

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-

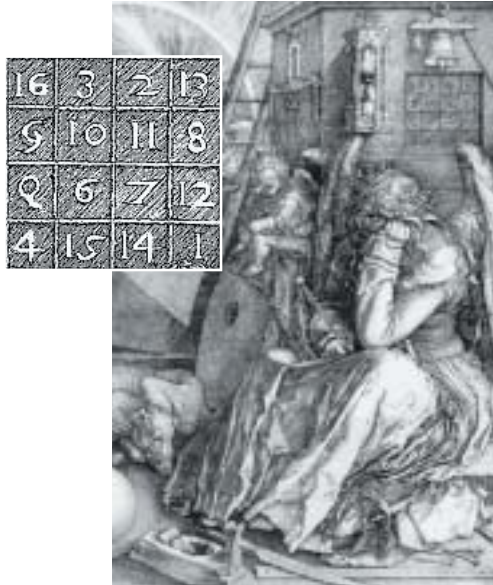
ment dépister les animaux vivants infectés, qui sont encore dans la période d'incubation. Ces tests devront être pratiqués sur des tissus facilement accessibles, de préférence le sang. Diverses méthodes ont été proposées, mais ce sont souvent des variations sur le même thème, des améliorations des réactifs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



Les premiers carrés tétra et pentamagiques

CHRISTIAN BOYER

Les carrés magiques ont une vie propre, distincte du courant mathématique principal. La découverte des premiers carrés tétra et pentamagiques prolonge une tradition millénaire.

Vous savez ce qu'est un carré magique : un carré de côté n , comportant donc $n \times n = n^2$ cases, où vous placez tous les nombres de 1 à n^2 de façon que les sommes des lignes, colonnes et diagonales soient toutes égales. Le carré magique de côté 3 est connu des Chinois depuis très longtemps : il daterait de... 2 200 ans avant Jésus-Christ ! (Figure 1a.) Un carré magique 4x4 est représenté dans Melancholia de Dürer (gravure de 1514 à côté du titre).

On sait aujourd'hui construire des carrés magiques de toute taille, à l'aide de nombreux et très variés algorithmes.

CARRÉS BIMAGIQUES ET TRIMAGIQUES

À la fin du XIX^e siècle, on eût l'idée de rajouter une condition supplémentaire. Si le carré magique reste magique lorsque l'on remplace chacun des nombres par son carré, alors le carré est dit « bimagique ». Hélas, le carré chinois est magique, mais vraiment pas bimagique, les sommes

variant de 77 à 107 ! (Figure 1b.) On imagine la difficulté pour construire de tels carrés bimagiques.

Le premier carré bimagique (figure 1c) connu date de 1890, et est dû au français Pfeffermann, qui n'a jamais donné sa méthode de construction. D'autres carrés bimagiques ont été ensuite trouvés par d'autres auteurs, ainsi que des méthodes pour les construire. Vous pourrez lire l'article de Pierre Tougne paru dans Pour la Science en août 1981, disponible sur le site de Pour la Science : www.pourlascience.com.

Les amateurs ont, bien sûr, essayé d'aller au-delà de la bimagie : les records sont faits pour être battus ! Mais l'art est difficile et le carré bimagique de Pfeffermann échoue en trimagie : les sommes des cubes des cellules, selon les rangées, varient entre 526 400 et 555 200. Seules 4 lignes valent la somme correcte, 540 800.

Le premier carré trimagique, donc

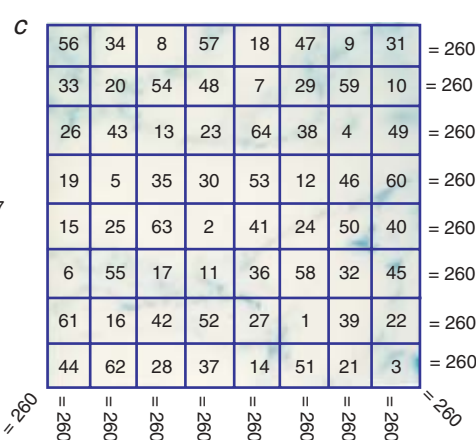
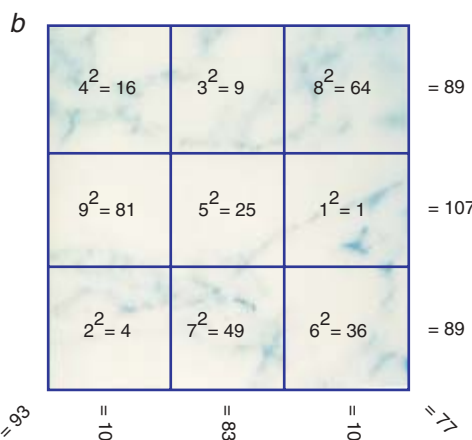
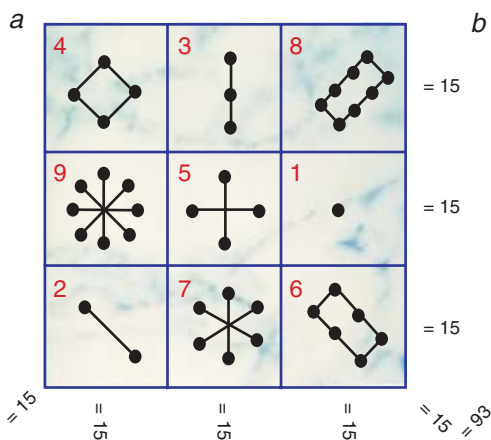


allant jusqu'au cube des cellules, est dû au français Gas-ton Tarry (1843-1913), un aveyronnais qui, après avoir étudié en Mathématiques Spéciales au Lycée Saint-Louis à Paris, fait toute sa carrière en Algérie au service des Contributions directes de l'Administration des Finances. Son métier lui fait donc manipuler les chiffres !

TOI AUSSI BRUTUS

Écoutons Tarry (représenté ci-dessus) raconter comment est née sa passion pour les carrés magiques alors qu'il avait une cinquantaine d'années :

Pendant trois ans, peu près, un ami d'Alger [Brutus Portier], mage enragé, m'a cessé de me turlupiner pour que je m'occupe des carrés magiques. Je l'envoyais promener, n'aimant pas ce que je considérais comme un jeu de casse-tête chinois. Un jour, mon pro-



1. Le carré magique 3x3 est le plus simple (a) : il était connu des Chinois avec la représentation indiquée ici. Ce n'est pas un carré bimagique : les sommes des carrés des éléments selon les lignes, les colonnes et les deux diagonales ne donnent pas la même valeur (b). Le premier

carré bimagique est celui de Pfeffermann (c). Il est facile de vérifier, en élevant au carré tous ses éléments, que la somme des carrés des éléments des lignes colonnes et diagonales sur le nouveau carré obtenu est égale à 11 180. En revanche, ce carré n'est pas trimagique.