

# Les maladies à prions : L'hypothèse de la « protéine seule » et ses conséquences dynamiques

Michel Laurent

*Dans l'hypothèse de la « protéine seule » formulée dès 1991 par Prusiner, hypothèse autour de laquelle un certain consensus semble aujourd'hui s'établir, les maladies à prions résulteraient du changement conformationnel d'une protéine prion PrP<sup>C</sup> en une isoforme pathogène PrP<sup>Sc</sup> susceptible de s'agréger. Le processus de conversion serait de nature autocatalytique, l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> activant, directement ou indirectement, la transition PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>. L'objectif de cet article est d'analyser les conséquences de ce processus dans un contexte cellulaire, c'est-à-dire dans des conditions tenant*

*compte du renouvellement permanent de la protéine native PrP<sup>C</sup>. Il apparaît ainsi que, dans ces conditions, le système possède des propriétés de bi-stabilité dont les conséquences dynamiques sont importantes. L'évolution d'une maladie à prions serait en effet, dans les limites de l'hypothèse testée, totalement différente de celle d'une maladie virale : il existerait des seuils d'infection, les organismes sains étant capables d'éliminer spontanément des apports infraliminaires endogènes ou externes de l'isoforme pathogène PrP<sup>Sc</sup>. Cela signifie que la détection de la forme pathogène de la protéine prion*

*n'est pas nécessairement le signe de la maladie, ni celui du caractère infectieux du matériel dans lequel elle est trouvée. Au contraire, des quantités supraliminaires de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> mais aussi, paradoxalement, de la forme native PrP<sup>C</sup>, provoqueraient la transition vers l'état stationnaire pathogène. La vitesse de rotation de la protéine normale PrP<sup>C</sup> apparaît être un paramètre important gouvernant la dynamique du système, ce qui pourrait ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement ou la prévention des maladies à prions.*

**D**ans une récente libre opinion, Jean-Claude Gluckman [1] tirait la sonnette d'alarme : « Les donneurs de sang peuvent être porteurs d'agents "non conventionnels", les prions, responsables d'affections neurologiques dégénératives comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob. On sait aujourd'hui que ces agents sont présents dans le culot lymphocytaire d'une majorité de donneurs sains sans aucun antécédent personnel ni familial. [...] Ces agents d'une pathologie qui peut se déclarer après une incubation qui se chiffre en décennies ne sont pas détectables par un dépistage des dons de sang. Ils ne sont apparemment inactivés par

*aucun procédé connu. » Cette inquiétude apparaît des plus légitimes au regard de notre conception actuelle de l'origine et du mécanisme des maladies à prions. Cependant, cette idée s'inscrit dans un cadre conceptuel très fragile et souffre de l'incidence d'une hypothèse (l'hypothèse virale, historiquement raisonnable) qui s'avère aujourd'hui peu vraisemblable. Une analyse approfondie de ses fondements tant historiques que théoriques apporte une lumière nouvelle sur la genèse possible (qu'elle soit sporadique ou infectieuse) de ces maladies et sur les stratégies thérapeutiques qui pourraient en découler.*

## **Les maladies à prions ne sont probablement pas des maladies virales**

Même si elle ne fut reconnue comme telle que bien plus tard, la première maladie à prions recensée chez l'homme fut le Kuru, affection neurodégénérative observée dans une peuplade de Nouvelle-Guinée pratiquant des rites funéraires au cours desquels le cerveau des cadavres était consommé. Cette maladie est en voie d'éradication depuis la cessation des rites cannibales, suggérant que le mode de transmission était lié à ces pratiques inhabituelles. De manière

similaire, en France, une quarantaine d'enfants ont été atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob après avoir été traités par de l'hormone de croissance préparée à partir d'hypophyses humaines (*m/s n° 4, vol. 2, p. 220*) [2]. En Grande-Bretagne, plusieurs dizaines de milliers de bovins ont été atteints d'encéphalopathie spongiforme (ou « maladie de la vache folle ») à la suite d'une modification du mode de préparation de leurs farines alimentaires (*m/s n° 3, vol. 6, p. 311*). Ces farines étaient préparées à partir d'abats de moutons, sans doute eux-mêmes contaminés par un de ces « agents non conventionnels », en l'occurrence celui responsable de la tremblante du mouton ou scrapie. L'étiologie des maladies à prions souligne l'une de leurs caractéristiques les plus inquiétantes : la maladie, toujours mortelle, peut être transmise au sein de la même espèce mais aussi parfois d'une espèce à l'autre. L'agent infectieux semble se propager à la manière d'un virus. Les maladies à prions sont lentes et précédées d'une phase d'incubation pouvant atteindre chez l'homme plusieurs dizaines d'années. L'hypothèse de l'origine virale de la maladie semblait corroborée par l'existence de différentes « souches » de scrapie (c'est-à-dire d'isolats possédant des caractéristiques spécifiques d'infectivité, tant en ce qui concerne le temps de latence que l'évolution de la maladie). Dès 1981 pourtant, Prusiner montrait qu'une protéine était absolument requise pour que la souche soit infectieuse [3]. D'autres études suggéraient fortement que l'agent pathogène pourrait être dépourvu de génome nucléaire [4, 5]. A l'origine, en 1982, Prusiner définit les prions comme étant des « *particules infectieuses protéiniques responsables de la scrapie et des autres encéphalites spongiformes* » [4]. Ces particules étaient ainsi simplement distinguées des virus et des virions, sans préjuger de l'éventuelle présence d'acides nucléiques. Cependant, les nombreuses tentatives visant à mettre en évidence la présence d'un tel composant dans les préparations cellulaires capables de transmettre la maladie, ont toutes échoué à ce jour. Au contraire, une seule et même protéine (nommée

PrP) s'est toujours révélée être le constituant majeur, sinon exclusif, de ces préparations. Les souris déléetées du gène *prnp* sauvage sont résistantes à la scrapie et ne peuvent produire de prions [6]. Finalement, la protéine PrP isolée d'une souche non contaminée acquiert, après incubation avec des isolats de cerveaux de souris infectées par différentes souches de prions, les propriétés de pathogénicité et d'infectivité de la cellule hôte [7]. Ce faisceau d'arguments convergents a conduit à un large consensus autour de l'hypothèse de la « protéine seule » avancée et défendue par Prusiner [4] dès 1991, même s'il demeure encore aujourd'hui un certain nombre de défenseurs de l'hypothèse virale. Dans l'hypothèse de la protéine seule, le prion serait simplement une forme modifiée (notée PrP<sup>Sc</sup>) et pathogène de la protéine native PrP<sup>C</sup>, la forme modifiée étant capable d'induire la conversion PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> par un mécanisme encore mal connu sur lequel nous allons revenir plus loin. Notons que les deux isoformes PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> ont été caractérisées biochimiquement : elles diffèrent tant par leur structure secondaire que par leurs propriétés physicochimiques [8-10]. En particulier, la forme « modifiée » et pathogène PrP<sup>Sc</sup> est résistante à la protéinase K dans des conditions où l'isoforme native PrP<sup>C</sup> est clivée [11, 12]. La transition PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> est le résultat d'un changement conformationnel (et non celui d'une quelconque modification covalente) entre des structures en hélice  $\alpha$  et des structures en feuillets  $\beta$  [9, 13]. De plus, l'isoforme transconformée PrP<sup>Sc</sup> est capable, à la différence de la forme native PrP<sup>C</sup>, de s'agrèger, ce qui conduit à la formation de fibrilles et de plaques amyloïdes décelables sur les coupes histologiques des cerveaux malades [14].

### Un problème de vocabulaire

Ces considérations historiques ont des conséquences sémantiques mais aussi, de manière induite et beaucoup plus pernicieuse, des implications au niveau de notre mode de pensée. L'expression « agent trans-

missible non conventionnel » est ambiguë : ce qui est considéré comme « non conventionnel », c'est plus la nature de l'agent que son mode de transmission. Certes, l'agent est probablement de nature protéique et non virale, ce qui est inhabituel en regard de nos connaissances actuelles. Mais le mode de transmission de la maladie doit lui aussi être qualifié de non conventionnel. Cette évidence apparaîtra de manière frappante lorsque nous aurons examiné les conséquences dynamiques du mécanisme de conversion PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>. Au contraire, l'inquiétude largement partagée autour de la présence de prions dans le culot lymphocytaire de donneurs sains, se comprend dans l'hypothèse d'un mode de contagion identique à celui des virus. D'ailleurs, même les plus ardents partisans de l'hypothèse de la « protéine seule » ont conservé, pour décrire ces maladies, la terminologie de l'hypothèse virale. Ils parlent ainsi de « souches » de scrapie alors qu'il s'agit, dans leur esprit, d'évoquer l'éventuelle existence de conformations différentes PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion. La confusion n'est-elle d'ailleurs pas sciemment entretenue lorsque des auteurs majeurs opposés à la théorie virale n'hésitent pas à parler de réplication des prions [10] ? Nous verrons également que les termes d'infection et de contamination devront être revus dans ce contexte particulier. Précisons au préalable que les limites de l'analyse présentée ici sont celles (mais seulement celles) de la validité de l'hypothèse de la « protéine seule » et de la nature autocatalytique de la transformation PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>.

### Un processus autocatalytique

Il a d'abord été postulé puis ensuite démontré expérimentalement que l'isoforme transconformée et pathogène PrP<sup>Sc</sup> était capable d'induire la conversion PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> de la protéine native. Comment une chaîne polypeptidique peut-elle modifier la conformation d'une autre chaîne ? L'étude du repliement des protéines apporte un premier élément de réponse à la question. On sait en effet que, dans la cellule, la plupart des

protéines acquièrent leur structure tridimensionnelle native grâce à l'assistance d'autres protéines appelées protéines chaperons. Le premier modèle (dit modèle du repliement) qui a été proposé [5] pour expliquer le mécanisme de la conversion  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  était fondé sur une idée de ce type : la protéine native  $\text{PrP}^{\text{C}}$  serait susceptible, dans la cellule, de se déplier au moins partiellement puis, avec l'assistance de l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  déjà présente, de se replier dans la conformation pathogène  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Dans cet esprit, Liautard a suggéré [15] que les prions pourraient être des protéines chaperons mal repliées. Dans le modèle du repliement, l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  jouerait tout à la fois le rôle d'amorce, d'amplificateur et de matrice de la transconformation. Comme il a été reconnu très tôt [5], un tel mécanisme est de nature autocatalytique puisque l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  rétroactive sa propre formation. Un modèle alternatif (dit *modèle de nucléation*) a émergé de la contribution de différents auteurs [14, 16, 17] : ici, plusieurs monomères de l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  seraient susceptibles de s'assembler pour former un noyau. Les formes natives  $\text{PrP}^{\text{C}}$  seraient ensuite capables de venir s'agréger sur ce noyau, un changement de conformation irréversible  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  se produisant au moment de cette agrégation. Là encore, l'étape de formation du noyau qui est l'étape limitante de la réaction conduit à un mécanisme globalement autocatalytique [12, 14, 16, 18]. Ainsi, dans les deux modèles, un processus autocatalytique de transconformation de la protéine native (dont le rôle physiologique est encore inconnu) vers une isoforme ayant des caractéristiques physicochimiques susceptibles de la rendre pathogène, serait à l'origine de cette modification post-traductionnelle très particulière.

### **La protéine $\text{PrP}^{\text{C}}$ est en permanence renouvelée**

Pour Weissmann [12], spécialiste incontesté des prions, l'apparition des maladies sporadiques de ce type résulte du fait que « la conversion  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  est un processus post-traductionnel tardif. La conversion spontanée est natu-

rellement – et heureusement – un événement extrêmement rare ». On retrouve ainsi, de manière sous-jacente, le modèle viral, à ceci près que l'on a remplacé ici la probabilité d'infection par celle de l'occurrence d'un événement spontané de très faible fréquence. Les rares fois où l'événement survient, le processus pathogène serait enclenché – du fait de la nature autocatalytique du mécanisme de transconformation – exactement comme la contamination par un seul exemplaire d'un virus suffit à déclencher une infection. Si l'on suit cette logique, les donneurs sains dont le culot lymphocytaire contient une certaine quantité de prions – rappelons qu'il s'agit d'une majorité des donneurs de sang [19], donc probablement de la majorité des individus de la population, même si les résultats de l'étude citée demanderaient à être confirmés par d'autres auteurs – seraient des malades en sursis, comme le sont les séropositifs asymptomatiques porteurs du virus du SIDA.

En fait, nos cellules ne disposent pas, une fois pour toutes, d'un stock immuable de protéines  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Ces protéines sont en permanence renouvelées, leur vitesse de rotation étant d'ailleurs, en ce cas précis, relativement importante puisque le  $t_{1/2}$  du processus de dégradation de la protéine  $\text{PrP}^{\text{C}}$  est d'environ 5 heures, alors que celui de sa synthèse est de quelques minutes [20, 21]. L'éventualité de la transition  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  ne peut donc se ramener à la probabilité d'occurrence d'un événement rare, c'est-à-dire à un problème statistique de tirage de boules. Il s'agit au contraire, par essence, d'un processus cinétique se déroulant au sein d'un système biologique ouvert. La dynamique nous offre les outils permettant d'analyser un tel système et nous allons voir que les conclusions qu'elle apporte divergent de la vision statique qui prévaut actuellement.

### **États stationnaires multiples**

La notion de multiplicité des états stationnaires est une propriété importante des systèmes dynamiques. A titre d'exemples (parmi de nombreux autres), signalons qu'elle a été

invoquée en biologie pour interpréter la différenciation des réseaux microtubulaires, la discrimination entre cycle lytique et cycle lysogène dans le cas de l'infection d'*E. coli* par le bactériophage *lambda*, le changement de perméabilité des membranes biologiques au cours de l'excitation nerveuse, l'inhibition de la glycolyse en aérobiose (effet Pasteur)... Une analogie devrait permettre de comprendre facilement cette notion fondamentale de la dynamique.

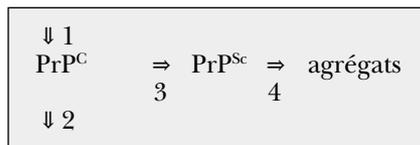
Imaginons qu'un ruisseau charriant branches mortes et autres débris soit, en certains endroits, suffisamment peu profond pour laisser émerger quelques pierres à sa surface. Habituellement, lorsque des branches s'immobilisent fortuitement entre deux pierres, elles sont emportées au fil du courant par les tourbillons dont les forces sont supérieures à la pression que les branches peuvent exercer sur les pierres. Le flux s'écoule ainsi de manière continue. Exceptionnellement, il peut arriver, soit en raison de sa forme particulière, soit parce qu'elle est accompagnée d'autres débris, soit pour d'autres raisons encore, qu'une branche reste immobilisée plus longtemps que les autres entre les pierres et qu'elle permette ainsi à d'autres débris de venir s'accumuler à son contact. La masse de cet enchevêtrement deviendra telle qu'elle engendrera sur les pierres une pression supérieure aux forces de convection des tourbillons. Celles-ci ne pourront plus détruire la construction instable et les alluvions charriées par le ruisseau viendront s'accumuler et grossir le barrage qui deviendra de plus en plus solide. Derrière lui finira par se former une retenue d'eau de laquelle s'échapperont quelques filets de sorte qu'en amont comme en aval, le ruisseau retrouvera son cours, son régime stationnaire. Pour autant, le paysage sera complètement transformé.

Ainsi, d'un événement fortuit peut naître un important bouleversement, l'apparition d'une singularité. Si l'on observe en plan large et fixe le lieu où est apparue cette singularité, comment décririons-nous la situation ? Initialement (avant la formation du lac), d'un côté de la scène (disons à gauche), nous notons l'apparition du

ruisseau. Celui-ci s'écoule en traversant le plan de gauche à droite pour en sortir à l'extrémité droite du cadre. Nous allons définir l'ensemble des éléments se trouvant à l'intérieur de ce cadre comme constituant un système. Ce qui est hors du plan constitue le milieu extérieur (sous entendu à ce système). Au point de vue thermodynamique, nous qualifierons le système de système ouvert parce qu'il échange de la matière (en l'occurrence l'eau du ruisseau) avec le milieu extérieur. Le système est doté de deux éléments lui permettant de communiquer avec l'extérieur : une entrée, à gauche, et une sortie, à droite. Le flux d'entrée, c'est-à-dire la quantité d'eau entrant dans le système par unité de temps, est égal au flux de sortie. Pour le moment, tant que ne se produit pas l'événement fortuit qui va conduire à la formation du lac, ce flux est constant, c'est-à-dire qu'il a la même valeur quel que soit l'instant auquel on le mesure. Un tel régime est dit stationnaire (par rapport au temps). Notons également que nous nous trouvons dans des conditions d'irréversibilité puisqu'il est exclu que le ruisseau puisse remonter son cours. Comment décririons-nous notre système, après la formation du lac ? A vrai dire, de manière fort peu différente en ce qui concerne ses échanges avec le milieu extérieur. Il s'agira toujours d'un régime stationnaire avec, en ce cas précis, la même valeur de flux que dans le cas précédent. En revanche, son état interne (le paysage) sera différent. Ainsi, un événement insignifiant aura provoqué une transition entre deux états stationnaires distincts du système. Dans le cas de la dynamique des prions, les concepts fondamentaux sont là encore ceux de système ouvert, de flux et d'état stationnaire. Nous allons cependant réintroduire la flèche du temps afin d'éliminer l'élément stochastique qui présidait à la naissance de la singularité.

### Schéma cinétique élémentaire

Le schéma cinétique tenant compte de la transconformation et du renouvellement de la protéine PrP<sup>C</sup> peut s'écrire de la manière suivante :



Dans ce schéma, PrP<sup>Sc</sup> représente soit le monomère transconformé (hypothèse du modèle de repliement), soit le noyau multimérique (cas du modèle de nucléation). Dans les deux cas, l'espèce transconformée PrP<sup>Sc</sup> rétroactive la conversion PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>, ce qui confère à l'étape 3 un caractère autocatalytique (la vitesse correspondante est une fonction sigmoïde de la concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>). Nous proposons ci-dessous une manière possible de formaliser ce processus. Les étapes 1 et 2 représentent respectivement les processus de synthèse et de dégradation de la protéine native PrP<sup>C</sup>. Les étapes 2 (dégradation de la forme PrP<sup>C</sup>) et 4 (agrégation de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup>) sont des cinétiques du premier ordre tandis que l'étape 1 peut être assimilée à un processus d'ordre 0, dans la mesure où il a été montré [5] que le taux d'ARN messager de la protéine PrP restait pratiquement constant dans une infection de type scrapie. Notons que la formation d'agrégats constitue ici le seul devenir possible de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> dans la mesure où l'on ne connaît actuellement aucune protéase susceptible d'hydrolyser cette isoforme [5]. Cependant, même s'il en allait autrement (plusieurs évolutions possibles de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup>), le comportement du système serait en tous points identiques à celui que nous allons décrire ici.

### L'étape de conversion PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> : description phénoménologique

Comment la protéine PrP<sup>C</sup> pourrait-elle être à l'origine des maladies à prions ? Dans l'approche réductionniste classique où toute « morphologie » résulterait d'éléments réductibles par analyse, le problème sera scindé en questions plus simples : comment une protéine peut-elle autocatalyser sa propre transformation ? Comment décrire l'évolution temporelle, liée au renouvellement de la protéine, de la concentration cellulaire en isoforme

me PrP<sup>C</sup> ? Pour rendre compte de l'évolution globale du système, on procédera par sommation de modèles locaux. Cependant, la pratique des discontinuités s'insère très mal dans ce schéma analytique (du fait que l'on peut difficilement tenir compte de l'existence de différents niveaux d'organisation). De même que le mouvement de balancier d'une vieille horloge mécanique n'est pas réductible à une propriété particulière d'un seul des éléments constitutifs de son mécanisme, de nouvelles propriétés peuvent être attendues de l'interaction d'éléments métaboliques simples, propriétés non réductibles en propre à un seul de ces éléments.

Dans une approche globale telle que celle retenue ici, nous allons donner une description quantitative mais purement phénoménologique du processus autocatalytique étudié. En d'autres termes, nous allons rechercher, au niveau de cette étape complexe, une formulation qui décrive le comportement du système sans chercher à l'interpréter au niveau moléculaire (nous renoncerons à donner un sens précis aux paramètres qui vont intervenir derrière la fonction modélisée). S'il s'agit d'une perte du point de vue des facteurs de certitude, nous y gagnons par contre en possibilités d'applications, donc en efficacité. Cette démarche s'apparente un peu à celle d'une approche « boîte noire » (en l'occurrence une boîte possédant la propriété d'autocatalyse) en ce sens qu'elle ne fait appel à aucune connaissance des mécanismes moléculaires mis en jeu et conduisant à la propriété recherchée. Elle ne s'y réduit pas complètement car il n'est malgré tout pas interdit de s'interroger, dans un deuxième temps, sur le contenu de cette boîte. Cette approche se trouve particulièrement justifiée dans le cas présent par le fait qu'il est actuellement impossible de trancher objectivement entre le modèle du repliement et le modèle de nucléation. De plus, ces modèles ont essentiellement été décrits de manière qualitative. D'un point de vue purement phénoménologique, la propriété commune des modèles de repliement et de nucléation est leur nature autocatalytique : l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> active, directe-

ment ou indirectement, la conversion  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ . La vitesse  $v_3$  d'un processus autocatalytique d'interconversion d'une forme  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en une isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  peut être décrit par une équation du type :

$$v_3 = [\text{PrP}^{\text{C}}] \frac{a(1 + b[\text{PrP}^{\text{Sc}}]^n)}{1 + c[\text{PrP}^{\text{Sc}}]^n}$$

Cette équation est très proche d'une équation de Hill. Le graphe de la courbe  $v = f[\text{PrP}^{\text{Sc}}]$  est une sigmoïde dont l'ordonnée à l'origine est non nulle. Le même type de graphe aurait été obtenu en utilisant l'équation de la fonction de saturation d'un modèle allostérique type Monod, Wyman et Changeux (exemple classique de processus autocatalytique en cinétique enzymatique) dans lequel la forme normale  $\text{PrP}^{\text{C}}$  serait le substrat et la forme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  serait activateur allostérique.

Cette comparaison a-t-elle un sens au point de vue moléculaire ? Bien que le mécanisme de la transition autocatalytique  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  demeure en grande partie inconnu, il semblerait que le changement conformationnel puisse être catalysé par l'hétérodimère  $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-PrP}^{\text{Sc}}$  [22]. Comme l'a déjà souligné Prusiner [5], on pourrait imaginer que cet hétérodimère existe sous deux conformations R et T ayant des affinités différentes pour la forme  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . On aboutirait ainsi à un modèle proche de celui de Monod, Wyman et Changeux. Cependant, cette analogie a ses limites. En effet, l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  serait ici tout à la fois le produit de la réaction catalysée et en même temps l'un des éléments constitutifs du catalyseur. De sérieuses adaptations s'imposeraient donc avant de pouvoir appliquer le modèle allostérique au comportement de la protéine prion. En l'état actuel de nos connaissances concernant le mécanisme de la transition  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ , de tels développements apparaîtraient certainement trop spéculatifs.

Aussi semble-t-il préférable de s'en tenir à une description purement phénoménologique de l'autocatalyse. En ce qui concerne le modèle de nucléation [14, 16, 17, 22], la seule formulation mathématique existante renvoie

au mécanisme de gélification de la désoxyhémoglobine S [23], système dans lequel les données expérimentales pouvaient s'analyser là aussi soit selon un processus autocatalytique, soit selon un processus de nucléation. Ces deux processus sont donc phénoménologiquement identiques, ce qui légitime l'approche retenue ici et son applicabilité à la description d'un processus de nucléation.

### Coexistence de deux états stationnaires stables

Dans un schéma cinétique tel que celui analysé ici, l'évolution de la concentration des espèces au cours du temps est décrite par le système d'équations différentielles suivant :

$$\frac{d[\text{PrP}^{\text{C}}]}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 \quad (\text{I})$$

$$\frac{d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]}{dt} = v_3 - v_4 \quad (\text{II})$$

où à chaque étape  $i$  est associée une vitesse  $v_i$ .

$v_1$  est la vitesse de synthèse de la protéine  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ,  $v_2$  sa vitesse de dégradation,  $v_3$  sa vitesse de transformation en  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ,  $v_4$  la vitesse de formation d'agrégats à partir de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

Le système d'équations I-II peut être intégré au moyen de méthodes de calcul numérique. Cependant, cette résolution numérique doit être précédée d'une étape d'analyse (dite analyse de stabilité) dont l'objet est d'identifier le type de comportements dynamiques attendus et de cerner l'espace paramétrique dans lequel ils sont censés se produire. Nous choisirons ici la méthode des isoclines qui est une méthode semi-graphique possédant certaines vertus pédagogiques (voir encadré, p. 782).

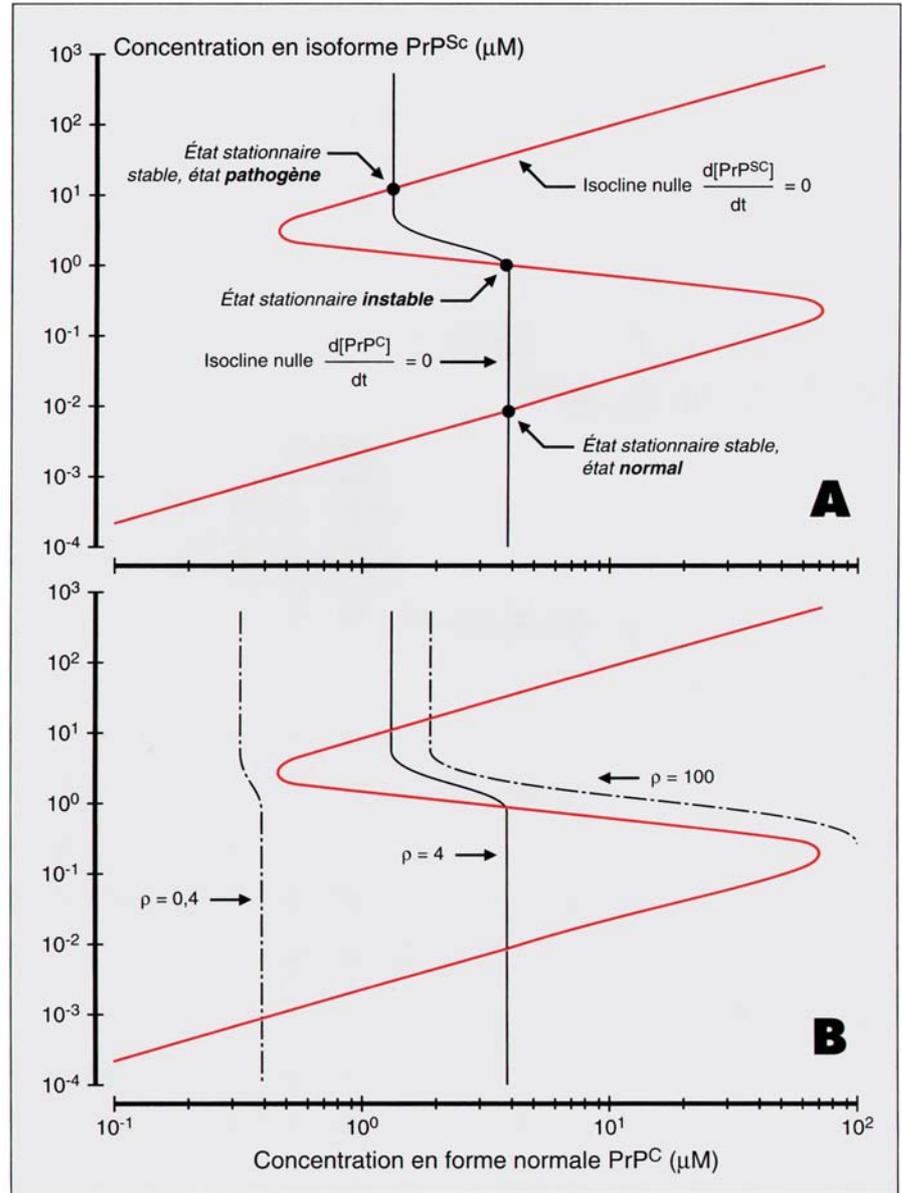
L'analyse de stabilité du système différentiel I-II montre que celui-ci est susceptible de posséder un ou trois états stationnaires, selon la valeur des paramètres cinétiques (figure 1A). Dans ce dernier cas, seuls deux des trois états stationnaires sont stables, l'état intermédiaire étant instable. La

figure 1B montre que parmi les paramètres cinétiques, la vitesse de rotation (qui est fonction de deux constantes de vitesse correspondant l'une à la synthèse, l'autre à la dégradation de l'espèce  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) de la protéine native  $\text{PrP}^{\text{C}}$  joue un rôle crucial quant au nombre d'états stationnaires qu'est susceptible d'adopter le système.

### Genèse des maladies sporadiques

La figure 1B montre qu'une diminution de la vitesse de rotation de la protéine native  $\text{PrP}^{\text{C}}$  engendre, au-delà d'un certain seuil, une transition brutale entre deux états stationnaires stables et distincts du système. L'état d'origine est un état à très basse concentration en isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  de la protéine prion tandis que l'état stationnaire post-transitionnel est au contraire un état à très forte concentration en cette isoforme. Avec les valeurs (arbitrairement choisies) des paramètres cinétiques de la figure 1, la concentration en isoforme pathogène diffère de plus de deux ordres de grandeur entre les deux états stationnaires. Un tel écart est tout à fait compatible avec les différences observées entre les cerveaux de hamster normaux et ceux atteints de scrapie [25]. Comment interpréter ce résultat en terme de genèse spontanée de la maladie ? Dans notre schéma, l'isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  conduit, par une réaction du premier ordre, à la formation d'agrégats, correspondant aux fibrilles et autres plaques amyloïdes décelables sur les préparations histologiques de cerveaux. La transition entre les deux états stationnaires du système se traduira donc par une augmentation considérable de la vitesse de formation des agrégats. Chiffrons cette augmentation en inversant les inconnues afin d'en fixer la signification : imaginons qu'il faille par exemple un an pour que la maladie s'installe lorsque la concentration en isoforme  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  correspond à celle de l'état stationnaire à forte concentration en forme transconformée. Toutes choses égales par ailleurs, il aurait fallu attendre plusieurs centaines d'années pour que le même état pathogène soit atteint dans l'hy-

Figure 1. **États stationnaires multiples et influence de la vitesse de rotation de la protéine PrP<sup>C</sup> sur cette multiplicité dans la dynamique des maladies à prions. A. Les états stationnaires du système se trouvent à l'intersection des deux isoclines nulles.** La stabilité locale de chacun de ces états peut être analysée en déterminant si le système revient (état stable) ou au contraire s'éloigne (état instable) de l'état d'origine, après une perturbation infinitésimale. Dans ce système, deux états stationnaires stables sont susceptibles de coexister. Comme l'indique l'échelle logarithmique des ordonnées, l'un d'entre-eux (état normal) est associé à une très basse concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>, l'autre à une très forte concentration en cette isoforme de la protéine prion (état pathogène). **B. Influence de la valeur de la vitesse de rotation de la protéine normale PrP<sup>C</sup> sur les caractéristiques dynamiques du système.** Le paramètre  $\rho$  représente en effet le rapport des constantes de vitesse des processus de synthèse et de dégradation de l'espèce PrP<sup>C</sup> ( $\rho = k_1/k_2$ ). Sa valeur n'influe ni sur la forme, ni sur la position de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$ . En revanche, sa modification entraîne une altération de la seconde isocline nulle de sorte que les deux courbes deviennent susceptibles d'avoir, soit un seul, soit trois états stationnaires (dans ce cas, seuls deux d'entre-eux sont stables). Pour une forte valeur de la vitesse de rotation ( $\rho=0,4 \mu\text{M}$ ), seul existe l'état stationnaire correspondant à un état physiologique normal. Au contraire, lorsque la vitesse de rotation devient très faible (pour  $\rho=100 \mu\text{M}$  par exemple), le système se trouve obligatoirement dans un état stationnaire à forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>, c'est-à-dire dans un état pathogène.



Les valeurs numériques des constantes  $k_i$  associées à chaque vitesse  $v_i$  dans les équations (I) et (II) sont les suivantes:  $k_1 = 800 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$  (ordre 0),  $k_2 = 200 \text{ s}^{-1}$  et  $k_4 = 50 \text{ s}^{-1}$  (premier ordre). La vitesse  $v_3$  correspond à un processus autocatalytique pouvant être décrit par une équation phénoménologique du type:  $v_3 = k'[\text{PrP}^{\text{C}}]$  où  $k' = a(1 + b[\text{PrP}^{\text{Sc}}]^n) / (1 + c[\text{PrP}^{\text{Sc}}]^n)$ . Dans cette expression, les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $c$  sont des constantes dont les valeurs ont été arbitrairement choisies égales à:  $n = 4$ ,  $a = 0,1$ ,  $b = 200$  et  $c = 0,05$ . Les modifications de la valeur du paramètre  $\rho = k_1/k_2$  ont été obtenues en jouant sur la valeur de la constante de vitesse  $k_2$ .

pothèse où le système n'aurait pas basculé vers l'état stationnaire alternatif. Encore cette valeur n'est-elle que toute théorique et en aucun cas indicative d'une évolution lente mais inexorable vers la maladie! Il est en effet vraisemblable qu'existent, dans

la cellule, des processus de redissolution des agrégats. Même s'ils sont très lents, ces processus peuvent devenir significatifs à l'échelle de temps envisagée, de sorte que l'agrégat ne doit plus alors être considéré comme un produit final d'accumulation. Aussi

convient-il d'appeler «état pathogène» l'état stationnaire à forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup> et «état normal» celui à faible concentration en cette isoforme. Ainsi, la maladie sporadique peut simplement résulter de la diminu-

tion, au-delà d'un certain seuil, de la vitesse de rotation de la protéine native PrP<sup>C</sup> (ou, éventuellement, de la modification de la valeur d'autres paramètres cinétiques du système). A ce stade, trois conclusions essentielles émergent de la prise en compte de la dynamique de ce système :

- Les maladies à prions sporadiques n'ont pas pour origine directe l'accumulation lente et continue dans le cerveau de l'isoforme transconformée PrP<sup>Sc</sup> de la protéine PrP<sup>C</sup>. Elles sont au contraire la conséquence d'un basculement brutal entre deux états stationnaires, cette transition pouvant résulter de la modification, même transitoire mais au-delà d'un certain seuil, d'un paramètre cinétique intervenant dans la dynamique du système.

- Ce n'est pas la transition spontanée PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> qui est un événement rare, mais l'occurrence de la modification supraliminale du paramètre en question.

- Chez un individu sain, la concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion n'a aucune raison d'être nulle. Il suffit qu'elle demeure en deçà du seuil de bifurcation vers l'état pathogène. La présence d'une certaine quantité de cette isoforme dans les culots lymphocytaires de donneurs sains n'apparaît donc nullement comme le signe précoce d'une quelconque maladie, ni comme celui d'un état d'infection asymptomatique.

### Retour à l'état non pathogène et phénomène d'hystérèse

Une fois l'état pathogène installé suite à la modification supraliminale de la vitesse de rotation de la protéine native, quelles sont les conditions de retour à l'état normal? Suffit-il en particulier que ce paramètre retrouve sa valeur initiale pour que le basculement inverse se produise? Les réponses à ces questions sont données par la *figure 2* où le comportement dynamique du système est analysé lorsque la vitesse de rotation de la protéine normale est modifiée de manière continue. Cette figure fait clairement apparaître la nature hystérique de la transition entre les

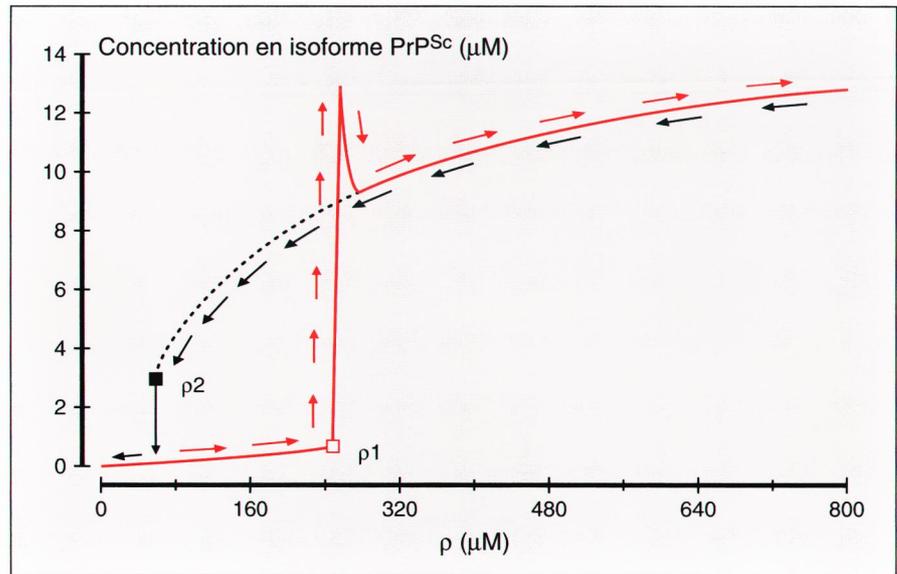
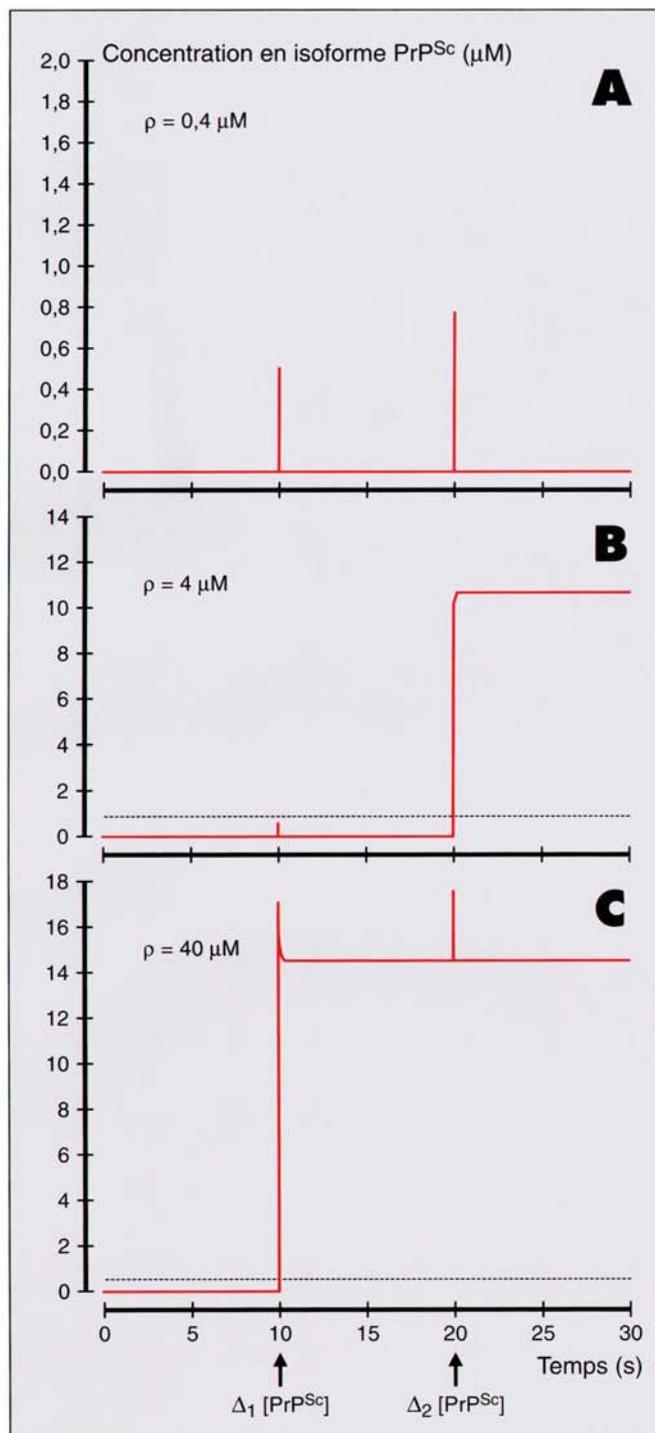


Figure 2. **Transition entre états stationnaires normal et pathogène par suite de la modification de la vitesse de rotation de la protéine normale PrP<sup>C</sup>. Nature hystérique de cette transition.** Le système se trouve initialement dans un état stationnaire normal (faible concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>); on suppose que la vitesse de dégradation  $k_2$  de la protéine PrP<sup>C</sup> diminue de manière continue (augmentation du paramètre  $\rho = k_1/k_2$ , flèches rouges). Tant que l'état stationnaire demeure sur la branche de stabilité inférieure de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$  correspondante (voir figure 1), la concentration stationnaire en isoforme PrP<sup>Sc</sup> est légèrement réajustée, en accord avec la trajectoire des solutions du système d'équations différentielles I-II. Lorsque la valeur du paramètre  $\rho$  excède celle du seuil  $\rho_1$  (ce seuil correspond au changement de signe de la pente de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$ ), le système saute sur la branche supérieure de stabilité de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$ . En conséquence, une augmentation brutale et soudaine de la concentration stationnaire en isoforme PrP<sup>Sc</sup> est observée. Si, partant d'un état stationnaire pathogène, on suppose maintenant que la valeur du paramètre  $\rho$  diminue de manière continue (flèches noires), le système parcourt la branche supérieure de stabilité de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$  jusqu'à ce que la pente de cette isocline change de signe (figure 1). Durant cette phase, la concentration stationnaire en isoforme PrP<sup>Sc</sup> est légèrement réajustée. Lorsque la valeur du paramètre  $\rho$  devient inférieure à celle du seuil  $\rho_2$ , une transition brutale vers la branche inférieure de stabilité est observée (retour vers l'état normal). Le seuil de transition n'est donc pas le même selon que la vitesse de rotation de la protéine normale augmente ou diminue, c'est-à-dire selon que l'on observe la transition état normal → état pathogène ou bien la transition inverse état pathogène → état normal. Une tel processus est qualifié d'hystérétique. Les valeurs numériques des constantes et paramètres choisies pour le tracé de la figure sont les suivantes:  $k_1 = 800 \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $k_2 = 50 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 0,1$ ,  $b = 2$  et  $c = 0,05$ . Le choix d'un jeu de valeurs différentes pour les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $c$  de celui choisi à la figure 1 témoigne simplement du fait que le comportement bi-stable est observé dans une large gamme de valeurs, et non de manière critique.

deux états stationnaires alternatifs du système: la transition ne se produit pas pour la même valeur seuil de la vitesse de rotation selon que celle-ci varie de manière croissante ou décroissante. En conséquence, si la vitesse de rotation diminue en deçà d'un seuil de sorte que le système bascule dans l'état pathogène, il sera

nécessaire que cette vitesse remonte au niveau d'un autre seuil supérieur à la valeur du premier pour que l'on assiste au basculement inverse correspondant au retour vers un état non pathogène (transition vers la branche des états stationnaires à faible concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>).

Figure 3. **Réponse de trois cellules non contaminées mais se trouvant dans un état physiologique légèrement différent à deux conditions distinctes d'infection par l'isoforme PrP<sup>Sc</sup>.** Les conditions d'infection correspondent à deux ajouts de concentrations distinctes d'isoforme PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion ( $\Delta 1[\text{PrP}^{\text{Sc}}] = 0,5 \mu\text{M}$  et  $\Delta 2[\text{PrP}^{\text{Sc}}] = 0,8 \mu\text{M}$ ). Les 3 cellules (A, B et C) sont supposées se trouver initialement dans un état stationnaire normal (à faible concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>), mais posséder une vitesse de rotation de la protéine PrP<sup>C</sup> (paramètre  $\rho$ ) légèrement différente. Cela signifie que l'état stationnaire relatif à chacune de ces cellules se trouve à une position distincte sur la branche de stabilité inférieure de l'isocline nulle  $d[\text{PrP}^{\text{Sc}}]/dt = 0$ . Dans chacun des cas, la ligne en pointillés dénote le seuil de transition entre états stationnaires. **A.** les deux perturbations sont éliminées (comme le serait toute autre perturbation, quelle que soit son amplitude) car pour cette valeur de la vitesse de rotation de la protéine ( $\rho = 0,4 \mu\text{M}$ ), le système ne possède qu'un et un seul état stationnaire, qui est l'état non pathogène (voir figure 1). **B.** Pour la cellule dont la protéine PrP<sup>C</sup> possède une vitesse de rotation intermédiaire ( $\rho = 4 \mu\text{M}$ ), la perturbation  $\Delta 1[\text{PrP}^{\text{Sc}}]$  est infraliminaires et est éliminée. Au contraire, la perturbation  $\Delta 2[\text{PrP}^{\text{Sc}}]$  est supérieure au seuil de transition. Elle est donc amplifiée et provoque le basculement de la cellule vers un état stationnaire à forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup> (état pathogène), la cellule devenant donc « infectée ». **C.** Dans le cas de la troisième cellule ( $\rho = 40 \mu\text{M}$ ), la première perturbation  $\Delta 1[\text{PrP}^{\text{Sc}}]$  suffit à provoquer le basculement vers l'état pathogène. Dans ce cas, la seconde perturbation  $\Delta 2[\text{PrP}^{\text{Sc}}]$  est légèrement amplifiée avant d'être quasi-instantanément éliminée, le système demeurant naturellement dans l'état pathogène (forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>) après le passage de la perturbation (mêmes valeurs des paramètres  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $k_1$  et  $k_4$  que dans la figure 1).



Le caractère hystérique de la transition entre états normal et pathogène rend peu probable le retour spontané du système vers un état normal, suite au déclenchement de la maladie par une altération constitutive de la vitesse de rotation de la protéine native. Le mé-

canisme de seuil a des conséquences importantes: les fluctuations infraliminaires de la vitesse de rotation seront toutes éliminées, quelles que soient leur durée et leur fréquence. En revanche, une fluctuation supraliminaires, même très transitoire, de cette vitesse

suffira à provoquer le basculement dans l'hypothèse où la valeur initiale de la vitesse est inférieure à celle du seuil de la transition inverse: le système demeurera en effet, dans l'état pathogène, même après disparition de la fluctuation.

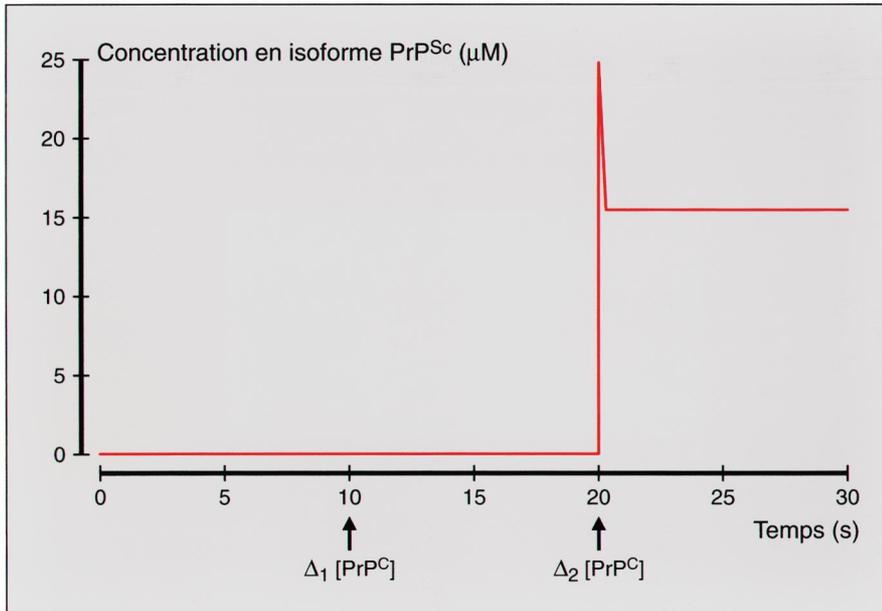


Figure 4. **Transition vers l'état pathogène induite par l'isoforme normale PrP<sup>C</sup>.** La cellule se trouve initialement dans un état stationnaire normal (à faible concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>). Elle est soumise, à  $t = 10$  s puis à  $t = 20$  s, à deux ajouts de concentrations distinctes de l'isoforme normale PrP<sup>C</sup> de la protéine prion ( $\Delta_1[\text{PrP}^C] = 85 \mu\text{M}$  et  $\Delta_2[\text{PrP}^C] = 95 \mu\text{M}$ ). La perturbation  $\Delta_1[\text{PrP}^C]$  est infraliminaires et est éliminée. Au contraire, la perturbation  $\Delta_2[\text{PrP}^C]$  provoque le basculement de la cellule vers un état stationnaire à forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup> (état pathogène), la cellule devenant donc « infectée » ( $\rho = 40 \mu\text{M}$  et mêmes valeurs des paramètres  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $k_1$  et  $k_4$  que dans la figure 1).

### Contamination et infection : une acception très particulière

La notion de seuil se retrouve également lorsque l'on analyse les conditions de contamination d'une cellule saine par une « souche » de prions. Nous allons considérer la réponse de trois cellules saines à l'ajout de deux concentrations différentes  $\Delta_1[\text{PrP}^C]$  et  $\Delta_2[\text{PrP}^C]$  de la forme pathogène de la protéine prion. Avant ces ajouts, les cellules se trouvent toutes trois dans un état physiologique non pathogène, mais la vitesse de rotation de la protéine prion PrP<sup>C</sup> diffère légèrement d'une cellule à l'autre. En conséquence, leurs seuils de transition sont distincts. Pour les raisons indiquées précédemment, l'état final du système dépendra, outre de son état initial, de l'amplitude des perturbations. En revanche, leur durée sera sans influence sur le comportement dynamique. En conséquence,

bien que nous allons procéder à une analyse de l'évolution temporelle du système, il est indifférent de considérer des perturbations de nature pulsatile ou correspondant au contraire à une longue incubation en présence de l'agent « infectieux ».

Comme le montre la figure 3, lorsque l'amplitude de la perturbation ne dépasse pas le seuil de transition, le système retourne spontanément vers son état stationnaire initial non pathogène (perturbation  $\Delta_1$  sur la figure 3B). Au contraire, lorsque la perturbation est supraliminaires (perturbation  $\Delta_2$  sur la figure 3B ou  $\Delta_1$  sur la figure 3C), le système bascule vers l'état stationnaire à forte concentration de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup>. Au niveau macroscopique, nous observerons alors une brutale (dans le modèle simplifié analysé ici) et considérable amplification du *pulse* initial en protéine pathogène PrP<sup>Sc</sup> et la cellule sera contaminée (elle reste dans l'état pathogène une fois la perturbation éliminée).

### ANALYSE DE STABILITÉ PAR LA MÉTHODE DES ISOCLINES

Par définition, l'état stationnaire correspond à des conditions où les concentrations des espèces intermédiaires ne varient plus au cours du temps. Dans le cas du système différentiel I-II, la condition énoncée s'écrit formellement :  $d[\text{PrP}^C]/dt = 0$  et  $d[\text{PrP}^Sc]/dt = 0$ , c'est-à-dire que les concentrations  $[\text{PrP}^C]$  et  $[\text{PrP}^Sc]$  sont telles que les équations différentielles I et II s'annulent simultanément. La méthode des isoclines consiste à tracer dans le plan du phase (dont les axes figurent les deux variables  $[\text{PrP}^C]$  et  $[\text{PrP}^Sc]$ ) et pour un jeu de paramètres donné, la courbe correspondant aux couples de points  $([\text{PrP}^C], [\text{PrP}^Sc])$  pour lesquels l'une des deux équations différentielles s'annule. Cette courbe est appelée courbe d'état quasi-stationnaire ou isocline nulle. Il existe naturellement une isocline nulle pour chacune des deux équations. En accord avec les conditions définies plus haut, l'état stationnaire se trouve à l'intersection de ces deux isoclines (conditions d'annulation simultanée des deux équations différentielles).

Le nombre d'états stationnaires différents que le système est susceptible d'adopter pour un jeu de paramètres donné sera déterminé par le nombre d'intersections existant entre les deux isoclines nulles. Leur stabilité peut être évaluée en étudiant l'effet d'une perturbation infinitésimale produite alors que le système se trouve dans l'état en question [24]. Si, suite à la perturbation, le système revient vers l'état stationnaire, celui-ci est stable; s'il s'en écarte, il est instable. Dans le cas du système d'équations I-II, l'isocline  $d[\text{PrP}^Sc]/dt = 0$  possède une forme en S caractéristique. On peut montrer que tout état stationnaire se trouvant sur la branche de pente négative est instable, alors que les deux branches de pente positive correspondent aux branches de stabilité.

Cependant, l'état initial du système a également une influence prépondérante sur son comportement dynamique. Lorsque la vitesse de rotation de la protéine PrP<sup>C</sup> est si élevée que seul l'état stationnaire non pathogène

ne existe (voir *figure 1*), toute addition de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> est éliminée, quelle que soit sa concentration (*figure 3A*). Une cellule se trouvant dans un tel état physiologique ne peut donc en aucun cas être infectée.

### **Des temps d'incubation particulièrement longs**

Les simulations de la *figure 3* montrent que la transition entre les états stationnaires alternatifs est, dans notre modèle, quasi-immédiate. Au contraire, les données expérimentales soulignent les temps exceptionnellement longs d'incubation de la maladie (de quelques jours chez le rat à plusieurs années chez l'homme).

Cette observation n'est pour autant nullement contradictoire avec notre modèle et témoigne seulement de son extrême simplicité. Nous ne nous sommes en effet intéressés, jusqu'à présent, qu'aux conditions d'existence d'états stationnaires multiples ainsi qu'à celles présidant aux possibilités de transitions entre ces états stationnaires. Le problème maintenant posé est celui de la vitesse à laquelle se produisent ces transitions. La prise en compte de cette caractéristique ne présente pas de difficulté conceptuelle mais nécessite d'aller plus avant dans les hypothèses concernant le mécanisme de la transition PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>. Nous avons jusqu'à présent modélisé le caractère autocatalytique de cette transition mais nullement le fait qu'il s'agisse d'une transition lente. Nous avons vu précédemment que notre description phénoménologique de la transformation PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> pouvait s'assimiler à celle d'un processus allostérique catalysé par l'hétérodimère PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>. Dans l'hypothèse où la transition conformationnelle T → R de cet hétérodimère serait supposée lente, le schéma cinétique résultant correspondrait à un système à trois variables dont l'analyse mathématique serait sensiblement plus complexe que celle réalisée dans le cas de notre système à deux variables (la méthode des isoclines n'est en particulier plus applicable). Nous n'entrons pas ici dans ces arcanes, d'autant qu'un tel modèle nous écarterait

sensiblement de notre souci de nous en tenir à une description essentiellement phénoménologique des processus impliqués. Néanmoins, il est important de souligner qu'un tel système demeurerait un système multistable, le basculement entre états stationnaires alternatifs correspondant cette fois à une transition lente. De plus, les temps d'incubation étant globalement définis comme étant le nombre de jours séparant la contamination de l'apparition de dysfonctionnements neurologiques, on peut également imaginer qu'il existe un certain délai entre l'élévation de la concentration intracellulaire en isoforme pathogène de la protéine prion et l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie.

### **La protéine normale pourrait aussi se révéler infectieuse**

Le rôle fondamental de la composante dynamique dans la genèse des maladies à prions conduit à poser une question qui, à l'évidence, paraîtrait saugrenue à quiconque penserait pouvoir comprendre ces maladies à partir des seules données moléculaires : l'isoforme normale PrP<sup>C</sup> de la protéine prion ne peut-elle également, dans certaines conditions, se révéler infectieuse ? La dynamique montre qu'une réponse assurément positive doit être donnée à cette question en apparence paradoxale.

En fait, dans tout système multistable, la perturbation de n'importe laquelle des variables est susceptible de provoquer la transition entre états stationnaires alternatifs. Les variables étant ici les concentrations en isoforme normale PrP<sup>C</sup> et pathogène PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion, il n'est donc pas étonnant d'aboutir ici à une telle conclusion. Ce comportement est illustré par la *figure 4* où une cellule se trouvant dans un état physiologique normal est soumise à l'ajout de différents *pulses* de protéine normale PrP<sup>C</sup>. La première addition qui est inférieure au seuil d'excitation, est éliminée par la cellule qui revient rapidement à son état stationnaire non pathogène. Au contraire, le second ajout, qui est supraliminaire, pro-

voque la transition du système vers l'état pathogène à forte concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup>. Là encore, la vitesse à laquelle se produira le basculement pourra dépendre de la cinétique propre à la transition PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup>.

Cette prévision, à l'évidence importante pour la définition des risques de contamination, devra être vérifiée expérimentalement, même si pour l'heure nous ne disposons pas des données nécessaires (position et forme exactes) pour le tracé dans le plan de phase des isoclines nulles expérimentales (nous ne connaissons pas l'ordre de grandeur de la perturbation en PrP<sup>C</sup> qu'il serait nécessaire d'appliquer pour que le système bascule vers l'état pathogène).

### **Conclusion**

Le paradoxe concernant les risques infectieux liés à l'ajout de protéine non pathogène n'est bien sûr qu'apparent, nos résultats révélant au contraire la nécessaire complémentarité entre les approches moléculaire et dynamique. Les études moléculaires permettent d'identifier et de caractériser les éléments constitutifs d'un système, ainsi que leur mécanisme élémentaire d'interconversion (et plus particulièrement la composante cinétique de ces mécanismes). Ces éléments doivent être connus, au moins en partie, avant de pouvoir entreprendre l'étude dynamique dont l'objet est d'atteindre à la description du comportement global du système, comportement qui dépend de la manière dont ses éléments constitutifs, dotés de propriétés moléculaires particulières, entrent en interaction. Des propriétés macroscopiques nouvelles émergent en effet de ces interactions, propriétés qui ne peuvent se réduire à la somme de celles des éléments isolés. Ainsi, ce n'est ni l'existence d'une vitesse de rotation élevée de la protéine normale PrP<sup>C</sup>, ni le caractère autocatalytique de la transition conformationnelle PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> qui confère au système ses propriétés de bistabilité. Celles-ci sont la conséquence du fait que la protéine normale PrP<sup>C</sup> est une protéine à forte vitesse de rotation et, en même temps, le point d'ancrage d'une voie méta-

bolique autoréglée conduisant à une isoforme à caractère pathogène. L'étude dynamique montre que des quantités supraliminaires de l'isoforme PrP<sup>Sc</sup> mais aussi de la forme normale PrP<sup>C</sup> de la protéine prion, provoquent le basculement du système vers l'état pathogène. A l'inverse, les perturbations, qu'elles soient d'origine endogène ou externe, sont spontanément éliminées lorsqu'elles sont d'amplitude inférieure au seuil de la transition entre états stationnaires. Les caractéristiques d'une infection de type prion ne se comparent donc en rien à celles d'une infection virale. D'autre part, l'origine des maladies sporadiques n'est pas la lente accumulation dans le cerveau de l'isoforme modifiée PrP<sup>Sc</sup>. Cette accumulation n'est que la conséquence et non la cause de la maladie. La cause primaire pourrait être une modification d'un des paramètres cinétiques gouvernant la dynamique de la protéine PrP<sup>C</sup>. Nous avons en particulier montré que la diminution constitutive de sa vitesse de rotation pouvait provoquer la transition vers l'état pathogène. On peut imaginer que certaines mutations ponctuelles dans le gène *prnp* codant pour la protéine PrP seraient susceptibles de conduire à une protéine altérée dont la vitesse de rotation serait modifiée. Notons par exemple [5] que des croisements d'animaux transgéniques à long et court temps d'incubation donnent, en F1, des résultats paradoxaux (temps d'incubation courts alors que les temps longs sont dominants). On ne sait malheureusement pas, pour l'instant, si ces observations sont le résultat d'une surexpression de la protéine PrP<sup>C</sup>, d'une modification de son temps de rotation, ou d'une autre cause encore. Bien qu'il existe un certain nombre d'expériences réalisées sur des souris transgéniques suggérant que le taux de protéine normale pourrait influencer sur la vitesse d'apparition de la maladie [6, 22], leurs résultats ne peuvent s'interpréter directement en termes de surexpression de la protéine PrP<sup>C</sup>, du fait de l'existence de barrières inter-espèces. Ainsi l'introduction de transgènes multiples PrP de hamster dans des souris dont les deux allèles du gène *PrP* ont été invalidés rendent,

certes, les souris susceptibles à la protéine prion de hamster mais beaucoup moins qu'à la protéine prion de souris [6]. Ces résultats suggèrent la nécessité d'une relation d'homotypie entre la protéine prion transfectée et la protéine native pour une propagation optimale de l'infection et le développement de la pathologie. Finalement, la présence d'une certaine quantité de l'isoforme transformée PrP<sup>Sc</sup> dans un culot lymphocytaire ne doit pas nécessairement apparaître comme le signe précoce du déclenchement d'une maladie à prions, ni comme celui d'un état d'infection asymptomatique : chez un individu sain, la concentration en isoforme PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion n'a aucune raison d'être nulle ; elle doit seulement demeurer en deçà du seuil de bifurcation vers l'état pathogène. Ces résultats ont des implications directes en ce qui concerne le choix des stratégies thérapeutiques à mettre en œuvre. Jusqu'à présent, ce choix s'orientait principalement [14] vers la recherche de composés susceptibles d'empêcher l'isoforme transconformée PrP<sup>Sc</sup> de la protéine prion de former des agrégats. Dans la limite du bien-fondé de l'hypothèse de la « protéine seule », nos résultats montrent qu'il devrait être possible d'intervenir beaucoup plus en amont dans le processus pathologique global de ces maladies. A titre préventif, l'idéal consisterait en effet à pouvoir prévenir tout risque de transition entre états stationnaires normal et pathogène, donc de pouvoir placer les cellules dans des conditions dynamiques telles que seul l'état stationnaire normal existe. Au niveau curatif, la stratégie consisterait à mettre les cellules dans des conditions physiologiques telles qu'elles déclenchent la transition inverse entre état pathologique et état normal. En accord avec nos résultats, des composés susceptibles d'accroître la vitesse de rotation de l'isoforme normale de la protéine prion pourraient ainsi s'inscrire comme candidats de choix dans une perspective tant préventive que curative. Notons que les prédictions ainsi offertes par cette analyse vont plus loin que celles résultant de l'observation expérimentale selon laquelle des animaux transgéniques dé-

pourvus de la protéine PrP sont « immuns » contre la maladie. Cette observation expérimentale suggère en effet que la prévention de la maladie pourrait être attendue d'une diminution du taux de la protéine normale PrP<sup>C</sup>. En accord avec cette observation, le modèle montre que toute diminution du taux stationnaire de protéine PrP<sup>C</sup> chez un sujet sain éloignera celui-ci de la zone de transition « dangereuse ». A la limite, l'absence de protéine PrP supprimera toute dynamique (il s'agit là d'une trivialité) ! Cependant, le taux de protéine est une chose, sa vitesse de rotation en est une autre. Le présent modèle suggère de chercher à augmenter la vitesse de rotation de la protéine. Rien n'indique en effet que ce soient nécessairement les mêmes paramètres (ou les mêmes thérapies) qui régissent la vitesse de rotation ou le taux intracellulaire de la protéine incriminée.

La nature très particulière du mécanisme des maladies à prions pourrait conduire à une remise en question de nos conceptions actuelles du fonctionnement normal de la cellule. Fondamentalement, l'origine de ces maladies relève en effet d'un mécanisme d'héritage structural au niveau moléculaire, une protéine transmettant directement son information conformationnelle à une autre protéine, sans intervention du génome [26, 27]. L'insuffisance de la doctrine *Omnis forma ex ADN* ayant déjà été soulignée par ailleurs [28], on peut se demander si un tel processus représente une simple curiosité atypique des maladies à prions ou bien s'il ne pourrait constituer, pour d'autres protéines, un mécanisme normal d'acquisition de leur structure fonctionnelle. Plus largement, un mécanisme de ce type pourrait s'avérer comme le chaînon manquant dans l'interprétation, au niveau moléculaire, des phénomènes d'héritage structural observés de longue date au niveau cellulaire, particulièrement chez les ciliés [29, 30] ■

## RÉFÉRENCES

1. Gluckman JC. Le risque zéro est-il concevable en pratique médicale? *médecine/sciences* 1995; 11: 1160-1.
2. Billette de Villemeur T. Maladie de Creutzfeldt-Jakob: l'intrication du gène de la PrP, d'un agent non conventionnel et de l'hormone de croissance. *médecine/sciences* 1992; 8: 584-5.
3. Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR. Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6675-9.
4. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
5. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-22.
6. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993; 73: 1339-47.
7. Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995; 375: 698-700.
8. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 1993; 32: 1991-2002.
9. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10962-6.
10. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994; 264: 530-1.
11. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2310-4.
12. Weissmann C. Yielding under the strain. *Nature* 1995; 375: 628-9.
13. Nguyen J, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry* 1995; 34: 4186-92.
14. Jarret JT, Lansbury PT. Seeding «one-dimensional crystallization» of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993; 73: 1055-8.
15. Liautard J. Les prions sont-ils des protéines chaperonnes mal repliées? *médecine/sciences* 1992; 8: 55-7.
16. Gajdusek DC. Transmissible and non-transmissible amyloidoses: autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to beta-pleated sheet configurations. *J Neuroimmun* 1988; 20: 95-110.
17. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 1994; 370: 471-4.
18. Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 1990; 250: 1587-90.
19. 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.
20. Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 1990; 110: 743-52.
21. Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Caughey B. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3923-7.
22. Come JH, Fraser PE, Lansbury PT. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5959-63.
23. Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA. Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4864-8.
24. Laurent M, Fleury A. A dynamical model for post-translational modifications of microtubules. *FEBS Lett* 1993; 336: 1-7.
25. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Miranda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D, DeArmond SJ. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990; 63: 673-86.
26. Pagès J. Encéphalopathies spongiformes et prions, liaison fatale? *médecine/sciences* 1993; 9: 1404-8.
27. Bussard A. La découverte des prions vaudra-t-elle révolutionner la biologie moléculaire? *médecine/sciences* 1993; 9: 1409-11.
28. Laurent M. Pour une approche dynamique du fonctionnement cellulaire. *médecine/sciences* 1995; 11: 119-23.
29. Beisson J, Sonneborn TM. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 53: 275-82.
30. Fleury A., Laurent M. Transmission of surface pattern through a dedifferentiated stage in the ciliate *Paraurostyla*. Evidence from the analysis of microtubule and basal body deployment. *J Euk Microbiol* 1994; 41: 276-91.

## M. Laurent

Directeur de recherche au Cnrs, Service d'Imagerie Cellulaire, Bâtiment 441, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

## TIRÉS À PART

M. Laurent.

## Summary

### Dynamic component in prion diseases as a result of the «protein only» hypothesis

Prion diseases such as scrapie or Creutzfeldt-Jakob disease could result from the conformational change of a normal isoform of a prion protein (PrP<sup>C</sup>) to a protease-resistant, pathogenic form called PrP<sup>Sc</sup>. The conversion is thought to rest only on an autocatalytic process requiring the presence of preexisting PrP<sup>Sc</sup> («protein only» hypothesis). Here we report the kinetic analysis of the dynamics of this process (which takes into account the turnover rate of the normal isoform of the protein) and show that the system exhibits bi-stability properties. We show how the characteristics of prion infection differ from those of virus replication, healthy organisms being able to eliminate spontaneously infrathreshold amounts of foreign PrP<sup>Sc</sup> protein. Under controlled conditions, addition of suprathreshold quantities of PrP<sup>Sc</sup> or also, paradoxically, of the normal PrP<sup>C</sup> protein, provokes a transition towards the pathogenic steady-state. We show that the research of compounds that would act on the turnover rate of the normal PrP<sup>C</sup> protein, appears as a possible therapeutic strategy against prion diseases.