

LE PRION : UN AGENT PATHOGÈNE ENCORE MYSTÉRIEUX

- une protéine que nous possédons tous pourrait devenir destructrice lorsqu'elle change de forme
- plusieurs axes de recherche à l'Institut Pasteur portent sur la protéine PrP et sur le prion

Extrait de La Lettre de l'Institut Pasteur n° 41, avril 2003.

Les agents transmissibles non conventionnels ou prions présentent des propriétés physicochimiques et biologiques exceptionnelles qui les distinguent de tous les autres micro-organismes connus. Ils résistent fortement à la chaleur (120 degrés), aux radiations ionisantes et n'entraînent pas de réponse immunitaire (production d'anticorps) chez les animaux ou les hommes qu'ils infectent.

Tous les mammifères sont porteurs d'une protéine appelée protéine du prion cellulaire (PrP) dans sa forme normale, présente en grandes quantités dans le cerveau. Dans des circonstances rares, cette même protéine peut prendre une forme anormale, pathologique, appelée PrPscrapie ou PrPsc (scrapie : tremblante en anglais).

La PrPsc se distingue de la PrP normale par son repliement dans l'espace, qui la rend résistante aux protéases et facilement agrégable. La PrPsc est considérée par la majorité de la communauté scientifique comme l'agent responsable des maladies à prions.

La PrPsc qui s'accumule lors de la tremblante du mouton, dont les caractéristiques s'avèrent semblables à la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) humaine, a été découverte par le biologiste américain Stanley Prusiner. En 1982, il publie un article dans la revue *Science* avançant l'hypothèse d'une protéine infectieuse qu'il baptise «prion»,

acronyme de «proteinaceous infection particle», «o» et «n» représentant les deux premières lettres de «only».

Les maladies à prions recouvrent une maladie humaine, la MCJ, la tremblante du mouton, l'encéphalopathie spongiforme bovine et l'on connaît aussi la tremblante de la chèvre et diverses encéphalopathies touchant les cervidés, les visons...

Chez l'homme, plusieurs situations sont possibles :

- il existe des cas spontanés ou «sporadiques» de maladies à prions, extrêmement rares (de l'ordre de 1 cas / million / an ; 81 victimes en France en 2002) ;

- on a observé, chez certaines familles, une fréquence anormalement élevée de MCJ. L'examen de leur patrimoine génétique a permis de mettre en évidence une mutation dans le gène codant pour la PrP qui pourrait augmenter la fréquence de la transformation de la protéine PrP normale en PrP pathologique (PrPsc) ;

- certains cas de MCJ pourraient être dûs à l'ingestion de produits bovins contaminés par des prions (150 sujets jeunes en Grande-Bretagne et 5 en France victimes du nouveau variant de la MCJ) ;

- d'autres cas par l'inoculation de produits contaminés (risque iatrogène), ce qui s'est produit pour certains lors de traitements par

l'hormone de croissance. Depuis 1989, 84 cas de MCJ liée à l'hormone de croissance ont été dénombrés en France. Ces cas semblent liés à la contamination, entre janvier 1984 et juin 1985, de plusieurs lots d'hormone extraite d'hypophysés humaines. Le grand nombre de cas déclaré - à ce jour près de 8 % des personnes traitées - pourrait être lié à la virulence de la souche de prions contaminante, aux caractéristiques génétiques des sujets atteints, ou à l'effet cumulatif d'injections de faibles doses de prions.

Le prion est un agent infectieux, mais « non conventionnel ». Il échappe aux lois de la biologie classique.

Un agent infectieux envahit généralement un hôte en apportant avec lui le matériel héréditaire propre à lui permettre de coloniser l'hôte, se répliquer, se diviser. C'est là que réside le premier mystère du prion : aucun matériel génétique n'a été mis en évidence ! Cette particule envahit son hôte sans gènes, sans acides nucléiques décelables. Comprendre comment le prion arrive à se répliquer sans gènes est un véritable défi pour les scientifiques.

Autre aspect surprenant de cette énigme biologique, découvert récemment : la protéine PrP, dans sa forme normale, jouerait des rôles importants dans la production... de nouveaux neurones.

LE GIS « INFECTIONS A PRIONS »

En avril 1996, les ministres de la Recherche, de la Santé et de l'Agriculture ont décidé la création d'un comité d'experts de veille scientifique, médicale et technique sur les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) et les prions. Composé de 24 personnalités et présidé par le Dr Dominique Dormont (département de Recherche médicale, Commissariat à l'Énergie Atomique), ce comité a proposé puis évalué un programme de recherches inter-organismes sur les ESST. En janvier 2001, une nouvelle étape a été franchie avec la mise en place un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) « Infections à prions ».

Ce GIS a pour objet de :

- coordonner et harmoniser les actions conduites par chacun des partenaires dans le domaine de recherche visant à avancer dans la connaissance, la prévention et le traitement des infections à prions ; à cet égard, les réseaux d'équipes et le développement d'infrastructure à usage partagé seront favorisés ;
- décider de la répartition des moyens spécifiques alloués par l'Etat et de leur utilisation optimale, en liaison avec les moyens propres affectés à la recherche sur les infections à Prions par les Partenaires ;
- susciter de nouveaux programmes de recherche et inciter de nouvelles équipes à s'impliquer dans la recherche sur les Agents Transmissibles Non Conventionnels et les maladies qu'ils provoquent ;
- assurer l'animation et le suivi de travaux entre les Partenaires et des tiers ;
- assurer le lien avec les programmes de recherche de l'Union européenne, des Etats membres et des pays tiers .

Le GIS associe notamment le ministère de la Recherche, le ministère de l'Agriculture, le secrétariat d'État à la Santé et l'ensemble des organismes concernés par les recherches sur les prions :

- des établissements de recherche : le CNRS, l'Inra, l'Inserm, le CEA, l'Institut Pasteur à Paris ;
- des agences : l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, l'Institut national de veille sanitaire.

Les axes prioritaires de développement sont les suivants :

- mise au point de nouveaux tests de détection ;
- compréhension de la nature de l'agent infectieux et de la physiopathologie des maladies à prions ;
- développement de la recherche épidémiologique et thérapeutique sur les maladies à prions ;
- développement des recherches sur les modes d'élimination des farines animales alternatifs à l'incinération.

Nombre de cas certains ou probables de maladie de Creutzfeldt-Jakob en France

Source : site Internet de l'Institut National de Veille sanitaire (www.invs.sante.fr)

données du Réseau national de surveillance des maladies de Creutzfeldt-Jakob et maladies apparentées
mise à jour 6 mars 2003

Année	Suspensions signalées	MCJ sporadique décédée	MCJ iatrogène hormone de croissance décédée*	Autre MCJ iatrogène décédée	MCJ génétique décédée	vMCJ certain ou probable décédée	vMJC probable non décédée	Total MCJ
1992	71	38	7	2	4	0	0	51
1993	63	35	12	1	7	0	0	55
1994	93	46	5	2	7	0	0	60
1995	114	59	8	1	6	0	0	74
1996	201	68	10	0	10	1	0	89
1997	296	80	6	1	4	0	0	91
1998	459	81	8	1	13	0	0	103
1999	590	92	8	0	5	0	0	105
2000	823	87	9	0	7	1	0	104
2001	1103	111	5	0	13	1	0	130
2002	1062	93	2	2	8	3	0	108
2003	227	4	0	0	0	0	0	4

* 4 décès de MJC iatrogènes par hormone de croissance extractives sont survenus en 1991.

L'Institut Pasteur, membre du Groupement d'Intérêt Scientifique " Infections à prions" (voir encadré) contribue aux recherches pour tenter de répondre aux nombreuses questions qui se posent sur l'infection par le prion, mais aussi sur des phénomènes similaires observés dans la maladie d'Alzheimer, par exemple.

Quatre équipes poursuivent des approches différentes :

- tenter de déterminer la structure du prion, toujours inconnue, pour apporter des éléments primordiaux dans la compréhension de la maladie humaine et parvenir à la diagnostiquer et à la combattre ainsi que mettre au point des tests de diagnostic plus fiables chez l'animal qui éviteraient l'abattage de troupeaux entiers ;
- explorer le rôle de la protéine normale PrP dans la production de nouveaux neurones chez l'adulte ;
- identifier le mécanisme déclenchant la conversion de la protéine normale en protéine anormale, de même que l'endroit dans la cellule où la conversion pathologique de la protéine a lieu ;
- reproduire toutes les étapes de l'infection humaine chez un modèle animal, évaluer comment a pu se faire l'installation de la maladie à partir d'injections répétées d'hormone de croissance à petites doses, hormone dont les lots auraient été préparés vraisemblablement à partir d'hypophyse(s) contaminée(s) par des prions humains.

PRION

- **Élucider la structure pathogène de la protéine**
- **Mettre au point des tests sensibles de détection**

Le laboratoire dirigé par le Pr Michel Goldberg a consacré ses travaux, depuis plusieurs décennies, à l'étude des mécanismes par lesquels une protéine nouvellement synthétisée acquiert la structure complexe, pourtant définie avec une précision extrême, qui lui confère sa fonction biologique spécifique. Cette structure particulière, unique parmi le nombre immense de structures

théoriquement accessibles à la protéine, est appelée la structure native.

Au cours de ses recherches, l'équipe de Michel Goldberg a été amenée à identifier et caractériser certaines réactions « parasites » qui empêchent parfois la protéine de devenir native et la conduisent à former des agrégats insolubles. Or plusieurs maladies, en particulier les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou les maladies à « prions » (Creutzfeldt-Jakob, Vache folle...) trouvent leur origine dans le repliement défectueux d'une pro-

téine par ailleurs normale, repliement qui leur donne une « mauvaise » structure et aboutit à la formation d'agrégats insolubles, les plaques ou fibres amyloïdes. Après avoir étudié l'agrégation et le repliement des protéines sous leurs aspects fondamentaux, Michel Goldberg a récemment entrepris d'appliquer les concepts et méthodologies développés dans son laboratoire à l'étude du mécanisme de formation et de propagation du prion, l'agent pathogène responsable des maladies de Creutzfeldt-Jakob, de la vache folle, et de la tremblante du mouton.

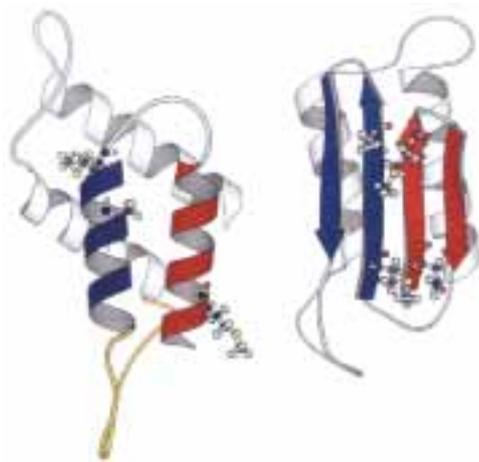
Le prion est constitué d'une protéine, la PrP (Protéine responsable du Prion), qui peut exister sous plusieurs formes. Chez l'individu sain, la PrP se trouve sous une forme normale, non pathogène, la PrPc (PrP cellulaire), présente à la surface de différents types de cellules, mais surtout dans celles du cerveau où il en existe une quantité particulièrement importante. Cette protéine peut accidentellement (heureusement très rarement en l'absence de contamination) changer de forme, se convertissant ainsi en PrPsc (PrP scrapie), la forme pathogène de la PrP observée dans le prion. Cette transformation n'implique aucune modification chimique de la protéine. Seule la structure dans l'espace, l'enroule-

ment de la protéine sur elle-même, change. Mais cette nouvelle structure, la forme "prion", est "transmissible" : en effet, lorsqu'un prion contenant la protéine sous la forme PrPsc entre en contact avec une PrPc normale, elle la transforme en PrPsc pathogène qui peut à son tour transformer d'autres PrPc saines, et ainsi de suite. Le résultat est l'apparition de PrPsc agrégée qui forme le prion, ainsi que les plaques et fibres amyloïdes caractéristiques de la maladie.

L'équipe du Pr Goldberg poursuit deux buts principaux.

Déterminer la structure du prion

L'un est de définir, à l'échelle atomique, les mécanismes responsables du changement de structure de la PrPc en PrPsc et de l'agrégation de la PrPsc en prion. Le premier pas à franchir dans cette étude est de déterminer la structure dans l'espace de la PrP sous sa forme "prion" pathologique (PrPsc). En effet, la structure de la protéine PrPc normale est désormais connue avec précision, grâce en particulier aux travaux de l'équipe de Kurt Wüthrich (Polytechnicum de Zürich). Par résonance magnétique nucléaire, ces chercheurs ont pu déterminer la conformation de la PrPc normale de plusieurs espèces animales (voir par exemple



1. Modélisation informatique de la structure envisagée pour la PrPc et la PrPsc (1996, groupe de Fred E. Cohen)

À gauche : la structure supposée de la forme soluble normale (PrPc) de la protéine.

À droite : l'une des structures supposées du prion, forme pathogène (PrPsc) de la protéine PrP, non soluble, susceptible de former des agrégats.



2. Schéma de la structure de la PrP bovine découverte en 1997 par Kurth Wüthrich, qui obtint le Prix Nobel de Chimie en 2002 pour ses travaux en Résonance Magnétique Nucléaire.

la PrPc de vache schématisée sur la figure 2). Au contraire, la structure de la forme PrPSc pathologique de la PrP reste à ce jour inconnue car le prion, peu soluble, se présente sous forme d'agrégats de haut poids moléculaire, ce qui l'empêche d'être analysé soit par résonance magnétique nucléaire, soit par diffraction des rayons X, les seules méthodes actuellement capables d'aboutir directement à la connaissance d'une structure moléculaire. Seule la prédiction d'une structure par modélisation moléculaire à l'aide d'ordinateurs très puissants est actuellement envisageable (voir figure 1 un exemple de modélisation du prion). Cependant, cette approche fournit toujours de nombreuses prédictions aussi plausibles les unes que les autres et il est difficile, voire impossible, de trier parmi les multiples structures prédites celle qui correspond à la réalité. L'équipe de Michel Goldberg a entrepris de caractériser la structure dans l'espace de la protéine PrPSc pathogène telle qu'elle se rencontre au sein du prion, en utilisant une approche de modélisation moléculaire fondée sur l'identification (par des méthodes biochimiques et immunochimiques) des atomes présents à la surface de la protéine et dans les régions de contact entre molécules au sein du prion. Parmi les conformations prédites par modélisation moléculaire, seule celle présentant les "bons" atomes à la surface de la molécule sera retenue. Une fois connue la structure de la PrP dans le prion, et donc définies les différences de structure entre PrPc normale et PrPSc pathologique, il deviendra possible d'imaginer les mécanismes moléculaires responsables du changement de structure de la PrP lorsqu'elle devient infectieuse. Et d'une meilleure connaissance de la

manière dont se produit ce changement de structure et l'agrégation de la protéine PrPSc, émergera sans doute la possibilité de concevoir et de synthétiser des molécules empêchant ces deux phénomènes, donc la propagation du prion. **De telles molécules devraient ouvrir la voie à la mise au point de médicaments capables de bloquer la maladie dès l'apparition des premiers symptômes.**

Améliorer la sensibilité des tests de détection

L'autre but poursuivi par l'équipe de Michel Goldberg est de produire des réactifs (anticorps monoclonaux) permettant d'améliorer les tests de détection du prion. Tous les tests couramment utilisés dans la filière alimentaire pour détecter la présence éventuelle de prions dans les viandes reposent sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant la PrP. Cependant, à l'heure actuelle, aucun anticorps connu ne reconnaît spécifiquement le prion : tous les anticorps connus reconnaissant la forme pathogène PrPSc de la PrP se fixent aussi sur la PrPc normale. La détection "spécifique" du prion passe donc actuellement par un traitement enzymatique qui dégrade la PrPc normale et permet de détecter, avec les anticorps anti-PrP, la PrPSc du prion qui résiste mieux que la PrPc normale à la dégradation. Cette approche, actuellement utilisée dans les tests de dépistage du prion, limite considérablement leur rapidité. Mais aussi leur sensibilité, car la dégradation enzymatique n'est pas totalement spécifique : si la PrPSc du prion résiste mieux à la dégradation, l'énorme excès de protéine PrPc normale par rapport au prion rend pratiquement impossible la dégradation totale de la

PrPc normale sans en même temps détruire la PrPSc prion. C'est pour quoi il n'est encore possible de détecter le prion que dans des tissus très fortement contaminés, comme le cerveau d'animaux malades, mais pas dans des organes ou des fluides contaminés où la quantité de prions est faible, comme dans le sang par exemple. C'est pour éviter l'utilisation de l'étape de dégradation enzymatique, et donc pour améliorer la vitesse et la sensibilité des tests de détection du prion, qu'il est envisagé d'obtenir des anticorps se fixant exclusivement sur le prion, et pas du tout sur la PrPc normale. L'obtention de tels anticorps permettrait de mettre au point de nouvelles méthodes de détection "hypersensibles" du prion dans des fluides biologiques tels que l'urine ou le sang.

L'expertise déjà acquise au sein du laboratoire dans le domaine des méthodes d'analyse de la structure des protéines à l'aide d'anticorps monoclonaux devrait aboutir au développement de nouveaux tests de détection, plus sensibles et rapides, qui permettront **le contrôle des animaux sur une simple prise de sang, sans avoir comme c'est encore le cas à présent à les abattre systématiquement en cas de suspicion pour prélever et analyser leur cerveau.**

Source :
Pr Michel Goldberg,
chef de l'unité Repliement et
modélisation des protéines.

PrP : **un rôle majeur dans la production de nouveaux neurones ?**

Stanley Prusiner (Université de Californie, San Francisco), inventeur du terme « prion », a été le premier à soutenir que la transmission des encéphalopathies spongiformes était due à une protéine infectieuse. Il a été distingué par le Prix Nobel de Médecine en 1997 pour sa découverte « Prions - un nouveau principe biologique d'infection ».

Pierre-Marie Lledo, chef de l'unité postulante Perception et mémoire olfactive, a travaillé dans son équipe et continue de collaborer avec elle. En fait, Stanley Prusiner suit deux stratégies :

- la première relève de la recherche clinique, avec l'objectif de trouver un moyen d'éliminer les protéines accumulées et augmenter la survie d'un sujet qui développe une maladie à prions ;

- l'autre, qui intéresse plus particulièrement le groupe de Pierre-Marie Lledo, consiste à connaître la fonction de la protéine normale, la PrP.

En élucidant la fonction de cette protéine, on pourrait obtenir des données capitales sur les mécanismes intervenant dans sa conversion en prion infectieux et envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En tant que protéine, le prion devrait être une matière inerte mais il s'avère capable de produire « des clones », de se reproduire à l'identique un grand nombre de fois, sans que l'on sache pourquoi ni comment. En tout cas sûrement pas par les voies de reproduction communément admises à l'heure actuelle en matière de maladies infectieuses.

Ce processus, finalement mortel, consiste à transformer Dr Jekyll en Mr Hyde.

La protéine constituant le prion, la PrP, dont nous sommes tous pourvus, est particulièrement utile. Mais, à un moment donné, cette même protéine PrP est capable de se transformer et de se retourner contre l'individu qui la porte. Pire, ces protéines malformées vont « contaminer » des protéines normales. Si l'énigme reste entière, on avance néanmoins des hypothèses. L'idée proposée aujourd'hui est l'exemple d'une matrice. Il pourrait y avoir un « patron », un « moule », qui imposerait sa forme aux autres protéines. Les protéines constituant notre organisme sont généralement solubles, contrairement aux protéines qui tapissent la surface de notre corps et qui entrent dans la composition des ongles ou des cheveux, par exemple.

Les PrP solubles vont être converties par l'agent infectieux en protéines qui deviennent insolubles et donc précipitent ; le cycle de formation des prions se poursuivrait ainsi. Par ailleurs, dans les protéines, il existe des structures régulières de deux types : en « hélices », et en « feuillets β ». Ces feuillets ont la forme de tôles ondulées. On imagine que les prions s'agrègent par l'empilement de ces tôles ondulées les unes sur les autres, formant des plaques amyloïdes à l'origine des dégâts irréversibles que subit le cer-

veau.

L'une des hypothèses récentes et prometteuse pour les années à venir consiste à penser que **les maladies neurodégénératives, celles qui entraînent la perte de neurones (cellules nerveuses) chez l'adulte, seraient des maladies liées à un défaut de la production de nouveaux neurones.** On a découvert, en 1994, l'existence, chez l'adulte, de cellules souches qui « dorment », en attendant des signaux pour se différencier et donner de nouveaux neurones. Cette découverte est riche d'espoirs.

On pensait auparavant que l'on disposait d'un « capital » d'origine de neurones, qui s'amenuisait au fil des ans.

L'équipe de Pierre-Marie Lledo s'intéresse à la neurogenèse chez l'adulte et à l'implication de la protéine normale PrP. Avec Stanley Prusiner qui lui fournit des « outils » (notamment des animaux transgéniques qui vont surexprimer ou au contraire ne plus exprimer la protéine prion normale), **l'équipe cherche à comprendre la fonction de cette protéine dans les stades précoces de la production de nouveaux neurones. Il s'avère que la PrP jouerait un rôle crucial.**

Concernant les maladies dégénératives, deux hypothèses sont prises en compte, sans s'exclure, se complétant plutôt :

- les protéines agrégées en plaques, par la toxicité issue de leur précipitation, sont susceptibles de provoquer l'apparition de « trous » dans le cerveau ;

- il existerait un renouvellement permanent de neurones dans le cerveau et la protéine PrP jouerait un rôle facilitateur pour acheminer les cellules souches vers les sites où leur présence est nécessaire.

Les travaux de Pierre-Marie Lledo et de son équipe s'inscrivent

dans la continuité des premières observations d'Odile Kellerman (voir encadré) qui ont été réalisées sur des cellules maintenues en culture, avec la mise en évidence d'un signal transmis par la protéine normale PrP au neurone pour accroître sa complexité dans l'arborescence, dans sa forme. C'était la première localisation d'une action de la protéine PrP. L'unité postulante Perception et mémoire olfactive poursuit ses recherches plus en amont.

Le cerveau n'est pas, comme on avait pu le penser, un organe qui, après la puberté, perdait ses éléments les plus précieux, à savoir les neurones. On sait maintenant que, quel que soit l'âge, le cerveau répond à son environnement, en acheminant plus ou moins de nouveaux neurones.

Par ailleurs, **l'équipe travaille sur la protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer (la protéine APP) qui joue les mêmes rôles que la PrP :**

- elle intervient dans la régulation de la production des neurones ;
- elle est précurseur d'une protéine susceptible de s'agréger et d'entraîner l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau. L'unité travaille sur ce sujet en collaboration avec l'équipe dirigée par Alain Prochiantz à l'École normale supérieure de Paris.

Source :

Entretien avec Pierre-Marie Lledo,
Chef de l'unité postulante
Perception et mémoire olfactive

La première fonction identifiée

Des équipes dirigées par Odile Kellermann (Pr à l'École normale supérieure, à l'université Paris XI, Institut Pasteur* / CNRS) et Jean-Marie Launay, de l'hôpital Lariboisière à Paris, ont ouvert une importante voie de recherche alors que les scientifiques n'avaient pas encore d'informations sur la fonction du prion (septembre 2000).

Grâce à un modèle neuronal *in vitro* élaboré à l'Institut Pasteur - des cellules souches embryonnaires pouvant se différencier en neurones complètement fonctionnels - Odile Kellermann et sa collaboratrice Sophie Mouillet-Richard (ingénieur ENGREF, ministère de l'Agriculture) ont montré que la protéine prion normale participait à une cascade de signalisation dont les premiers effecteurs ont été identifiés.

La protéine prion intervient de façon subtile et complexe dans une voie de signalisation permettant le maintien et la régulation des fonctions des neurones.

Des travaux en cours de l'équipe d'Odile Kellerman reposent sur le modèle mis au point dont les cellules peuvent être infectées par les prions, ce qui permet d'aborder les mécanismes d'infectiosité impliqués dans les maladies dont ils sont responsables.

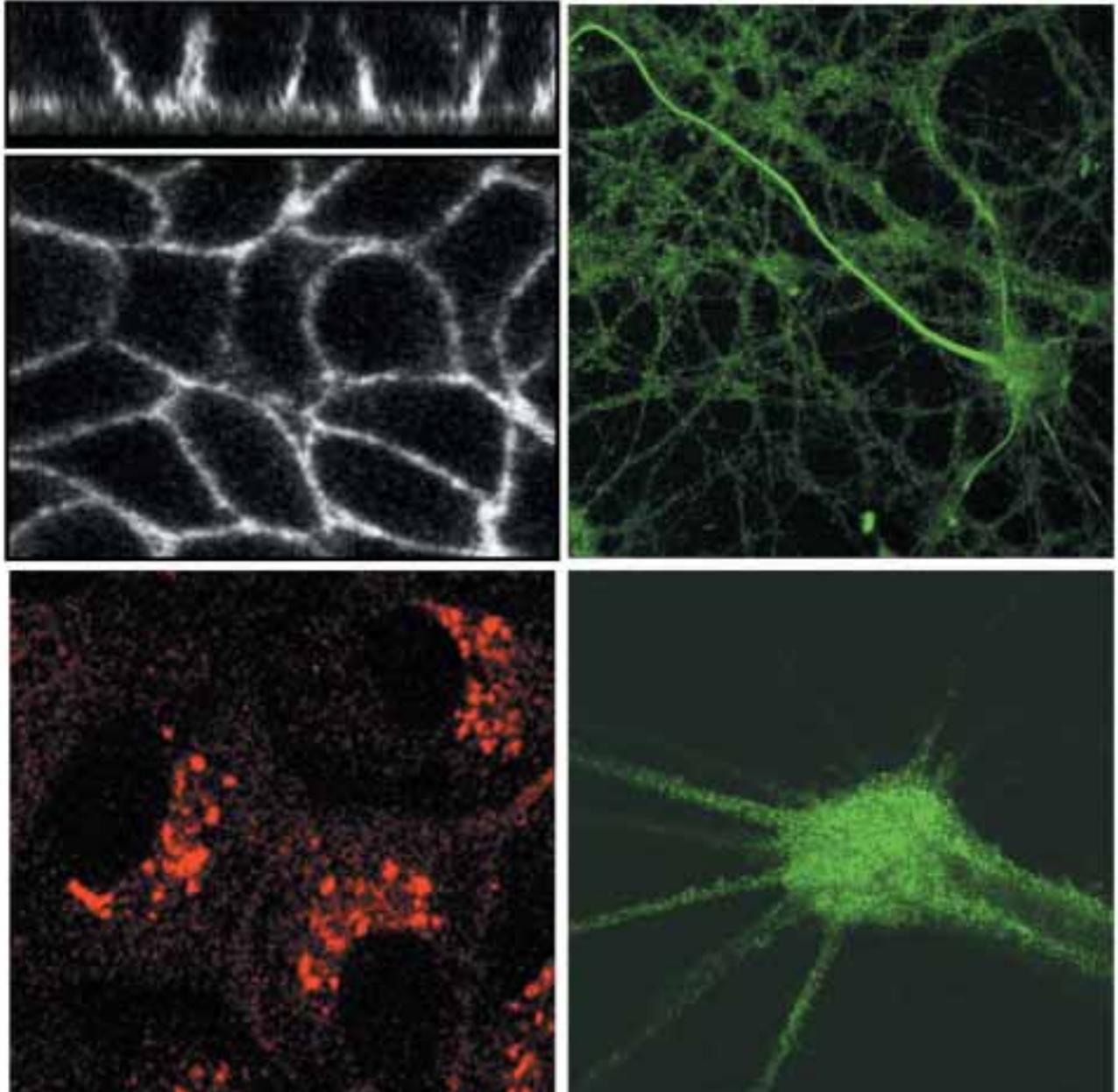
* Odile Kellerman était alors responsable du laboratoire de Différenciation cellulaire à l'Institut Pasteur. Elle a rejoint depuis l'Institut André Lwoff où elle dirige le laboratoire Différenciation cellulaire et prions, laboratoire associé à l'Institut Pasteur et rattaché au département Biologie cellulaire et infection.

EXPLORER LES VOIES DE LA CONVERSION

L'équipe de Chiara Zurzolo, chef de l'unité postulante Trafic membranaire et pathogenèse s'est fixé comme objectifs d'analyser les répercussions du déplacement intracellulaire de la protéine précurseur du prion et d'identifier les mécanismes de la conversion de la protéine normale en prion.

Le fait qu'une protéine puisse transmettre une maladie en induisant des changements conformationnels d'une protéine hôte va à l'encontre des principes fondamentaux selon lesquels la présence d'acides nucléiques, comme l'ADN, est essentielle pour l'infection. La PrP^{sc} (prion) n'est pas toxique chez les souris génétiquement modifiées qui ne fabriquent pas leur propre PrP (protéine responsable du prion), ce qui implique que le mécanisme infectieux nécessite la présence de la protéine endogène. Cependant, le mécanisme déclenchant la conversion de la protéine normale en protéine anormale n'est pas encore connu. De même que l'endroit dans la cellule où la conversion pathologique de la protéine a lieu. Les protéines sont la base de la vie, fournissant à la fois le matériel, le personnel et l'énergie nécessaires pour faire tourner le moteur. Comme de simples feuilles de papier donnent naissance à des objets grâce à l'origami, les protéines se plient pour donner naissance à des formes complexes.

Parfois une protéine se plie



Images en haut à gauche (noir et blanc): cellules épithéliales cultivées sur filtres et marquées avec des anticorps anti-PrP. La PrP est révélée à la surface des cellules.

L'image en bas à gauche montre, pour le même type cellulaire, une coloration (en rouge) de la PrP à l'intérieur des cellules. La coloration apparaît granuleuse et localisée à proximité de l'appareil de Golgi.

Les images de droite montrent la coloration verte de la PrP en surface (image du haut) et à l'intérieur (image du bas) de motoneurones de rat. La coloration apparaît granuleuse et particulièrement concentrée sur les axones.

incorrectement, d'autres fois une mutation, lors de la construction de la protéine, cause une malformation. Généralement, un mauvais repliement signifie un mauvais fonctionnement de la protéine, mais il peut également conduire à une mauvaise localisation de la protéine au sein de la cellule. Par exemple, la PrP mal formée ne peut être transportée à la surface des membranes extra-cellulaires et reste bloquée dans la cellule.

La malformation de la protéine PrP peut être due soit à la propagation d'une mauvaise conformation après infection, soit au déclenchement d'une mutation présente dans le gène correspondant que l'on retrouve dans la forme héréditaire de la maladie.

Dévoiler le cheminement de la protéine

Pour Chiara Zurzolo, la transformation de la protéine PrP de sa forme normale vers sa forme anormale PrPsc est fortement influencée par le déplacement intracellulaire de la protéine au sein de la cellule. **Cette perspective a des implications importantes, non seulement pour comprendre les mécanismes fondamentaux de la maladie, mais aussi pour le développement de mesures prophylactiques, thérapeutiques et pour le diagnostic de la maladie.** Pour comprendre comment la protéine passe de la forme normale à la forme anormale, on doit d'abord comprendre le cheminement de la protéine dans la cellule ainsi que les interactions qui le contrôlent. Alors que la protéine PrP est une glycoprotéine transmembranaire, la protéine prion qui en est issue semble rester localisée dans la cellule, en partie près de vésicules qui semblent être des lysosomes. Il

semble que le retrait de la protéine normale de la surface de neuroblastes infectés par la protéine prion bloque l'apparition de la PrPsc intracellulaire. Ces résultats sont en accord avec l'idée selon laquelle la présence de protéine prion à la surface des cellules est le précurseur essentiel de la protéine mutée. Ceci suggère que la conversion de la protéine normale en protéine mutée se déroule également à la surface de la membrane cellulaire ou après l'entrée dans la cellule de la protéine. Néanmoins, l'identité du compartiment cellulaire impliqué dans la conversion des protéines n'est pas encore connue. On ne sait pas non plus s'il existe un récepteur spécifique à la surface des cellules qui jouerait un rôle dans l'entrée des particules prions infectées dans la cellule. L'analyse du cheminement cellulaire de la protéine normale est très important pour savoir comment la PrP est transformée en PrPsc, ainsi que pour avoir des informations importantes sur le fonctionnement physiologique de la protéine normale.

Explorer les mécanismes et la localisation de la conversion en protéine pathogène

L'équipe de Chiara Zurzolo entreprend à l'Institut Pasteur un projet dont le but est de **comprendre, au niveau moléculaire et microscopique, les mécanismes ainsi que la localisation de la conversion de la protéine prion.** Pour réaliser ce projet différents outils et lignées cellulaires (neuronale et épithéliale) seront utilisés. L'un des principaux objectifs est d'analyser le site de conversion des protéines en fusionnant la protéine prion avec une protéine fluorescente (GFP) dans des cellules neu-

ronales avant et après infection de ces cellules par des homogénats de cerveaux infectés. Avec cette technique, et avec l'aide du nouveau Centre d'imagerie dynamique de l'Institut Pasteur, il sera possible de voir si l'infection par la PrPsc entraîne un changement de localisation de la protéine fluorescente PrP-GFP et ainsi identifier le site de conversion. Dès que l'équipe aura mis au point une méthode pour suivre la conversion des protéines au sein des cellules infectées en culture, il sera possible d'analyser le déroulement de cette conversion puis d'essayer de la bloquer.

L'analyse des mouvements intracellulaires de la protéine PrPc est essentielle pour comprendre comment elle peut être convertie en PrPsc, et devrait apporter des informations précieuses sur les fonctions de la protéine PrPc. L'intérêt de comprendre ces mécanismes est **d'offrir de nouveaux choix thérapeutiques en agissant soit sur le cheminement de la protéine dans la cellule, soit sur les modifications de la protéine par des protéases.** Enfin, la biologie cellulaire de la PrP est comparable sur de nombreux points à la biologie cellulaire des précurseurs de protéines amyloïdes rencontrés dans la maladie d'Alzheimer, où les aberrations de fabrication de ces précurseurs de protéines associées aux membranes conduisent à des situations pathologiques. **Ainsi, les recherches poursuivies dans l'unité sur les encéphalopathies spongiformes pourront fournir des informations pertinentes sur la maladie d'Alzheimer.**

Source :
Chiara Zurzolo,
chef de l'unité postulante Trafic
membranaire et pathogénèse.

PRION

Reproduire toutes les étapes de l'infection humaine dans un modèle animal

Le groupe de Françoise Lazarini étudie la propagation du prion infectieux telle qu'elle est observée dans la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob qui a émergé après l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine, ainsi que les cas résultant de la contamination de l'hormone de croissance.

En utilisant un modèle murin, l'équipe explore les cibles de l'agent infectieux parmi les cellules du système immunitaire, notamment les cellules dendritiques et les macrophages. L'effet de doses répétées sur la propagation du prion infectieux de la périphérie vers le système nerveux est également analysé, pour voir si des doses sous-infectieuses peuvent éventuellement induire cette maladie mortelle.

Le groupe procède donc par microinjections de prions chez des souris utilisées comme modèles animaux susceptibles de reproduire toutes les étapes de l'installation de l'infection chez l'homme.

Ce travail s'insère dans la problématique de la contamination de certains lots d'hormone de croissance. À l'heure actuelle, on sait que certains lots d'hormone de croissance, délivrés à un millier d'enfants entre 1984 et 1985, étaient contaminés par de faibles doses de prions humains. On voudrait comprendre pourquoi il y a eu tant d'enfants contaminés - plus de 80 - à partir de petites doses.

L'une des hypothèses sur laquelle le groupe de Françoise Lazarini concentre ses efforts porte sur l'existence ou non d'un effet cumulatif.

Les enfants étaient traités sur de longues durées, en moyenne pen-

dant deux ans, avec des injections d'une à six fois par semaine.

L'injection de très faibles doses de prions de manière répétitive et sur une longue période n'aurait-elle pas déclenché la maladie, alors qu'une injection isolée d'une dose subinfectieuse de prion n'entraîne pas la maladie ? C'est ce que l'équipe tente de découvrir.

Le modèle animal utilisé pour cela est la souris, infectée par des prions adaptés à la souris, provenant du mouton. Ces prions ont été adaptés par « passages successifs » chez la souris pour stabiliser le prion venant du mouton. Ceci pour obtenir des réactions cliniques stéréotypées, un temps d'incubation qui ne varie pratiquement pas d'une souris à l'autre, une anatomopathologie similaire, des taux d'infectiosité des organes similaires.

Un contexte infectieux expérimental reproductible dont on peut maîtriser de nombreux paramètres.

Les injections sont répétées, avec différents lots, tous les jours, tous les deux jours, une fois par semaine... pendant une durée de sept mois. Chez la souris, les très faibles doses de prions injectées n'entraîneraient normalement pas l'apparition de la maladie. Les investigations en cours devraient permettre de déceler l'impact de l'éventuel effet cumulatif.

À noter toutefois qu'à l'origine, pour préparer le passage du prion du mouton à la souris, certaines souris ont été infectées, d'autres non. C'est à partir des souris infectées que les souches de prion ont été progressivement stabilisées. Pourquoi les autres souris ont-elles résisté ? Cette résistance représente la barrière d'espèce, qui protège une espèce donnée de la contamination par des prions adaptés à d'autres espèces. Les souches de prions existantes se distinguent par leur spectre d'espèces sensibles. Il semblerait que les souches de prions observées dans différentes espèces diffèrent par le repliement

de la forme pathologique de la protéine du prion (PrP^{sc}), qui se traduit souvent par un profil électrophorétique spécifique en Western blot, après digestion à la protéinase K.

Pour des raisons de facilité de mise en œuvre, de fiabilité d'interprétation des résultats, et de sécurité, le groupe utilise donc un prion bien connu, adapté à la souris. La sécurité est de rigueur car des centaines de souris, toujours les mêmes, sont inoculées chaque jour.

Les recherches se font en laboratoire de haute sécurité, de type P3, comme pour les autres équipes poursuivant des recherches sur le prion, la forme pathogène de la protéine PrP, à l'Institut Pasteur. En ce qui concerne le prion, des réglementations très strictes doivent être respectées pour la manipulation, en particulier l'acheminement des déchets, l'autoclavage à des températures plus élevées (134 ° en vapeur humide pendant 20 minutes), l'élimination des déchets liquides avec des incinérateurs spéciaux, etc. Par ailleurs, il est particulièrement difficile de décontaminer les laboratoires de sécurité où l'on a manipulé du prion ; il faut donc confiner les expérimentations dans des lieux spécifiques dédiés à la recherche sur cet agent infectieux.

Le deuxième volet des travaux de Françoise Lazarini fait l'objet d'un Programme transversal de recherche de l'Institut Pasteur, en association avec la société Bio-Rad, qui a pour ambition d'identifier et de caractériser les cellules du système immunitaire répliquant et/ou propageant l'agent de l'ESB. Ces données seront essentielles pour la mise au point d'un test de dépistage de l'ESB à partir du prélèvement sanguin.

Source :

Entretien avec Françoise Lazarini, chargée de recherche dans l'unité Neurovirologie et régénération du système nerveux dirigée par Monique Dubois-Dalq.