

Assemblages d'alpha-synucléine

Existe-t-il différentes souches ?

Dorian Sargent, Thierry Baron

Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES),
Laboratoire de Lyon, unité « Maladies neuro-dégénératives »,
31, avenue Tony Garnier, 69364 Lyon Cedex 07, France.
dorian.sargent@anses.fr
thierry.baron@anses.fr



► De nombreuses études ont suggéré qu'il existait des ressemblances entre les maladies à prions, comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob, et d'autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Au cours de la maladie de Parkinson, l'alpha-synucléine, une protéine exprimée principalement dans le tissu nerveux, a la particularité de s'agréger, formant des lésions appelées *corps de Lewy* et *neurites de Lewy*, caractéristiques des synucléinopathies¹. Braak et son équipe ont réalisé les premières observations montrant la présence précoce de ces agrégats dans le bulbe olfactif et dans les plexus nerveux intestinaux des patients parkinsoniens. Ces signes pathologiques précéderaient l'invasion, *via* le nerf vague, du système nerveux central, en particulier de la substance noire dont l'atteinte est à l'origine des troubles moteurs caractéristiques de la maladie de Parkinson [1, 2]. En 2008, une étude a montré la présence de corps de Lewy au sein de neurones mésencéphaliques fœtaux greffés, de nombreuses années auparavant, dans des cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson [3, 4] (→).

L'agrégation de l'alpha-synucléine serait donc capable de se propager des neurones de l'hôte la présentant, à ceux du greffon. Plus récemment,

(→) Voir la Nouvelle de F. Lelan, *m/s* n° 1, janvier 2009, page 15

plusieurs équipes ont suggéré, dans des modèles expérimentaux *in vivo*, que la propagation de l'agrégation de l'alpha-synucléine se réaliserait selon un mécanisme qui ressemblerait à celui de la protéine prion, notamment dans un modèle transgénique murin de synucléinopathie développant une symptomatologie sévère [5-7].

Dans ce contexte, l'une des questions que se posent actuellement les chercheurs est la suivante : tout comme il existe des « souches » dans les maladies à prion, existe-t-il également des « souches » dans les pathologies associées à l'alpha-synucléine ? Les souches dans les maladies à prion se définissent, dans un hôte donné, (1) par la durée d'incubation de la maladie, après un *challenge* expérimental (administration) réalisé par injection intracérébrale d'homogénat de cerveau d'animal atteint d'une maladie à prion, (2) par la répartition des lésions induites au sein du système nerveux, mais aussi (3) par les caractéristiques moléculaires de la protéine prion accumulée dans le cerveau sous une forme pathologique, notamment sa résistance à la protéinase K². Il existe plusieurs synucléinopathies chez l'homme, comme l'atrophie multi-systématisée, la démence à corps de Lewy et la maladie de Parkinson. Ces pathologies se différencient

notamment par la nature et la localisation des lésions dans le cerveau des patients. Ces lésions sont ainsi détectées dans la substance noire dans la maladie de Parkinson, tandis qu'elles sont davantage localisées dans le cortex cérébral chez les patients atteints de démence à corps de Lewy. Dans l'atrophie multi-systématisée, les inclusions d'alpha-synucléine ciblent les oligodendrocytes, alors que ce sont les neurones qui sont atteints dans la maladie de Parkinson ou la démence à corps de Lewy. Cette diversité neuropathologique conduit ainsi à s'interroger sur l'existence possible de souches dans ces maladies.

L'alpha-synucléine humaine d'origine recombinante peut exister sous forme de fibres ou de rubans

En 2013, l'équipe de Ronald Melki est parvenue à produire expérimentalement deux types de structures d'alpha-synucléine à partir d'alpha-synucléine humaine recombinante sauvage : l'une en forme de rubans et l'autre en forme de fibres [8]. Ces deux formes structurales ont été différenciées par un ensemble de propriétés, incluant leurs caractéristiques physiques (temps de polymérisation, diffraction aux rayons X, etc.), leur résistance à la dégradation par la protéinase K, leur faculté à se lier aux membranes et à rentrer dans les cellules, et leur toxicité en culture cellulaire. Mais jusqu'à présent, aucune étude n'avait été publiée prouvant que ces différentes formes

² La protéinase K est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique.

¹ Pathologies impliquant l'alpha-synucléine

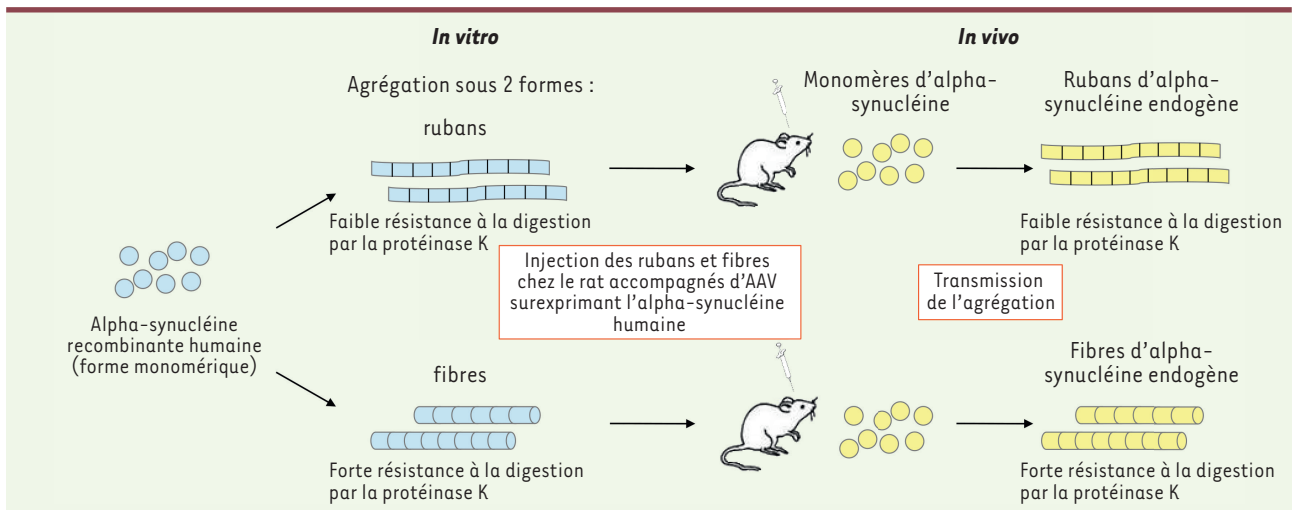


Figure 1. Transmission d'une empreinte moléculaire d'alpha-synucléine chez le rat. Transmission d'une empreinte moléculaire par l'injection chez le rat de différents assemblages d'alpha-synucléine recombinante humaine fabriqués *in vitro*, dans un contexte de surexpression de l'alpha-synucléine humaine véhiculée par des vecteurs viraux adéno-associés (AAV). Le maintien *in vivo* des caractéristiques différentielles de résistance à la protéinase K suggère la transmission des conformations distinctes des assemblages inoculés à l'alpha-synucléine endogène.

d'alpha-synucléine étaient capables de se comporter différemment *in vivo*, comme le feraient différentes souches de prion.

Une nouvelle approche expérimentale : influence de la forme et de la surexpression de l'alpha-synucléine

L'équipe de Baekelandt, en collaboration avec l'équipe de Ronald Melki, a étudié *in vivo* chez le rat, ces différents assemblages d'alpha-synucléine, après avoir inoculé au niveau de la substance noire l'alpha-synucléine recombinante humaine sous forme d'oligomères, de fibres ou de rubans [9]. Ces inoculations ont été réalisées en présence ou non d'une surexpression de l'alpha-synucléine humaine réalisée à l'aide d'un virus adéno-associé (AAV) [13] (Figure 1) (→).

(→) Voir la Synthèse de A. Rossi et A. Salvetti, *m/s* n° 2, février 2016, page 167

En effet, dans les pathologies associées à des anomalies de repliement protéique, il est intéressant d'étudier l'effet d'une surexpression de la protéine impliquée, voire de mutations qu'elle peut subir. Ainsi, dans la maladie de Parkinson, certains patients ont leur gène codant l'alpha-synucléine dupliqué

[10], voire tripliqué [11] ; la surexpression de la protéine, qui en résulte, est associée à la survenue de la maladie. D'autres anomalies génétiques, chez l'homme, peuvent être présentes et favoriser la maladie, notamment des mutations ponctuelles touchant la protéine. Les effets de telles anomalies peuvent être étudiés dans des modèles animaux transgéniques exprimant des gènes altérés. Une autre approche est l'utilisation des vecteurs viraux. Ils permettent une surexpression locale du transgène chez l'animal. L'équipe de Baekelandt a ainsi effectué des travaux sur la maladie de Parkinson en injectant, dans la substance noire de rats, des AAV permettant de surexprimer l'alpha-synucléine humaine normale avec pour conséquence un dysfonctionnement dopaminergique progressif [9].

Différences pathologiques et moléculaires observées *in vivo* avec les différents assemblages d'alpha-synucléine recombinante

La première expérience de l'étude de l'équipe de Baekelandt [9] montre, par tomographie, que les oligomères se disséminent plus aisément, une fois

injectés dans la substance noire de rats, que les fibres et les rubans. Cependant, seuls les fibres et les rubans induisent, 4 mois après injection, l'apparition d'inclusions rappelant les corps et les neurites de Lewy au sein de la substance noire, et ceci de façon beaucoup plus importante pour les rubans. L'agrégation d'alpha-synucléine est, de plus, observée au sein d'oligodendrocytes uniquement pour la forme ruban et lorsque l'alpha-synucléine est surexprimée par des AAV. Il y a ainsi une différence quant à la capacité de ces différentes structures à induire la formation d'inclusions après inoculation chez le rat.

L'inoculation seule de fibres ou de rubans n'a pas provoqué de perte en neurones dopaminergiques, contrairement à l'injection d'AAV seul qui, elle, a entraîné la destruction de neurones dopaminergiques associée à un déficit moteur. Lorsque les AAV sont injectés avec chacune des formes d'alpha-synucléine, la destruction des neurones dopaminergiques et les déficits moteurs sont accentués. Par rapport au contrôle injecté avec l'AAV seul, les fibres diffèrent des rubans, en induisant une perte significative de projections et d'axones au niveau du striatum. Pourtant, le test comportemental



réalisé sur ces animaux ne révèle pas de différences entre les atteintes motrices observées sur les animaux inoculés avec les fibres ou les rubans.

L'apparition d'un déficit moteur n'est pas associée obligatoirement à une mort des neurones dopaminergiques ou à une réduction du nombre de leurs axones dans le striatum. Les auteurs ont donc analysé la capacité de cellules primaires de cortex, prélevées chez le rat à la naissance, à générer un potentiel d'action en présence, ou non, d'alpha-synucléine *in vitro*. En utilisant des tests électrophysiologiques, ils ont ainsi observé que l'alpha-synucléine pouvait interférer avec l'émission de potentiels d'action, et cela de manière significative, lorsque la protéine se trouve sous la forme de fibres ou d'oligomères. En revanche, il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les fréquences d'émission des potentiels d'action lorsque les cellules sont cultivées en présence des rubans. Ces résultats pourraient permettre d'expliquer la plus grande toxicité des fibres d'alpha-synucléine *in vivo*.

Dans la suite de l'étude, les auteurs ont cherché à mettre en évidence l'agrégation d'alpha-synucléine dans le cerveau de rats inoculés avec les différents assemblages de la protéine. Ils ont tout d'abord confirmé la présence d'agrégats d'alpha-synucléine, en la détectant au sein de la fraction insoluble en sarkosyl³, et ce chez tous les groupes de rats. Ils ont ensuite étudié la résistance à la digestion par la protéinase K de la protéine provenant des cerveaux de rat inoculés avec les formes fibre et ruban. Il avait précédemment été montré, *in vitro*, que la forme fibre présentait une plus grande résistance à la digestion par la protéinase K par rapport à la forme ruban [8]. L'alpha-synucléine extraite du cerveau de rats inoculés avec les

fibres résiste également à des concentrations plus importantes de protéinase K par rapport à la protéine extraite du cerveau de rats inoculés avec les rubans. Le maintien des caractéristiques de résistance différentielle suggère ainsi que la conformation de l'alpha-synucléine inoculée semble s'être transmise à l'alpha-synucléine endogène de l'hôte (Figure 1). Le fait que la forme fibre soit plus résistante à une digestion par la protéinase K pourrait contribuer à sa toxicité par rapport aux rubans.

Passage de la barrière hémato-encéphalique par l'alpha-synucléine recombinante

Certaines particularités des maladies à prion étant retrouvées dans la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, ces découvertes génèrent de nouvelles questions d'ordre sanitaire. Des contaminations iatrogènes⁴ par les prions ont en effet été observées, notamment à la suite d'interventions neuro-chirurgicales (électrodes implantées dans le cerveau) ou après des traitements par hormones de croissance provenant de glandes hypophysaires humaines. Très récemment, une étude a suggéré la possibilité d'une pathologie liée à la β -amyloïde, une protéine qui joue un rôle central dans la maladie d'Alzheimer, chez des patients atteints de maladie de Creutzfeldt-Jakob en relation avec la prise d'hormone de croissance [12].

Dans la maladie de Parkinson, aucun cas de transmission de la maladie par des dérivés de tissus humains n'a été décrit jusqu'à présent. Cependant peu d'études ont été réalisées dans ce domaine. Baekelandt et ses collègues ont étudié la capacité des différents types d'assemblages d'alpha-synucléine recombinante à franchir la barrière hémato-encéphalique. Après des injections intraveineuses répétées chez le rat, ils ont pu constater, par des études en imagerie, que fibres, rubans et oligomères étaient détectables dans le cerveau des animaux 4 mois après

les premières injections. En couplant les différentes formes d'alpha-synucléine avec un fluorochrome afin de pouvoir les tracer, les auteurs ont constaté que les rubans et les oligomères franchissent plus aisément la barrière hémato-encéphalique. L'apparition de dépôts d'alpha-synucléine et l'activation des cellules de l'inflammation montrent que fibres et rubans ont également diffusé au sein de la moelle épinière.

Conclusions

Ces résultats montrent des différences de neurotoxicité entre fibres et rubans d'alpha-synucléine *in vivo*, certaines de ces différences nécessitant l'utilisation d'un contexte particulier de surexpression de l'alpha-synucléine humaine par des AAV pour être mises en évidence. Le fait que les profils de digestion de ces différentes conformations d'alpha-synucléine aient été conservés après qu'elles aient été inoculées, suggère que la conformation initiale de la protéine exogène a été transmise à l'alpha-synucléine endogène. Ces résultats constituent un argument en faveur de l'existence possible de souches associées à différentes structures d'alpha-synucléine. Cependant, cette étude n'a pas permis d'observer de différences de répartition, ou de nature, des dépôts lors de l'agrégation de l'alpha-synucléine suite à l'inoculation. Aussi, il n'y a pas de différences dans les déficits moteurs révélés à 4 mois, après inoculation des fibres ou des rubans. D'autres études seront nécessaires afin de confirmer ces résultats et de pouvoir affirmer l'existence de souches dans les synucléinopathies. ♦

Assemblies of alpha-synuclein: do different strains exist?

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Braak H, Del Tredici K, Rub U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003 ; 24 : 197-211.

³ Le sarkosyl est un détergent qui ne désagrège pas les agrégats d'alpha-synucléine. Ceux-ci persistent ainsi au sein d'une fraction dite insoluble en sarkosyl, obtenue par resuspension du culot après ultracentrifugation en présence de ce détergent.

⁴ Occasionnés par le traitement médical.

RÉFÉRENCES

- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann NY Acad Sci* 2009 ; 1170 : 615-22.
- Li JY, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008 ; 14 : 501-3.
- Lelan F, Damier P. Les neurones dopaminergiques greffés dans la maladie de Parkinson sont-ils à leur tour atteints par le processus dégénératif ? *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 15-6.
- Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* 2012 ; 33 : 2225-8.
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, et al. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med* 2012 ; 209 : 975-86.
- Prusiner SB, Woerman AL, Mordes DA, et al. Evidence for alpha-synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E5308-17.
- Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 2575.
- Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, et al. alpha-synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 2015 ; 522 : 340-4.
- Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004 ; 364 : 1169-71.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003 ; 302 : 841.
- Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, et al. Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 2015 ; 525 : 247-50.
- Rossi A, Salvetti A. Intégration des vecteurs AAV et mutagenèse insertionnelle. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 167-74.

NOUVELLE

La mémoire virtuelle des lymphocytes T cytotoxiques

Valérie Martinet, Stanislas Goriely

Différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en cellules mémoires : la voie classique et les voies alternatives

Les lymphocytes T CD8⁺ sont des acteurs importants de la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus ou certaines bactéries. Ils sont également impliqués dans le contrôle de l'élimination des cellules tumorales. Lors d'une infection ou d'une vaccination, les cellules du système immunitaire inné (comme les cellules dendritiques) captent les antigènes et les présentent à des lymphocytes « naïfs ». Grâce aux signaux qu'ils reçoivent, les cellules capables de reconnaître un antigène spécifique prolifèrent fortement et acquièrent des fonctions effectrices permettant l'élimination du pathogène. Ces cellules vont reconnaître et lyser les cellules infectées grâce à l'expression de molécules cytotoxiques, ainsi qu'à la production de cytokines telles que l'interféron- γ (IFN γ). La plupart des cellules activées subissent une différenciation terminale et seront éliminées lors de la phase dite de contraction de la réponse. À l'issue de celle-ci, ne subsistera qu'une

petite population de cellules dites « mémoires » [1] (→).

La persistance de ces cellules dépend de leur capacité à répondre à des cytokines prolifératives comme l'interleukine (IL)-7 et l'IL-15, ainsi qu'au maintien de l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl2 (*B-cell lymphoma* 2). En répondant plus efficacement et plus rapidement lors d'un nouveau contact avec le même antigène, les cellules mémoires confèrent à l'organisme une protection à long-terme face à des infections ultérieures.

On sait depuis plusieurs années que des lymphocytes T CD8⁺ naïfs peuvent également acquérir le phénotype et la fonction de cellules mémoires en l'absence de contact et de reconnaissance antigénique [2]. En effet, dans des conditions de lymphopénie (comme lors de transfert de lymphocytes T CD8⁺ naïfs dans des hôtes immunodéficients ou irradiés), les fortes concentrations de cytokines prolifératives poussent les lymphocytes T CD8⁺ naïfs à acquérir le phénotype et les propriétés des cellules mémoires

(→) Voir la Synthèse de T. Walzer, *m/s* n° 11, novembre 2001, page 1105

Institute for medical immunology (IMI),
8, rue A. Bolland, CP305, Université Libre
de Bruxelles, 6041 Gosselies, Belgique.

stgoriel@ulb.ac.be

(phénomène qualifié de mémoire par « prolifération homéostatique »). Des études récentes réalisées chez l'animal montrent que ces lymphocytes T CD8⁺ mémoires « non conventionnels » apparaissent également dans des conditions physiologiques et qu'ils constituent une partie importante du *pool* de cellules mémoires (Figure 1). En effet, l'étude des sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ dans des souris élevées en l'absence de pathogène et qui n'ont jamais été immunisées, montre que 10 à 30 % de ces cellules présentent un phénotype mémoire. Cette population, appelée « mémoire virtuelle », augmente fortement avec l'âge [3]. On considérerait jusqu'à présent que l'apparition de cette population résultait de l'activation et de la formation de cellules mémoires en réponse à des antigènes de la flore microbienne. Cependant, des études récentes montrent que cette population de cellules mémoires apparaît également dans des animaux élevés en conditions axéniques (c'est-à-dire en l'absence complète de germes) ainsi que dans divers modèles transgéniques. Cette population mémoire « virtuelle »