

III- Les agents infectieux responsables des ESST communément admis: les prions

L'incompréhension de la communauté scientifique face à l'origine de ces maladies a entraîné l'appellation « d'agents transmissibles non conventionnels » (ATNC) pour définir l'agent pathogène. Actuellement, la protéine prion pathologique est considérée par la plupart des scientifiques comme l'origine la plus probable des ESST. Mais plusieurs hypothèses crédibles ont été émises au cours des recherches pour connaître la nature de ces ATNC.

A- Les diverses hypothèses étiologiques avancées

Les premières recherches devant la découverte des ESST ont eu pour but d'isoler et de caractériser la nature de l'agent infectieux.

1- La théorie d'un virus

Dès 1954, Sigurdsson émet l'hypothèse d'un virus appelé «virus lent» à propos de l'agent responsable de la tremblante. Ce virus posséderait des caractéristiques biochimiques et physiques non usuelles et aurait notamment un acide nucléique de très petite taille et un matériel protéique lui permettant d'assurer sa réplication (Detwiler *et al.*, 2000). Cependant, du fait de l'absence de réactions immunitaires, de l'aspect héréditaire de certaines ESST et de l'absence de détection d'acides nucléiques ou de toute structure évocatrice d'un virus au cours des nombreuses recherches entreprises, cette hypothèse n'a pas été retenue par la majorité des scientifiques.

2- La théorie d'un virino

Une autre hypothèse serait que l'ATNC soit un virino, une structure hybride comprenant un très petit acide nucléique infectieux nu ne codant pour aucune protéine virale susceptible d'être reconnue par le système immunitaire. Il est cependant capable de se lier intimement à des protéines de l'hôte, qui formeraient ainsi une coque pour le protéger (Detwiler *et al.*, 2000). L'existence d'un acide nucléique expliquerait l'infectiosité et les différentes souches rencontrées dans certaines maladies, lié aux possibles mutations du matériel génétique de l'agent. Les protéines de l'hôte l'entourant lui permettraient d'échapper à la réponse immunitaire. Cependant, aucun acide nucléique étranger à l'hôte n'a pu être identifié avec certitude (Prusiner, 1998).

3- L'hypothèse retenue : la théorie de la « protéine seule »

En 1967, un nouveau concept est proposé par Griffith qui suggère que sous certaines conditions, des protéines peuvent s'auto-répliquer et agir comme un agent infectieux (Griffith, 1967). En 1982, Prusiner reprend cette hypothèse et formule la théorie de la «protéine seule», selon laquelle les ATNC responsables des ESST serait une protéine (Prusiner, 1982) et parvient à la mettre en évidence. Il nomme cette protéine «prion» pour « proteinaceous infectious particle only », ou PrP pour protéine prion. En 1985, Chesebro et Oesch montrent l'existence, chez le hamster sain et la souris saine, d'une protéine très similaire à celle du prion (Chesebro *et al.*, 1985, Oesch *et al.*, 1985). Ces travaux ont permis de montrer que, chez les animaux malades, la PrP existait à la fois

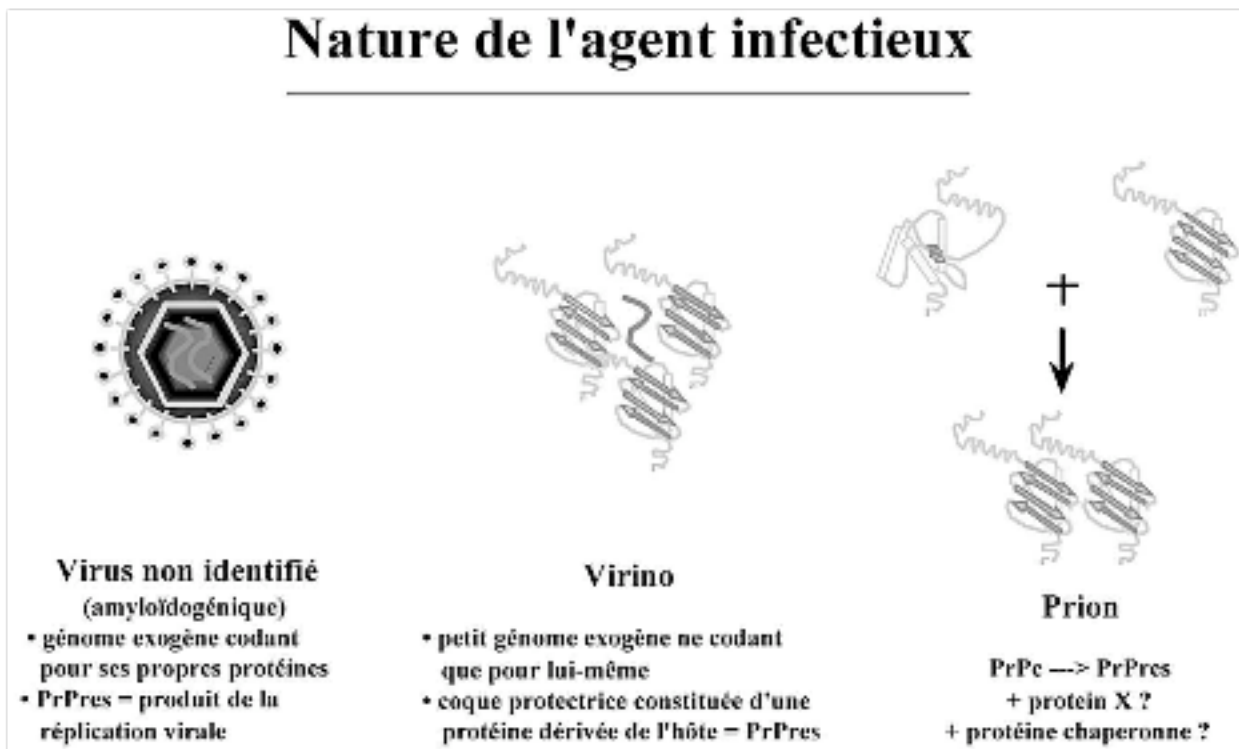
sous une forme normale (PrPc pour PrP cellulaire) et sous une forme pathologique (PrPres pour PrP résistante à la dégradation par les protéases) (Meyer *et al.*, 1986).

Aujourd'hui, nombreux sont ceux qui oscillent entre le recours à un cofacteur et le concept de la « protéine seule » (Fasano *et al.*, 2006). Ainsi, parmi les cofacteurs nécessaires à l'infectiosité et à la propagation des prions, certaines équipes proposent l'intervention de rétrovirus (Leblanc *et al.*, 2006), d'autres celle de bactéries comme *Spiroplasma* (Bastian, 2005) ou encore celle de polyanions (Deleault *et al.*, 2005).

Il apparaît ainsi difficile de choisir entre les principales théories (Figure 16), bien que la théorie proposée par Prusiner en 1982 soit celle la plus communément admise par la communauté scientifique, même si elle ne permet pas de démontrer l'absence ou non de cofacteurs nécessaires à la propagation de l'infectiosité. Plusieurs travaux récents ont permis d'étayer cette hypothèse de la « protéine seule » :

- L'infectiosité est considérablement réduite en présence d'anticorps anti-PrP (Enari *et al.*, 2001, Peretz *et al.*, 2001)
- La technique de PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), dans un système acellulaire, a permis de mettre en évidence la capacité de la PrPres à convertir la PrPc en PrP infectieuse (Kocisko *et al.*, 1994, Saborio *et al.*, 2001)
- L'inoculation à des souris transgéniques surexprimant la PrP d'une protéine prion recombinante de souris synthétisée à l'aide d'*Escherichia Coli*, et polymérisée en fibrilles amyloïdes, conduit au développement d'une ESST chez ces animaux (Legname *et al.*, 2004).

Figure 16: Principales théories sur la nature de l'agent infectieux des ESST



(Source: Deslys, 2003)

B- La protéine prion

La protéine prion fut extraite pour la première fois à partir de la purification de fractions infectieuses de cerveaux de hamsters (Prusiner, 1982). Cette protéine existe sous deux formes, une forme normale ou PrP^c et une forme infectieuse ou PrP^{Sc}.

1- Le gène de la protéine prion, polymorphismes et mutations

Le gène codant pour la protéine prion a été décrit par l'équipe d'Alan Dickinson dans les années 70 et fut baptisé Sinc (pour *Scrapie INCubation period*) (Dickinson *et al.*, 1972). En 1985, Oesch isole le gène de la PrP de hamster (Prnp) (Oesch *et al.*, 1985). Ce sont les travaux de Westaway et Moore qui ont permis de montrer que les gènes Prnp et Sinc étaient identiques (Moore *et al.*, 1998).

Les deux isoformes, PrP^c et PrP^{Sc}, sont codées par le même gène. Celui-ci est localisé sur le chromosome 20 chez l'homme (PRNP), sur le chromosome 2 chez la souris (Prnp) et sur le chromosome 13 chez l'ovine (Prnp). Ce gène est très conservé chez tous les mammifères, avec plus de 80 % d'homologie entre les espèces (Oesch *et al.*, 1991, Westaway et Prusiner, 1986).

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés à l'état normal dans la séquence codante du gène Prnp. Chez l'Homme tout d'abord, le polymorphisme le plus connu se situe au niveau du codon 129 (Méthionine ou Valine) (Deslys *et al.*, 1998). Un polymorphisme sur les codons 219 et 171 a également été décrit. Chez les ovins ensuite, le polymorphisme des codons 136, 154 et 171 est très bien connu puisqu'il détermine la sensibilité des animaux à la tremblante classique (Voir II- C- 1- La tremblante des petits ruminants).

Des mutations peuvent évidemment avoir lieu sur le gène codant pour la PrP, pouvant occasionner la conversion spontanée de la PrP^c normale en PrP^{Sc} pathologique, déclenchant ainsi une ESST. Mais le rôle exact des mutations ne semble pas si simple et reste controversé. En effet:

- Le comportement de la protéine varie en fonction de la nature de la mutation. Dans certains cas, seul l'allèle muté participe à la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc}, alors que dans d'autres, ce sont les deux allèles mutés et non mutés qui participent à cette conversion (Chen *et al.*, 1997).
- Il existe des interactions entre certaines mutations et la nature du polymorphisme sur le gène : ainsi, la mutation asparagine 178 s'associe soit à la MCJ soit à l'IFF selon la nature du codon 129 sur l'allèle muté (Goldfarb *et al.*, 1992).
- Chez des souris transgéniques exprimant des gènes mutés de la protéine prion, on observe pour certaines mutations une neurodégénérescence sans nécessairement conduire à la présence de PrP^{Sc} (Hsiao *et al.*, 1989, Muramoto *et al.*, 1997).

Le polymorphisme et les mutations du gène codant pour la PrP ont donc un rôle important dans le déclenchement des ESST mais le mode d'action reste encore méconnu.

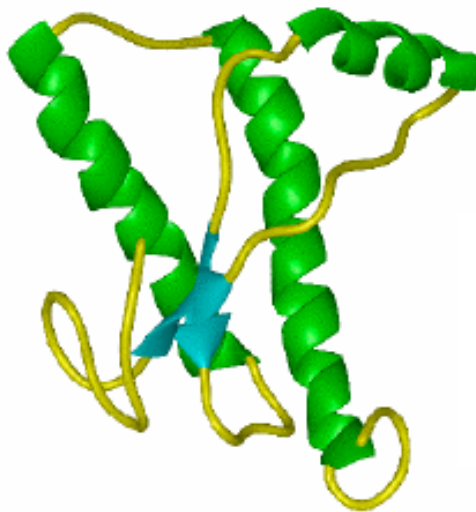
2- La structure de la protéine prion

a- La PrPc

La protéine prion normale est une sialoglycoprotéine diglycosée composée de 253 acides aminés chez l'Homme, 254 chez la souris, 256 chez le mouton et 269 chez la vache.

La PrPc contient une majorité d'hélice α (42%) et très peu de feuillets β (3%) (Pan *et al.*, 1993). Sa moitié N-terminale n'est pas structurée et a la forme d'une queue de composition variable. Cependant, des études menées sur des souris transgéniques ont révélé que la région comprise entre les acides aminés 32 et 121 joue un rôle physiologique important. La queue pourrait acquérir sa conformation finale après fixation à la membrane plasmique (Aguzzi et Polymenidou, 2004). La partie C-terminale est structurée de manière globulaire et est composée de trois hélices α et de deux feuillets β antiparallèles (Figure 17). C'est cette partie qui possède un glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), qui va s'attacher à la face externe des membranes cellulaires (Cohen *et al.*, 1994).

Figure 17: Structure tertiaire de la PrPc

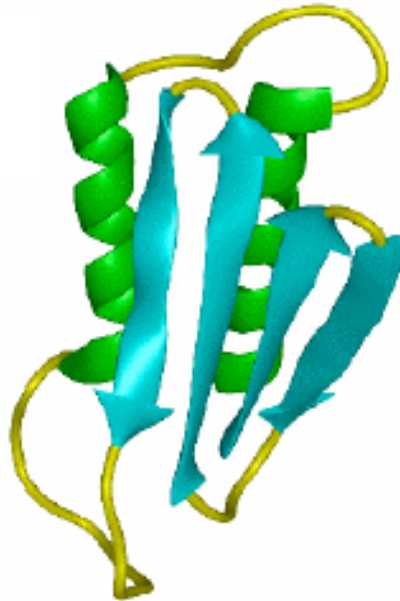


(Source: Riek *et al.*, 1996)

b- La PrPres

La structure primaire de la PrPres est identique à la PrPc. En revanche la structure secondaire et tertiaire sont différentes. La première différence notable est le contenu élevé de la PrPres en feuillets β (43%) et moins d'hélices α (30%). Les études pour déterminer sa structure tertiaire ont indiqué que la PrPres est constituée de deux hélices α et de 4 feuillets β (Figure 18) (Cohen *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1996).

Figure 18: Structure tertiaire de la PrPres



(Source: Huang *et al.*, 1996)

Les différences biochimiques entre la PrPc et la PrPres sont résumées dans le tableau 4. Les caractéristiques les plus importantes sont la solubilité et la résistance à la protéinase K pour les deux formes. Ainsi la protéine prion cellulaire est soluble, alors que la protéine prion pathologique est insoluble lui conférant des propriétés d'agrégation sous forme de fibrilles, appelées SAF (*Scrapie Associated Fibrils*), décelables sur des coupes histologiques de cerveaux infectés.

La PrPc est sensible à la protéinase K et se trouve complètement dégradée en sa présence (Oesch *et al.*, 1985). La PrPres est quant à elle partiellement résistante à la protéinase K. Cette différence est couramment utilisée pour différencier la PrPc de la PrPres par la méthode de Western-Blot ou en test ELISA.

Tableau 4: Différences biochimiques entre la PrPc et la PrPres

PrPc	PrPres
Soluble	Hydrophobe
Très peu auto-agrégable : pas d'amyloïdes	Facilement auto-agrégable et polymérisable : amyloïdes
Digestion complète par les protéases et les phospholipases	Digestion partielle par les protéases et les phospholipases
Soluble et détruite par les détergents	Insoluble et résistante aux solvants organiques, formaldéhyde et détergents non ioniques (sauf SDS)
Destruction facile	Résistance aux UV, aux radiations et à une stérilisation à 121°C
Localisation cellulaire membranaire exclusive	Localisation cellulaire intracytoplasmique dans les lysosomes secondaires et le neuropile, et localisation extracellulaire (plaques)
« Turnover » intracellulaire rapide et demi-vie courte (3-6 heures)	Synthèse lente et stable (temps de demi-vie supérieur à 24 heures)
Présence dans toutes les cellules de l'organisme	Présence presque exclusive dans le système nerveux central
Conformation spatiale avec beaucoup d'hélices α et très peu de feuillets β	Conformation avec beaucoup de feuillets β plissés

(Source : Toupet, 2009)

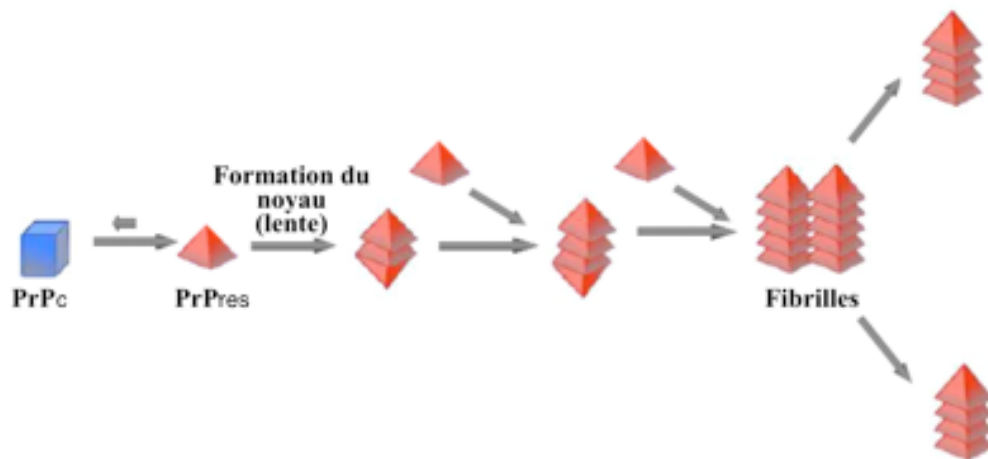
3- La conversion de la PrPc en PrPres

Le mécanisme par lequel la PrPres pathologique permet la conversion de la PrPc normale en PrPres est encore inconnu. Trois modèles sont proposés: la nucléation-polymérisation, l'auto-catalyse et la nucléation assistée.

a- Modèle de nucléation-polymérisation

Selon ce modèle, la PrPc est en équilibre thermodynamique avec la PrPres, en faveur de la PrPc. Après la création lente d'un noyau stable de PrPres cet équilibre est déplacé vers la formation de PrPres. Enfin l'agrégation de monomères de PrPres conduit à la formation de fibrilles capables de se fragmenter (Aguzzi et Polymenidou, 2004) (Figure 19).

Figure 19: Modèle de nucléation-polymérisation

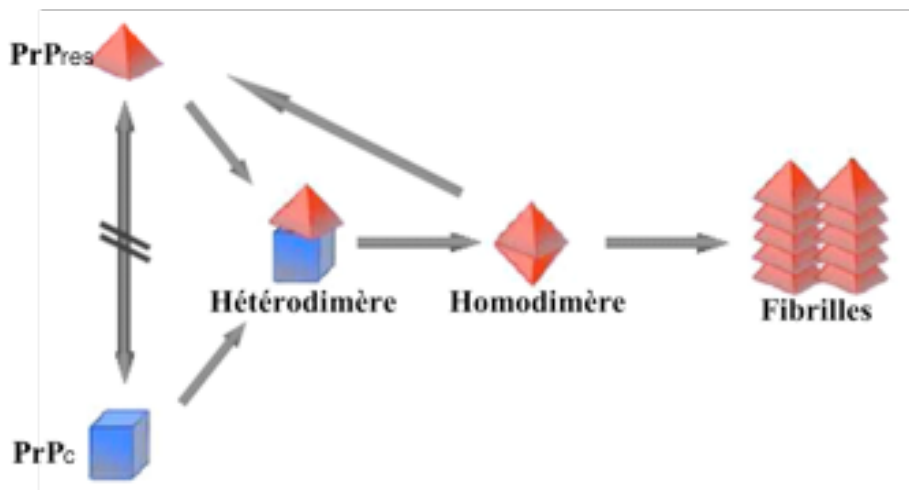


(Source : Toupet, 2009)

b- Modèle auto-catalytique

Ici la conversion de la PrPc en PrPres passe par la formation d'un hétérodimère PrPc-PrPres. La PrPc convertie en PrPres s'agrège alors avec d'autres molécules de PrPres formant ainsi des fibrilles ou forme de nouveau un hétérodimère avec une autre PrPc (Aguzzi et Polymenidou, 2004) (Figure 20).

Figure 20: Modèle auto-catalytique



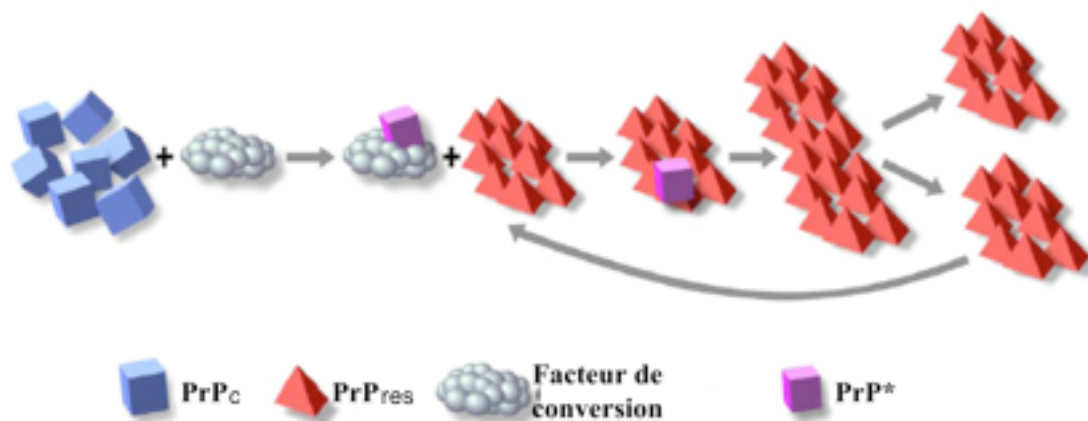
(Source : Toupet, 2009)

c- Modèle de nucléation assistée

La PrPc dans ce modèle est convertie en un état intermédiaire PrP* après interaction avec un facteur de conversion, parfois désigné sous le nom de «protéine X». La conformation intermédiaire prépare la PrPc à subir des changements structuraux majeurs menant à la formation de PrPres (Abid et Soto, 2006) (Figure 21).

Dans la recherche de la nature du facteur de conversion, une étude montre que la conversion de la PrP_C est stimulée par l'apport dans le milieu de culture *in vitro* d'ARN monobrin (Deleault *et al.*, 2003). D'autres scientifiques émettent l'hypothèse que le facteur de conversion est une protéine chaperonne. En effet des expériences *in vitro* dans un milieu acellulaire montrent qu'en ajoutant une protéine chaperonne de levure ou une protéine chaperonne bactérienne la formation de PrP^{Sc} est stimulée (Chernoff *et al.*, 1995). Néanmoins l'existence de telles protéines chaperonnes n'a pas été mis en évidence chez les mammifères à ce jour.

Figure 21: Modèle de nucléation assistée

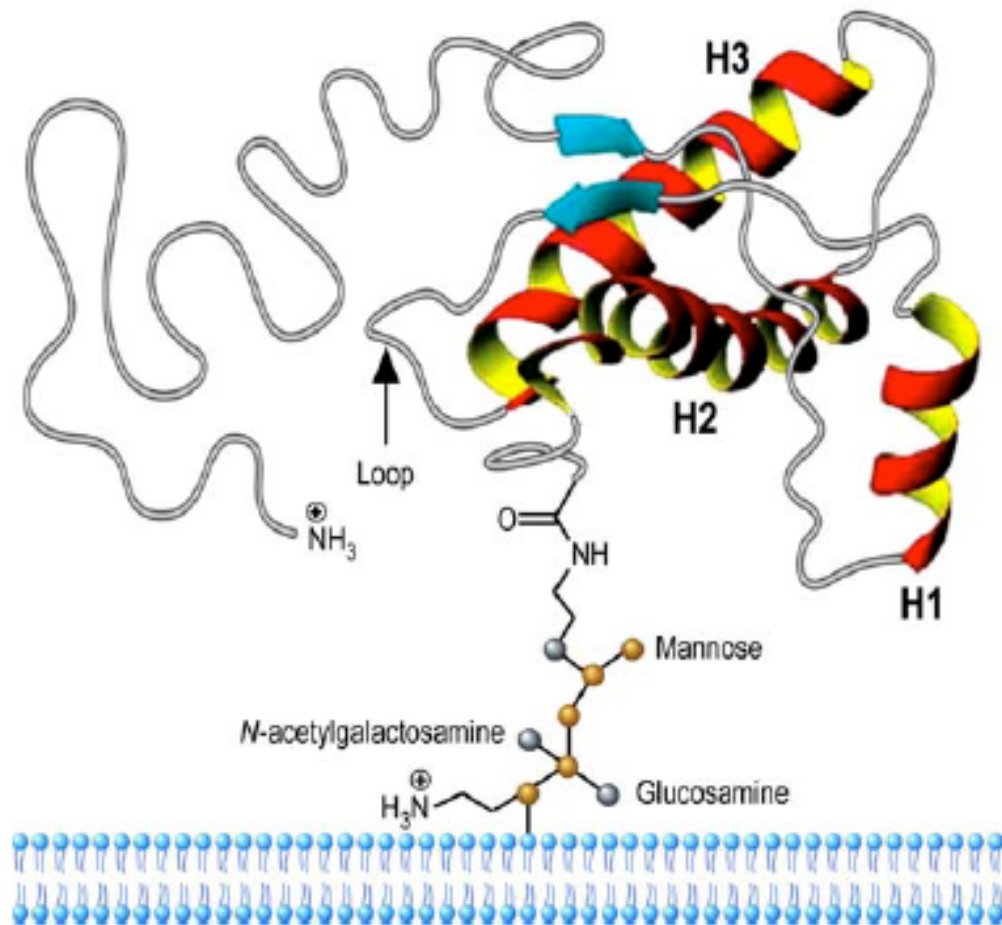


(Source : Toupet, 2009)

4- La biosynthèse et la localisation subcellulaire de la PrP

La synthèse de la PrP_C a lieu comme pour toutes les protéines : l'information provenant du noyau sous forme d'ARN messenger est traduite pour la synthèse de la protéine par les ribosomes. Puis la PrP_C passe dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) où elle reçoit son ancre GPI à l'extrémité C-terminale qui lui permettra son ancrage dans la membrane plasmique (Figure 22). La protéine prion passe dans l'appareil de Golgi après le RER puis est exportée à la surface cellulaire via des vésicules sécrétoires (Stahl *et al.*, 1987). La plupart des protéines PrP_C sont localisées au niveau des rafts lipidiques de la membrane cellulaire (Naslavsky *et al.*, 1997). La membrane plasmique étant le premier lieu de contact entre la PrP_C et la PrP^{Sc}, les rafts lipidiques ont été décrits comme des sites privilégiés de la conversion (Kaneko *et al.*, 1997a, Taraboulos *et al.*, 1995). D'autres sites de conversion possibles seraient au niveau du RER et des voies d'endocytose (Ivanova *et al.*, 2001).

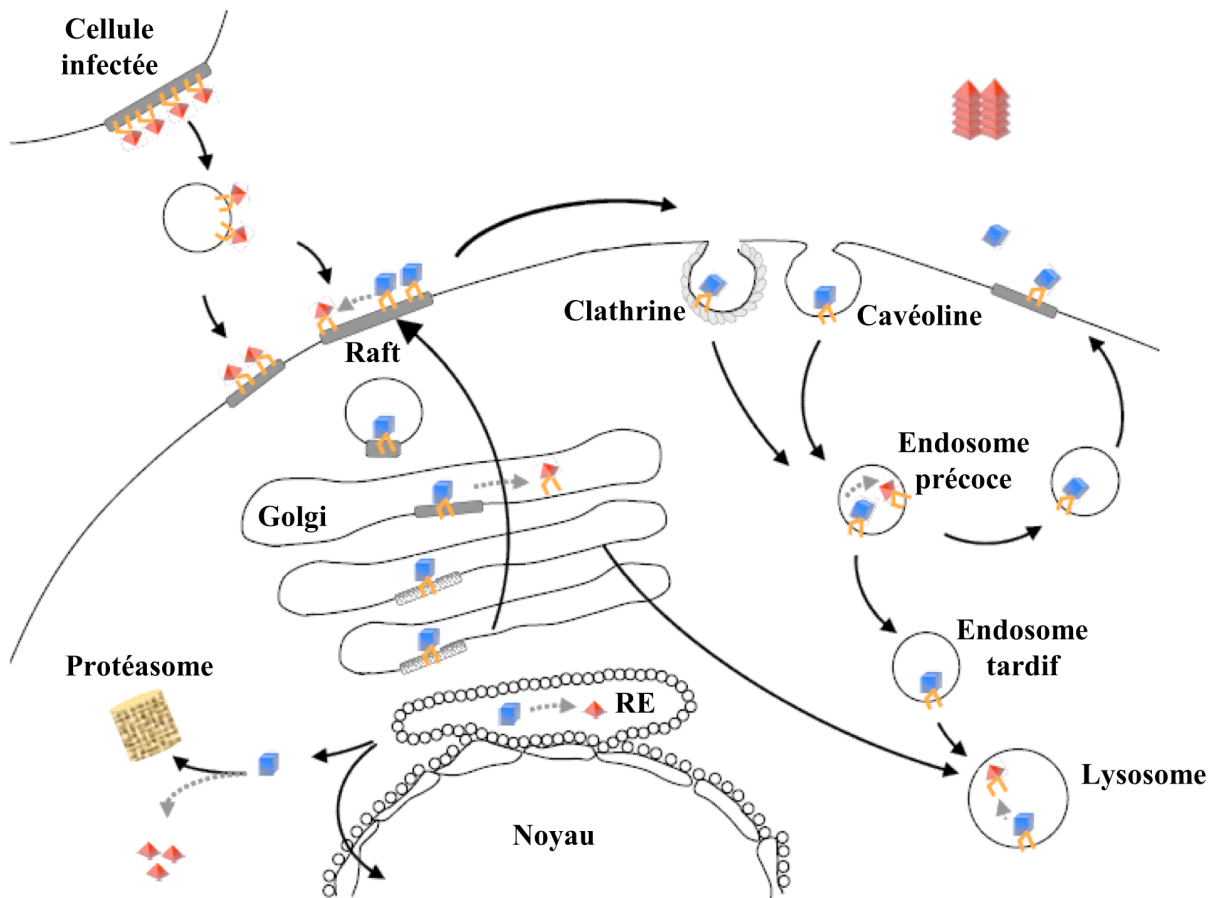
Figure 22: Ancrage de la PrPc dans la membrane plasmique grâce à son ancre GPI



(Source : Aguzzi et Heikenwalder, 2006)

Une partie des protéines PrPc présentes à la surface cellulaire sont recyclées via des vésicules de clathrine (Harris, 2003) ou des puits à cavéoline en présence de fortes concentrations de cuivre (Peters *et al.*, 2003). Le recrutement des vésicules de clathrine pour l'endocytose de la PrP est surprenant puisque, comme toutes les protéines à ancre GPI, la PrP ne possède pas de domaine pouvant interagir directement avec la clathrine. Cette observation étonnante a conduit à proposer l'existence d'un récepteur à la PrPc qui serait une protéine transmembranaire faisant l'intermédiaire entre la clathrine et la PrPc (Harris, 2003). Il a notamment été proposé que ce récepteur puisse être le récepteur à la laminine LRP/LR (Gauczynski *et al.*, 2001, Gauczynski *et al.*, 2006). Après endocytose, 95% des molécules de PrPc sont recyclées intactes vers la surface cellulaire où elles vont se réancrer, et 5% sont protéolysées dans les lysosomes. Dans l'ensemble, la synthèse de la PrPc et son « turnover » intracellulaire sont rapides (temps de demi-vie compris entre 3 et 6 heures) (Figure 23).

Figure 23: Trafic cellulaire de la PrPc (en bleu) et sites potentiels de formation de la PrPres (en rouge)



(Source : Collins *et al.*, 2004)

5- Les fonctions de la PrPc

La PrPc est localisée majoritairement dans le système nerveux (cerveau, ganglions périphériques, système nerveux parasympathique (Bendheim *et al.*, 1992).

L'étude de souris transgéniques où le gène codant pour la protéine prion a été invalidé a permis d'identifier des rôles probables de la PrPc :

- Rôle dans l'homéostasie du cuivre : chez les souris transgéniques, on retrouve de plus faibles taux intracellulaires de cuivre (Brown *et al.*, 1997). Il semblerait également que des concentrations élevées en cuivre favorisent l'endocytose de la PrP, suggérant son possible rôle dans le transport du cuivre et son métabolisme (Lee *et al.*, 2001).
- Rôle dans la lutte contre le stress oxydatif du fait de son activité superoxyde dismutase (Mabott et Bruce, 2001).
- Rôle dans la survie cellulaire, lié à la faculté de la PrPc à se lier à des facteurs intervenant dans l'apoptose cellulaire (Chiarini *et al.*, 2002).
- Rôle dans la transduction de signaux cellulaires : la localisation membranaire de la PrP ainsi que sa possible liaison avec différents partenaires font de cette protéine un acteur essentiel de la signalisation cellulaire (Mouillet-Richard *et al.*, 2000).

- Des études réalisées sur des coupes histologiques de cerveaux de souris montrent que l'absence de la PrPc au niveau des synapses engendre une altération de la formation des synapses et du rythme circadien, suggérant que cette protéine est impliquée dans la neurotransmission et l'activité neuronale du système nerveux central (Collinge *et al.*, 1994, Sales *et al.*, 1998).
- La PrPc jouerait aussi un rôle de signalisation au niveau du système immunitaire : chez des souris n'exprimant pas la PrP, la prolifération des lymphocytes est réduite par rapport aux souris sauvages (Mabbott *et al.*, 1997). De même, la prolifération des lymphocytes T humains est inhibée en présence d'anticorps anti-PrPc (Li *et al.*, 2001).
- Enfin, un rôle de la PrPc dans la transduction de signaux au niveau de la fonction du a été mis en évidence en culture cellulaire et in vivo chez la souris (de Almeida *et al.*, 2005, Krebs *et al.*, 2006).
- Rôle dans l'olfaction : une étude a montré en 2008 que des récepteurs de la PrPc sont présents sur les axones des neurones du système olfactif (Le Pichon et Firestein, 2008). Par la suite, il a été démontré que les souris transgéniques n'exprimant pas la PrPc présentent des perturbations olfactives (Le Pichon *et al.*, 2009).

[MCours.com](https://www.mcourses.com)