

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.

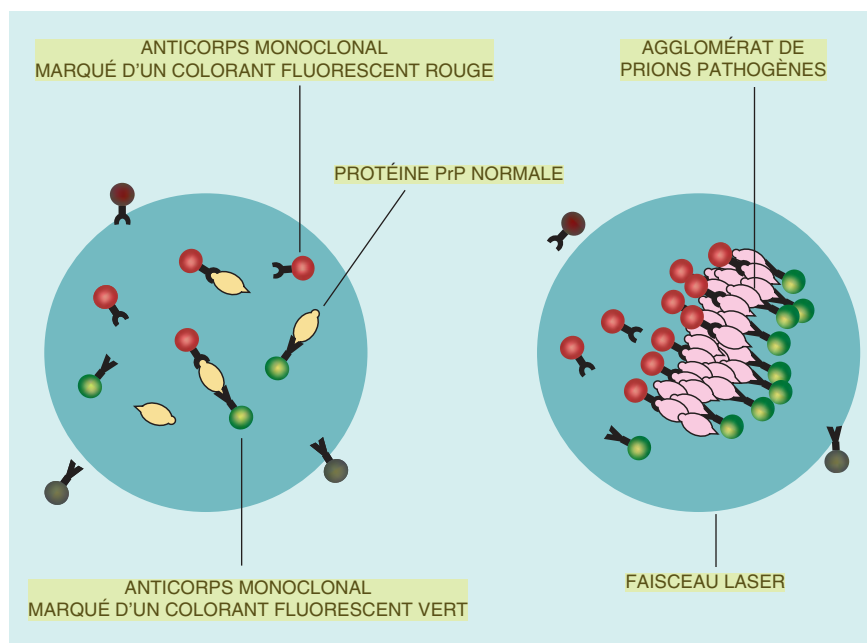
Cette méthode, dite d'autocorrélation, fonctionne avec un marqueur fluorescent lié à une substance qui se fixe avec une grande affinité sur le composé à détecter, apposant une sorte d'étiquette lumineuse. On utilise généralement des anticorps monoclonaux, qui se fixent spécifiquement sur des séquences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