

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.

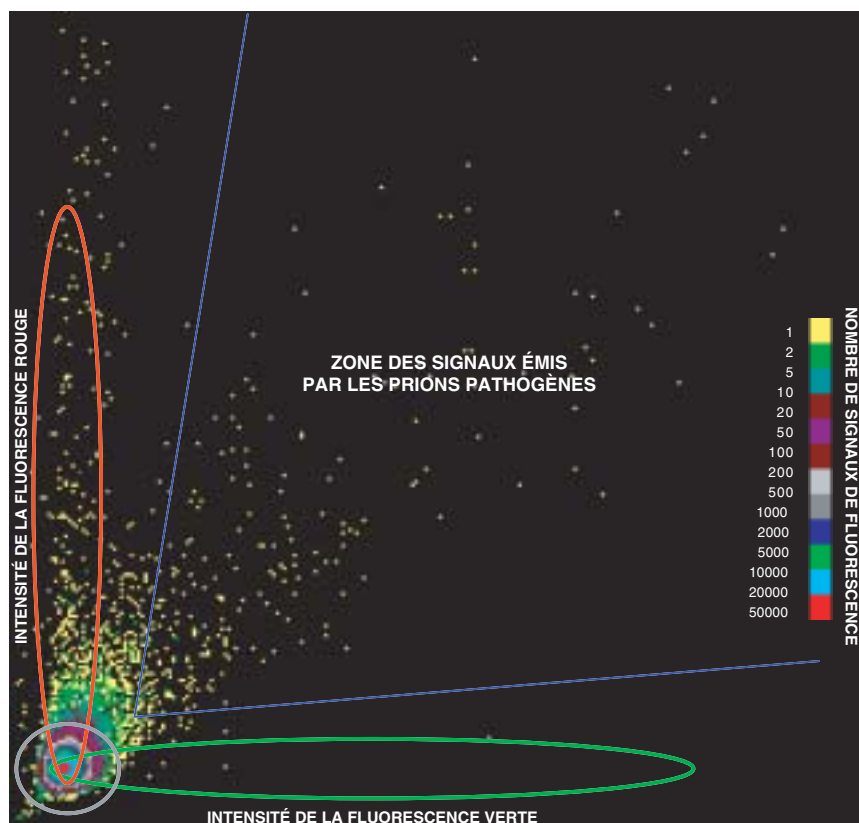
Or, toutes les méthodes de dépistage connues aujourd'hui présentent, certes, une sensibilité extrêmement élevée, mais elles ne détectent que des quantités de prions pathogènes très supérieures aux 100 000 sous-unités d'un germe infectieux. Les nouvelles méthodes, parfois 100 fois plus sensibles que les 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.

Des cellules productrices de prions

DIDIER VILETTE

La fonction de la protéine PrP normale et sa transformation en prion pathogène seront précisées par l'étude de lignées de cellules qui produisent des prions.

La tremblante du mouton et de la chèvre est une encéphalopathie spongiforme transmissible, décrite depuis longtemps, et très répandue : elle touche les ovins et les caprins sur l'ensemble du globe à l'exception de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande, réputées indemnes. En France, elle touche jusqu'à 10 pour cent des animaux de certains troupeaux. Ainsi, cette pathologie est un problème de santé animale et fait l'objet de recherches menées dans différents laboratoires de l'Institut national de recherche agronomique, l'INRA. De surcroît, la tremblante ovine est considérée comme le prototype des encéphalopathies spongiformes transmissibles naturelles. La maladie se propage naturellement comme une maladie infectieuse, contrairement aux encéphalopathies spongiformes transmises expérimentalement aux rongeurs. Les enseignements tirés de l'étude de la tremblante du mouton et de son agent pathogène sont précieux pour les recherches menées sur les souches naturelles responsables de l'encéphalopathie spongiforme bovine, ou maladie de la vache folle, ou de la maladie humaine de Creutzfeldt-Jakob.

Pour étudier la fonction de la protéine PrP normale et sa transformation en prion pathogène, nous essayé d'obtenir des cellules qui synthétiseraient à la demande des prions. Nous nous sommes fondés sur divers résultats expérimentaux établis par les équipes qui travaillent depuis plusieurs années sur les prions. Ainsi, nous savons aujourd'hui que la sensibilité de l'animal à la maladie dépend de l'expression du gène codant la protéine PrP normale : des souris transgéniques chez

qui cette protéine est surexprimée développent la maladie beaucoup plus rapidement que les autres souris. En outre, la protéine PrP normale intervient dans le franchissement de la barrière d'espèce : l'infection par des prions pathogènes provenant d'une autre espèce est, en général, bien plus rapide quand l'animal receveur synthétise la protéine PrP normale de l'espèce infectante. Ainsi, nous avons choisi de renforcer, par transfection, l'expression de la protéine PrP ovine normale dans différentes lignées cellulaires, qu'elles soient de mouton ou d'autres espèces, puis nous avons testé si elles assuraient la répllication des prions pathogènes ovins.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'utiliser des lignées cellulaires provenant du système nerveux central de mouton (l'organe cible des prions pathogènes), mais, après la transfection, la protéine PrP ovine normale était peu surexprimée, et ces cellules se révélèrent être un piètre moyen de multiplier les prions. Avec nos collègues de l'équipe Infections à prions, à Jouy-en-Josas, nous avons alors mené des essais sur des lignées cellulaires issues d'autres espèces, et nous avons obtenu de bons résultats avec une lignée de cellules épithéliales de lapin. Nous avons placé le gène codant la protéine PrP ovine normale sous contrôle d'un promoteur inductible par les tétracyclines, c'est-à-dire qu'en agissant

sur le promoteur, on commande le moment de l'expression et la quantité de protéine produite. Ce gène ovine modifié a été réintroduit par transfection dans les cellules épithéliales de lapin. La lignée cellulaire correspondante a été nommée Rov. En l'absence de l'inducteur – la doxycycline –, le gène ne s'exprime pas et les cellules Rov ne produisent pas la protéine PrP ovine normale. En revanche, dès que l'on introduit de la doxycycline dans le milieu de culture, les cellules modifiées de lapin synthétisent la protéine ovine.

La deuxième étape consistait à vérifier que l'on pouvait aussi produire du prion ovine pathogène. Pour infecter les cellules Rov, on les fait incuber pendant quelques jours en présence d'un broyat de cerveau de mouton atteint de la maladie. Pour détecter si des prions ovins sont bien produits dans les cellules infectées, nous avons réalisé deux types de tests. Le plus simple consiste à détecter biochimiquement la présence de la protéine PrP anormale dans les cellules infectées. Pour ce faire, on extrait les protéines cellulaires, on fait agir une protéase pour dégrader la protéine PrP normale (seul le prion pathogène résiste aux protéases) et l'on recherche par des méthodes de laboratoire adaptées la présence de la forme pathogène. La deuxième « preuve » de la présence de prions pathogènes consiste à inoculer dans le cerveau d'animaux sains des extraits de nos cultures. Si l'animal meurt d'une encéphalopathie spongiforme, c'est bien que la culture cellulaire contenait l'agent infectieux.

La longueur de la période d'incubation des encéphalopathies spongiformes est l'une des difficultés des expériences menées sur les prions. Afin de se doter d'un modèle animal plus sensible aux prions ovins que les souris classiques, nous avons mis au point, avec Jean-Luc Vilotte, du laboratoire de Génétique biochimique et cytogénétique de l'INRA, des souris transgéniques qui expriment non plus la protéine PrP normale de souris, mais la protéine PrP normale de mouton. Nous avons obtenu des animaux pour lesquels la période d'incubation a été réduite d'un an (passant de 14 mois à 2 mois), quand elles sont infectées par le prion ovine.

Grâce à notre modèle de souris transgéniques, nous avons montré que les cellules Rov assurent une production stable des prions ovins pathogènes : toutes les souris transgéniques inoculées avec les cultures infectées succombent d'une encéphalopathie spongiforme. Les concentrations infectieuses obtenues après multiplication de ces prions en culture sont comparables à celles que l'on obtient chez l'animal. De plus, nous avons vérifié qu'en l'absence d'expression de la protéine PrP normale, les prions pathogènes ne sont pas produits.

Sur cette culture de cellules épithéliales de lapin, certaines cellules (en bleu) ne produisent pas de prions pathogènes de mouton, mais d'autres (en marron) en synthétisent.

Oliver Andreoletti

Enfin, les cellules Rov infectées convertissent la protéine PrP normale en protéine anormale, agrégée et résistante à la dégradation par les protéases.

Généralement, on admet que, chez l'animal, le prion pathogène est à l'origine de la mort neuronale ; pourtant, dans nos cultures cellulaires, nous n'avons constaté aucun effet cytopathogène associé à la multiplication de l'agent infectieux dans les cellules Rov. Ni leur croissance ni leur viabilité ne sont perturbées par la réplication de l'agent ovin, et l'observation au microscope ne permet pas de distinguer les cellules infectées des cellules contrôles. En conséquence, des cultures infectées peuvent être maintenues et étudiées pendant plusieurs mois. Ainsi, des cellules qui ne sont pas d'origine neuronale peuvent assurer une réplication efficace de prions pathogènes pour peu que l'expression de la protéine PrP normale soit suffisante.

La mise au point de ces nouveaux outils ouvre de nombreuses perspectives pour la recherche sur les encéphalopathies spongiformes transmissibles. Aujourd'hui, on ne dispose d'aucun modèle qui permettrait d'étudier la réplication de prions bovins ou humains en culture cellulaire. La méthode que nous avons mise au point pour l'agent de la tremblante du mouton permettrait d'assurer la multiplication des prions responsables de l'encéphalopathie spongiforme bovine ou de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Grâce à ces cultures cellulaires, on pourra tester de nombreuses molécules et identifier celles qui bloquent la propagation de ces agents pathogènes.

Les souches de tremblante circulant dans le cheptel ovin sont très variées et leur caractérisation, longue et complexe, nécessite la transmission à l'animal de laboratoire. Les modèles cellulaires pourraient représenter une alternative à l'expérimentation animale et nous serviront à étudier, à l'échelle cellulaire, le cycle infectieux, la réplication et la propagation de ces agents infectieux non conventionnels.

Didier VILETTE mène ses recherches dans l'équipe de Hubert Laude, Virologie et immunologie moléculaires, de l'INRA, à Jouy-en-Josas.

D. VILETTE et al., *Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous cells expressing ovine PrP prion protein*, in *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, pp. 4055-4059, 2001.

L'amplification des prions par PMCA

Les prions, les agents infectieux associés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles, semblent constitués uniquement d'une protéine qui ne diffère de la protéine naturelle PrP, présente à la surface de nombreuses cellules de l'organisme, que par sa conformation. Aujourd'hui, de nombreuses questions restent ouvertes : par quel mécanisme, le prion pathogène se réplique-t-il dans l'organisme ? Comment déclenche-t-il la maladie ? Quelles substances pourra-t-on utiliser pour lutter contre la maladie ? Et enfin, comment peut-on améliorer les tests de dépistage de cet agent pathogène ?

L'émergence du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob impose de mettre au point des procédés de diagnostic qui puissent détecter la maladie de façon rapide, efficace et précise. Toutefois, la difficulté principale tient au fait que les prions pathogènes ne sont abondants que dans l'organe cible principal : le cerveau. Pourtant, on a montré que les prions pathogènes sont également présents en petites quantités dans certains tissus, tels que les organes lymphoïdes et le sang. Généralement, les maladies infectieuses sont diagnostiquées grâce aux réactions immunitaires que l'agent infectieux déclenche dans l'organisme ou par l'amplification de la signature (la présence d'acides nucléiques spécifiques) de l'agent incriminé, notamment par la réaction d'amplification des gènes, la PCR. Toutefois, les encéphalopathies spongiformes transmissibles ne déclenchent pas de réactions immunitaires, car l'agent infectieux est une protéine qui a la même séquence qu'une protéine synthétisée naturellement par l'organisme. De surcroît, la PCR n'est d'aucune aide, puisque les prions ne contiennent pas d'acides nucléiques. Dès lors, quel test diagnostique précoce, sensible et spécifique peut-on utiliser pour diagnostiquer une encéphalopathie spongiforme transmissible ?

La méthode standard la plus sensible utilisée jusqu'à présent pour détecter l'agent infectieux consiste à inoculer le matériau testé dans le cerveau d'animaux de laboratoire (des souris ou des hamsters) et à observer l'apparition de symptômes. Malheureusement, ce type d'expérience peut prendre des mois, voire des années. Pour détecter plus rapidement les prions pathogènes, plusieurs laboratoires européens ont mis au point des tests biochimiques, mais ils sont moins sensibles que les tests biologiques, et il n'est pas établi qu'ils repèrent les animaux porteurs asymptomatiques. De surcroît, ces tests sont pratiqués *post-mortem* sur le cerveau des animaux abattus, et nous devons absolument trouver com-

ment dépister les animaux vivants infectés, qui sont encore dans la période d'incubation. Ces tests devront être pratiqués sur des tissus facilement accessibles, de préférence le sang. Diverses méthodes ont été proposées, mais ce sont souvent des variations sur le même thème, des améliorations des réactifs ou de l'appareillage déjà utilisés.

Nous n'avons pas essayé de mettre au point une méthode de détection plus sensible, mais nous avons tenté d'amplifier des traces de prions indétectables par tout autre méthode aujourd'hui disponible. Nous avons élaboré la méthode d'amplification cyclique des protéines anormalement repliées, la PMCA, qui imite la réplication des prions *in vivo*. Au moment de l'infection, les animaux ou les hommes sont contaminés par de minuscules quantités de prions pathogènes, qui se répliquent lentement au détriment de la protéine PrP normale. La PMCA reproduit le même scénario, à ceci près qu'il est accéléré, au point que quelques années dans la réalité deviennent quelques heures en laboratoire. Le prion pathogène est un petit oligomère qui contient plusieurs unités protéiques dans une conformation anormale, et la protéine infectieuse enclenche le repliement anormal de la protéine normale. De cette façon, de plus en plus de protéines normales sont transformées et incorporées dans le polymère pathogène. Pour multiplier le nombre d'unités mal conformées, nous avons utilisé des ultrasons dont on sait qu'ils cassent les polymères.

Par ce procédé de sonication, les agents pathogènes sont découpés en petits fragments qui vont «repousser» en présence de protéine PrP. Ainsi, avec la PMCA, on soumet un échantillon contenant des traces de prions et un excès de protéine PrP à des cycles d'incubation (où le polymère pathogène croît) suivis de bouffées d'ultrasons (qui multiplient le nombre d'unités infectieuses). Le nombre de cycles peut être multiplié à volonté et la quantité de prions pathogènes augmente exponentiellement. Cette méthode est spécifique, car, en l'absence de prion, la protéine PrP ne peut être transformée.

C'est la première méthode qui autorise une amplification cyclique, *in vitro*, des prions, selon un principe qui ressemble à la multiplication de l'ADN par PCR. La PMCA servira certainement dans des tests sanguins de dépistage de l'encéphalopathie spongiforme bovine et du nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, à un stade précoce.

Claudio SOTO, Institut de recherches pharmaceutiques *Serono*