

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.

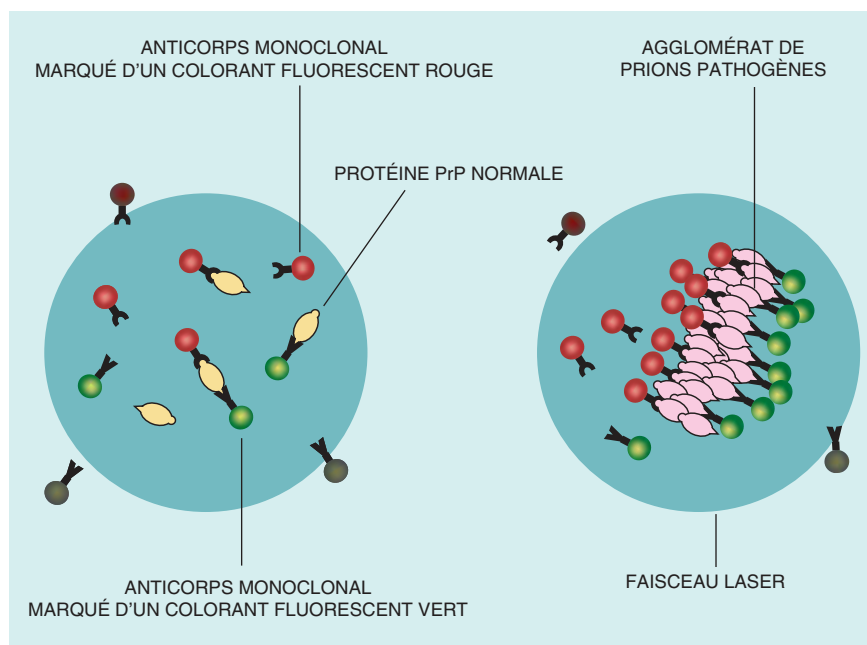
Cette méthode, dite d'autocorrélation, fonctionne avec un marqueur fluorescent lié à une substance qui se fixe avec une grande affinité sur le composé à détecter, apposant une sorte d'étiquette lumineuse. On utilise généralement des anticorps monoclonaux, qui se fixent spécifiquement sur des séquences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

tiques. On ne doit pas se contenter d'une concentration en prions pathogènes inférieure à un seuil donné, on doit s'assurer que la viande est totalement exempte de matériel infectieux. On doit trouver comment interdire toute commercialisation de denrées alimentaires susceptibles de contenir des germes pathogènes.

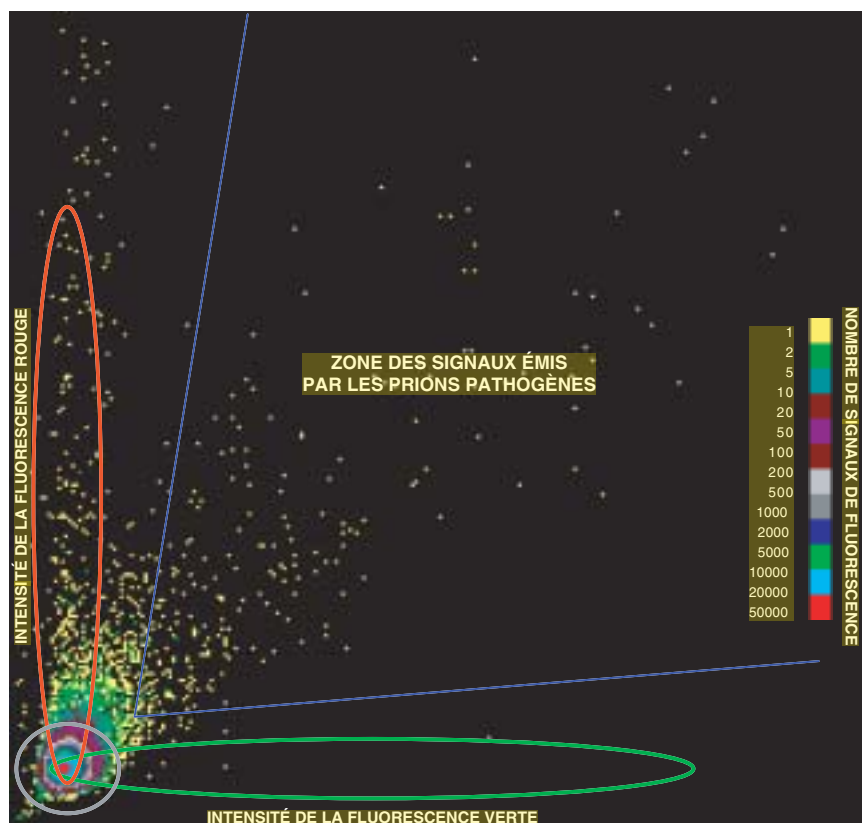
Or, toutes les méthodes de dépistage connues aujourd'hui présentent, certes, une sensibilité extrêmement élevée, mais elles ne détectent que des quantités de prions pathogènes très supérieures aux 100 000 sous-unités d'un germe infectieux. Les nouvelles méthodes, parfois 100 fois plus sensibles que les méthodes classiques n'améliorent guère la situation. Dès lors, comment peut-on débusquer les prions pathogènes parmi l'énorme quantité de particules propres à l'organisme?

La sécurité du consommateur

On pourrait essayer de multiplier artificiellement les germes présents jusqu'à ce que leur concentration dépasse le seuil de détection. Pour les virus et les bactéries, dont le pouvoir pathogène est inscrit dans leurs gènes, cela ne pose aucune difficulté, notamment grâce à la méthode d'amplification des gènes, la PCR. Il faut entre une seconde et une minute pour qu'une séquence caractéristique soit doublée. Pour un échantillon ne contenant qu'une seule séquence cible d'ADN, on obtient 30 réplifications en une demi-heure, soit environ un milliard (2^{30}) de copies.

Même si l'on disposait d'une méthode analogue pour les prions, une telle amplification nécessiterait environ un an, en raison de la cinétique décrite précédemment. Comment peut-on accélérer ces réactions *in vitro*? On pourrait, par exemple, exploiter le fait que les agrégats sont hydrophobes et se fixent préférentiellement sur les membranes. Il nous faudrait influencer sur la cinétique de façon à amplifier en peu de temps les traces infimes de prion pathogène. Ainsi pourrait-on dépister une infection dès qu'elle commence.

La question lancinante de la nature exacte du prion se pose à nouveau. L'agent infectieux n'est ni une protéine isolée ni un polymère défini de sous-unités protéiques. Il s'agit plutôt d'agrégats unidimensionnels de



4. AFIN D'ÉVALUER L'INTÉRÊT DE LA MÉTHODE SIFT pour la recherche de prions pathogènes chez l'homme, on a ajouté une quantité donnée d'agrégats de prions infectieux à du liquide céphalo-rachidien prélevé sur des personnes souffrant de troubles neurologiques qui n'étaient pas dus à une maladie à prions. Dans cette méthode, on utilise deux anticorps marqués par des colorants fluorescents (un rouge et un vert) et, lorsque la fluorescence est intense, on en déduit que le faisceau laser a éclairé un amas de molécules qui ont fixé l'un ou l'autre, ou les deux colorants. On a ainsi enregistré les signaux lumineux et leur intensité (sur l'axe vertical, la fluorescence rouge et sur l'axe horizontal, la fluorescence verte). On observe une majorité de signaux faibles produits par des anticorps marqués à l'aide d'un colorant fluorescent, qui correspondent à la détection de prions inoffensifs (en bas, à gauche). Au contraire, lorsqu'un agrégat de prions pathogènes ayant fixé un grand nombre d'anticorps fluorescents rouges et verts est éclairé par le faisceau laser, il émet une fluorescence intense (composée à parts quasi égales de rouge et de vert). Ces émissions intenses sont représentées par des points jaunes dans la zone supérieure droite (entre les deux lignes bleues). Les points à l'intérieur de l'ellipse rouge et de l'ellipse verte proviennent d'autres agrégats protéiques, qui fixent par hasard l'un des deux marqueurs fluorescents.

protéines, constitués de prions pathogènes et caractérisés par une longueur moyenne de chaîne. La taille de l'unité infectieuse ne dépend pas seulement de cette longueur moyenne. Les agrégats sont probablement plutôt fixés à des membranes, et seules les extrémités des chaînes sont infectieuses. Une seule chaîne de 100 000 sous-unités pathogènes a un pouvoir

infectieux 1 000 fois inférieur à la même quantité d'unités pathogènes réparties sur 1 000 fragments de chaînes d'une longueur moyenne de 100 unités. Le nombre des extrémités de chaînes «infectieuses» qui assurent la croissance exponentielle des unités pathogènes est un facteur clé des maladies spongiformes transmissibles.

Manfred EIGEN est directeur émérite du Département de cinétique biochimique de chimie et de biophysique de l'Institut Max Planck, à Göttingen.

J. MAZEL et al., *Quantifying the Kinetic Parameters of Prion Replication*, in *Biophysical Chemistry*, vol. 77, p. 139, 1999.

J. BIESCHKE et al., *Ultra-sensitive Detection*

of Pathological Prion Protein Aggregates by Dual-color Scanning for Intensely Fluorescent Targets (SIFT), in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, p. 5468, 2000.

M. EIGEN, *Das Gen und der Mensch*, sous la direction de G. Gottschalk, éditions Wallstein Verlag, 2000.