

K. TSIROULNIKOV^{§1}, H. REZAF²,
E. BONCH-OSMOLOVSKAYA³,
P. NEDKOV⁴, A. GOUSTEROVA⁵,
V. CUEFF⁶, A. GODFROY⁶,
G. BARBIER⁶, F. MÉTRO¹,
J.-M. CHOBERT¹, P. CLAYETTE⁷,
D. DORMONT⁸, J. GROSCLAUDE²,
T. HAERTLÉ¹

¹ *Laboratoire d'Etude des Interactions
des Molécules Alimentaires, Institut
National de la Recherche Agronomique,
BP 71627, F-44316 Nantes Cedex 3*

² *Virologie et Immunologie Moléculaires,
Institut National de la Recherche
Agronomique, F-78352 Jouy-en-Josas*

³ *Institute of Microbiology, RAS,
Prospekt 60 Let Oktyabrya 7/2,
117811 Moscow, Russia*

⁴ *Institute of Organic Chemistry,
Bulgarian Academy of Sciences, ul.
Acad. G. Bonchev, 1113 Sofia, Bulgarie*

⁵ *Institute of Microbiology, Bulgarian
Academy of Sciences, ul. Acad.
G. Bonchev, 1113-Sofia, Bl.27,
Bulgarie*

⁶ *Laboratoire de Microbiologie et de
Biotechnologie des Extrémophiles,
IFREMER, Centre de Brest, BP 70,
F-29280 Plouzané*

⁷ *SPI-BIO c/o Service de Neurovirologie,
Commissariat à l'Energie Atomique,
BP 6, F-92265 Fontenay aux Roses
Cedex*

Utilisation des microorganismes dans l'hydrolyse des amyloïdes et des farines animales

⁸ *Service de Neurovirologie,
Commissariat à l'Energie Atomique,
BP 6, F-92265 Fontenay aux Roses
Cedex*

[§] *On leave from Laboratory of Proteolytic
Enzyme Chemistry, Shemyakin &
Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry of RAS, Moscow, Russie*

Courriel : haertle@nantes.inra.fr

Ce travail a fait l'objet d'une demande
de dépôt de brevet (Chobert *et al* 2004,
N°FR-0450513) et d'une publication
(Tsiroulnikov *et al*).

Résumé

A la suite de l'interdiction des farines animales en alimentation animale, il est nécessaire de mettre au point des procédés simples et économiques pour les valoriser et les décontaminer vis-à-vis de la présence possible de prion pathogène. L'usage des microorganismes est une solution possible. Aussi, des collections de microorganismes capables de croître sur la kératine ou sur des farines animales et sécrétant des protéases capables de dégrader la PrPsc contenue dans les farines animales ont été criblées. Ceci a permis de découvrir trois souches de bactéries thermophiles, isolées de différentes sources chaudes réparties sur la planète, qui sont capables de dégrader la protéine prion infectieuse PrPsc et de croître sur un milieu composé de farines animales. Leur activité protéolytique, de type chymotrypsique pour l'essentiel, est maximale à la température de 60 à 80°C et focalisée sur certaines liaisons peptidiques qui sont nombreuses sur la protéine prion. Leur action découpe ainsi la protéine prion en morceaux plus courts inoffensifs. Les perspectives sont de mettre en œuvre ces microorganismes thermophiles dont le patrimoine protéolytique permettrait la dégradation des farines animales, actuellement incinérées, et les protéines prions qu'elles renferment.

Introduction

La protéine prion pathogène provoque la transformation de la protéine normale, physiologique et soluble en une forme amyloïde insoluble. Les protéines prions des mammifères présentent un haut degré d'homologie (85 à 97 %) ; en d'autres termes leur composition est très proche. Les protéines prions pathogènes sont donc capables, après introduction dans un autre organisme, de provoquer la transformation des protéines prions normales endogènes (Prusiner 1998) en protéines anormales. L'infection des bovins a ainsi été associée à la présence, dans leur nourriture, de farines de viandes et d'os d'animaux, désignées « farines animales », provenant d'animaux contaminés par les protéines prions pathogènes.

L'existence de farines animales provenant d'animaux contaminés par l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) présente de nombreux problèmes d'ordres économique, technique et environnemental. La forme amyloïde insoluble de la protéine prion (PrP^{Sc}), qui est suspectée d'être la forme infectieuse et pathogène, est très stable. Cette protéine est riche en feuillets β , elle résiste à la chaleur et aux enzymes protéolytiques les plus actives, comme par exemple la protéinase K (Prusiner 1998). Par conséquent, dans de nombreux pays, les produits d'origine animale qui pourraient être utilisés comme supplément nutritionnel pour les animaux, tels que les farines animales, sont incinérés pour éviter tout risque de transmission de la protéine prion infectieuse à d'autres animaux. En Europe, l'utilisation des farines animales et de leurs sous-produits en tant que nourriture pour les animaux destinés à la consommation humaine (y compris porcs et volailles) a été interdite par précaution fin 2000. Ainsi, à titre d'exemple, puisque la réglementation récente interdit la consommation des farines par les animaux, presque 800 000 tonnes de farines animales sont à détruire chaque année en France.

Les protéines prion infectieuses sont résistantes aux méthodes de destruction conventionnelles qui permettent de dénaturer les protéines, incluant par exemple l'autoclavage, la congélation et l'exposition à des réactifs fortement délétères pour les bactéries, comme le formaldéhyde, l'acide carboxylique et le chloroforme. A titre illustratif, la protéine prion infectieuse résiste à des températures de l'ordre de 200°C. Actuellement seuls l'incinération ou encore le traitement avec des agents de blanchiment sont utilisés en pratique pour détruire l'isoforme pathogène de la protéine prion.

Il existe donc un besoin pour de nouvelles formulations et de nouvelles méthodes pour détruire la protéine prion infectieuse qui soient applicables au traitement de matériaux biologiques, comme les tissus animaux, comprenant une protéine prion infectieuse. Ces nouvelles techniques devraient être moins consommatrices d'énergie, techniquement plus simples et plus économiques que les techniques connues. Elles devraient ne pas entraîner la destruction totale des farines à décontaminer comme cela peut être le cas avec l'incinération. Les procédés disponibles actuellement pour détruire la protéine prion étant assez complexes et présentant des inconvénients d'ordre technique ou économique, il devenait crucial de rechercher des bactéries capables de se multiplier sur les substrats à décontaminer et de produire simultanément *in situ* des enzymes protéolytiques efficaces contre les amyloïdes.

La résolution du problème de réduction du caractère pathogène des farines animales à l'aide de microorganismes a requis l'étude préalable de l'activité de protéases sécrétées sur des substrats modèles. Les kératines sont des bons substrats modèles car elles présentent de nombreuses similarités structurelles avec les amyloïdes infectieux. On peut citer

notamment l'insolubilité des kératines due à la présence de nombreux ponts disulfure intra et inter moléculaires, le contenu important en feuillets β , dans le cas des β kératines, et leur degré important d'agrégation (Arai *et al* 1996, Goddard et Michaelis 1934). Les kératines ne peuvent être détruites que par des protéases (kératinases) hautement actives, comme les subtilisines sécrétées par les bactéries appartenant au genre *Bacillus* (Williams *et al* 1990, Lin *et al* 1992, Atalo et Gashe 1993, Cheng *et al* 1995, Kristie *et al* 2000) ou par des protéases actives en conditions dénaturantes qui déstabilisent les substrats résistant à la protéolyse (Han et Damodaran 1997). La kératine insoluble, formant des structures fibrillaires similaires à la PrP^{Sc} a été utilisée comme substrat modèle.

Pour atteindre ces objectifs, des collections de microorganismes capables de croître sur la kératine ou sur des farines animales et sécrétant des protéases capables de dégrader la PrP^{Sc} contenue dans les farines animales ont été criblées, ce qui a permis de découvrir des bactéries capables de dégrader la protéine prion infectieuse PrP^{Sc} et de croître sur un milieu composé de farines animales.

L'efficacité du procédé pour dégrader les amyloïdes infectieux était inattendue puisque l'exposition à des températures élevées et à des enzymes comme la protéinase K, connue pour dégrader les structures amyloïdes ne suffit pas à dégrader la protéine prion. Il est donc très surprenant que l'incubation de bactéries avec la protéine prion infectieuse parvienne à la détruire, à des températures compatibles avec la survie des bactéries.

1 / Matériel et méthodes

Les composés suivants, à savoir les sels, les milieux, la chaîne B de l'insuline bovine, la gélatine bovine, le MOPS et tous les autres composés chimiques ont été obtenus auprès de Sigma Chemical Company (Saint-Louis, MO, USA). Les préparations purifiées de prion ovin recombinant ont été obtenues à partir de corps d'inclusions produits par les bactéries *E. coli* selon la méthode décrite par Rezaei *et al* (2000). La kératine de poulet a été obtenue auprès de Yu Zuev (Kazan Centre of Science, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia). Les poils de porc ont été obtenus auprès de la société SIFDDA (Plouvara, France).

1.1 / Souches bactériennes, milieux et conditions de croissance

Parmi l'ensemble des souches microbiennes criblées, celles qui ont donné des résultats positifs sont des souches bactériennes thermophiles anaérobies isolées de souches collectées au site Rainbow (36°, 14' Nord, 33°, 54' Ouest, 2300 mètres de profondeur). Les souches AT1243 et AT1222 ont été isolées d'un puits de chaleur. La souche AT1222 a été enrichie à 60°C en milieu SP (30 g/L de sel marin, 2 g/L de poils de porc).

La souche AT1243 a été enrichie à 80°C dans un milieu SPS (SP + 5 g/L de sulfure de sodium). Les sous-cultures réalisées pour les dosages de protéases ont été effectuées dans les mêmes conditions. Des amplifications par Polymerase Chain Reaction (PCR) et un séquençage ont indiqué que la souche AT1222 appartient à l'espèce *Thermosipho sp.* (bactérie thermophile) et que la souche AT1243 est une bactérie archaïque qui appartient à l'espèce thermophile *Thermococcus genus*.

La souche S290 a été isolée du point chaud de caldera Uzon, Kamchatka et a été identifiée comme appartenant au genre *Thermoanaerobacter* par des réactions avec des oligonucléotides spécifiques dirigés contre des ARNr-16S. La souche S290 a été cultivée à 60°C pendant 5 jours sur un milieu minéral Th (0,33 g/L de KH_2PO_4 , 0,33 g/L de NH_4Cl , 0,33 g/L de MgCl_2 , 0,33 g/L de CaCl_2 , 0,33 g/L de KCl , 0,5 g/L de NaHCO_3 , et 0,5 g/L de Na_2S), supplémenté avec 2 g/L de poil de porc ou de plumes.

Lorsque les différentes espèces et souches de bactéries ont été cultivées sur des farines animales, la kératine de tous les milieux a été remplacée par 2 g/L de farines de viande, d'os, de sang ou de farines comprenant un mélange de ces trois composants.

L'activité des protéases provenant des surnageants des bactéries cultivées en présence de kératine hydrolysée, de farines animales ou de prion recombinant non pathogène a été déterminée par électrophorèse. 50 µL de surnageants ont été ajoutés à 50 µL de kératine de plumes (1 mg/mL), ou de kératine de poils de porc (2 mg/mL), ou de farines animales (2 mg/mL) ou encore de prion recombinant (1 mg/mL) dans un tampon MOPS 20 mM, de pH 7,2 et ont été incubés à différentes températures pendant 20 à 40 h. Parallèlement, et à titre de témoin, l'hydrolyse du substrat par la protéinase K [0,02 mg/mL (0,6 µM)] a été réalisée à 37°C. Le tampon de lyse a été ajouté aux fractions aliquotes provenant des différentes réactions protéolytiques. Les fractions aliquotes ont été portées à ébullition durant 10 min et ensuite un gel SDS-PAGE à 15 % a été réalisé selon Laemmli (1970). Les protéines sur les gels ont été colorées au bleu de Coomassie Brilliant R-450.

1.2 / Spécificité des protéases

L'activité peptidasique envers les acides aminés ou les peptides N-substitués par des *p*-nitroanilides (substrats chromophores dont l'hydrolyse peut être suivie par spectrophotométrie) a été déterminée. 900 µL de substrat à 0,1 mM ont été ajoutés à 100 µL de surnageants dans un tampon MOPS 20 mM, de pH 7,2, DMSO 10 %. Le mélange réactionnel a été incubé à différentes températures durant 3 et 20 h, puis l'absorption à 410 nm a été mesurée (ϵ_{410} *p*-nitroanilides = 8800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

La spécificité des protéases provenant des surnageants des bactéries a été déterminée en mesurant la fragmentation de la chaîne B oxydée de l'insuline bovine, un substrat stan-

dard permettant de tester l'activité des enzymes protéolytiques. La chaîne B de l'insuline est composée d'un grand nombre d'acides aminés hydrophobes et inclut également un nombre important de résidus branchés chargés. 100 µL de surnageant ont été incubés avec 100 µL de chaîne B d'insuline à 2 mg/mL dans un tampon MOPS 20 mM, de pH 7,2 à différentes températures pendant 10 h. Les produits de l'hydrolyse ont été séparés par HPLC en phase inversée sur une colonne de Nucléosil 300-5 C_{18} avec un gradient de 0 à 60 % de CH_3CN , TFA 0,1 %. Les fractions collectées ont été soumises à des analyses d'acides aminés (Bidlingmeyer *et al* 1984). La séquence en acides aminés des peptides a été établie grâce à la connaissance de la structure primaire de la chaîne B de l'insuline.

2 / Résultats

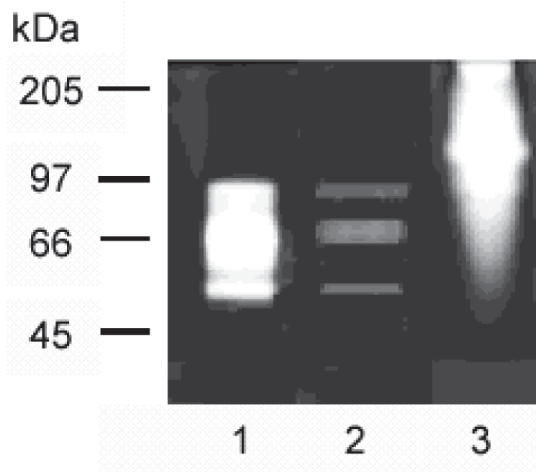
2.1 / Détermination des activités protéolytiques

Dans le but de caractériser les protéases sécrétées par les cultures de bactéries, des zymogrammes ont été réalisés sur les surnageants provenant de telles cultures. La technique du zymogramme consiste à polymériser de la gélatine bovine à 0,01 % dans un gel d'électrophorèse réalisée en présence de SDS. Là où la protéase migre en fonction de sa masse moléculaire, elle va hydrolyser la gélatine qui disparaît alors du gel. Après coloration de l'ensemble du gel, des bandes blanches apparaissent, indicatrices des lieux d'hydrolyse, donc de la présence de protéases. Les protéases soumises à une électrophorèse conservent leur activité protéolytique (figure 1, pistes 1 et 2). Les zymogrammes réalisés à partir des surnageants de la souche AT1243 montrent que cette souche possède un ensemble de protéases possédant une masse moléculaire apparente de l'ordre de 45 à 100 kDa. Les zymogrammes réalisés à partir des surnageants des souches AT1222 montrent une seule bande d'activité protéolytique, correspondant à une masse moléculaire approximative de 100 kDa. Enfin, les zymogrammes réalisés à partir des surnageants de la souche S290 montrent des bandes d'activité protéolytique correspondant à des masses moléculaires approximatives de 66, 100, 200 kDa et plus (figure 1, piste 3), révélant la présence de plusieurs activités protéolytiques.

La capacité des protéases sécrétées par les bactéries thermophiles AT1243, AT1222 et S290 à hydrolyser les substrats de faible masse moléculaire, (*p*-nitroanilides de N-benzoylarginine, dérivés N-succinyl de phénylalanine, peptides Ala-Ala-Pro-Phe et Ala-Ala-Pro-Lys) a été étudiée. Après trois heures d'incubation, l'activité des surnageants des souches S290 envers le peptide Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA a été observée (tableau 1).

L'hydrolyse de la chaîne B de l'insuline oxydée, un substrat standard permettant de tester l'activité des enzymes protéolytiques a été

Figure 1. Zymogrammes des surnageants provenant des bactéries thermophiles et S290. SDS-PAGE 10 %, piste 1 : surnageant de souche AT1243 (incubation à 80°C), piste 2 : surnageant de souche AT1222 (incubation à 80°C), piste 3 : surnageant de souche S290. Les zones non colorées correspondent au niveau de migration des protéases, en fonction de leur masse moléculaire.



étudiée. La structure primaire de la chaîne B de l'insuline est la suivante :

Phe¹-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys^{*}-Gly-Ser⁹-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu¹⁵-Tyr¹⁶-Leu-Val-Cys^{*}-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe²⁵-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala
(* signifie que le résidu cystéyle est oxydé).

L'analyse des acides aminés provenant des peptides hydrolysés permet de proposer que les protéases de la souche AT1243 clivent les liaisons peptidiques suivantes : Ser⁹-His¹⁰, Tyr¹⁶-Leu¹⁷ et Phe²⁵-Tyr²⁶. Un site de clivage additionnel (Leu¹⁵-Tyr¹⁶) a été observé dans le cas de la souche AT1222. Les protéases de la souche S290 hydrolysent la chaîne B de l'insuline au niveau des liaisons peptidiques Leu¹⁵-Tyr¹⁶ et Tyr¹⁶-Leu¹⁷. Donc, la majorité des protéases produites par les microorganismes thermophiles étudiés possède une spécificité de type chymotrypsine ; la chymotrypsine est une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine et dont l'activité protéolytique est dirigée vers les liaisons peptidiques impli-

quant des résidus d'acides aminés hydrophobes et aromatiques. Certaines des bactéries montrent également une capacité inattendue à hydrolyser les liaisons peptidiques après un résidu de sérine. De manière surprenante, les protéases secrétées par les microorganismes thermophiles n'attaquent pas les autres sites hydrophobes situés dans la molécule de la chaîne B de l'insuline. Les protéases des souches sélectionnées pour l'hydrolyse des kératines reconnaissent donc des motifs structuraux particuliers dans la molécule substrat. La protéine prion contient de nombreux résidus hydrophobes : 10 Tyr, 3 Phe, 8 Trp et 4 Ile et de nombreux résidus Ser (8). Par conséquent, les protéases sont capables de dégrader les prions jusqu'à l'obtention de peptides relativement courts. De plus, l'accès aux sites de clivage est augmenté pendant le chauffage à la température optimale d'hydrolyse par les protéases, parce que dans de telles conditions, la structure de la protéine est partiellement ou complètement dénaturée.

2.2 / Croissance des microorganismes étudiés sur les milieux contenant de la kératine ou des farines animales

La capacité des bactéries thermophiles, souches S290, AT1243 et AT1222 à croître sur des milieux contenant de la kératine de poils de porc ou de plumes a été testée. Les bactéries sélectionnées sont capables d'utiliser des kératines α provenant de poils de porc ou β provenant de plumes, comme principale source de nutriment.

La croissance sur de la kératine de laine a été la plus importante dans le cas des souches S290 et AT1222, la souche AT1243 présentant des caractéristiques de croissance inférieures sur ce milieu. Le temps de culture de la plupart des bactéries était de trois jours.

Les souches de bactéries étudiées ont également prouvé qu'elles étaient capables de croître sur les farines animales. De plus, ces bactéries croissent sur les farines animales de manière plus rapide que sur de la kératine. La croissance la plus faible a été obtenue lorsque

Tableau 1. Activité des protéases (pourcentage d'hydrolyse de substrat) des surnageants des bactéries thermophiles envers des substrats chromogènes de faible masse moléculaire. Les conditions de réactions sont données dans la partie matériel et méthode. Les substrats ont été incubés pendant trois heures à 80°C (AT1243 et AT1222) et à 60°C (S290).

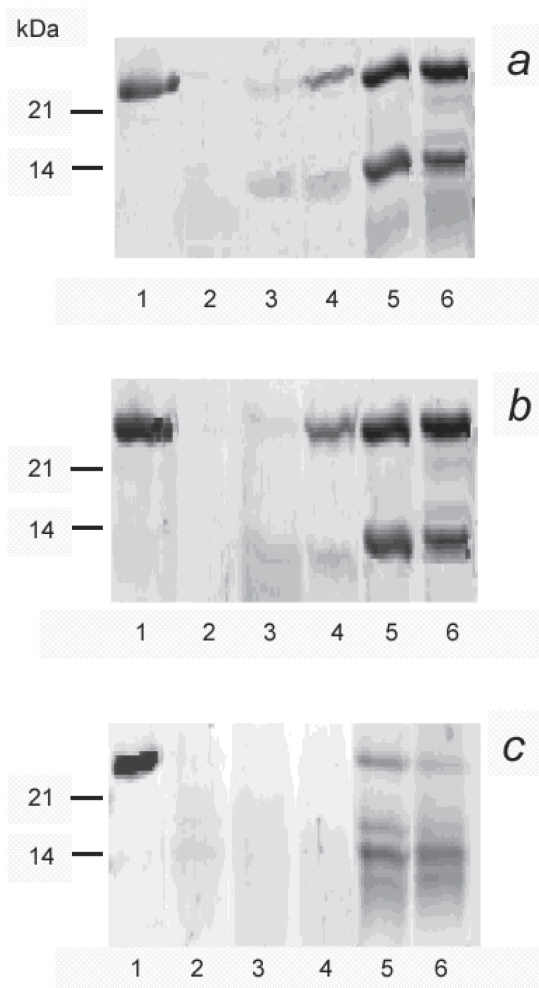
	Bzl-Arg-pNA	Suc-Phe-pNA	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA
AT1243	0,8	0,6	0	0
AT1222	1,0	0,6	1,3	0
S290	0,1	0,4	30	0,3

Figure 2. Hydrolyse de la protéine prion recombinante par les surnageants de bactéries thermophiles.

(a) Pistes 1 à 6 : respectivement protéine prion native, protéine prion hydrolysée par les surnageants des souches S290 (60°C), AT1243 (80°C), AT1222 (80°C), AT1243 (60°C) et AT1222 (60°C) pendant 5 h.

(b) Pistes 1 à 6 : respectivement protéine prion dénaturée thermiquement (PrP^{den}), PrP^{den} hydrolysée par les surnageants des souches S290 (60°C), AT1243 (80°C), AT1222 (80°C), AT1243 (60°C) et AT1222 (60°C) pendant 5 h.

(c) Pistes 1 à 6 : respectivement protéine prion native en présence de Cu^{2+} (PrP^{Cu}), PrP^{Cu} hydrolysée par les surnageants des souches S290 (60°C), AT1243 (80°C), AT1222 (80°C), AT1243 (60°C) et AT1222 (60°C) pendant 5 h.



le substrat utilisé était le sang, probablement à cause de la toxicité de certains composants présents.

2.3 / Activité des protéases produites par les bactéries thermophiles envers la protéine prion recombinante

La protéine prion recombinante ovine se dénature à 80°C et forme des structures amy-

loïdes. Cette protéine a donc été utilisée comme modèle de structure amyloïde cellulaire. La capacité des protéases provenant des bactéries thermophiles utilisées à hydrolyser le prion ovin natif ou dénaturé thermiquement a été étudiée.

Les figures 2a et b montrent que les protéases produites par la souche S290 hydrolysent le prion natif et le dénaturent complètement à 60°C en 4 h. Les protéases produites par les souches AT1243 et AT1222 hydrolysent la protéine prion native ou dénaturée thermiquement à 80°C, ce qui correspond à leur température de croissance optimale. Cependant, à 60°C, la protéine prion n'est pas hydrolysée complètement par ces souches. Dans ce cas, comme on l'observe avec la protéinase K, un grand fragment hydrolytique d'une masse moléculaire d'environ 14 kDa s'accumule. Comme cela a été déjà démontré, la résistance de ce fragment à la protéolyse est causée par sa capacité à s'agréger. La formation de ces agrégats dépend de la concentration et de l'activité des protéases. Si elles sont inférieures à une valeur critique, les produits de cette protéolyse limitée s'agrègent et deviennent totalement résistants à une hydrolyse future. A 80°C, les agrégats sont déstabilisés et/ou dénaturés et l'activité des protéases augmente considérablement, donc l'accumulation du fragment de 14 kDa n'apparaît pas. L'introduction d'ions cuivre peut faciliter la transformation des molécules de protéine prion sous leur forme amyloïde. En utilisant ce modèle de structure amyloïde, il a été montré que les protéases des souches S290 (à 60°C), AT1243 et AT1222 (à 80°C) hydrolysent complètement la protéine prion en 4 h (figure 2c). Durant l'étude de l'activité protéolytique des protéases des souches AT1243 et AT1222 à 80°C, l'accumulation de grands fragments hydrolytiques de protéine prion n'a pas été observée dans le cas de l'hydrolyse du prion natif et dénaturé contrairement à l'activité de ces souches à 60°C (figure 2c). Les structures amyloïdes sont donc déstabilisées à 80°C, facilitant leur destruction par les protéases des thermophiles.

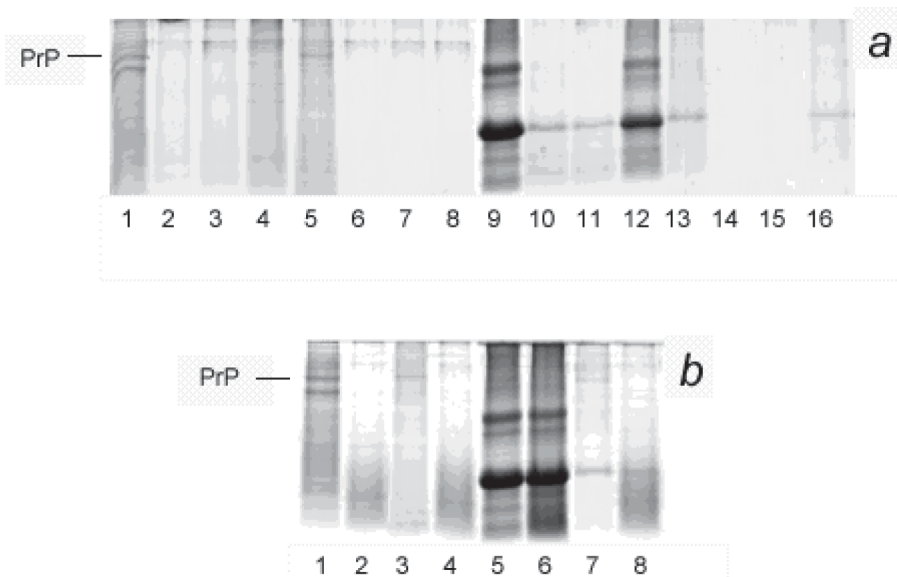
2.4 / Activité protéolytique des surnageants de culture bactérienne

Après 24 h d'incubation avec des farines de laine/poils, de viande, de sang et de mélange avec les surnageants des souches AT1243, AT1222 et S290, une dissolution partielle du substrat a été observée. Les protéases des souches AT1243 et AT1222 hydrolysent efficacement les farines de viande, les farines de laine/poils, les farines de sang et les farines mixtes (figure 3a).

Les enzymes des souches S290 montrent une activité plus faible. Cela pourrait résulter des faibles températures d'incubation à savoir 80°C dans le cas des souches AT1243 et AT1222 et 60°C dans le cas de la souche S290.

La protéinase K hydrolyse efficacement les farines de laine/poils et avec une plus faible

Figure 3. Hydrolyse de farines animales par les surnageants de bactéries thermophiles et par la protéinase K. (a) Les pistes 1 à 16 représentent respectivement : des farines de laine/poils (1), des farines de laine/poils hydrolysées par les surnageants des souches AT1243 à 80°C (2), AT1222 à 80°C (3) et S290 à 60°C (4), des farines de viande (5), des farines de viande hydrolysées par les surnageants des souches AT1243 (6), AT1222 (7) et S290 (8), des farines de sang (9), des farines de sang hydrolysées par les surnageants des souches AT1243 (10), AT1222 (11) et S290 (12), des farines mixtes (13), des farines mixtes hydrolysées par les surnageants des souches AT1243 (14), AT1222 (15) et S290 (16). Les temps d'incubation sont de 20 h. (b) Les pistes 1 à 8 représentent respectivement : des farines de laine/poils (1), des farines de laine/poils hydrolysées par la protéinase K (1 µM, 37°C) (2), des farines de viande (3), des farines de viande hydrolysées par la protéinase K (4), des farines de sang (5), des farines de sang hydrolysées par la protéinase K (6), des farines mixtes (7), des farines mixtes hydrolysées par la protéinase K (8). Les temps d'incubation sont de 20 h.



efficacité, les farines de viande et les farines mixtes. La protéinase K est pratiquement inactive envers les farines de sang (figure 3b).

2.5 / Résultats et perspectives

L'analyse des résultats obtenus démontre que l'élimination des amyloïdes et des farines animales en utilisant des bactéries thermophiles est réaliste. Naturellement, de nombreux essais doivent encore être réalisés, en particulier pour confirmer la neutralisation de l'infectiosité des farines à risque, ou plutôt des farines infectieuses et/ou des inoculats infectieux tout court. Ces essais devraient être pratiqués *in vivo* par l'utili-

sation d'animaux, les souris en l'occurrence.

Compte tenu de nos observations, il est fort probable que l'infectiosité des prions soit éliminée lors de l'élimination des formes amyloïdes. Si tel est le cas, on peut espérer que grâce à cette approche combinée impliquant les compétences des laboratoires de l'INRA, de l'IFREMER, et ceux des collègues russes et bulgares, une méthode de neutralisation des facteurs infectieux des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sera trouvée. A ce moment là, il faudra mettre en place les travaux de développement qui pourront également être réalisés en dehors de notre Institut.

Références

- Arai K., Naito S., Dang V.B., Nagasawa N., Hirano M., 1996. Cross-linking structure of keratin. VI. Number, type, and location of disulfide cross linkages in low-sulphur protein of wool fibre and their relation to permanent set. *Journal of Applied Polymer Science*, 60, 169-179.
- Atalo K., Gashe B.A., 1993. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A), which degrades various kinds of fibrous proteins. *Biotechnology Letters*, 15, 1151-1156.
- Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L., 1984. Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *Journal of Chromatography*, 336, 93-104.
- Cheng S.W., Hu H.M., Shen S.W., Takagi H., Asano A., Tsai Y.C., 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59, 2239-2243.
- Chobert J.-M., Grosclaude J., Haertlé T., Demande de brevet français n° 0450513 « Compositions et méthodes pour la destruction de protéines prion infectieuses » 12 mars 2004.
- Goddard D.R., Michaelis L.K., 1934. A study on keratin. *Journal of Biological Chemistry*, 106, 604-614.

Han X.Q., Damodaran S., 1997. Stability of protease Q against autolysis and in sodium dodecyl sulphate and urea solutions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240, 839-843.

Kristie L., Evans J.C., Crowder J., Miller E.S., 2000. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 1004-1011.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assemblage of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 225, 650-657.

Lin X., Lee C.G., Gasale E.S., Shih J.C.H., 1992. Purification and characterisation of a keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3271-3275.

Prusiner S.B., 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 13363-13383.

Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hui Bon Hoa G., Haertlé T., Grosclaude J., Debey P., 2000. High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2833-2839.

Tsirounnikov K., Rezai H., Bonch-Osmolovskaya E., Nedkov P., Gousterova A., Godfroy A., Cuff V., Barbier G., Métro F., Chobert J.-M., Clayette P., Dormont D., Grosclaude J., Haertlé T., 2004. Hydrolysis of the amyloid prion protein and non-pathogenic Meat and Bone Meal (MBM) by anaerobic thermophilic prokaryotes and *Streptomyces* subsp. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 6353-6360.

Williams C.M., Richter C.S., Mackenzie J.M. Jr., Shih J.C.H., 1990. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1509-1515.

Abstract

Use of microorganisms in hydrolysis of amyloids and Meat and Bone Meal

The interdiction of the use of MBM in animal feeding makes the elaboration of simple and economically viable procedures of valorization and decontamination of substances containing pathogenic prions necessary. One of the possible solutions is the use of microorganisms. Hence, collections of microorganisms able to grow on keratin or on MBM, and secreting proteases able to degrade PrPsc were screened. Three strains of thermophilic bacteria, isolated initially from hot

springs scattered on the planet, were able to degrade amyloids (some of them infectious) and to grow on media made of MBM. Their proteolytic activity, mostly of chymotryptic nature were maximal between 60 and 80 °C and were triggered towards the hydrolysis of peptide bonds between amino acids largely present in prion proteins. Their action cleaves the prion protein into short inoffensive fragments. The perspectives resulting from this work imply the use of such microorganisms, whose proteolytic potential allows to degrade MBM-containing prions, actually still incinerated.