

LA TERRE

50 expériences pour découvrir



Comment naissent les dunes ?
Comment une rivière creuse-t-elle une vallée ?
Comment se forment les grottes ?
Pourquoi les pierres éclatent-elles sous le froid ?
Ce livre propose une série d'expériences pour comprendre comment le vent, la pluie, la glace, les cours d'eau modèlent le visage de la Terre.

ANDRÉ PROST est géologue, ancien enseignant à l'université d'Orléans et à Paris VI, et ingénieur au Bureau des Recherches Géologiques et Minières à Orléans.

Code 002401-100 F-128 pages

Voir bon de commande page 98

BELIN • POUR LA SCIENCE

dans le transport des ions cuivre à travers la membrane, car la partie mobile de la protéine présente une forte affinité pour ces ions, importants pour le fonctionnement de certaines enzymes qui protègent les cellules contre le stress oxydatif.

Séquences superflues, séquences clés

Malheureusement, on ne peut pas encore analyser le prion pathogène, car les fibrilles ont tendance à s'agréger, ce qui interdit leur analyse aux rayons X ou par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, laquelle n'est pas utilisable pour les grosses protéines en solution, qui, de surcroît, sont insolubles. L'équipe de C. Weissmann a réussi à repérer les zones de la protéine PrP normale qui ne sont pas indispensables à la conversion en prion pathogène. Ils ont produit des souris chez qui certaines séquences du gène codant la protéine PrP avaient été éliminées. La délétion d'un long fragment constitué des acides aminés 23 à 88 de la queue flexible n'avait aucune conséquence : les animaux pouvaient toujours être infectés par le prion.

En revanche, quand la protéine était raccourcie encore davantage, les souris devenaient résistantes, comme si elles ne synthétisaient plus du tout de protéine PrP normale. Dès 1993, l'équipe de S. Prusiner avait montré que de longues séquences de la protéine PrP normale adoptent une structure en feuillets bêta, lors de la conversion en prion pathogène. Il s'agit notamment de la séquence des acides aminés 90 à 120 de la terminaison libre, qui, une fois repliée en feuillets bêta, résiste aux enzymes protéolytiques. Outre les questions que posent encore la structure de la protéine PrP normale et celle du prion pathogène, reste une autre question ouverte : comment un prion d'une espèce peut-il se transmettre à une autre espèce et devenir pathogène ?

Pour comprendre comment les barrières d'espèces peuvent être franchies, les biologistes ont d'abord injecté des prions directement dans le cerveau de différents animaux de laboratoire. Ainsi, des hamsters ont reçu des prions extraits de cervelles de souris contaminées ; ils sont devenus malades après une durée d'incubation d'environ 380 jours. La durée d'incubation pour des souris à qui l'on aurait injecté les mêmes prions aurait été trois fois

plus courte. La durée d'incubation pour une transmission de prions de hamster à d'autres hamsters n'est que de 60 jours, et les souris résistent aux prions de hamster. Ainsi, l'efficacité de la barrière d'espèce dépend à la fois de l'espèce réceptrice et de l'origine des prions. Elle pourrait être franchie quand les prions transmis et ceux de l'espèce réceptrice interagissent.

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure la structure des protéines PrP normales participe à l'efficacité de la barrière d'espèce. Nous avons comparé des structures modélisées des protéines PrP de la souris, du hamster, de la vache et de l'homme. Nous avons ensuite montré que les protéines PrP normales de la souris, du hamster et de la vache présentent, localement, des différences. Cela expliquerait pourquoi on peut transmettre expérimentalement l'encéphalopathie spongiforme bovine à la souris et au hamster, et confirmerait qu'il existe tout de même une barrière d'espèce plus ou moins élevée. Les protéines de la vache et de l'homme ont une ossature presque identique. Pour autant, cela signifie-t-il qu'il n'y a pas de barrière d'espèce pour la transmission du prion bovin à l'homme ?

L'évaluation des risques

Une protéine n'a pas seulement un «squelette», elle a aussi une «musculature» : les résidus d'acides aminés. C'est pourquoi nous avons simulé sur ordinateur les surfaces – les rondeurs – des protéines PrP normales humaine et bovine. Nous avons fait apparaître les charges électrostatiques de surface (voir la figure 4). Les deux protéines ont des ossatures semblables (seuls huit acides aminés diffèrent), mais les répartitions des charges présentent 21 différences. Ainsi, la protéine PrP bovine normale porte en un site une charge négative, absente dans la version humaine. Inversement, la molécule humaine porte plusieurs charges négatives absentes de la protéine bovine. Ces différences de charges électriques de surface expliquent vraisemblablement – du moins en partie – la barrière d'espèce qui protège l'homme de l'encéphalopathie spongiforme bovine.

Malheureusement, on ne sait pas préciser davantage les risques encourus, et les estimations de l'ampleur de l'épidémie due au nouveau variant

PROTÉINE PrP BOVINE

PROTÉINE PrP HUMAINE

CHARGE POSITIVE

ZONE DE NEUTRALITÉ ÉLECTRIQUE

CHARGE NÉGATIVE

4. LA RÉPARTITION DES CHARGES DE SURFACE des protéines PrP humaine et bovine diffère. Les flèches jaunes indiquent les domaines chargés négativement (en rouge) dans la protéine PrP humaine, mais qui sont absents de la protéine PrP bovine. Au contraire, les flèches

blanches montrent des charges négatives présentes sur la protéine PrP bovine et absentes de la protéine humaine. Ces différences renforcent sans doute la barrière d'espèce entre l'homme et la vache, et limite la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine à l'homme.

de la maladie de Creutzfeldt-Jakob varient notablement : dans le meilleur des cas, quelques centaines de personnes seraient atteintes ; dans le pire, plus de 100 000 personnes auraient déjà été contaminées. Jusqu'à présent, toutes les victimes avaient des spécificités génétiques qui se retrouvent chez 35 pour cent des Européens : la susceptibilité à la maladie différerait d'une personne à l'autre.

En Grande-Bretagne, probablement 750 000 bovins infectés sont entrés dans la chaîne alimentaire. Les tissus et les organes sont plus ou moins infectieux. Lorsque la maladie est déclarée chez l'animal, le cerveau, la moelle épinière et les yeux contiennent de grandes quantités de prions : près d'un milliard de protéines pathogènes par gramme de tissus. C'est également le cas de la moelle osseuse, des ganglions lymphatiques, des amygdales, de certaines parties de l'intestin grêle et du gros intestin, ainsi que de la rate et des glandes surrénales : environ un million de prions par gramme. En revanche, on n'a jamais réussi à détecter de prions dans le lait ou dans les muscles. Toutefois, lors de l'abattage et de la préparation, des

prions risquent d'être transmis par des couteaux ou par des scies contaminés à des morceaux de bœuf normalement sains. Les produits d'origine bovine sont également utilisés en dehors de l'industrie agroalimentaire : 70 pour cent des produits pharmaceutiques contiennent des extraits bovins, notamment de la gélatine. Néanmoins, son utilisation semble être sans risque, en raison des procédés de fabrication et de surveillance mis en œuvre.

Aujourd'hui, les tests rapides de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine utilisés sur les animaux abattus n'offrent pas une sécurité totale, car ils détectent le prion seulement lorsque sa concentration cérébrale est

élevée. Plusieurs équipes recherchent des tests beaucoup plus sensibles de détection du prion chez l'animal. La sensibilité requise dépendra du nombre de prions nécessaires pour infecter un être humain, ce qui n'est pas encore connu. Toujours est-il qu'une vache peut être contaminée par l'ingestion de seulement un gramme de cervelle infectée.

Pour juguler la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine, nous devons continuer à étudier l'agent pathogène et à élucider sa structure interne. C'est sur ces seules bases que l'on pourra développer des méthodes diagnostiques performantes, ainsi que des médicaments efficaces contre la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Ralph ZAHN mène ses recherches à l'Institut de biologie moléculaire et de biophysique de l'École Eidgenössischen Technische Hochschule, à Zurich.

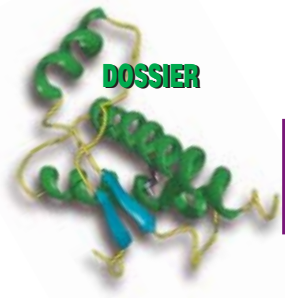
Stanley PRUSINER, *Prions*, in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, pp. 13 363-13 383, 1998.

Ralph ZAHN, *Prion propagation and molecular chaperones*, in *Quarterly*

Reviews of Biophysics, vol. 32, pp. 309-370, 1999.

Hans KRETZSCHMAR et al., *Function of PrP^c as a copper-binding protein at the synapse*, in *Archives of Virology*, suppl. 16, pp. 239-249, 2000.

Adriano AGUZZI et al., *Prions : pathogenesis and reverse genetics*, in *Annual Reviews of the New York Academy of Sciences*, vol. 920, pp. 140-157, 2000.



L'énigme des prions

MANFRED EIGEN

Pour améliorer la fiabilité des tests de dépistage de la maladie de la vache folle, on devra encore préciser les mécanismes d'action et de multiplication des agents responsables de cette maladie.

L'encéphalopathie spongiforme bovine, encore nommée maladie de la vache folle, est transmissible à l'homme et provoque, après une courte période d'incubation, la forme humaine de la maladie, nommée le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, qui aboutit inéluctablement à la mort. La maladie de Creutzfeldt-Jakob est connue depuis longtemps et suit la même évolution, mais elle ne touche pas des personnes si jeunes et sa probabilité d'apparition est très faible.

Si les mesures prises pour éviter de nouvelles contaminations ont été drastiques, de nombreuses questions restent ouvertes : quel est le degré de sécurité des tests ? Quelle est la durée d'incubation chez les bovins ? Chez l'homme ? Les réponses à ces questions ne sont pas précises, car nous ignorons comment l'agent responsable de la maladie de la vache folle se reproduit dans l'organisme et finit par déclencher les symptômes. Pour comprendre l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine et ses effets, nous devons d'abord élucider à quelle vitesse s'effectuent les mécanismes moléculaires sous-jacents, c'est-à-dire en déterminer la cinétique. Ce n'est qu'à cette condition que l'on pourra trouver des mesures efficaces pour enrayer l'épidémie.

La recherche sur les mécanismes d'action du prion, l'agent « infectieux » de la maladie animale et humaine progresse, de sorte que l'on a mis au point des tests de détection des prions infectieux plus fiables, capables de déceler l'agent responsable à une concentration dix à cent fois inférieure à celle des méthodes utilisées jusqu'à présent. Ces tests devraient également permettre le diagnostic de la maladie de la vache folle à un stade plus précoce. Il faudrait cependant des tests encore plus sensibles de plusieurs ordres de grandeur pour que l'on puisse déterminer si un morceau de viande de bœuf est vraiment sans risque, donc pour pouvoir garantir qu'il ne contient pas de prions pathogènes. Les nouvelles connaissances acquises en matière de cinétique de la multiplication des prions ouvrent la voie à de telles méthodes de dépistage.

Stanley Prusiner, de l'Université de San Francisco, a obtenu le prix Nobel de chimie en 1997 pour avoir découvert que les agents infectieux de l'encéphalopathie spongiforme bovine et des maladies apparentées sont des protéines. Il a montré qu'une protéine normale est synthétisée naturellement par l'organisme sain, mais on en ignore encore la fonction. La protéine normale est nommée PrP, et sa forme cellulaire PrP^c. En revanche, la forme anormale ou « infectieuse » est la protéine PrP^{sc}. La désignation *sc* rappelle que l'on connaît depuis longtemps une forme ancienne de la maladie animale, la scrapie ou

tremblante du mouton. La protéine pathogène se distingue de la forme normale uniquement par sa structure spatiale, c'est-à-dire par le repliement de la chaîne d'acides aminés qui constitue les protéines.

Une unique molécule de la protéine pathogène n'est pas infectieuse. La quantité minimale de protéines pathogènes capables de déclencher une infection est plutôt de l'ordre de 100 000 molécules. Cette évaluation résulte d'expériences où, après avoir inoculé à différents groupes d'animaux de laboratoire diverses quantités de la protéine pathogène, on a observé combien d'animaux contractaient la maladie, dans chaque groupe.

L'étrangeté du prion

Charles Weissmann et ses collègues de l'Université de Zurich ont montré que des souris dont le gène de la protéine normale avait été inactivé ne deviennent jamais malades, quelle que soit la quantité de protéines pathogènes administrée : pour qu'un animal devienne malade, il doit synthétiser la protéine PrP normale. De surcroît, Detlev Riesner, de l'Université de Düsseldorf, a montré que même avec des mesures physico-chimiques extrêmement sensibles, on ne détecte aucun ADN ni aucun ARN dans l'« agent » responsable des maladies de type encéphalopathie spongiforme bovine. On peut exclure que les unités infectantes de protéines pathogènes contiennent autre chose qu'une molécule d'une centaine de nucléotides.

Pourtant, les maladies à prions sont « infectieuses » dans la mesure où l'agent pathogène se multiplie de façon exponentielle. Jusqu'à présent, toutes les maladies infectieuses avaient été attribuées à un agent « reproductible », fondé sur la duplication de son matériel génétique (de l'ADN ou de l'ARN), ce qui n'est manifestement pas le cas des prions. Bien sûr, cette constatation ne remet pas en cause nos connaissances en virologie et en bactériologie « classiques ». Elle montre simplement qu'il existe des systèmes constitués uniquement de protéines qui simulent le comportement répliatif des acides nucléiques.

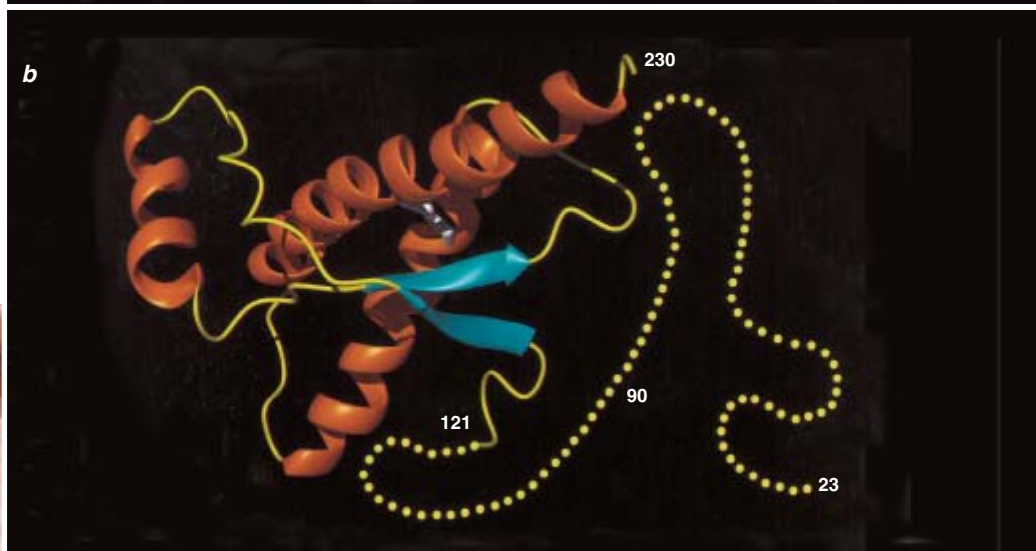
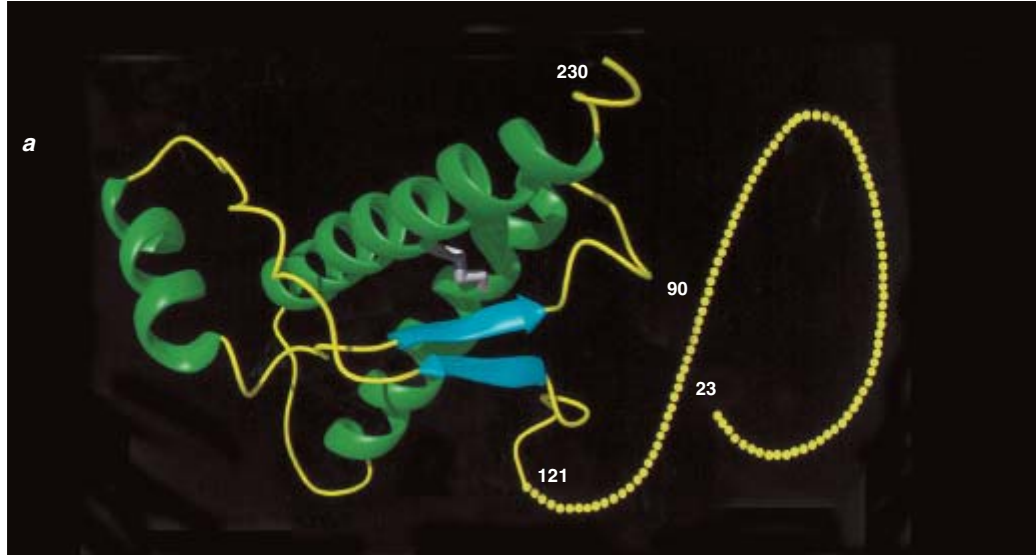
C'est à Kurt Wüthrich, de l'École supérieure de technique, à Zurich, que l'on doit une nouvelle découverte dans ce domaine. À l'aide de mesures par résonance magnétique nucléaire, il a déterminé la structure des protéines PrP naturelles (voir la figure 1). Elles présentent un domaine « globulaire » au sein duquel les chaînes d'acides aminés forment trois structures enroulées en hélice. Ce domaine globulaire peut être « digéré » par une enzyme dite protéolytique ; au contraire, le domaine globulaire des prions pathogènes

résiste à toutes les enzymes. Sans doute, la forme pathogène contient-elle moins d'hélices et davantage de ce que l'on nomme des feuillets bêta, où la chaîne d'acides aminés a une structure de «tôle ondulée». Les enzymes ne peuvent alors couper qu'une partie de l'extrémité libre de la chaîne.

Le test actuellement utilisé pour le dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine repose sur cette plus ou moins grande résistance aux enzymes. De plus, K. Wüthrich a calculé le degré de divergence entre les prions de différentes espèces animales d'après la structure de leur domaine globulaire. Il a montré que les prions bovin et humain ont une structure spatiale très proche, ce qui permettrait leur transmission d'une espèce à l'autre.

S. Prusiner fut aussi le premier à proposer un mécanisme de transformation de la protéine PrP normale en prion pathogène : quand une molécule

A. Zahn, P. Günther, K. Wüthrich



David Stoecklin/Stock Market

1. LA PROTÉINE PrP BOVINE naturelle (a) est constituée d'une séquence (entre les acides aminés 121 à 230) dont la structure est complexe, alors que le reste de la molécule (des acides aminés 23 à 121) forme une terminaison (en pointillés jaunes) dépourvue de structure fixe et libre de se déplacer. Le domaine replié comprend trois hélices alpha (en vert) et un court feuillet bêta (en bleu). Quand on compare cette protéine bovine à la protéine PrP normale de l'homme (b), on constate que

le «corps» de la protéine humaine est, comme la protéine normale bovine, constituée de trois domaines enroulés en hélices (en rouge) et d'une structure en feuillet bêta (en bleu). Lors de la transformation des protéines PrP normales en prions pathogènes, la géométrie de cette zone centrale change. Les chiffres indiquent la position des acides aminés dans la séquence. Les acides 1 à 22 servent d'étiquette d'adressage, et cette séquence est éliminée dès que la destination est atteinte.

● PROTÉINE PrP NORMALE
 □ PRION PATHOGÈNE
 ■ EXTRÉMITÉ INFECTIEUSE

NOMBRE
D'EXTRÉMITÉS
INFECTIEUSES

2

4

8

16

M. Eigen

2. LES PRIONS pathogènes se multiplient en deux grandes étapes : une phase de croissance et une phase de division. Quand des protéines PrP normales se fixent aux extrémités d'un prion pathogène, elles adoptent la conformation anormale des prions infectieux. Progressivement, par addition de molécules saines à la chaîne infectieuse, cette dernière s'allonge. Au cours de la seconde phase, les chaînes en croissance se scindent en deux (de sorte que leur longueur moyenne reste constante au cours du temps). Alors que l'allongement des chaînes n'augmente pas le nombre de prions infectieux, leur rupture aboutit à une multiplication exponentielle. En réalité, le mécanisme de multiplication est moins régulier que sur le schéma.

pathogène se fixe sur une protéine PrP normale, elle contraint cette dernière à changer de forme et à adopter la forme pathogène. L'agent infectieux catalyserait la conversion de la forme inoffensive en forme nocive et, de proche en proche, assurerait sa propre multiplication.

Selon Peter Lansbury, à Boston, le prion pathogène se multiplierait par un mécanisme proche d'une polymérisation. Dans ce type de réaction, on synthétise un polymère, tel le polyéthylène, par « collage » linéaire d'un grand nombre de sous-unités identiques : ici, une chaîne linéaire de prion pathogène serait obtenue en raboutant des protéines PrP normales qui, une fois assemblées, deviendraient pathogènes. De surcroît, une chaîne ne deviendrait dangereuse, qu'après avoir atteint une taille critique (la chaîne forme alors ce que l'on nomme un germe), au-delà de laquelle, l'addition de nouvelles unités est plus rapide que l'élimination, par des enzymes, de sous-unités déjà fixées. Ces hypothèses semblaient cohérentes avec les observations que l'on fait sur les personnes décédées de la maladie de Creutzfeldt-Jakob : en général, le prion pathogène est présent dans le cerveau des victimes, sous forme de bâtonnets, et « l'unité infectieuse » comporte un

grand nombre de sous-unités de la protéine PrP normale.

En 1996, j'ai étudié la cinétique des réactions chimiques en cause dans cette maladie. J'ai montré que pour que les résultats soient cohérents avec les faits, plusieurs sous-unités doivent interagir. Plusieurs enzymes « allostériques » contrôlent leur activité en adoptant leur forme active seulement après intervention d'une molécule dite effectrice. Grâce à cet effet coopératif, qui impose le changement de structure, on détermine un nombre minimal de prions nécessaires à l'apparition de la maladie.

En fait, le mécanisme de formation de germes de P. Lansbury comprend, lui aussi, une sorte d'interaction coopérative entre les éléments constitutifs de la chaîne du prion pathogène. Un seul composant de cette chaîne est incapable de déclencher les modifications de structure qui rendent le prion pathogène ; pour que la transformation ait lieu, un nombre de sous-unités au moins égal à celui que comporte le germe critique doit coopérer. C'est seulement alors que la vitesse de synthèse de la chaîne devient supérieure à celle de sa dégradation.

Toutefois, bien que la chaîne puisse croître par autocatalyse après avoir atteint la taille du germe critique, on ne constate pas l'accélération expo-

nentielle caractéristique des réactions autocatalytiques. Cela suppose qu'après la transformation, le catalyseur initial, tout comme le produit de la réaction, restent disponibles pour de nouveaux cycles d'autocatalyse, de sorte que le nombre d'éléments autocatalytiques double à chaque cycle de réaction. Pourtant, ce n'est pas ce qui se produit au cours d'une polymérisation, où seule l'extrémité des chaînes présente une activité catalytique constante.

À nouveau, cette difficulté a trouvé une solution : le mécanisme de polymérisation produit lui aussi une croissance exponentielle lorsque les chaînes en cours de construction sont dégradées en continu, libérant en permanence de nouveaux catalyseurs. Martin Nowak, à l'Université de Princeton, a élaboré un modèle, que Joanna Masel, de l'Université d'Oxford, a appliqué à l'évolution des maladies à prions.

Un modèle de la multiplication des prions

Dans ce modèle, M. Nowak a tout d'abord posé les équations du bilan de la croissance, de la rupture des protéines et de leur dégradation. La croissance correspond à une expression de l'allongement de la chaîne. L'action conjointe de l'allongement et de la rupture des chaînes aboutit à l'augmentation exponentielle du nombre d'extrémités de chaînes douées de pouvoir catalytique. La dégradation à laquelle sont soumis les polymères limite la durée de vie des germes infectieux.

La vitesse d'allongement dépend de trois mécanismes : la fixation d'une protéine normale à l'une des extrémités du prion pathogène (limitée par la fréquence de rencontre des partenaires de la réaction) ; le détachement d'une unité saine dont la structure n'a pas encore été transformée ; la conversion de la protéine saine en une protéine pathogène par transformation de sa structure (elle est alors intégrée dans la protéine et assure l'elongation de la chaîne).

Les vitesses de ces trois mécanismes peuvent être regroupées en une seule équation mathématique. Au lieu de poser une équation pour le bilan de chacun des prions pathogènes pris séparément, M. Nowak a utilisé deux termes dont l'un com-

prend la quantité totale d'unités de protéines PrP normales incluses dans les chaînes polymériques de différentes longueurs, et l'autre reflète le nombre de ces chaînes et, par conséquent, de toutes les terminaisons à activité catalytique.

La méthode présente l'intérêt que plusieurs termes s'annulent. Il ne reste que deux équations différentielles, qui décrivent la variation en fonction du temps des deux termes mentionnés précédemment. Les solutions sont constituées de la somme de deux fonctions exponentielles, où le temps apparaît comme exposant, une fois avec le signe plus et une fois avec le signe moins (voir l'encadré ci-contre).

L'une des fonctions représente un terme de croissance, l'autre un terme de dégradation. Ce dernier décrit l'établissement d'un état d'équilibre, où la quantité des chaînes de longueur donnée est constante. Au bout d'un certain temps, ce terme devient négligeable devant le terme de croissance. Le nombre de chaînes de polymères – et celui des prions pathogènes – augmente alors de façon exponentielle, tandis que le nombre de protéines PrP normales diminue.

Une durée d'incubation prolongée

Joanna Masel, à l'Université d'Oxford, a analysé en détail toutes les conclusions tirées de ce modèle et les a comparées à des données expérimentales. Ses résultats seront précieux pour les recherches en cours visant à diagnostiquer les maladies à prions à un stade toujours plus précoce. Ainsi la fixation d'un prion normal sur une chaîne et sa transformation en un prion pathogène durent à peu près un quart d'heure. Un prion pathogène contient un millier de sous-unités : son temps de formation sera d'une dizaine de jours (1 000 quarts d'heure). Selon diverses expériences, cette durée varie de 5 à 20 jours. Pour qu'un état d'équilibre s'établisse, il faut qu'une rupture de chaîne, en moyenne, se produise pendant ce temps. La demi-période pour la rupture en un point donné est d'environ 30 ans. Chaque chaîne présentant en moyenne 1 000 points de rupture possibles, il se produit dans l'ensemble de l'agrégat une rupture de chaîne environ tous les dix jours. La formation et la rupture des chaînes s'équilibrent, mais le

nombre de chaînes (et, par conséquent, d'extrémités de chaînes actives) augmente de façon exponentielle.

Une autre grandeur importante est le rapport entre la vitesse de formation et la vitesse d'élimination des prions pathogènes. D'après des mesures effectuées sur des animaux de laboratoire, les deux vitesses sont du même ordre de grandeur. Cela signifie que le matériel infectieux doit «se reproduire» sans cesse pour survivre. On ignore encore comment se fait l'élimination, mais les défenses immunitaires interviennent vraisemblablement, ainsi que d'autres mécanismes de dégradation ou d'inactivation des prions pathogènes. Le terme traduisant la dégradation est proportionnel à la quantité disponible de prions infectieux. De surcroît, seul

le substrat de la réaction, le prion normal à transformer, se déplace librement en solution et atteint une chaîne pathogène en croissance (schématiquement, on dit que cette réaction rapide est «contrôlée par la diffusion»). Les chaînes de prions pathogènes ne sont pas libres, mais fixées à des membranes : ainsi, une «unité infectieuse» serait bien constituée de 100 000 molécules de prions, mais les chaînes se rompraient dès qu'elles atteignent une longueur environ égale à 1 000 sous-unités. Les fragments restent dans le voisinage et se comportent comme des essaims coopératifs. Ils ne se dispersent qu'à partir du moment où ils se détachent de la membrane.

Ainsi, le matériau pathogène double au bout de plusieurs semaines,

La cinétique de la multiplication

Pour comprendre la multiplication des prions infectieux du point de vue mathématique, on doit prendre en compte l'ensemble des réactions pouvant conduire à une chaîne pathogène de longueur i , et évaluer la vitesse de formation de cette molécule. Certaines réactions, par exemple les défenses immunitaires, peuvent inactiver le mécanisme (a). La chaîne peut se rompre à n'importe quel endroit (b). Seuls les fragments d'une longueur minimale n restent infectieux. Enfin, la chaîne peut s'allonger grâce à la fixation d'une protéine PrP naturelle et de sa conversion en forme pathogène (c). Le métabolisme produit et dégrade des protéines PrP saines à des vitesses données, respectivement v_p et v_d .

Toutes ces réactions ont des constantes de vitesse spécifiques. On exprime le nombre total de chaînes (y) et le nombre total de

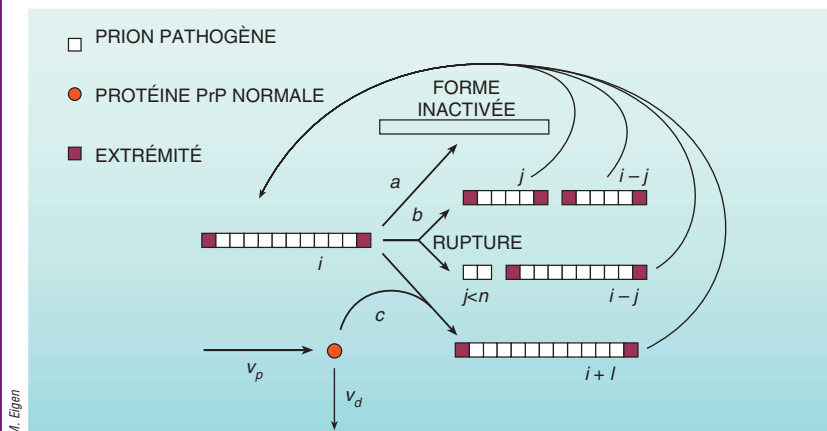
prions pathogènes qu'elles renferment (z) en fonction du temps et de la concentration en protéines PrP normales (x).

Ces termes sont liés par des équations différentielles. À l'équilibre de la réaction, la concentration en protéines PrP normales est considérée comme étant quasi constante, et l'on obtient les expressions de y et de z :

$$y(t) = A_2 e^{k_2 t} + A_1 e^{-k_1 t}$$

$$z(t) = B_2 e^{k_2 t} + B_1 e^{-k_1 t}$$

Ces deux solutions comprennent chacune un terme de croissance et un terme de dégradation. Ce dernier a une constante de temps ($-k_1$) négative : il s'établit un équilibre tel que la répartition des longueurs des chaînes reste constante. Au bout d'un certain temps, le terme de croissance l'emporte. Ces équations révèlent aussi que les prions infectieux se multiplient lentement.



Un prion pathogène peut soit être inactivé (a), soit se diviser (b). Progressivement, la longueur de la chaîne pathogène augmente (c), mais il s'établit un équilibre, où la répartition de la longueur des chaînes pathogènes reste quasi constante et où le nombre des prions pathogènes finit par l'emporter sur le nombre des prions inoffensifs.

et la multiplication d'un germe infectieux jusqu'à une concentration décelable par des méthodes d'analyse classiques requiert près d'une année. Malgré ces résultats, on s'interroge encore sur les phases initiale et terminale de l'infection, sur les modes d'infection, sur le temps qui s'écoule jusqu'à l'invasion du cerveau et de la moelle épinière, ainsi que sur la façon dont l'agent pathogène dégrade ces tissus dans la phase terminale.

Sensibilité des tests et dépistage précoce

Connaissant la cinétique de l'infection, on détermine le stade où l'on peut dépister la maladie. Plus le diagnostic sera précoce, plus efficace sera la lutte contre l'épidémie.

En raison de l'extrême lenteur de la multiplication des prions pathogènes, une méthode de dépistage plus sensible permet de diagnostiquer la maladie des mois, voire des années plus tôt. En 1994, nous avons décrit une méthode adaptée à la détection de très petites quantités de prions. Il s'agit de la spectroscopie de corrélation de fluorescence. La spectroscopie de fluorescence classique consiste

à marquer les molécules à détecter à l'aide d'un colorant qui devient fluorescent lorsqu'il est éclairé par une longueur d'onde caractéristique. On irradie l'ensemble de l'échantillon et l'on mesure l'intensité de la fluorescence, qui indique la concentration de la molécule fluorescente. Celle-ci doit toutefois être suffisamment élevée pour que le signal de fluorescence mesuré soit supérieur au bruit de fond. Cela requiert des concentrations supérieures à 10^{15} particules par litre.

Les nouvelles méthodes détectent des concentrations notablement inférieures. On n'analyse plus la totalité de l'échantillon, mais on dirige le rayon laser sur la plus petite surface possible, imposée par la longueur d'onde choisie. Dans notre cas, le volume analysé par le laser est inférieur au femtolitre (10^{-15} litre). Comme la concentration en molécules fluorescentes est infime et que le signal risque d'être noyé dans le bruit de fond, on n'enregistre plus le signal stationnaire pondéré en fonction du temps, mais on se «met à l'affût» et on attend qu'une molécule fluorescente pénètre dans le faisceau laser. La molécule n'y reste que quelques millisecondes, mais pendant ce temps elle

émet plusieurs milliers de photons. Cette salve de photons se distingue des photons isolés du bruit de fond.

Le dispositif de détection est constitué d'un microscope confocal à fluorescence et d'un ordinateur. Par cette méthode, on visualise des molécules une par une, de sorte que l'on détecte des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre de la femtomole, ce qui correspond à environ un milliard de particules par litre.

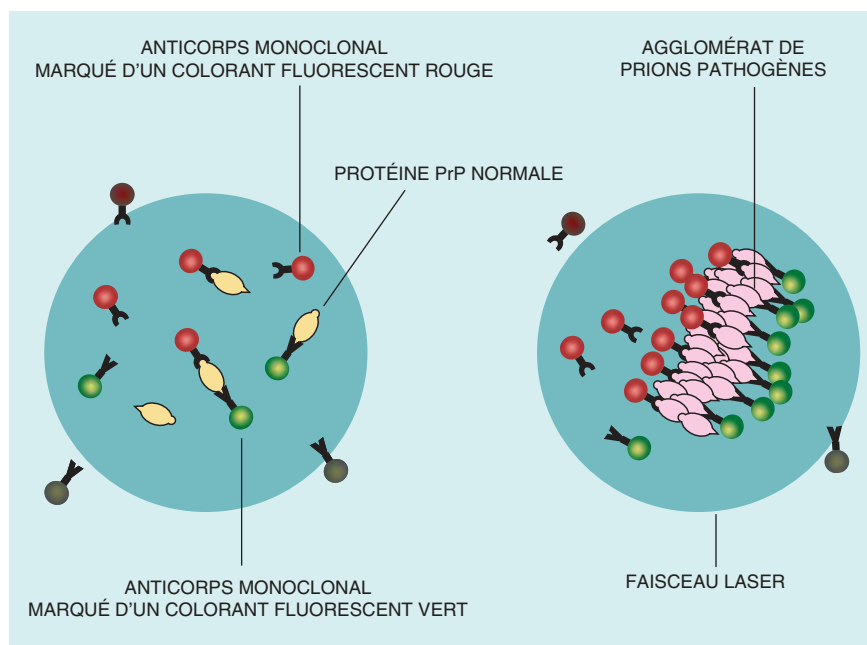
Cette méthode, dite d'autocorrélation, fonctionne avec un marqueur fluorescent lié à une substance qui se fixe avec une grande affinité sur le composé à détecter, apposant une sorte d'étiquette lumineuse. On utilise généralement des anticorps monoclonaux, qui se fixent spécifiquement sur des séquences spécifiques du prion normal. Le prion pathogène est un agrégat de protéines, constitué de nombreux prions normaux, de sorte qu'un grand nombre d'«étiquettes» peuvent s'y fixer.

On peut utiliser deux substances fluorescentes : dès qu'un agrégat pathogène pénètre dans le volume analysé, il émet simultanément un signal rouge et un signal vert, par exemple. Leur coïncidence est une preuve de la présence du prion infectieux. Bien qu'une protéine PrP normale puisse également fixer à la fois un marqueur rouge et un vert, elle ne forme pas d'agrégats de grande taille et ne produit qu'un signal très faible.

La SIFT (pour *Scanning for intensely fluorescent targets*, c'est-à-dire méthode de scannage des cibles très fluorescentes) est une méthode de détection de la fluorescence. Nous l'avons utilisée pour analyser le liquide céphalo-rachidien de personnes souffrant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

La sensibilité de cette méthode est 10 à 100 fois supérieure à celle des méthodes classiques de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine. La méthode autorise le dosage de l'agent pathogène dans les fluides corporels accessibles, par exemple le liquide céphalo-rachidien. En principe, on pourrait l'appliquer au dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine chez les bovins vivants (bien que le prélèvement de liquide céphalo-rachidien soit compliqué et nécessite une anesthésie).

Les exigences en matière de recherche de l'agent de l'encéphalopathie spongiforme bovine sont dras-



3. UN MARQUAGE À L'AIDE DE DEUX COLORANTS FLUORESCENTS améliore la détection des prions pathogènes. La méthode (SIFT) utilise deux types d'anticorps qui se fixent spécifiquement sur deux sites différents des prions. L'un est marqué d'un colorant fluorescent rouge, l'autre d'un colorant fluorescent vert. Lorsqu'ils rencontrent un prion pathogène à longue chaîne, les anticorps fluorescents s'y fixent en de nombreux sites (à droite). La particule pathogène trahit sa présence en émettant une forte fluorescence verte et une intense fluorescence rouge lorsqu'elle est excitée par un faisceau laser adapté. Seuls quelques anticorps se fixent sur les protéines PrP normales, de sorte que ces dernières ne fournissent qu'un signal fluorescent très faible lorsqu'elles sont éclairées par le même faisceau laser (à gauche).