84, elle soulève encore des questions dans le cas d'une utilisation avec l'anticorps P4, pour laquelle les marquages de PrP^{res} sont restés très modestes. Compte tenu de cette faible détection de la PrP^{res} à l'aide de l'anticorps P4, le deuxième objectif, qui était d'appliquer cette approche à l'étude des souches d'agents responsables de ces maladies, a été plus difficile à atteindre. Cependant, ce travail a permis de dégager de nouvelles pistes méthodologiques à tester. Il serait en particulier intéressant de tester d'autres conditions d'application afin de tenter d'augmenter l'intensité du marquage obtenu avec cet anticorps. Il est aussi simplement possible que la sensibilité de cet anticorps ne soit pas idéale dans une application de détection *in situ*.

Enfin, à la suite de ce travail, il apparaît intéressant de prévoir l'utilisation d'autres anticorps anti-prion reconnaissant un épitope intermédiaire entre P4 et SAF84. Ce qui pourrait constituer un moyen d'affiner la différentiation des souches d'agents responsables des maladies à prions, avec peut-être une meilleure sensibilité de détection.

Bibliographie

[1] Dormont D. *Les maladies à prions.* Médecine thérapeutique, 2000, Vol. 6, n°10, pages 837-842.

[2] Hauw JJ., Haïk S., Faucheux B. et al. *Neuropathologie des maladies à prions.* Neurologies, 2001, Vol. 4, pages 327-329

[3] Dormont D. *Les agents transmissibles non conventionnels ou prions.* Virologie, 1997, Vol. 1, Hors série n°1, pages 11-22.

[4] Baron T. *Identification of inter-species transmission of prion strains.* Journal of neuropathology and experimental neurology, 2002, Vol. 61, n°5, pages 377-383.

[5] Lantier F., Marc D., Sarradin P. et al. *Le diagnostic des encéphalopathies spongiformes chez les ruminants.* INRA Prod. Anim., 2004, Hors série, pages 79-86.

[6] Deslys JP. *Maladies à prions et risques pour l'homme.* Sang Thrombose Vaisseaux, 2001, Vol. 13, Supplément, pages 5-19.

[7] Direction départementale des services vétérinaires de la Meuse. *Questions-réponses concernant la tremblante.* En ligne : http://ddsv55.agriculture.gouv.fr/article.php3?id_article=268 (Consulté le 19/03/09).

[8] Ministère de l'agriculture et de la pêche. Site d'information sur l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine. En ligne : http://agriculture.gouv.fr/esbinfo/esbinfo.htm (Consulté le 19/03/09).

[9] Belay E., Maddox R., Williams E. et al. *Chronic wasting disease and potential transmission to humans.* Emerging Infectious Diseases, 2004, Vol.10, n°6, pages 977-984.

[10] Chabry J. *Introduction aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles.* En ligne : http://www.123bio.net/revues/jchabry/index.html (Consulté le 19/03/09).

[11] Lang CJ., Heckmann JG., Neundorfer B. *Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants.* Journal of the Neurological Sciences, 1998, Vol. 160, n°2, pages 128-139.

[12] Bruce ME., Will RG., Ironside JW. et al. *Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.* Nature, 1997, Vol. 389, n°6650, pages 498-501.

[13] Michael P. Alpers. *The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end.* Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences, 2008, Vol. 363, n°1510, pages 3707-3713.

[14] Prusiner SB. *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.* Science, 1982, Vol. 216, n°4542, pages 136-144.

[15] Büeler H., Aguzzi A., Sailer A. et al. *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.* Cell, 1993, Vol. 73, pages 1339-1347.

[16] Pan KM., Baldwin M., Nguyen J. et al. *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.* Proceedings of National Academy of Sciences USA, 1993, Vol. 90, pages 10962-10966.

[17] Biacabe AG., Laplanche JL., Ryder S. et al. *Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases.* EMBO reports, 2004, Vol. 5, n°1, pages 110-114.

[18] Baron T., Biacabe AG. *Molecular behaviors of "CH1641-Like" sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice TgOvPrP4.* Journal of Virology, 2007, Vol. 81, n°13, pages 7230-7237.

[19] Jeffrey M., Martin S., Gonzales L. *Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy.* Journal of General Virology, 2003, Vol. 84, pages 1033-1045.

Glossaire

Barrière d'espèce : la propriété de barrière d'espèce est basée sur la structure primaire de la PrP. Ainsi, une analogie entre les séquences d'acides aminés du donneur et du receveur favoriserait la conversion de la PrP^{c} du receveur selon le modèle imposé par la PrP^{sc} du donneur. Au contraire, des structures primaires trop différentes entre le donneur et le receveur empêcheraient cette conversion.

Gliose réactionnelle : prolifération des cellules gliales en réaction à un processus pathologique comme, par exemple, la perte de neurones.

PET Blot : Paraffin-Embedded Tissue Blot. Méthode permettant de visualiser *in situ* la PrP^{res}, à partir de coupes de tissus inclus en paraffine.

Prion : protéine représentant tout ou partie de l'agent infectieux responsable des ESST et ayant la particularité de résister à de très nombreux procédés de décontamination ou de stérilisation.

Souche : la notion de souche est basée sur les caractéristiques de pathogénicité observées chez des souris expérimentalement infectées. Les principaux paramètres pris en compte sont la transmissibilité, la durée d'incubation, le profil lésionnel, la distribution de la PrP^{sc}...

Spongiose : vacuolisation du tissu, lui donnant un aspect d'éponge.

Transmission horizontale : la transmission de la maladie est dite horizontale lorsqu'elle se réalise par contact avec un individu infecté (par action de la promiscuité par exemple).

ANNEXES

- Annexe 1 -

Traitements d'inactivation des ATNC

- Annexe 2 -

Protocole de l'analyse par immunohistochimie manuelle (Anticorps SAF84 ou P4)

- Annexe 3 -

Protocole de l'analyse par PET Blot (Anticorps SAF84 ou P4)

- Annexe 4 -

Poster - La méthode du PET Blot différentiel : principe & contributions à l'étude des souches d'agents responsables des maladies à prions

- Annexe 5 -

Logigramme - Processus général des études histopathologiques appliquées à des cerveaux de souris infectées par des ATNC

Annexe 1 : Traitements d'inactivation des ATNC

Groupe 1 : Produits et procédés inefficaces
Acide chlorhydrique Ammoniaque Chaleur sèche Eau bouillante Eau oxygénée Ethanol Formaldéhyde Glutaraldéhyde Rayons ionisants Ultraviolets Sodium Dodécyl Sulfate 0,5 %
Groupe 2 : Efficacité partielle
Autoclavage à 121°C pendant 30 min Soude 0,5 M pendant 30 min Hypochlorite de sodium 0,5 % pendant 15 min Sodium Dodécyl Sulfate 3 % à ébullition pendant 3 min
Groupe 3 : Efficacité importante
Autoclavage à 134°C pendant 18 min Soude 1 M pendant 1h Hypochlorite de sodium 2 % pendant 1h
Groupe 4 : Efficacité maximale
Soude 1 M pendant 1h, puis autoclavage à 134°C pendant 1h Hypochlorite de sodium 2 % pendant 1h, puis autoclavage à 134°C pendant 1h
Groupe 5 : Destruction
Incinération à plus de 800°C avec pyrolyse ou combustion

Annexe 2 : Protocole de l'analyse par immunohistochimie manuelle (Anticorps SAF84 ou P4)

Pour 10 lames :

Déparaffinage/Réhydratation	Automate (Programme n°2)	55 min
Prétraitement	Acide formique 99 % (En bac)	SAF84 : 10 min à TA P4 : 5 min à TA
Rinçage	Eau ultrapure (En bac)	2x5 min à TA
Autoclavage	En immersion (400 ml par bac) SAF84 : dans eau ultrapure P4 : dans tampon citrate pH 6,1 (40 ml de tampon citrate 10X + 360 ml d'eau ultrapure)	1 cycle : 20 min à 121°C
Blocage des peroxydases	H_2O_2 (En bac) : SAF84 : 15 ml H_2O_2 30 % + 150 ml d'eau ultrapure P4 : 18 ml H_2O_2 30 % + 132 ml d'eau ultrapure	5 min à TA
Rinçage	Eau ultrapure	5 min à TA
Montage en Coverplate	Assemblage dans un bécher rempli de PBST	
Démasquage antigénique (Uniquement pour SAF84)	Protéinase K (20 µg/ml) : 2,1 µl de PK dans 1,5 ml de PBS 0,1M	15 min à 37°C
Rinçage	Remplir le Coverplate avec du PBST	
Saturation	4 gouttes de solution bloquante (Kit EnVision)	10 min à TA
Anticorps primaire	SAF84 : 1/300 dans PBS 0,1M/Triton 0,1M P4 : 1/1000 dans diluant P4 Distribuer 150 µl par Coverplate	1h à 37°C
Rinçage	Remplir le Coverplate avec du PBST	
Anticorps secondaire	4 gouttes (Kit EnVision)	30 min à TA
Préparation de la DAB	Kit Vector Laboratories : 2,5 ml d'eau ultrapure + 1 goutte de Buffer + 2 gouttes de DAB + 1 goutte de peroxyde d'hydrogène + 1 goutte de chlorure de nickel	
Défaire le montage Coverplate et placer les lames sur un portoir		
Révélation	DAB	
Coloration	Hématoxyline aqueuse Eau ultrapure (2 bains) PBS Eau ultrapure	Quelques secondes dans chaque bain
Déshydratation	Automate (Programme n°10)	55 min
Montage sous lamelles		

Annexe 3 : Protocole de l'analyse par PET Blot
(Anticorps SAF84 ou P4)

Déparaffinage	Clearify préchauffé à 40°C	2x10 min
Déshydratation	Isopropanol 100°	2x10 min à TA
Séchage	Dans une boite de Pétri	1 nuit à TA
Humidification	TBST tiède	10 min
Digestion enzymatique	Protéinase K (250 µg/ml) dans tubes de 50 ml : Pour 1 tube : 1 ml de protéinase K (2500 µg/ml) + 9 ml de tampon PK	8h à 55°C (Four à hybridation)
Rinçage	TBST	2x10 min à TA
Dénaturation des protéines	Thiocyanate de guanidium 4M	10 min à TA
Rinçage	TBST	5x5 min à TA
Anticorps primaire	SAF84 : 0,59 mg/ml utilisé au 1/2500 P4 : 1 mg/ml utilisé au 1/1000 Dilution dans 4 ml de solution bloquante (pour 1 tube)	1 nuit à TA (Four à hybridation)
Rinçage	TBST	3x10 min à TA
Anticorps secondaire	Anti-souris couplé à la phosphatase alcaline IgG2b pour SAF84, IgG (H+L) pour P4 Dilution 1/500 dans 4 ml de solution bloquante (pour 1 tube)	1h à 37°C (Four à hybridation)
Rinçage	TBST	5x10 min à TA
Alcalinisation	NTM pH 9,5	2x5 min à TA
Révélation	NBT/BCIP (Kit Vector Laboratories) : 5 ml de Tris-HCl 100 mM pH 9,5 + 2 gouttes de réactif 1 (BCIP) + 2 gouttes de réactif 2 (NBT) + 2 gouttes de réactif 3 ($MgCl_2$)	20 à 30 min à TA
Rinçage	Eau ultrapure	Quelques minutes à TA
Séchage		

La méthode du PET-Blot différentiel : principe & contributions à l'étude des souches d'agents responsables des maladies à prions

Julie BUFFA, Mikaël LEBOIDRE, Céline RAYNAUD, Thierry BARON, Anna BENCSIK

INTRODUCTION :

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives identifiées chez l'homme (maladie de Creutzfeldt-Jakob) et l'animal (encéphalopathie spongiforme bovine, tremblante des petits ruminants...). Ces maladies sont associées à l'accumulation d'une protéine anormale, la protéine prion pathologique (PrP^p), caractérisée par sa résistance à de nombreux traitements chimiques et physiques. En raison du risque pour la santé publique, il est primordial de pouvoir distinguer les souches d'agents infectieux responsables de ces maladies. Il est possible d'identifier ces souches après transmission de la maladie à des modèles murins, sauvages et transgéniques[1], permettant de fixer les caractéristiques spécifiques de cet agent parmi les différentes souches existantes. Nous présentons ici la méthodologie dans l'exemple d'un modèle de souris transgéniques pour la protéine prion ovine (Tg(OvPrP)4), infectées par différentes souches de tremblante.

MATERIELS ET METHODES :

Cerveaux fixés de souris Tg(OvPrP)4 inoculées par voie intra-crânienne (homogénats de cerveaux d'animaux décédés de maladies à prions). Recoupés dans des sites de référence, avant d'être inclus en paraffine, mis en bloc, coupés au microtome, puis recueillis sur lames traitées ou sur membranes de nitrocellulose. La distribution de PrP^p est étudiée dans le cerveau par immunohistochimie (IHC). De façon originale, la méthode du PET-Blot est introduite pour faciliter l'examen macroscopique de cette distribution de PrP^p.

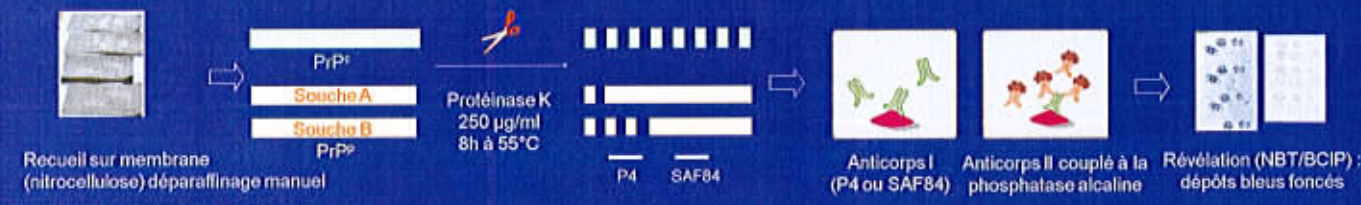


PRINCIPES :

➢ IHC



➢ PET-Blot



CONTROLES ET VALIDATIONS :

➢ Témoin positif ovin : choix de l'anticorps II



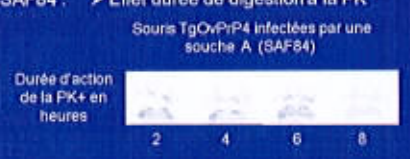
➢ Témoin négatif : Souris KO pour le gène de la PrP



➢ Choix de la dilution de l'anticorps SAF84 :



➢ Effet durée de digestion à la PK



EXEMPLES :

➢ Distribution neuro-anatomique de la PrP^p (SAF84) : Souris TgOvPrP4 infectées par une souche de type B



➢ Détection différentielle de la PrP^p (SAF84/P4) : Souris TgOvPrP4 infectées par une souche de type A



ATOUTS

- Spécificité
- Intensité
- Utilisation de blocs d'archives
- Détection de la PrP^{res} in situ
- Distribution de la PrP^p
- Facilité, rapidité, fidélité

LIMITES

- Rigueur dans la préparation des coupes
- Contraintes de manipulation :
  - Standardisation,
  - Reproductibilité moins aisées
- Nombre limité de membranes par analyse
- Résolution cellulaire pauvre

CONCLUSION :

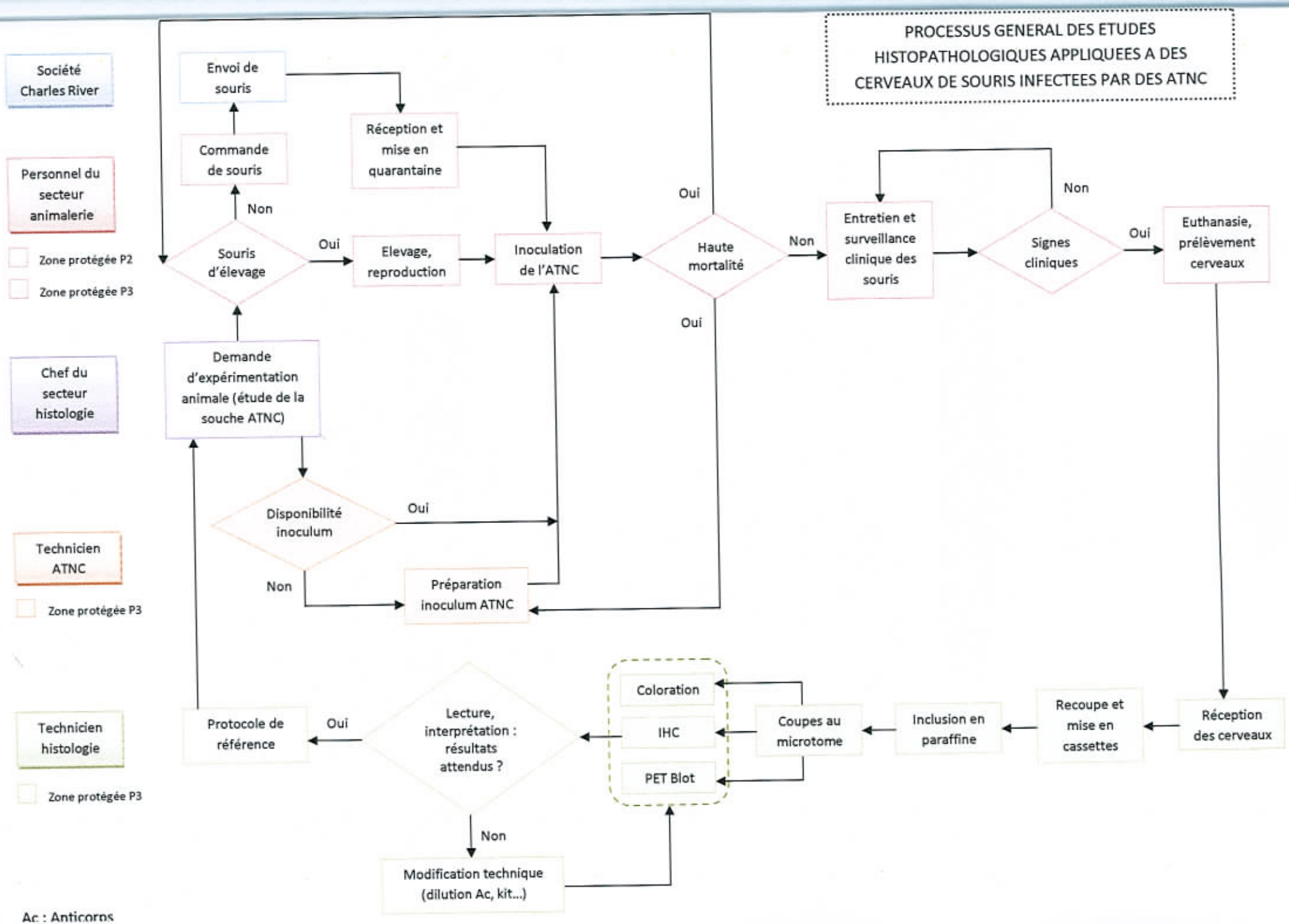
L'analyse par la méthode du PET Blot des cerveaux de souris Tg(OvPrP)4 expérimentalement infectées par les maladies à prions animales représente un outil complémentaire dans la recherche histologique et biochimique des caractéristiques de la PrP^p.

Remerciements : Émilie ANTIER, Rabah BELKEIR, Désiré CHALLIAU, Lateta CHOUAF-LAKHDAR, Lise OLLAGNIER, du service des animaleries rongeurs de l'Afssa de Lyon, pour leurs contributions respectives à ce travail.

Références : 1. Croot et al, 2001, Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene, J. Virol., 75, 5328-34

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
Unité ATNC, Lyon, France.

PROCESSUS GENERAL DES ETUDES HISTOPATHOLOGIQUES APPLIQUEES A DES CERVEAUX DE SOURIS INFECTEES PAR DES ATNC



Ac : Anticorps