

TYPOLOGIE DES PHENOTYPES BIOCHIMIQUES DE L'ESB PAR ANALYSE DISCRIMINANTE *

Eric Morignat¹, **Anne-Gaëlle Biacabe**², **Christian Ducrot**³,
Thierry Baron² et **Didier Calavas**¹

RESUME : Une étude biochimique rétrospective des cas d'ESB diagnostiqués en France a permis d'identifier aux cotés de la forme classique, deux nouvelles formes atypiques. Ces formes se distinguent entre elles et de la forme classique de la maladie, entre autres par les caractéristiques biochimiques de la protéine prion pathologique mise en évidence par la technique de Western Blot. Cet article présente l'utilisation de l'analyse discriminante de Fisher pour la différenciation moléculaire des trois types d'ESB. Cette méthode quantitative permet la prise en compte de l'ensemble des données biochimiques pour définir une classification des différents types de cas.

Mots-clés : ESB, ESB atypique, protéine prion, analyse discriminante.

SUMMARY : A retrospective biochemical study of the BSE cases diagnosed in France allowed to identify, besides the classical form, two new atypical forms of BSE. These different forms are identifiable thanks to different electrophoretic profiles of the prion protein in Western Blot. This paper presents the use of the Fisher Discriminant analysis to differentiate the three molecular types of BSE. This quantitative method takes into account all the biochemical parameters in order to classify the different forms of BSE cases.

Keywords: BSE, atypical BSE, prion protéine, discriminant analysis.



I - INTRODUCTION

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), maladie neurodégénérative faisant partie de la famille des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) reconnues aussi bien chez l'homme que chez l'animal, est caractérisée par l'accumulation d'une protéine prion (PrP) sous une forme pathologique dans le cerveau (PrPres).

Contrairement aux autres EST, les études menées sur l'ESB chez les bovins atteints en Europe ont longtemps suggéré une

remarquable unicité de la souche à l'origine de la maladie [Collinge *et al.*, 1996]. Ainsi, la localisation des lésions cérébrales est très univoque, quel que soit le bovin atteint. De la même façon, la caractérisation de l'agent infectieux, après inoculation expérimentale à différents modèles de tissus cérébraux infectés de quelques bovins provenant de différents pays a révélé un comportement tout à fait homogène en faveur d'un agent infectieux unique [Bruce *et al.*, 1996].

* Texte de la communication orale présentée à la Journée AESA-AEEMA, 19 mai 2006

1. AFSSA, Unité Epidémiologie, Lyon, France

2. AFSSA, Unité ATNC, Lyon, France

3. INRA, Unité d'épidémiologie animale, Saint Genès-Champagnelle, France

Cependant, des études menées sur les caractéristiques moléculaires de la protéine prion pathologique (PrPres) par la technique de Western blot, ont récemment permis d'identifier deux autres types de PrPres, un type H (High) [Biacabe *et al.*, 2004] et un type L (Low) ou Bovine Amyloïde Spongiform Encephalopathy (BASE) [Casalone *et al.*, 2004], distincts entre eux et distincts de la PrPres classiquement décrite, ceci sur un nombre très limité de bovins.

Les caractéristiques moléculaires de ces deux formes atypiques se différencient de celles de l'ESB classique, d'une part, sur le plan du poids moléculaire apparent des différentes

bandes di-, mono- et non-glycosylées de la PrPres et, d'autre part, sur le plan de l'intensité de ces bandes les unes par rapport aux autres.

Ainsi, la PrPres de type H est, par Western blot, principalement caractérisée par un poids moléculaire plus élevé pour l'ensemble des bandes par rapport à celles de la PrPres classique (figure 1) et une réactivité différente vis-à-vis des anticorps. La PrPres de type L est, quant à elle, caractérisée par une sous-représentation de la bande di-glycosylée de la PrPres par rapport à celle de l'ESB (figure 1) et par un poids moléculaire plus faible de la bande non-glycosylée (figure 2).

Figure 1

Représentation schématique des différents types de PrP pathologique (ESB classique, type H et type L) par la technique de Western Blot

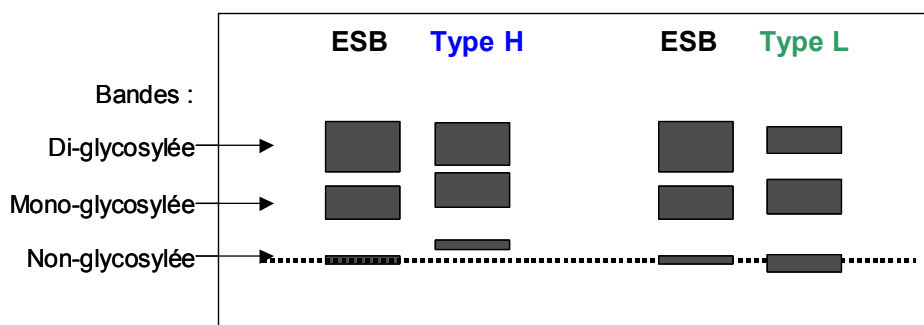
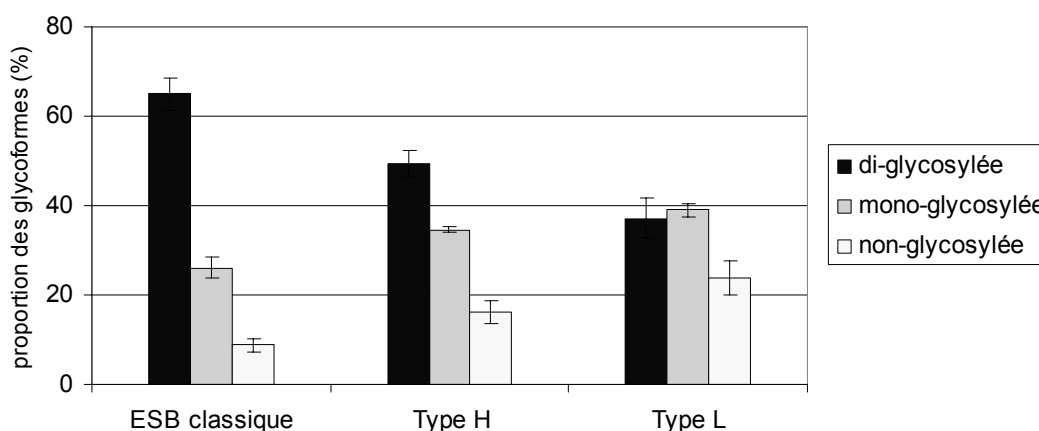


Figure 2

Distribution des glycoformes en fonction du typage de la PrPres (ESB classique, type H et type L) avec l'anticorps 6H4



L'objectif de cette étude est de proposer une classification par analyse discriminante linéaire des trois différents types de PrPres détectés par Western blot, en prenant en compte

l'ensemble des données quantitatives (poids moléculaire et intensité des bandes), et ceci en fonction des différents anticorps qui peuvent être utilisés pour la détection de la PrPres.

II - MATERIEL

Depuis juillet 2001, la surveillance de l'ESB est exhaustive. Au réseau de surveillance passive en place depuis 1990 et à la surveillance à l'abattoir chez les bovins de 30 mois et plus (24 mois de juillet 2001 à juillet 2004) en place depuis janvier 2001, s'est ajoutée la surveillance à l'équarrissage des bovins de 24 mois et plus. C'est ainsi que 912 cas ont été diagnostiqués entre 2000 et 2005, par des tests rapides (Western Blot Prionics-Check ou Prionics AG, ou Elisa Platelia-Biorad), en première intention dans les laboratoires vétérinaires départementaux et confirmés à l'AFSSA Lyon par Western Blot après traitement à la protéinase K et/ou par immunohistochimie.

Une étude rétrospective de caractérisation moléculaire des types de PrPres par Western Blot a été réalisée sur 280 de ces cas d'ESB.

Quatre cas de type L et sept cas de type H ont été mis en évidence parmi ces cas.

L'échantillon d'étude utilisé pour l'analyse discriminante a été constitué par 10 cas d'ESB atypiques, dont quatre cas ayant une PrPres de type L et six cas ayant une PrPres de type H (un cas de type H n'a pas pu être typé faute de matériel) ainsi que par 11 cas d'ESB classiques qui ont été appariés à ces cas atypiques sur la base de leur région de provenance et de leur âge à la détection.

Les analyses ont été réalisées pour chaque prélèvement, lorsque la quantité de matériel était suffisante, avec six anticorps différents dirigés contre différentes séquences de la PrP : 6H4 [144-152], RB1 [101-105], F89/160.1.5 [142-145], BAR-233 [152-163], F99/97.6.1 [220-225] et SAF-84 [160-170].

III - METHODE

1. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES TYPES D'ESB

Les techniques de caractérisation moléculaire de la PrP pathologique reposent sur l'analyse de son profil électrophorétique, obtenu par Western Blot après digestion partielle de la PrP par une enzyme (protéinase K).

Les critères de caractérisation reposent, d'une part, sur le poids moléculaire apparent des trois ou quatre bandes de la protéine identifiées par Western blot correspondant aux trois niveaux de glycosylation de la protéine (forme di-, mono-, non-glycosylée) associées ou non à une quatrième bande identifiée avec certains anticorps (F99/97.6.1 et SAF 84) et, d'autre part, sur la proportion relative entre ces bandes.

Les mesures de poids moléculaires ont été réalisées par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire et les intensités relatives des bandes ont été calculées en utilisant le

logiciel Quantity One® (Biorad) après capture du signal luminescent par une caméra CCD.

2. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse discriminante de Fisher part de la connaissance de la partition en classes des individus d'une population et cherche les combinaisons linéaires des variables décrivant les individus qui conduisent à la meilleure discrimination entre les classes.

Selon cette méthode, les coefficients de cette combinaison linéaire sont les vecteurs propres (V) de $W^{-1}B$, qui est le rapport entre la variance inter-groupe (B) et la variance intra groupe (W)

$$W^{-1}B V = V \lambda$$

$$\text{où } B = T-W$$

avec

$$W = \sum_{j=1}^c (X_j - \bar{1x}_j)^T (X_j - \bar{1x}_j)$$

et $T = (X - \bar{1x}^T)^T (X_j - \bar{1x}^T)$.

Les valeurs propres quant à elles (éléments diagonaux de Λ) indiquent le pouvoir de discrimination des combinaisons linéaires correspondantes [Venables et Ripley, 2002].

Les deux fonctions les plus discriminantes ont été recherchées pour chaque anticorps et ont été utilisées comme les deux axes définissant un espace de projection des données. Les variables utilisées pour la classification sont les caractéristiques biochimiques dérivées du Western Blot, à savoir les poids moléculaires des différentes bandes non, mono et di-glycosylées, les proportions relatives de ces bandes estimées par l'intensité du signal (glycotypes) et la présence ou non d'une quatrième bande supplémentaire révélée par certains anticorps pour la PrPres de type H.

Ces deux fonctions discriminantes sont donc des combinaisons linéaires des poids moléculaires des différentes bandes non, mono et di-glycosylées, et des proportions relatives d'une partie de ces bandes estimées par l'intensité du signal (glycotype).

La somme des ratios de glycoforme étant égale à 100%, tous les ratios de glycoformes ne peuvent pas être utilisés puisque les variables discriminantes ne doivent pas être colinéaires [Klecka, 1980]. Ainsi, pour les anticorps 6H4, RB1, F89/160.1.5 et BAR-233 pour lesquels la PrPres est caractérisée par trois bandes quel que soit son type, les fonctions discriminantes ont été définies

comme des combinaisons linéaires du poids moléculaire des trois bandes de glycosylation et des ratios de glycoforme de seulement deux bandes.

Concernant les anticorps F99/97.6.1 et SAF-84, les fonctions discriminantes ont été définies comme des combinaisons linéaires du poids moléculaire des quatre bandes et des ratios de glycoforme de trois bandes. Cependant, comme le poids moléculaire et le ratio de glycoforme de la bande additionnelle ne sont mesurés que dans le cas du type H, la valeur de ces deux variables a été fixée à 0 pour le type L et le type classique.

Seuls les cas pour lesquels l'ensemble des données biochimiques, à savoir les poids moléculaires de chaque bande et tous les ratios de glycoformes, ont pu être recueillis ont été retenus pour l'analyse discriminante. Les deux fonctions discriminantes ont ensuite été utilisées pour définir l'espace de projection des cas d'ESB et pour prédire le type biochimique de chaque cas.

Une procédure LOOCV (leave-one-out cross-validation) a été utilisée afin de valider les prédictions pouvant être faites à partir de ces fonctions discriminantes pour chaque anticorps. Cela signifie que chaque prédiction pour un cas donné a été faite à partir des fonctions discriminantes définies à partir d'un jeu de données constitué par l'ensemble des cas de la population d'étude, sans le cas pour lequel la prédiction a été faite. Les prédictions des types moléculaires ont été alors comparées aux types moléculaires observés.

L'analyse a été réalisée avec le logiciel S+® 6.1 for Windows.

IV - RESULTATS

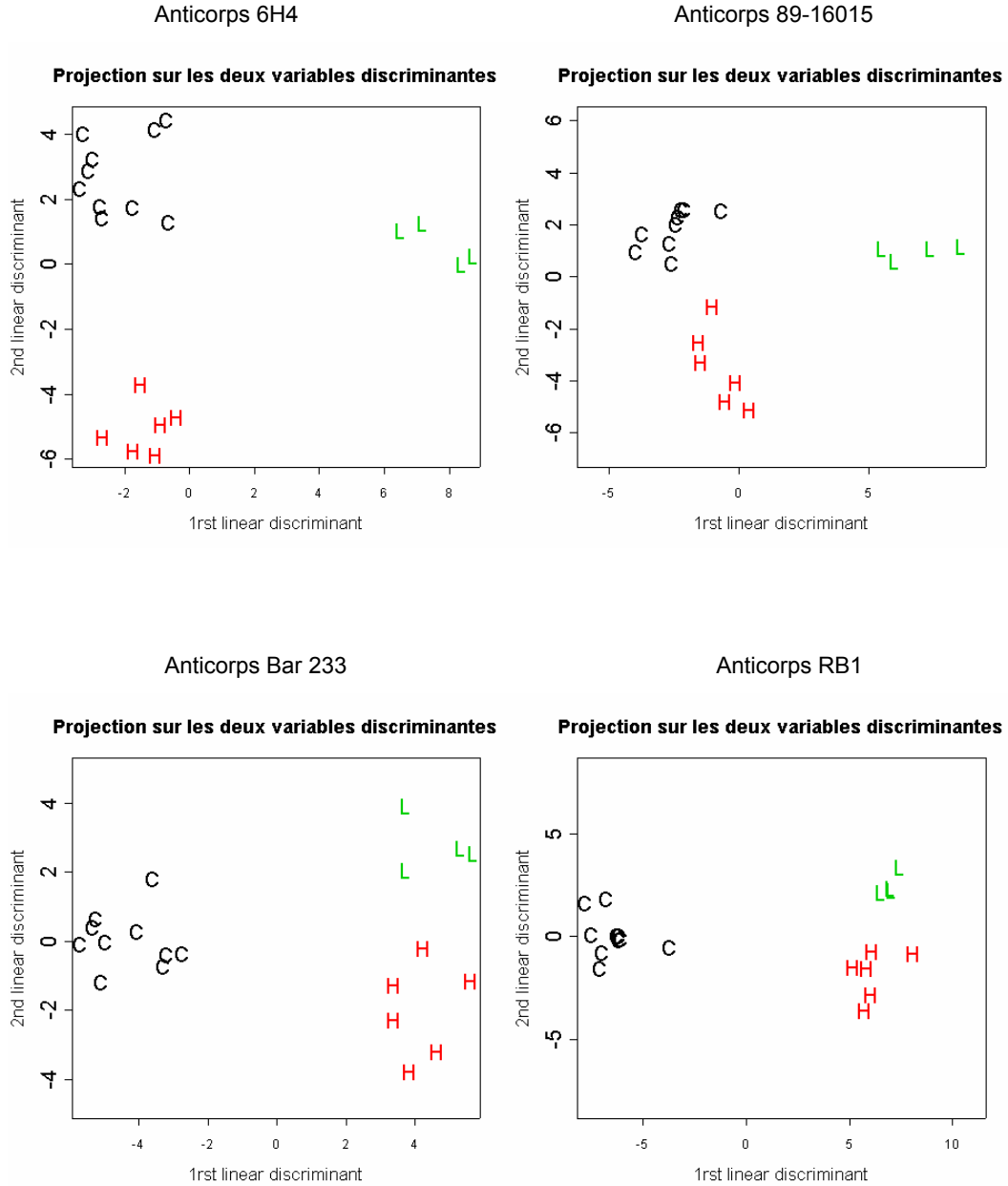
Les projections des cas d'ESB sur les deux axes discriminants sont présentées pour chaque anticorps utilisé dans la figure 3.

Les résultats de la procédure de validation croisée LOOCV indiquent qu'une meilleure discrimination des types moléculaires de la PrPres est obtenue avec les anticorps 6H4,

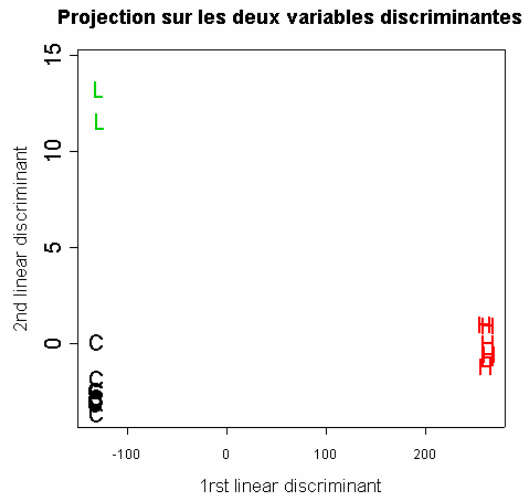
RB1, SAF84 et F99/97.6.1, puisque 100% de leurs prédictions étaient exactes. Avec l'anticorps F89/160.1.5, 18 cas sur 19 étaient bien classés (1 type H classé C) contre 18 sur 20 avec l'anticorps BAR-233 (1 type H classé L et 1 type L classé H).

Figure 3

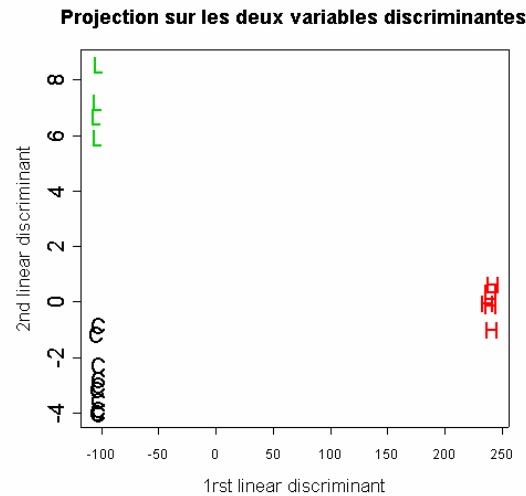
Résultats de l'analyse linéaire discriminante avec les anticorps : 6H4, RB1, F89/160.1.5, BAR-233, F99/97.6.1 et SAF-84



Anticorps 99-976



Anticorps SAF 84



C : ESB classique
H : ESB de type H
L : ESB de type L

V - DISCUSSION

La classification des différents types d'ESB était réalisée jusqu'à présent par comparaison visuelle des profils électrophorétiques de la PrPres entre eux ou bien par la comparaison quantitative de chaque élément de caractérisation d'un profil par rapport à l'autre (par exemple le poids moléculaire de chacune des bandes ou l'intensité relative des différents glycoformes). L'approche originale de l'analyse discriminante est de prendre en compte l'ensemble des facteurs pour définir une ou plusieurs fonctions qui permettent de caractériser au mieux chaque type. La projection des cas dans l'espace défini par les deux axes discriminants permet alors une interprétation simple et immédiate du résultat. La validation des fonctions discriminantes se fait classiquement en scindant le jeu de données en un jeu de travail utilisé pour définir les fonctions discriminantes et en un jeu de données réservé à la validation des fonctions discriminantes. Les prédictions faites sur le deuxième jeu de données sont alors comparées à la classification des données.

Dans notre cas, cela n'a pas été possible compte tenu du faible nombre de sujets dans chaque groupe. Nous avons donc utilisé la procédure LOOCV qui a permis de valider les fonctions discriminantes retenues.

Les résultats de l'analyse ont permis d'évaluer le pouvoir discriminant des différents anticorps, et ainsi de les comparer entre eux, à l'exception toutefois de l'un d'entre eux (F99/97.6.1) pour lequel les données biochimiques incomplètes (sur deux cas de PrPres de type L) n'ont pas permis en toute rigueur la comparaison directe avec les autres anticorps. Les résultats obtenus montrent clairement que le pouvoir discriminant varie en fonction des anticorps utilisés. Cette étude a ainsi permis de sélectionner de façon pertinente les anticorps pour la recherche et la caractérisation de ces phénotypes atypiques de PrPres : les anticorps 6H4, RB1, SAF84 et F99/97.6.1 apparaissent les plus adéquats pour identifier les différents phénotypes de l'ESB.

Il sera intéressant d'appliquer la classification définie au moyen d'une analyse discriminante aux futurs cas d'ESB détectés, et de manière rétrospective à l'ensemble des cas d'ESB détectés en France depuis le début de l'épizootie. Au delà de l'intérêt de valider ce modèle sur un plus grand nombre de cas, cela permettrait de préciser l'importance relative des cas atypiques parmi les cas d'ESB détectés, de contribuer à savoir depuis quand

de tels cas existent, et de préciser le type d'animaux atteints par ces formes. De même, il sera intéressant de confronter ce modèle aux caractéristiques des cas atypiques d'ESB actuellement décrits dans d'autres pays

européens : Italie [Casalone *et al.*, 2004], Allemagne [Bushman *et al.*, 2006], Pologne [Polak *et al.*, 2004], [Baron, 2006], ou aux USA [Hall, 2006] pour valider la pertinence et l'universalité du modèle proposé.

BIBLIOGRAPHIE

- Baron Th. - Atypical BSE (France). Présentation orale, International conference of Prion Diseases of Domestic Livestock. London, 28th-30th May 2006.
- Biacabe A.G., Laplanche J.L., Ryder S. et Baron T. - Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, 2004, **5**, 110-5.
- Collinge J, Sidle K.C.L., Meads J, Ironside J, Hill A.F. - Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 1996, **383**, 685-690.
- Bruce M. - In *Methods in Molecular Medicine: Prion Diseases*, Baker H., Ridley R.M. (eds) pp 223-236. Totowa, NJ: *Humana*, 1996, sous presse.
- Buschmann A., Gretschel A., Biacabe A.G. Casalone C., Hoffmann C., Eiden M., Baron T., Caramelli M., Conraths F.J. et Groschup M. - Atypical BSE cases in Germany. Germany *J Vet Med*, sous presse
- Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., TagliaVini F., Monaco S. et Caramelli M. - Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**, 3065-70.
- Hall M. - Atypical BSE (US). Présentation orale, International conference of Prion Diseases of Domestic Livestock. London, 28th-30th May 2006.
- Klecka W. R. - Discriminant analysis. Sage University Paper on Quantitative Application in the Social Sciences, series no. 07-019. Beverly Hills, CA: Sage, 1980.
- Polak M. P., Rozek W., Rola J., et Zmudzinski J. - Prion protein glycoforms from BSE cases in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2004, **48**, 201-205.
- Venables W. N. et Ripley B. D. (4th ed.) - *Modern Applied Statistics with S.*, 2002.



Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Michèle Lavoine pour les analyses de Western Blot.