

# Les prions

LA NATURE DE L'AGENT

## Les prions - Nature de l'agent

### La PrP pathologique et la nature de l'agent

Le spectre d'inactivation très particulier des ATNC ainsi que la nature biochimique et structurale des plus petites fractions infectieuses purifiées ont conduit Stanley Prusiner à proposer l'hypothèse d'un agent transmissible de nature exclusivement protéique. (Prusiner, 1982)

#### Propriétés physico-chimiques des ATNC

Les ATNC possèdent des propriétés peu communes de résistance aux procédés habituels d'inactivation des agents microbiologiques. Les techniques conventionnelles de stérilisation ne permettent pas de diminuer l'infectiosité des échantillons à des niveaux compatibles avec la sécurité hospitalière.

Les procédures de décontamination habituellement préconisées sont :

- L'autoclavage à 134 / 136 °C pendant 18 min.
- L'inactivation par la soude 1 N pendant 1h à température ambiante
- L'inactivation par l'hypochlorite de sodium (2° Cl) pendant 1 heure à 20 °C.

Le spectre d'inactivation des ATNC est relativement atypique. Les ultrasons les rayonnements ionisants et non ionisants, les nucléases, le formaldéhyde et les détergents sont peu efficaces voir totalement inefficaces. (Latarget et al., 1970) (Gibbs et al., 1978) (Brown et al., 1990) (Taylor, 1996)

Par exemple les ATNC présentent une résistance aux radiations ionisantes 1000 fois supérieure aux plus résistants des agents microbiologiques connus. Par ailleurs, ces agents présentent une forte résistance à l'inactivation par la chaleur sèche.

De manière générale, l'infectiosité résiste bien mieux aux procédés détruisant les acides nucléiques qu'aux procédés dégradants ou dénaturants les protéines; ainsi, les ions chaotropes, le phénol ou les digestions par des protéases diminuent sensiblement le titre infectieux.

#### Résistance et inactivation des ATNC

(Dickinson and Taylor, 1978)

Procédé d'inactivation	Réduction du titre infectieux
<b>Procédés d'inactivation physique</b>	
Chaleur sèche	Résistance 3 ans à température ambiante Résistance 24 heures à 160 °C Résistance 1 heure à 360 °C
Chaleur humide	Perte de 3,5 à 7,5 logs d'infectiosité à 134 °C pendant 20 min. (variable selon les souches)

Ultrasons	Résistance totale
Radiations ionisantes	Dose inactivatrice 37% : >10000 Grays
Rayons ultraviolets	Dose inactivatrice 37% : 40 000 J/m <sup>2</sup>
<b><i>Procédés d'inactivation chimique</i></b>	
Nucléase	Résistance quasi-totale
Proteinase K	Résistance partielle
Permanganate de Potassium	Résistance quasi-totale
Formaldéhyde, Glutaraldéhyde	Résistance quasi-totale
Bétapropionolactone	Résistance quasi-totale
Peroxyde d'hydrogène	Résistance quasi-totale
Ionophores	Résistance quasi-totale
Acide peracétique	Résistance quasi-totale
Oxyde d'éthylène	Résistance quasi-totale
Sodium dodécyl sulfate + chauffage 100 °C	Diminution importante de 4 à 10 logs en 1h (variable selon les souches)
Urée 6 M ou 8 M	Diminution de 3 logs
Hypochlorite de sodium 2%	Diminution de 4 à 10 logs en 1 h (selon les souches)
Hydroxyde de sodium 1 M	Diminution de 3 à 6 logs en 1 h (selon les souches)

## Purification de l'Infectiosité

Malgré des titres infectieux élevés, aucune structure compatible avec une particule virale conventionnelle ou un acide nucléique spécifique n'a pu être mise en évidence dans le système nerveux central quelle que soit la technique utilisée.

Ceci a motivé la mise au point de procédés spécifiques de purification de l'agent transmissible. Ces protocoles associent une protéolyse limitée et des étapes successives d'extraction par des détergents, de centrifugations différentielles et de sédimentation sur gradient de sucrose. Ils ont permis d'isoler une protéine hydrophobe de 27 à 30 kDa, insoluble dans les détergents et résistante partiellement à la digestion par les protéases.

Cette protéine a été appelée PrP pour « *Protease Resistant Protein* ». (Prusiner et al., 1982) La PrP 27-30 co-purifie avec l'infectiosité et, est le seul composant retrouvé de façon reproductible dans les fractions infectieuses. (Bolton et al., 1982) Sa concentration est proportionnelle au titre infectieux.

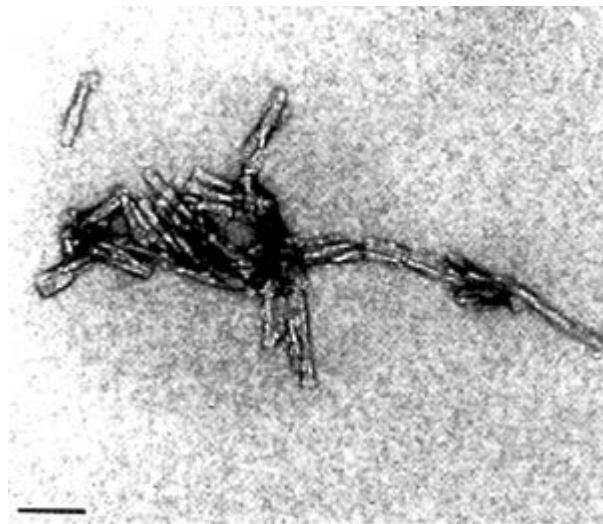
En microscopie électronique, elle apparaît sous la forme de structures fibrillaires caractéristiques (SAF pour « scrapie associated fibrils » ou « prion rods »). (Merz et al., 1983; Prusiner et al., 1983) Des travaux ultérieurs ont permis de montrer que la PrP 27-30 également, appelée PrP<sup>Sc</sup> ou PrP<sup>Res</sup>, correspond à la forme anormale d'une protéine constitutive de 33 à 35 kDa codée par l'hôte : la PrP<sup>C</sup>.

### PrP<sup>Res</sup> purifiée observée en microscopie électronique

(Merz et al., 1983; Prusiner et al., 1983)



SAF



Prion rods

## La PrPsc, un analogue pathologique de la PrPc

La PrP sous sa forme pathologique présente certaines caractéristiques qui la distinguent de la PrPc.

### Propriétés comparées de la PrP cellulaire et de la PrPsc

	PrPc	PrPsc
Résistance PK	Nulle	Partielle
Solubilité dans les détergents	Bonne	Faible ou nulle
Digestion PIPLC	Relarguage de la PrP	Inefficace
Structure II		
Hélice $\alpha$	42%	30%
Feuillet $\beta$	3%	43%
Structure III		
Hélice $\alpha$	4 théoriques / 3 déterminés par RMN	2
Feuillet $\beta$	2	4
Temps de demi-synthèse	<1h	15h
Temps de demi-vie	3-6h	>24h

### Structure primaire

La séquence de la PrPsc obtenue par microséquençage partiel de la partie N-terminale et centrale, montre qu'il n'existe pas de différence de structure primaire entre la PrP cellulaire et la PrPsc. (Hope et al., 1986; Turk et al., 1988) La digestion par la protéinase K utilisée lors de la purification de la protéine conduit à l'élimination de la portion N-terminale de la PrP générant une forme de 27 à 30 kDa. Comme la PrPc, la PrPsc possède une ancre GPI à son extrémité C-terminale, et son profil de glycosylation est identique à celui de la PrPc. (Haraguchi et al., 1989)

### Structure secondaire

L'analyse de la structure secondaire de la PrPsc, bien qu'étant incomplète, a révélé d'importantes différences avec celle de la PrP cellulaire. L'analyse spectroscopique par transformée de Fourier et dichroïsme circulaire a révélé que la PrPsc contenait 30 % d'hélices  $\alpha$  et 45 % de structures  $\beta$  plissées (la PrPc est composée de 40 % d'hélice  $\alpha$  et environ 3 % de feuillets  $\beta$ ) : l'essentiel des modifications distinguant la PrPsc de son analogue cellulaire, est donc de nature physico-chimique, la PrPsc étant majoritairement constituée de feuillets  $\beta$ . (Bazan et al., 1987; Nguyen et al., 1995)

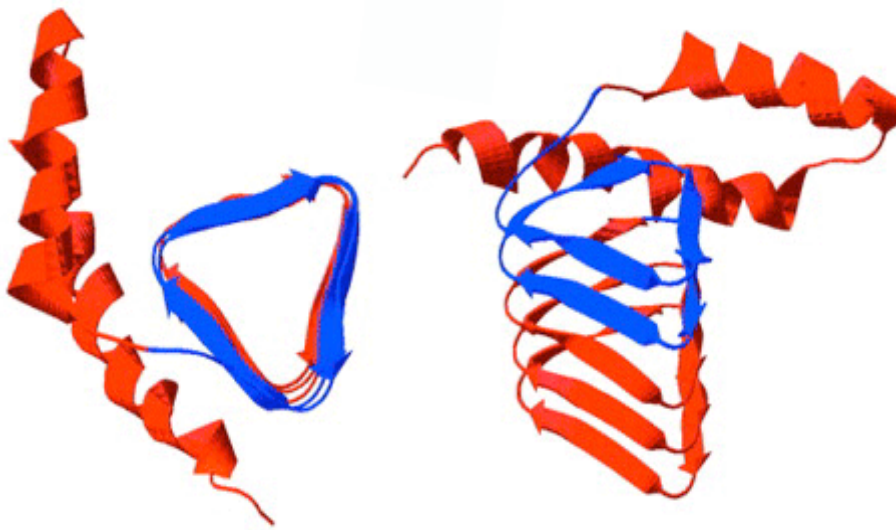
### Structure tertiaire

A ce jour, en raison des propriétés physico-chimiques de la PrPsc (agrégabilité, insolubilité dans les détergents), aucune structure tertiaire n'a été obtenue par RMN ou par diffraction des rayons

X. Les seules structures disponibles ont été établies par modélisation moléculaire (dynamique) à partir des données de FTIR et de dichroïsme circulaire. Selon ces modèles, la PrP<sup>sc</sup> est composée de 2 hélices  $\alpha$  et de 4 feuillets  $\beta$  (Huang et al., 1996). Plus récemment, Wille et al. dans une étude de structure de la PrP<sup>sc</sup> utilisant la cristallographie par diffraction au rayon X propose la formation d'une hélice  $\beta$  lors du processus de conversion. (Wille et al., 2002)

### Modèle 3D de la PrP<sup>sc</sup> selon Wille et al. (Wille et al., 2002)

Dans ce modèle, les structures  $\beta$  sont parallèles et forment une hélice.



## L'hypothèse du prion

L'hypothèse de la nature exclusivement protéique des ATNC a été émise dès 1967 et en 1970 sur la base des propriétés physico-chimiques exceptionnelles de ces agents. (Alper et al., 1967; Latarget et al., 1970) En 1982, Stanley Prusiner propose l'hypothèse d'un agent protéique dénué d'acide nucléique et constitué exclusivement de protéines (prion pour proteinaceous infectious particle). (Prusiner, 1982) L'agent serait la PrP<sup>sc</sup> elle-même, et sa réplication reposerait sur un mécanisme de conversion protéique : la PrP<sup>sc</sup> pourrait lier la PrP<sup>c</sup> et la transconformer en PrP<sup>sc</sup>.

Plusieurs modèles de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> ont été proposés, notamment :

**Le modèle de nucléation polymérisation :** la transconformation de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup> monomérique serait réversible, la PrP<sup>sc</sup> étant moins stable que la PrP<sup>c</sup>. L'agrégation de la PrP<sup>sc</sup> permet sa stabilisation. Des molécules de PrP<sup>c</sup> pourraient se lier au noyau de PrP<sup>sc</sup> et y être converties en PrP<sup>sc</sup> de façon stable et non réversible. (Horwich and Weissman, 1997; Jarrett and Lansbury, 1993; Weissmann, 1996) Dans ce modèle, quand l'agrégat de PrP<sup>sc</sup> atteint une masse critique, il se dissocie en plusieurs fractions qui à leur tour pourraient reproduire la réaction (amplification).

**Le modèle de polymérisation assisté par une amorce :** dans ce modèle, la PrP<sup>sc</sup> serait plus stable que la PrP<sup>c</sup> mais cinétiquement inaccessible ; la conversion passerait par un intermédiaire conformationnel équidistant thermodynamiquement de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>sc</sup>. (Horwich and Weissman, 1997; Prusiner, 1991; Weissmann, 1996) La liaison entre la PrP<sup>sc</sup> et cet intermédiaire favoriserait sa conversion en PrP<sup>sc</sup>.

## Références

- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214: 764-766.
- Bazan JF, Fletterick RJ, McKinley MP, Prusiner SB. Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein. *Protein Eng* 1987; 1: 125-135.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218: 1309-1311.
- Brown P, Wolff A, Liberski PP, Gajdusek DC. Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation, and limited survival after ashing at 360 °C: practical and theoretical implications. *J Infect Dis* 1990; 161: 467-472.
- Dickinson AG, Taylor DM. Resistance of scrapie to decontamination. *New Eng J Med* 1978; 299: 1413-1414.
- Gibbs CJ, Gajdusek DC, Latarjet R. Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 6268-6270.
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 1-13.
- Hope J, Morton LJD, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein. *EMBO J* 1986; 5: 2591-2597.
- Horwich AL, Weissman JS. Deadly conformations - Protein misfolding in prion disease. *Cell* 1997; 89: 499-510.
- Huang ZW, Prusiner SB, Cohen FE. Scrapie prions: A three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* 1996; 1: 13-19.
- Jarrett JT, Lansbury PT. Seeding One-Dimensional Crystallization of Amyloid - A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie. *Cell* 1993; 73: 1055-1058.
- Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T. Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* 1970; 227: 1341-1343.
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE. Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1983; 306: 474-476.
- Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB, et al. X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J Mol Biol* 1995; 252: 412-422.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-144.
- Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-1522.
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran KA, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 1982; 21: 6942-6950.
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35: 349-358.

Taylor DM. The resistance of the BSE agent to inactivation. *J. Br. Cattle. Vet. Assoc.* 1996; 4: 377-379.

Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 1988; 176: 21-30.

Weissmann C. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Lett* 1996; 389: 3-11.

Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, et al. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3563-8.