

MALADIE DE CREUTZFELDT-JAKOB ET AUTRES AMYLOÏDOSES : PREVENTION DE LA TRANSMISSION IATROGENE

**Virologie Immunologie Moléculaires
Equipe Macro-Assemblages Protéiques
et Maladies à Prion (MAP2) Jouy-en-Josas**

Guillaume Fichet, PhD

Risques associés aux maladies à prion

< 300 cas cliniques mais

1 / 2000 porteurs asymptomatiques vMCJ au Royaume-Uni

1 / 20000 en France (Gil et *al.* 2013)

10 millions de personnes exposées (Chen et *al.* 2014)

Réplication extraneurale limitée pour le sporadique / étendue pour le variant

Risque iatrogène clairement identifié via le matériel médico-chirurgical :

- liste de produits inactivants totaux proposée par l'ANSM

PROTOCOLE STANDARD PRION (PSP)

Novembre 2011

Ce protocole sera révisé en fonction de l'évolution des connaissances

1) Prions de laboratoire (hamster 263K) (*in vitro* et *in vivo*)

**2) Détection de la protéine prion pathologique (PrP^{res})
par une technique *in vitro* directe : *Western-Blot***

**3) Inactivation prouvée sur un support par bioessai
(*tige métallique 5 mm*)**

1) LA SOUCHE TEST 263K

(robuste, reproductible, forts titres infectieux, modèle très bien décrit dans la littérature)

Critiques :

- Prions de mouton (tremblante) adaptés à un rongeur...
loin de la problématique de santé humaine

- La sensibilité aux procédés d'inactivation est souche dépendante (*Prusiner et coll, 2008*)

La sensibilité des prions aux procédés d'inactivation est souche-dépendante : exemple avec l'AUTOCLAVAGE 134°C

(Giles et al., PloS Pathog. 2008) / Prusiner Prix Nobel 2007

Resistance of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Prions to Inactivation

Kurt Giles^{1,2}, David V. Glidden³, Robyn Beckwith¹, Rose Seoanes¹, David Peretz^{1,2*}, Stephen J. DeArmond^{1,4}, Stanley B. Prusiner^{1,2,5*}

1 Institute for Neurodegenerative Diseases, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, 2 Department of Neurology, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, 3 Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, 4 Department of Pathology, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, 5 Department of Biochemistry and Biophysics, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America

Abstract

Distinct prion strains often exhibit different incubation periods and patterns of neuropathological lesions. Strain characteristics are generally retained upon intraspecies transmission, but may change on transmission to another species. We investigated the inactivation of two related prion strains: BSE prions from cattle and mouse-passaged BSE prions, termed 301V. Inactivation was manipulated by exposure to sodium dodecyl sulfate (SDS), variations in pH, and different temperatures. Infectivity was measured using transgenic mouse lines that are highly susceptible to either BSE or 301V prions. Bioassays demonstrated that BSE prions are up to 1,000-fold more resistant to inactivation than 301V prions while Western immunoblotting showed that short acidic SDS treatments reduced protease-resistant PrP^{Sc} from BSE prions and 301V prions at similar rates. Our findings argue that despite being derived from BSE prions, mouse 301V prions are not necessarily a reliable model for cattle BSE prions. Extending these comparisons to human sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and hamster Sc237 prions, we found that BSE prions were 10³- and 10⁶-fold more resistant to inactivation, respectively. Our studies contend that any prion inactivation procedures must be validated by bioassay against the prion strain for which they are intended to be used.

Untreated, 15 min, 134°C	6.2 (5.2, 7.8)	2.9 (2.3, 3.7)	>7.2 (4.3, >7.2)	7.1 (5.6, >7.2)
Untreated, 30 min, 134°C	>8.1 (6.5, >8.1)	3.2 (2.5, 4.3)	>7.2 (4.3, >7.2)	>7.2 (6.4, >7.2)
Untreated, 2 h, 134°C	>8.1 (6.6, >8.1)	>4.0 (3.1, >4.0)	>7.2 (4.3, >7.2)	>7.2 (6.4, >7.2)

ESB murinisée

ESB

sMCJ

Sc237

≈ 263K

X 1000

X 10 000

2) LE WESTERN-BLOT : technique *in vitro* directe (rapide)

Critique :

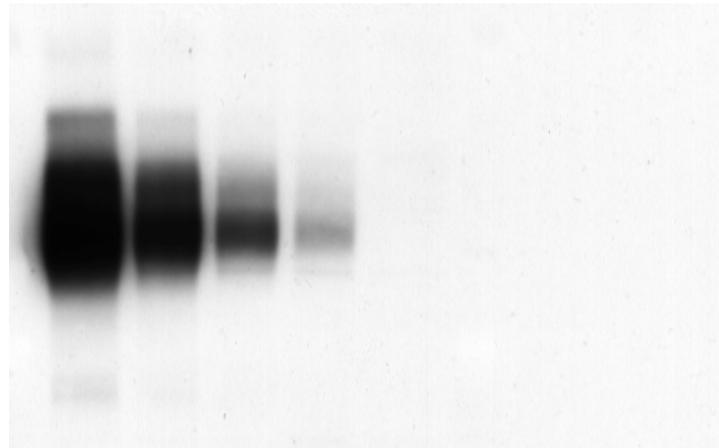
Méthode de criblage trop peu sensible :

RF < 3 logs

Dilution sériée de 10 en 10



Protéine prion PrP^{res}



3) Inactivation prouvée par un support (tige métallique 5 mm)

Critiques :

La tige ne tient compte que de l'élimination/du décrochage

Devenir de l'effluent?

Compte tenue des rinçages, hétérogénéité d'adsorption

Problème éthique d'un corps étranger laissé à demeure chez l'animal

LIMITES ACTUELLES DU PSP

- Dr Dominique Goullet : Stérilisation Magazine Juin 2015
'les produits jugés figurant sur la liste PSP ne sont pas efficaces contre le variant!'

- Dr Daisy Bougard et coll
(présentation orale 10^{ème} journée d'actualités Prions 10.12.2015 +
publication dans PlosOne le 22.01.2016)
 - tige vMCJ / amplification in vitro du prion (PMCA)
 - 6 traitements chimiques anonymisés de la 1^{ère} liste ANSM
 - 5/6 partiellement efficaces ou inefficaces
sur prions 127S et vMCJ !

STERILISATION 134°C ET BASSE TEMPERATURE

(DM thermo-résistants et thermo-sensibles)

- 134°C validé sur prions humains
- 134°C validé sur une amyloïdose murine

- Mais pour la stérilisation basse température (plasma, ozone, H2O2...)
 - Compte-tenu des données erronées du PSP...

- PREDESINFECTION EN AMONT ESSENTIELLE!

... mais nous proposons :

4) Prions humains : sporadique (*MM1*) et variant *vMCJ*

5) Amélioration de la méthode de détection *in vitro* : criblage par une technique ultrasensible d'amplification

6) Vérification de l'inactivation *in vivo* de l'inoculum traité et neutralisé / bioessai souris transgéniques « humanisées »

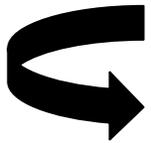
7) Adaptation de la méthode à l'ensemble des amyloïdoses :

Protocole de Contrôle d'Efficacité d'Amyloïcidie=PCEA

Prions humains dans le cadre d'une problématique de santé humaine

Prions humains les plus répandus : forme sporadique MM1

Souche variante humaine : vMCJ



agents propageables en modèles transgéniques

Amplification in vitro des prions : Technique décrite depuis 2001 par Soto *et al.*

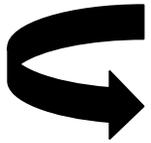
Amplification des prions par alternance de cycles sonication / incubation

Large gamme d'étude : jusqu'à la dilution 10^{-8} pour le vMCJ

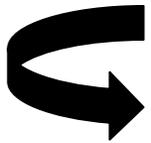
Cycles en 48-96 heures vs 500 jours pour le bioessai

Inoculum direct

Inoculum traité et neutralisé dans son ensemble



technique brevetée



Inactivation de l'infectiosité prion (ou RF) par bioessai

**Détection de la PrP^{Sc} dans des homogénats de cerveau contenant des prions
263K traités par des formulation prionicides et amplifiés par PMCA**

Témoin positif 263K : activité PMCA détectée : dilution 10^{-6}

Formulation liste ANSM : aucune efficacité

(Données non publiées)

Détection de la PrP^{Sc} dans des homogénats de cerveau contenant des prions vMCJ traités par des formulation prionocides et amplifiés par PMCA.

In vitro

Témoin positif vMCJ : activité PMCA détectée : dilution 10⁻⁸

Formulation liste ANSM : aucune efficacité

In vivo

Bioessai MM1 en cours : la formulation ANSM ne marche pas

Evolution future du PSP ?

- Tests sur des prions humains pour une problématique santé humaine
- Amplification *in vitro*
- Tige conservée *in vitro* en PMCA pour évaluer le décrochage/
l'élimination
- Inoculum en direct pour évaluer l'inactivation
 - *in vitro* en PMCA
 - Confirmation en bioessai

...vers un nouveau

Protocole de Contrôle d'Efficacité d'Amyloïcidie (PCEA)

Autres amyloïdoses

> 30

(Parkinson, Alzheimer, Huntington...)

LES AMYLOIDOSES : DONNEES CHIFFREES

<i>Maladies</i>	<i>Localisation</i>	<i>Nb cas (France)</i>
Alzheimer	cortex	850 000 (1,3 M en 2020)
Parkinson	subst. noire	120 000 (160 000 en 2020)
<i>Huntington</i>	<i>striatum</i>	<i>6 000-12 000</i>
<i>Ataxie Spino-cereb.</i>	<i>cervelet</i>	<i>< 5 000</i>
<i>Sclérose Lat. Amyo.</i>	<i>cortex,</i>	<i>< 5 000</i>
<i>Sclérose en plaques</i>	<i>cortex, tronc cérébral</i>	<i>60 000</i>
Creutzfeldt-Jakob	cerveau, cervelet	1.5 / an / million

Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy

Zane Jaunmuktane¹, Simon Mead^{2,3,4}, Matthew Ellis³, Jonathan D. F. Wadsworth^{2,3}, Andrew J. Nicoll^{2,3}, Joanna Kenny^{2,4}, Francesca Launchbury³, Jacqueline Linehan², Angela Richard-Loendt³, A. Sarah Walker⁵, Peter Rudge^{2,4}, John Collinge^{2,3,4} & Sebastian Brandner^{1,2,3}

- Patients MCJ traités par l'hormone de croissance extractive au Royaume-Uni
- Détection de plaques amyloïdes β distinctes des prions chez 50% des patients analysés
- Risque lors d'un acte médico-chirurgical?
Non pris en compte dans le PSP actuel

Original article | Published 26 January 2016, doi:10.4414/smw.2016.14287

Cite this as: Swiss Med Wkly. 2016;146:w14287

Amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting

Karl Frontzek^a, Mirjam I. Lutz^b, Adriano Aguzzi^a, Gabor G. Kovacs^b, Herbert Budka^{a,b}**

- Patients MCJ jeunes ayant reçu des greffes de dure-mère
- Détection de dépôts amyloïdes β chez 70% des patients analysés
- Risque lors d'un acte médico-chirurgical?
Non pris en compte dans le PSP actuel

Evidence for α -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism

Stanley B. Prusiner^{a,b,c,1}, Amanda L. Woerman^a, Daniel A. Mordes^d, Joel C. Watts^{a,b,2}, Ryan Rampersaud^a, David B. Berry^a, Smitta Patel^a, Abby Oehler^e, Jennifer K. Lowe^f, Stephanie N. Kravitz^f, Daniel H. Geschwind^{f,g}, David V. Glidden^h, Glenda M. Hallidayⁱ, Lefkos T. Middleton^j, Steve M. Gentleman^k, Lea T. Grinberg^{b,l}, and Kurt Giles^{a,b}

^aInstitute for Neurodegenerative Diseases, University of California, San Francisco, CA 94143; ^bDepartment of Neurology, University of California, San Francisco, CA 94143; ^cDepartment of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143; ^dC. S. Kubik Laboratory for Neuropathology, Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114; ^eDepartment of Pathology, University of California, San Francisco, CA 94143; ^fCenter for Neurobehavioral Genetics, Center for Autism Research and Treatment, and Department of Neurology, University of California, Los Angeles, CA 90095; ^gDepartment of Human Genetics, University of California, Los Angeles, CA 90095; ^hDepartment of Epidemiology and Biostatistics, University of California, San Francisco, CA 94143; ⁱSchool of Medical Science, Faculty of Medicine, University of New South Wales, and Neuroscience Research Australia, Randwick, NSW 2031, Australia; ^jAgeing Research Unit, School of Public Health, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom; ^kCentre for Neuroinflammation and Neurodegeneration, Department of Medicine, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom; and ^lMemory and Aging Center, University of California, San Francisco, CA 94143

Contributed by Stanley B. Prusiner, July 22, 2015 (sent for review May 19, 2015)

- Extraits de cv de patients atteints d'atrophie multisystématisée
- Transmission de l'agent impliquée (alpha synucléine) chez 100% des souris
- L'agent se propage selon un mécanisme de type prion
- Risque lors d'un acte médico-chirurgical?
Non pris en compte dans le PSP actuel

...VERS DE NOUVEAUX PRIONS?

- Accumulation d'une protéine spécifique sous forme agrégée
- Monomérique en solution, aptitude à s'agréger en structures amyloïdes
- Différentes conformations adoptées
- Initiation et dissémination d'un processus trans-conformationnel...
Braak-Dunning 2012
- Résistance à la chaleur : Amyloïdose murine partiellement résistante pendant 5 minutes à 135°C (Ogawa et al. 2015)
- Rôle du tractus gastro-intestinal dans le développement de la maladie
- Détection et présence forte en périphérie (Fasano et al., Lancet 2015)

CONCLUSION : VERS UN NOUVEAU PROTOCOLE DE CONTRÔLE D'EFFICACITE D'AMYLOÏCIDIE

Prévention du risque

- Un PSP erroné : le réécrire en tenant compte des nouvelles connaissances sur les amyloïdoses

- *IN VITRO* : TIGES + INOCULUM DIRECT
 - prions sporadiques MM1
 - prions vMCJ
 - au moins l'alpha synucléine (évolution selon l'état des connaissances)
 - méthodes ultrasensibles (PMCA)

- CONFIRMATION PAR BIOESSAI (INOCULUM DIRECT sur souris tg)

INRA : PARTENARIAT AVEC UN INDUSTRIEL FRANCAIS

- PRIONICIDE et AMYLOÏCIDE
(laveur désinfecteur d'instruments 1% 10 min 55°C)
- Répond au 'Protocole Standard Prions' en vigueur
- Validé sur prions humains
- Répond au 'Protocole de Contrôle d'Efficacité d'Amyloïcidie'
- Proposition d'évolution du PSP vers le PCEA

Remerciements

INRA

Mohammed Moudjou

Fabienne Reine

Laetitia Herzog

Nad'a Lepejova

Pierre Sibille

Human Rezaei

Vincent Béringue

Partenaire industriel

Ingénieurs du
laboratoire de chimie



INVITATION

Mardi 15 mars 2016

Conférence - Débat

Évaluation du risque iatrogène de transmission secondaire
interhumaine des amyloïdoses

Amphithéâtre B.440 • Centre Inra de Jouy-en-Josas



INRA
SCIENCE & IMPACT

conferenceVIM2016@jouy.inra.fr