

● 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

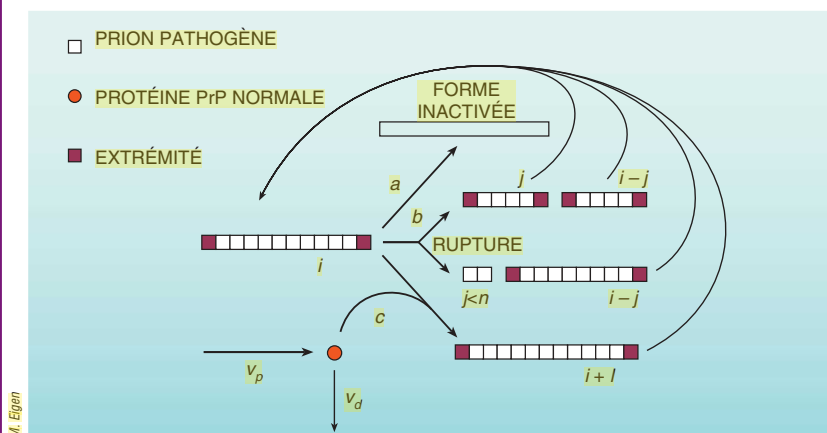
prions pathogènes qu'elles renferment (z) en fonction du temps et de la concentration en protéines PrP normales (x).

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.

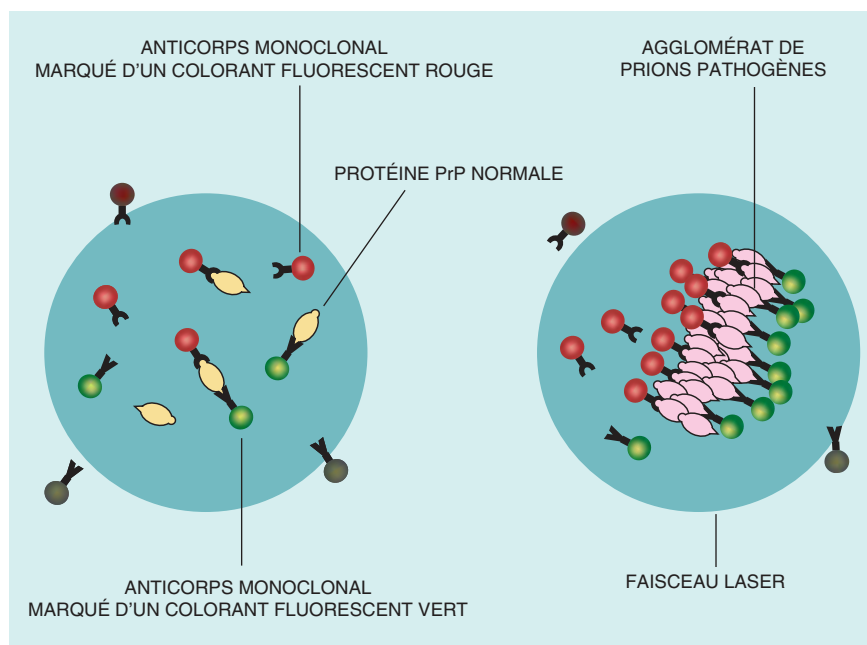
Cette méthode, dite d'autocorrélation, fonctionne avec un marqueur fluorescent lié à une substance qui se fixe avec une grande affinité sur le composé à détecter, apposant une sorte d'étiquette lumineuse. On utilise généralement des anticorps monoclonaux, qui se fixent spécifiquement sur des séquences 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).