

Encéphalopathies spongiformes et prions, liaison fatale ?

C'est sur des arguments principalement biochimiques qu'en 1982 S.B. Prusiner émit l'hypothèse que l'agent responsable de la scrapie était une protéine ([1], *m/s* n° 10, vol. 2, p. 588) : la présence quasi exclusive dans les sous-fractions infectieuses d'une protéine (avec, en fait, une très faible quantité d'acides nucléiques [2]) ; la persistance du pouvoir infectieux après traitement par des agents qui altèrent la structure des acides nucléiques (Zn²⁺, psoralènes, rayons ultraviolets) ; la résistance du pouvoir infectieux aux détergents. La confirmation de cette théorie passait par au moins trois étapes indispensables : (1) comprendre les mécanismes biochimiques du pouvoir infectieux de la protéine ; (2) obtenir cette protéine sous forme pure et reproduire la maladie ; (3) expliquer les divers modes d'apparition des maladies de la même famille que la scrapie : la maladie de Creutzfeldt-Jakob et le syndrome de Gerstmann-Scheinker-Sträussler héréditaires, le Kuru, les maladies transmissibles par inoculation et la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (*figure 1*).

Pour atteindre ce but, tout l'arsenal de la biologie moléculaire a été employé, et, à ce jour, seule la première étape n'a pu être que partiellement franchie. La théorie de Prusiner semble confortée, même si quelques groupes restent sceptiques [3], et le « non-conformisme » des maladies à prions se retrouve actuellement à chaque stade de la pathogénie : la forme infectieuse serait protéique, le pouvoir infectieux résiderait dans un changement conformationnel inductible, responsable de la résistance aux protéases, les points de mutations et le polymorphisme du gène influeraient sur les formes cliniques.

Il est intéressant de dresser un tableau récapitulatif des recherches qui ont permis de faire évoluer le concept de maladie à prions. Le fractionnement biochimique des inoculats infectieux a permis tout d'abord de montrer que la protéine infectieuse (PrP^{Sc}) avait une taille apparente de 27-30 kDa [4]. Après microséquençage de cette protéine, on a pu synthétiser des oligonucléotides grâce auxquels le gène codant pour PrP a été isolé. La forme native de PrP a un poids moléculaire de 33-35 kDa [5]. Il s'agit d'une glycoprotéine qui se lie à la membrane par une ancre phosphatidylinositol (GPI), dont le gène se trouve, chez l'homme, sur le bras court du chromosome 20, et ne possède qu'un seul exon [6]. Le niveau de transcription du gène ne change pas chez les animaux infectés [7], et on ne connaît, actuellement, aucune fonction à cette protéine. Chez le poulet, on a cependant pu copurifier la PrP avec une protéine liée au récepteur de l'acétylcholine [8]. Cela n'est pas étonnant car des études histologiques ont montré que la protéine se trouverait localisée dans les synapses et les terminaisons axonales [9].

Les études biochimiques ont été menées sur la protéine responsable de la scrapie, PrP^{Sc}, produite *in vitro* dans des cellules de neuroblastome [10] et, *in vivo*, par la souris et le hamster. Chez ces animaux, il ne semble pas exister de différence de séquence entre les deux formes protéiques, PrP^{Sc} infectieuse de masse moléculaire apparente 27-30 kDa, résistante aux protéases, et PrP normale, de masse moléculaire apparente 33-35 kDa, sensible à la dégradation protéasique. Cela réduit la probabilité qu'un mécanisme d'*editing** (*m/s* n° 4, vol. 6,

p. 396 et *m/s* n° 6, vol. 8, p. 605) soit responsable des différences entre les deux formes protéiques. Ces éléments, ainsi que la stabilité transcriptionnelle du gène lors de l'infection, suggèrent que le pouvoir infectieux de la PrP^{Sc} serait dû à un changement de conformation de la PrP qui, devenue résistante à la dégradation enzymatique cellulaire, s'accumulerait dans le cerveau [11]. Des études récentes *in vitro* semblent indiquer que cette modification de conformation serait le résultat du passage d'une structure en hélice α de certains domaines de la protéine, à une structure en feuillet β [12, 13]. Par ailleurs, la cinétique d'apparition de la protéine anormale implique une interaction protéine/protéine sous forme de dimère, une protéine anormale convertissant une protéine normale par un mécanisme de coopération comparable à celui observé dans l'allostérie [11]. Grâce à des anticorps spécifiques, il est possible de distinguer la PrP^{Sc} de la PrP. Des expériences de chasse isotopique (*pulse chase*), menées dans les cellules en culture, montrent une apparition retardée de la forme Sc par rapport à la forme normale, suggérant que l'interaction délétère est tardive. Par ailleurs, les agents qui altèrent la PrP lorsqu'elle est membranaire, comme l'addition de protéases dans le milieu de culture, ou de phospholipase C spécifique des phosphatidylinositol (PI-PLC) qui décroche la PrP de son ancrage GPI, inhibent la formation de PrP^{Sc} dans ces cellules [10]. Ces résultats permettent donc de situer le changement de conformation, soit au sein de la membrane plasmique, soit

* *Editing* ou correction sur épreuves : modification du transcrit primaire par addition, remplacement, ou, plus rarement, délétion de résidus uridyliques.

lors de l'internalisation de la protéine. De plus, aucune fraction subcellulaire, isolée de son environnement, n'a permis d'effectuer une conversion de la PrP en PrP^{Sc} [14]. Ces éléments corroborent les travaux d'autres auteurs qui ont localisé le lieu de transition des formes normales vers les formes pathologiques dans la voie endosomique [15]. Une représentation synthétique de ces éléments est présentée dans les figures 1 et 2.

Les apports de la transgénèse ont été multiples pour la compréhension de la physiopathologie des prions. Tout d'abord l'obtention d'animaux transgéniques pour une forme altérée de la protéine, équivalente à une mutation retrouvée dans le syndrome de Gerstmann-Scheinker-Sträussler, a confirmé que la présence de la seule protéine pouvait induire la maladie ([16] et *m/s* n° 2, vol. 7, p. 186). Plus récemment, le *knock out* du gène codant pour les prions (RNP) a montré que, d'une part, les animaux obtenus étaient viables et avaient un comportement normal [17], et que, d'autre part, ces animaux étaient résistants à l'infection par des inoculats de PrP^{Sc} ([18] et *m/s* n° 8-9, vol. 9, p. 989). Les hétérozygotes Prnp^{0/+} présentent, après inoculation, des signes atténués et d'apparition plus tardive que les témoins: les animaux Prnp^{0/+} sont toujours vivants à 322 jours, par opposition aux animaux sauvages Prnp^{+/+} pour lesquels le décès survient 180 jours après inoculation. Le croisement des homozygotes Prnp^{0/0} avec des souris transgéniques pour la forme normale de la protéine de hamster donne des animaux sensibles aux PrP^{Sc} de hamster. Il faut noter qu'un faible taux d'agent infectieux a été retrouvé dans les extraits de cerveau des homozygotes Prnp^{0/0} 20 semaines après inoculation. A 25 semaines, toutefois, il ne semblait plus exister de particules infectieuses chez les animaux Prnp^{0/0}, faisant suspecter une contamination lors de la manipulation des échantillons à 20 semaines. Cette hypothèse est en cours d'évaluation.

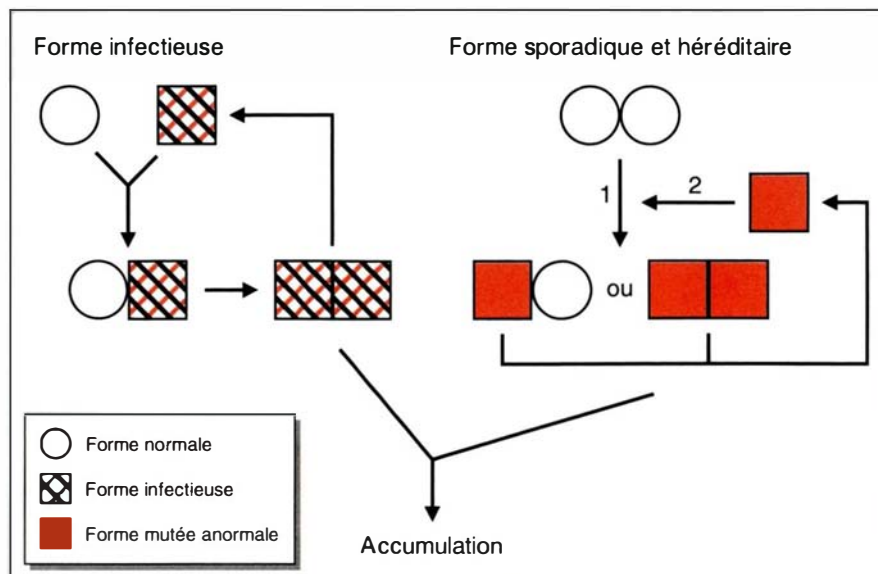


Figure 1. **Schématisme des différentes formes de transmission de la molécule anormale.** Dans la forme infectieuse, une molécule anormale importée dans l'organisme (carré quadrillé), par un acte iatrogène le plus souvent chez l'homme, va présider à la transformation des formes normales endogènes (cercle vide). La protéine ainsi transformée participera à la fois à la conversion d'autres formes normales et à la pathogénie par accumulation. Dans les formes héréditaires, la mutation favorise la conversion spontanée de la forme normale en forme anormale (carré rouge), soit d'un homodimère complet, soit d'une molécule qui influencera la conformation des protéines mutées qui sont plus susceptibles aux changements. Pour la forme sporadique, l'origine de la transformation peut être, soit la survenue d'une mutation somatique, soit un changement conformationnel spontané. Par la suite, un mécanisme d'auto-infection amplifie cet événement initial.

Quoiqu'il en soit, ces études ouvrent des perspectives intéressantes pour la thérapeutique des maladies à prion. On peut, en effet, concevoir qu'un ARN antisens puisse ralentir le développement de la maladie chez l'homme. En ce qui concerne l'élevage, la production d'ovins transgéniques pour un ARN antisens, ou ayant un gène Prnp inactif, empêcherait le développement de la scrapie. L'autre apport de la transgénèse se situe sur le plan génétique. On a vu que l'on pouvait reproduire la maladie par transgénèse d'une forme mutée de la PrP, confirmant la responsabilité de la PrP dans les formes héréditaires de la maladie. Par ailleurs, l'existence d'une barrière inter-espèces aurait pu remettre en cause la théorie de la protéine comme seul agent infectieux. C'est

en fait une barrière relative, qui a pour conséquence principale de retarder l'apparition des signes lorsque l'on inocule, par exemple, une souris avec la PrP^{Sc} du hamster. Prusiner *et al.* [19] ont obtenu des souris transgéniques pour le gène RNP du hamster. On observe alors que la susceptibilité à la PrP^{Sc} de hamster est proportionnelle au niveau de transcription du transgène, avec réduction du temps d'incubation lorsque le transgène est fortement exprimé. Et surtout, preuve que la barrière inter-espèces est relative, lorsque l'on inocule ces souris transgéniques avec une PrP^{Sc} de souris, le temps d'apparition des signes, bien que plus long qu'avec la PrP^{Sc} de hamster, est plus court que chez la souris non transgénique et est fonction, lui aussi, du niveau de transcription du transgène. Tou-

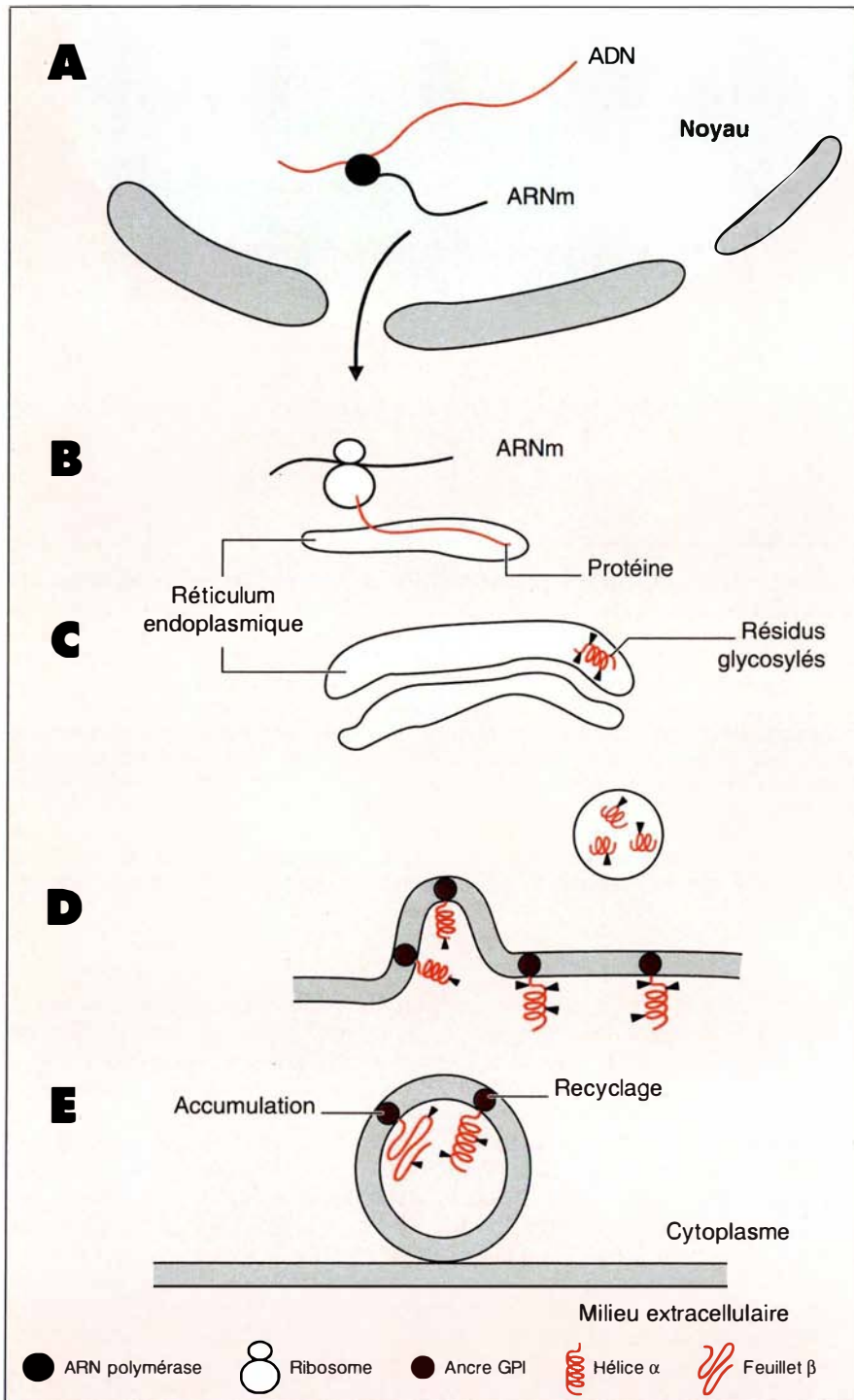


Figure 2. **Formation des prions.** **A** : transcription de l'ADN génomique ; **B** : traduction au sein du réticulum endoplasmique ; **C** : maturation (glycosylation) ; **D** : ancrage membranaire ; **E** : changement de conformation lors de l'internalisation des protéines : formation des feuillets β . Les protéines anormales pourront être recyclées et participer à la conversion d'autres protéines, ou bien s'accumuler. GPI = glucosamine phosphatidylinositol.

tes ces données suggèrent que le degré d'homologie entre les protéines est un élément clé de la conversion de la protéine PrP en protéine PrP^{sc}. Il a été montré, de plus, que les lésions histologiques observées variaient avec l'origine de l'inoculum, de même que la cinétique d'installation des symptômes. Sur ce dernier point, des études de liaison génétique ont fait suspecter l'existence d'un *locus*, Prnp-i, qui serait responsable des différences observées et expliquerait l'existence apparente de diverses souches d'inoculats.

De telles observations nous amènent à aborder la génétique humaine des maladies à prions qui se révèle être relativement riche. Après la découverte du gène PRNP, des études de liaison ont été entreprises pour savoir si les formes héréditaires de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (environ 15 %) étaient bien dues à une mutation du gène PRNP. Plusieurs types de mutations ont été observés. Un octapeptide est normalement retrouvé répété cinq fois dans la région NH₂-terminale. Certains patients atteints de maladie de Creutzfeldt-Jakob ont cet octet en cinq, sept ou huit exemplaires supplémentaires ([20] et *m/s* n° 2, vol. 8, p. 189). Cette même séquence est parfois délétée sans pour cela entraîner de troubles [21]. Deux mutations ponctuelles sont impliquées dans les autres cas familiaux, une portant sur le codon 178 et une autre sur le codon 200. Pour le syndrome de Gerstmann-Scheinker-Sträussler, à transmission autosomique dominante, quatre mutations ponctuelles ont été retrouvées dans les codons : 102, 117, 198 et 217 [22, 23]. Une maladie récemment apparue dans la nosologie neurologique, l'insomnie fatale [24], a elle aussi été reliée à une mutation du gène PRNP. Cette dernière maladie est remarquable en ce que la mutation observée se situe dans le codon 178, comme dans certains cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob. Un polymorphisme associé du codon 129 semble déterminer la survenue de l'une ou de l'autre des deux maladies.

Chez tous les patients présentant une insomnie fatale, on trouve une méthionine en position 129 associée à l'allèle muté. Pour les patients souffrant de maladie de Creutzfeldt-Jakob, l'allèle muté est associé à une valine en position 129. L'alternative entre les deux atteintes n'est plus le fait d'un allèle, mais plutôt d'un haplotype. De plus, les patients homozygotes pour le codon 129 présentent une forme clinique plus sévère, avec survie plus courte après apparition de la maladie, à la fois dans l'insomnie fatale et dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob. L'âge de survenue de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est, quant à lui, plus précoce chez les patients homozygotes pour le codon 129 ([25] et *m/s* n° 7, vol. 7, p. 754). Ce polymorphisme a déjà été impliqué dans la susceptibilité à la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène, lors de traitements par une hormone de croissance d'origine humaine (*m/s* n° 6, vol. 8, p. 584 et [26]) : quatre individus sur sept étaient homozygotes Val/Val en position 129, alors que ce génotype est le plus rare dans la population (12 %). Par ailleurs, on trouve un excès d'homozygotes, Val/Val ou Met/Met, dans les cas sporadiques de maladie de Creutzfeldt-Jakob, ce dernier génotype étant, de plus, associé à une évolution plus rapide de la maladie chez les homozygotes que chez les hétérozygotes. Cette caractéristique est à rapprocher du locus *Prnp-i* chez la souris qui influence sur la vitesse d'apparition des signes [11]. La mutation est elle-même responsable de différentes formes cliniques, comme il avait été observé chez la souris où différents inoculats pouvaient entraîner des signes histologiques différents. Pour le syndrome de Gerstmann-Scheinker-Straüssler, en particulier, une forme ataxique est observée pour la mutation du codon 102, une forme tégumentaire pour le codon 117, et une forme avec dépôt de substance amyloïde pour le codon 200 [23]. L'ensemble des mutations rencontrées est représenté sur la figure 3.

m/s n° 12 vol. 9, décembre 93

La réunion de ces éléments biochimiques et génétiques permet de compléter le modèle. La PrP est synthétisée puis exportée vers la membrane plasmique, où elle joue un rôle encore inconnu. Lors de son internalisation, alors qu'elle se trouve à l'état de dimère (qui serait sa forme active ?), peut se produire un changement conformationnel qui la rend résistante aux protéases lysosomiales. Ce changement peut avoir trois origines : (1) soit l'interaction d'une protéine anormale (infectieuse) avec une protéine normale au sein d'un hétérodimère : le recyclage probable de ces protéines devenues indestructibles serait responsable de la conversion des formes normales observée après l'événement infectieux ou iatrogène initial ; (2) soit un changement conformationnel spontané, du fait d'un contexte thermodynamique favorable, au sein d'un homodimère de protéines normales, les formes anormales engendrées favorisant par la suite la conversion des protéines normales. Ce phénomène, considéré comme un mécanisme d'auto-infection, pourrait rendre compte des formes sporadiques de la maladie ; (3) soit un changement conformationnel favorisé par une instabilité de la structure tertiaire à la suite d'un changement de la structure

primaire (mutation de la séquence codante). Par la suite, les formes anormales contribueraient au changement conformationnel des protéines susceptibles. Ce mécanisme, rencontré dans les formes héréditaires, pourrait aussi se retrouver dans les formes sporadiques à la suite d'une mutation somatique isolée. En effet, la mutation d'une seule cellule suffirait pour que, par diffusion, le phénomène touche tout un groupe de cellules.

Bien que séduisantes, ces hypothèses n'expliquent pas toutes les observations. Les détracteurs de cette théorie se basent sur plusieurs observations. Tout d'abord, l'existence d'acides nucléiques dans les isolats infectieux. Selon Manuelidis *et al.*, ces acides nucléiques semblent avoir une homologie de séquence avec certains rétrovirus endogènes [2]. La même équipe a récemment montré que les protéines des isolats infectieux pouvaient se lier à l'ADN, et notamment à des composants d'ADN rétroviraux (LTR, région codant *gag* et une partie de *pol*) [3]. Les mêmes auteurs ont, par ailleurs, montré que l'on peut induire une dégénérescence neurologique spongiforme par inoculation de la fraction leucocytaire de sujets sains à des hamsters. Cela laisse supposer que l'agent responsable de cette

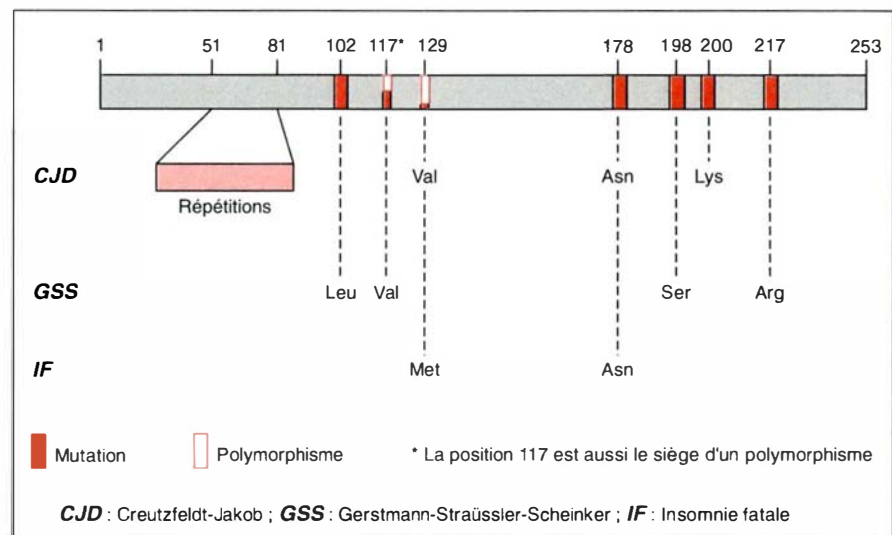


Figure 3. **Mutations observées dans les différentes maladies à prions.**

atteinte est présent de façon endémique dans la population [2]. Le recensement de quinze souches d'inoculats différents pour la scrapie, et la possibilité d'isolats infectieux indépendants de la PrP, sont aussi des arguments en faveur d'une origine virale de ces affections. Ces observations, ainsi que les similitudes observées avec certaines leucoencéphalites virales, par exemple, rendent plausible l'existence d'un rétrovirus comme agent responsable. L'hypothèse selon laquelle la PrP ne serait que le récepteur membranaire d'un rétrovirus putatif [2] n'est pas totalement dénuée de sens et intégrerait bien les observations décrites ci-dessus.

Pour conclure, on pourra remarquer que plusieurs caractéristiques surprenantes sont encore inexplicables :

1. Les formes sporadiques concourent majoritairement à la même symptomatologie, la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

2. Si le seul mécanisme de la maladie est l'accumulation d'une protéine anormale, comment expliquer les différentes symptomatologies observées ? Ne doit-on pas alors soupçonner des mécanismes coopératifs avec des ligands différents, intervenant dans les différentes régions du cerveau, qui favoriseraient le changement de conformation de façon différentielle selon la localisation ?

3. Le rôle du codon 129 dans la physiopathologie semble se situer à deux niveaux. D'une part, le polymorphisme intervient en modifiant la symptomatologie. D'autre part, l'homozygotie à cette position modifie la cinétique de la maladie. On peut alors penser qu'une homologie du produit des deux allèles favorise l'interaction des protéines entre elles, et donc la conversion d'une protéine normale par une forme anormale.

Ainsi l'hypothèse, hérétique pour certains, d'une protéine comme seul agent infectieux a progressivement pris corps, sans toutefois qu'un argument décisif ait permis son acceptation définitive. Des arguments épidé-

miologiques et biologiques lui conférant un rôle de récepteur d'un rétrovirus existent, et aucune des expériences de l'équipe de Prusiner ne permet de les infirmer. C'est donc bien dans l'analyse moléculaire encore affinée des fractions infectieuses que devrait résider la réponse à une des grandes énigmes biologiques des années 1980-1990 ■

RÉFÉRENCES

1. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
2. Manuelidis EE, Manuelidis L. A transmissible Creutzfeldt-Jakob disease-like agent is prevalent in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7724-8.
3. Sklaviadis T, Akowitz A, Manuelidis E, Manuelidis L. Nucleic acid binding proteins in highly purified Creutzfeldt-Jakob disease preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5713-7.
4. McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 1983; 35: 57-62.
5. Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735-46.
6. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 320-9.
7. Prusiner SB, Scott M, Foster D, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990; 63: 673-86.
8. Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9097-101.
9. Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, et al. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7620-4.
10. Caughey B, Raymond G. The scrapie associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease, phospholipase sensitive. *J Biol Chem* 1991; 266: 18217-23.
11. Prusiner SB. Molecular biology of prion disease. *Science* 1991; 252: 1515-22.
12. Gasset M, Baldwin M, Fletterick R, Prusiner SB. Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 71-5.
13. Gasset M, Baldwin M, Ilyod D, et al. Predicted α helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10940-4.
14. Raeber AJ, Borchelt D, Scott M, Prusiner SB. Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems. *J Virol* 1992; 66: 6155-63.
15. Caughey B, Raymond J, Ernst D, Race R. N-Terminal truncation of the scrapie associated form of PrP by lysosomal proteases: implications regarding the site of conversion of PrP to the protease resistant state. *J Virol* 1991; 65: 6597-603.
16. Hsiao K, Scott M, Foster D, et al. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein of Gerstmann-Sträussler syndrome. *Science* 1990; 250: 1587-90.
17. Büeler H, Fisher M, Lang Y, et al. The neuronal cell surface protein PrP is not essential for normal development and behavior of the mouse. *Nature* 1992; 356: 577-82.
18. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993; 73: 1339-47.
19. Prusiner SB, Scott M, Foster D, et al. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990; 63: 673-86.
20. Goldfarb I, Brown P, McCombie R, et al. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10926-30.
21. Prusiner SB. Natural, experimental prion diseases of human, animals. *Curr Opin Neurol* 1992; 2: 638-47.
22. Dlouhy SR, Hsiao K, Farlow M, et al. Linkage of the Indiana kindred of GSS disease to the prion protein gene. *Nature Genet* 1992; 1: 64-7.
23. Hsiao K, Dlouhy S, Farlow M, et al. Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genet* 1992; 1: 68-71.
24. Medori R, Tritschler HJ, Leblanc A, et al. Fatal insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion gene. *N Engl J Med* 1992; 326: 444-9.
25. Goldfarb I, Petersen R, Tabaton M, et al. Fatal insomnia, familial Creutzfeldt-Jakob disease; disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; 258: 806-8.
26. Collinge J, Palmer MS. Prion diseases. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2: 448-54.

Jean-Christophe Pagès

Laboratoire de génétique et pathologie expérimentales, CJF 90-03 ICGM, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

TIRÉS A PART

J.C. Pagès.