

Infections et agents infectieux

Mais quel est donc l'agent (ou le complexe) infectieux des maladies à prions ? S'agit-il uniquement de conformations pathogéniques de la protéine PrP, comme de nombreux arguments le suggèrent sans le démontrer encore définitivement ? ou bien, PrP n'est-elle que l'un des composants essentiels d'un « complexe infectieux » encore élusif ? Les récentes données publiées ne permettent pas encore de trancher ce dilemme ; en revanche, elles renforcent fortement l'hypothèse d'une identité entre l'agent de l'encéphalite bovine spongiforme et celui de la nouvelle forme variante de maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Les incertitudes sont moindres, de jour en jour, concernant les agents infectieux d'autres maladies humaines, notamment le SIDA et les hépatites. Il existe plusieurs souches de VIH, qui peuvent être distinguées par le co-récepteur utilisé, la cellule cible et l'effet pathogène. Les virus infectant les macrophages, ne produisant pas de syncytium, utilisent CCR5. Les virus pathogènes pour des lignées T, inducteurs de syncytiums, utilisent de manière prédominante CXCR4. Le virus de l'hépatite δ , jouant un rôle d'auxiliaire aggravant des hépatites B, semble de nature composite, associant un « viroïde » ressemblant à des ARN circulaires pathogènes de plantes, et un gène, d'origine cellulaire qui, en augmente la réplication. Enfin, peut-être est-il possible d'appriivoiser des virus afin de réserver leur pouvoir pathogène à des cellules cancéreuses... ainsi que le montre l'exemple d'un adénovirus incapable de réprimer l'activité de l'antioncogène p53, et ne lysant donc que les cellules malignes qui en sont dépourvues.

Le lien entre encéphalopathie spongiforme bovine et le nouveau variant de maladie de Creutzfeldt-Jakob

On sait depuis environ six mois que de nombreux arguments épidémiologiques, cliniques et neuropathologiques suggèrent que l'agent infectieux de la « maladie de la vache folle » peut contaminer différentes autres espèces que les bovins, notamment l'homme [1]. Une nouvelle pièce à conviction en ce sens vient d'être apportée par J. Collinge *et al.* (Édimbourg et Londres, GB) qui permet de suspecter fortement la responsabilité du prion de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) dans les nouveaux cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob atypique (vMCJ) décrits par R.G. Will *et al.* en avril dernier [2, 3].

L'hypothèse de la « protéine seule »

Comme chacun sait, tout est difficile à analyser et à comprendre dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles (voir l'excellente synthèse de S. Lehmann [4]) : l'agent pathogène serait une protéine, la protéine prion ou PrP [5]. Pourtant l'existence de souches* différentes alors que la séquence de la protéine PrP est identique fait douter de l'unicité protéique de l'agent pathogène ; la présence d'un acide nucléique ou d'un autre composant

associé à la PrP dans les prions expliquerait bien ces résultats mais elle n'a jamais pu être montrée (*m/s* n° 8/9, vol. 9, p. 989). On a donc proposé que les différentes souches pourraient correspondre, en fait, à des isoformes conformationnelles, éventuellement variablement glycosylées, de la protéine prion elle-même [6, 7]. Cette protéine possède en effet deux sites de glycosylation et on lui connaissait déjà les deux conformations PrP^c (normale) et PrP^{sc} (pathologique, liée aux encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles, dont la première connue a été la scrapie ou tremblante) [3-6]. La PrP^{sc} posséderait plus de feuilletts plissés β . Par ailleurs, des peptides dérivés de la partie centrale de la PrP sont capables d'adopter spontanément une structure en feuilletts β , phénomène amplifié par la présence de mutations potentiellement pathogènes lorsqu'elles surviennent dans la protéine *in vivo* ; ces modifications conformationnelles pourraient suffire à rendre la protéine insoluble et résistante aux agents protéolytiques. Rappelons enfin qu'existe un polymorphisme Val/Met (V/M) de la molécule en position 129 ; l'homozygotie MM ou VV est un facteur de susceptibilité important pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob (*m/s* n° 1, vol. 6, p. 77) : jusqu'à présent, tous les malades étiquetés vMCJ sont homozygotes MM et, parmi les MCJ sporadiques, l'homozygotie est surreprésentée.

* Les « souches » se différencient par la durée d'incubation et les signes cliniques et histologiques de dégénérescence nerveuse dans une espèce hôte donnée ; les différentes souches touchent diverses populations neuronales.

L'énigme des souches de prions

L'hypothèse de l'existence de souches « conformationnelles » d'une protéine prion infectieuse, *a priori* invraisemblable pour tous les spécialistes de la structure protéique, devait cependant se trouver légitimée par des observations faites sur les prions de vison. Il existe deux souches d'agents de l'encéphalopathie transmissible du vison auxquelles correspondent des mobilités électrophorétiques différentes des glycoconjugués de la PrP^{Sc}, témoignant probablement de l'existence de conformations distinctes qui semblent stables et « hérissables » après propagation chez le hamster syrien [8]. Cependant, il manque encore à la théorie selon laquelle « la protéine seule » est l'agent infectieux sa démonstration expérimentale définitive : montrer qu'elle est réellement infectieuse. En effet, la protéine prion produite par génie génétique, même quand on a pu lui imprimer par différents moyens une structure ressemblant à celle supposée pour la PrP^{Sc}, n'a encore jamais entraîné l'apparition d'une maladie après injection intracérébrale à des animaux sensibles. Les fractions infectieuses sont toutes hétérogènes et les efforts pour purifier la protéine plus avant semblent lui faire perdre son pouvoir infectieux. De plus, des expériences préliminaires récentes montrent que, *in vitro*, PrP^{Sc} peut protéger des acides nucléiques exogènes contre des nucléases, ce qui ôte une partie de sa force à l'argument selon lequel des nucléases n'inactivent pas le pouvoir infectieux d'extraits de cerveau scrapique. Il n'en reste pas moins qu'aucun acide nucléique supérieur à quelques dizaines de pb n'a jamais été observé dans les fractions infectieuses.

Le cheminement du prion

Une autre difficulté « conceptuelle » à la théorie de « la protéine seule » est le mode de contagé supposé de la forme variante de Creutzfeldt-Jakob : une possible infection par voie digestive, semblant progresser par l'intermédiaire des formations lymphoïdes de la muqueuse intesti-

nale, puis en utilisant les nerfs végétatifs, déclencherait la maladie après un délai de plusieurs années. Intuitivement, un tel scénario rappelle le mode de dissémination de certains agents infectieux classiques et de cellules malignes et reste troublant dans la perspective d'un phénomène d'exportation à distance d'une protéine chaperon ou de la propagation de proche en proche d'un phénomène de transconformations en chaîne. Une hypothèse possible serait qu'une cellule ayant internalisé la « protéine infectieuse », par exemple un macrophage ou une cellule folliculaire dendritique, pourrait la transporter vers les centres nerveux, franchissant la barrière hémato-encéphalique selon un processus équivalent à celui responsable de l'atteinte neurologique du SIDA.

Typage des prions par analyse de la PrP : conformation et glycosylation

Le nouveau travail de Collinge *et al.* [2] concerne l'identification biochimique des différents prions chez l'homme et chez les animaux. Ces auteurs ont examiné par *Western blot* la migration électrophorétique et la glycosylation des PrP^{Sc} impliquées dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique, la maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogénique, et le nouveau variant vMCJ. Deux types de résultats sont présentés : (1) le pourcentage des espèces di-mono- et non-glycosylées ; (2) le poids moléculaire apparent des espèces déglycosylées et hydrolysées par la protéinase K qui, renseignant sur le site de clivage protéolytique, viendrait à l'appui de l'hypothèse de conformations différant par leur accessibilité à la protéase. En effet, le séquençage du gène *PNRP* des malades n'a décelé aucune anomalie.

• Site de protéolyse

Dans tous les cas, les extraits de cerveau sont soumis à une protéolyse avant migration électrophorétique qui permet d'éliminer la PrP normale, entièrement protéolysée. La protéolyse par la protéinase K clive le domaine aminoterminal de la PrP^{Sc} et seul le domaine carboxyterminal qui

porte les sites de glycosylation apparaît sur les électrophorèses. Trois types de migration sont décrits par les auteurs pour les échantillons de MCJ sporadique et iatrogénique (*figure 1*) : les types 1 et 2 sont différenciés entre eux par la proportion de protéine non glycosylée, légèrement inférieure dans le type 2 ; les trois bandes du type 2 ont, en outre, une migration électrophorétique un peu plus rapide que celles du type 1. Le type 3 se distingue des deux précédents par une masse moléculaire inférieure de 2 kDa dans chacune des espèces di-mono- et non glycosylée, phénomène qui pourrait être lié à un site de clivage protéolytique différent de celui des types 1 et 2 ; en outre, le type 3 ne se rencontre que dans certaines MCJ iatrogéniques, lorsque la contamination a eu lieu par voie périphérique, par injection d'hormone de croissance contaminée, par exemple.

• Glycosylation

Ces trois types sont en fait très proches et, dans tous les cas, l'espèce monoglycosylée prédomine (40-45 %), suivie, autour de 30 % par l'espèce non glycosylée, puis, pour 20-25 % par l'espèce diglycosylée. Les protéines PrP^{Sc} isolées de cerveaux d'animaux infectés expérimentalement par des broyats de cerveaux humains atteints de MCJ conservent des caractéristiques identiques à celles observées dans les échantillons humains (en dehors du fait que, chez la souris, le type 1 se transforme en type 2, mais il faut noter que les souris utilisées sont des souris transgéniques à gène *PRPN* humain codant pour une Val en position 129, alors que le type 1 ne s'observe que sur les échantillons humains homozygotes MM). En revanche, la migration des échantillons vMCJ est univoque et diffère des trois types précédents par une représentation prépondérante de l'espèce diglycosylée (proche de 50 %), l'espèce monoglycosylée étant inférieure à 40 % et l'espèce non glycosylée comptant pour 10 % à 15 %. La migration électrophorétique de ses trois bandes est identique à celle observée dans le type 3 (*figure 1*). On n'a encore pu transmettre l'infection

vMCJ aux souris; cependant, les pourcentages de glycosylation des échantillons de cerveaux de souris et d'un macaque infectés par l'ESB sont en tous points comparables à ceux issus de bovins atteints par l'ESB et de malades morts de vMCJ. Ces résultats sont interprétés par les auteurs comme la mise à jour d'une signature de l'ESB et un argument majeur en faveur du lien entre ESB et vMCJ. La transmission des types 1, 2 et 3 à des souris transgéniques exprimant le gène humain *PRNP* de génotype V montre que le maintien ou la conversion du type dépend du génotype au codon 129: le type 1 de génotype MM transféré aux souris entraîne l'apparition d'un profil de type 2, alors que les types 2 et 3 de génotypes MV ou VV entraînent, chez la souris, l'apparition de types homologues 2 ou 3.

• **Une signature de l'ESB**

Ces résultats suggèrent que le profil de la PrP après protéolyse partielle, dépendant tout à la fois de son niveau de glycosylation et de sa conformation, est modulé par deux paramètres: la nature de la souche d'agent infectieux et le génotype *PRNP*. Collinge *et al.* proposent que ces résultats renforcent l'hypothèse de « la protéine seule » [2]. En fait, autant les résultats rapportés semblent en effet conforter l'hypothèse d'une transmission à l'homme de l'ESB, autant ils n'apportent, en revanche, aucun élément décisif nouveau concernant la nature exacte de l'agent infectieux. En effet, outre l'interprétation plausible des auteurs, il en est une autre également vraisemblable qui s'intègre dans un tout autre modèle. Si la protéine PrP est un cofacteur de l'infection (récepteur de l'agent infectieux, chaperon, molécule protectrice, etc.) et subit une modification post-traductionnelle au cours de celle-ci, il n'est guère étonnant que le type de cette modification dépende de la souche de l'agent infectieux. Selon cette manière de voir, la variabilité du profil des isoformes de la protéine PrP^{Sc}, différent selon les souches, aurait la même signification que celle des tableaux cliniques et les lésions anatomiques caractéristiques de l'infec-

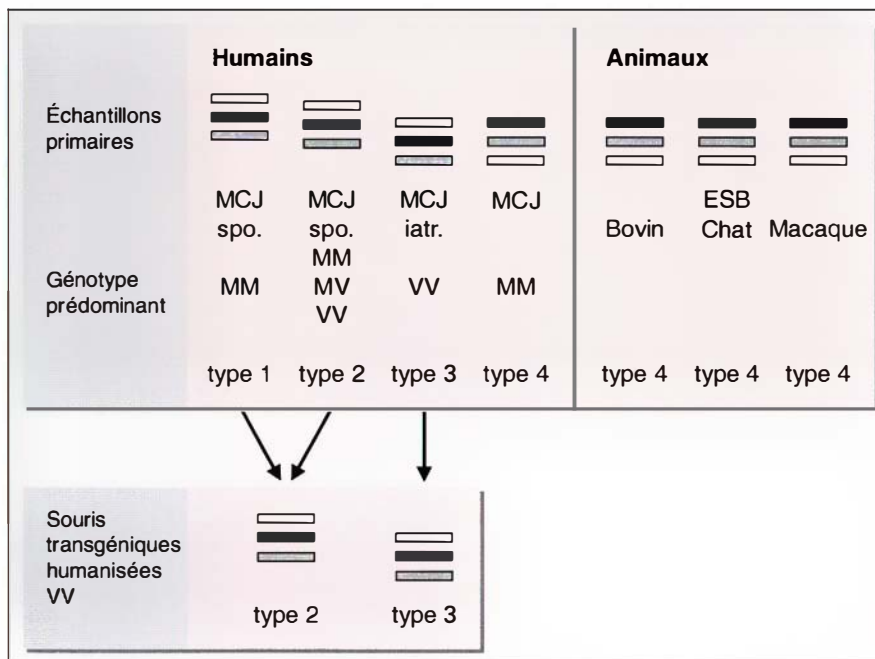


Figure 1. **La signature ESB ?** Immunotransferts (Western blots) des homogénats de cerveaux de sujets atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), traités par la protéinase K. **A.** Quatre types humains sont montrés: deux proviennent de malades atteints de la forme sporadique (types 1 et 2 qui diffèrent dans leur provenance génotypique, les types 1 provenant toujours de sujets homozygotes MM au codon 129, alors que le génotype du type 2 est variable, incluant certains MM); le type 3 provient de MCJ iatrogénique, acquise par voie périphérique (injection intramusculaire d'hormone de croissance contaminée); le type 4 provient de malades atteints du nouveau variant de MCJ (vMCJ), tous de génotype MM. **B.** Échantillons primaires d'animaux atteints d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (bovin, chat contaminé dans les conditions naturelles (non inoculé) par l'agent de l'ESB, macaque infecté par voie cérébrale par un broyat de cerveau de bovin ESB). Ils sont tous de type 4. **C.** Échantillons issus de souris transgéniques, humanisées pour le gène *PRNP* de génotype V, infectées par les souches de type 1, 2 et 3. Les échantillons de type 1 engendrent chez cette souris un type 2; on peut donc penser que c'est la différence de génotype du prion qui est responsable des phénotypes 1 et 2. La vitesse de migration de l'ensemble des trois bandes de chaque échantillon dépend vraisemblablement du site de clivage de la PrP par la protéinase K. Les échantillons les plus rapides sont de type 3 et 4 (identiques entre eux, avec 2 kDa de différence de poids moléculaire apparent avec le type 1), puis le type 2. Chaque échantillon donne à l'électrophorèse trois bandes dont la différence de poids moléculaire apparent dépend du degré de glycosylation: les bandes supérieures sont diglycosylées, les bandes médianes monoglycosylées et les bandes inférieures non glycosylées. Les différents types sont, outre leur poids moléculaire, différenciés par l'importance respective de leur glycosylation: dans les types 1, 2 et 3, c'est la monoglycosylation qui prédomine, puis l'espèce non glycosylée, l'espèce diglycosylée étant la moins représentée; en revanche, dans le type 4 c'est l'espèce diglycosylée qui est prépondérante, l'espèce non glycosylée ne comptant que pour 10-15 %. Baisse du poids moléculaire apparent et glycosylation particulière seraient la signature de l'ESB.

tion par ces souches : il serait la conséquence de processus pathologiques distincts, et non la signature de l'identité entre le PrP^{Sc} et l'agent infectieux.

Physiopathologie de la vMCJ

Outre le jeune âge des malades vMCJ comparé à celui des malades atteints de MCJ sporadique, cette nouvelle affection se différencie par ses signes cliniques : un début insidieux et un développement prolongé, l'importance des signes cérébelleux et, à l'histologie, la présence de plaques bourgeonnantes et non de dépôts synaptiques. Les macaques infectés par voie intracérébrale par des extraits de cerveaux de bovins atteints d'ESB par l'équipe de D. Dormont (CEA, Fontenay-aux-Roses) présentent des signes cliniques et neuropathologiques identiques. Les résultats de Collinge *et al.* peuvent-ils donner des indications sur la souche de prion en cause ? L'identité entre les poids moléculaires des formes de PrP^{Sc} de type 3 et de type 4 issues de malades vMCJ et des animaux ESB soumises à la digestion protéolytique suggère que les sites de clivage, et donc la conformation de la PrP des malades atteints de vMCJ, seraient analogues à ceux du prion des MCJ iatrogéniques acquises par voie périphérique ; dans l'hypothèse où la PrP^{Sc} serait elle-même l'agent infectieux, une souche de type 3 responsable de l'ESB pourrait, du fait de la contamination digestive et d'une glycosylation particulière, jouer un rôle important dans le ciblage des neurones infectés, conférant à la maladie sa signature phénotypique [9]. Cependant, le macaque auquel a été transféré le prion de l'ESB n'a pas été contaminé par voie digestive mais par voie intracérébrale, ce qui ne milite pas en faveur de l'identité originelle des prions de types 3 et 4. Une autre hypothèse serait que le type 4 soit l'équivalent du type 3, mais avec un génotype MM, l'homozygotie pour la méthionine 129 changeant le tropisme cellulaire et le profil de glycosylation de cette forme de PrP^{Sc}. Il est, en effet, intéressant de noter que tous les


malades vMCJ sont homozygotes MM au codon 129. Cela signifie-t-il que, dans ce cas, la période d'incubation est raccourcie ou que seuls ces prions vont acquérir la glycosylation spécifique qui permet à la protéine de cibler certaines populations neuronales ?

Conclusion

En conclusion, les récents résultats de Collinge *et al.* renforcent les arguments épidémiologiques et neuropathologiques en faveur d'un passage de l'agent de l'ESB à l'homme chez lequel, en cas de génotype PNRP MM, il pourrait provoquer une forme variante de MCJ. La relation étroite entre la protéine prion dans une conformation PrP^{Sc} et l'agent infectieux est, s'il en était besoin, encore soulignée. Cependant, la nature exacte du ou des constituants du « complexe infectieux » n'est pas encore définitivement établie ■

RÉFÉRENCES

1. Dormont D, Bursaux E. Dernière heure : l'encéphalopathie spongiforme bovine : commentaires sur un cyclone. *Med Sci* 1996 ; 12 : 673-5.
2. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of « new variant » CJD. *Nature* 1996 ; 383 : 685-90.
3. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996 ; 347 : 921-5.
4. Lehman S. Le rôle de la protéine du prion dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines. *Med Sci* 1996 ; 12 : 949-58.
5. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982 ; 216 : 136-44.
6. Liautard J. Les prions sont-ils des protéines chaperonnes mal repliées ? *Med Sci* 1992 ; 8 : 55-7.
7. Laurent M. Les maladies à prions : l'hypothèse de la « protéine seule » et ses conséquences dynamiques. *Med Sci* 1996 ; 12 : 774-85.
8. Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 1994 ; 68 : 7859-68.
9. Aguzzi A, Weissmann C. A suspicious signature. *Nature* 1996 ; 383 : 666-7.



MOSAÏQUES
Association
des « X fragile »
77, rue Raspail
92270 Bois-Colombes, France
Tél./Fax : 01 47 60 24 99

le samedi 22 mars 1997
au CNIT-EXPO
(amphithéâtre GOETHE)
2, place de la Défense
92503 PARIS LA DÉFENSE
sur le thème :

LE SYNDROME DE L'X FRAGILE,
aspects génétiques,
cliniques et thérapeutiques

avec la participation de :

Dr Éric Fombonne,
Président du Conseil Scientifique
Dr Christophe-Loïc Gérard (Paris)
Pr Randi J. Hagerman (Denver USA)
Pr Jean-Louis Mandel (Strasbourg)
Pr Arnold Munnich (Paris)
Pr Gérard Ponsot (Paris)
Pr Allan Reiss (Baltimore USA)
Pr Bernadette Rogé (Toulouse)
Dr Jeremy Turk (London)

Axel Kahn
Élisabeth Bursaux

*Inserm U. 129, ICGM, CHU Cochin, 24,
rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014
Paris, France.*

**M/S ANNIVERSAIRE EN
VIDÉO-CASSETTES**

**Les conférences de la journée
du 10^e anniversaire de médecine/
sciences du 16 mars 1995 sont
disponibles sur vidéo-cassettes
auprès de :**

**ASSOCIATION DIFFUSION
DES CONNAISSANCES**
2, avenue Léon-Bernard,
35043 Rennes Cedex, France.

TIRÉS À PART

A. Kahn.