

## Une première étape dans l'identification de récepteurs cellulaires de la protéine du prion

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) comprennent principalement la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme, la tremblante du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Elles sont caractérisées par leur dualité: il s'agit de maladies neurodégénératives liées au développement d'un agent infectieux, et leur transmissibilité constitue un critère nosologique primordial [1], mais elles peuvent également se présenter sous forme de maladies génétiques et sont, dans ce cas, liées à des mutations du gène codant pour la protéine PrP [2, 3]. Cette dernière est une protéine très conservée au cours de l'évolution, présente dans de nombreux tissus de l'organisme et exprimée en grande quantité dans le cerveau [4]. Elle s'accumule sous une forme anormale, particulièrement résistante aux protéases (d'où la dénomination de PrP<sup>res</sup>), dans le cerveau et les autres organes cibles du système réticulo-endothélial (SRE) chez les individus infectés [5]. Cette protéine PrP est appelée protéine du prion (anagramme de *proteinaceous infectious particle* [6]) et constituerait en soi, lorsqu'elle est sous sa forme pathologique, un agent infectieux d'un type nouveau appelé « prion », dans l'hypothèse du même nom. Celle-ci stipule que le prion serait constitué de PrP anormalement repliée, se multipliant grâce à l'association entre une molécule de PrP anormale (PrP<sup>res</sup>) et une molécule de PrP native, la première induisant un changement conformationnel chez la seconde [7]. Cependant, d'autres hypothèses sur la nature des agents étiologiques des ESST soutiennent

l'existence, soit d'un virus conventionnel amyloïdogénique [8, 9] soit d'un acide nucléique associé à la PrP anormale (hypothèse du « virino ») [10]. Ces hypothèses permettent en effet d'expliquer certaines propriétés de type viral des agents responsables des ESST, telles que la variabilité observée entre les différentes souches d'agent, le phénomène de compétition de souches (exclusion de surinfection), ainsi que le tropisme de l'agent infectieux (pour les organes lymphoïdes dans un premier temps, pour le système nerveux central dans un second temps).

### La protéine PrP

Le rôle physiologique de cette protéine de l'hôte reste inconnu: des souris dont le gène codant pour la PrP a été invalidé (souris *knock-out*) se développent et se comportent normalement (*m/s n° 6, vol. 8, p. 806*), mais présentent néanmoins un certain nombre d'anomalies différant en fonction des lignées de souris *knock-out* [11-13]. Il s'agit principalement d'anomalies du rythme circadien et de l'alternance veille/sommeil, de troubles électrophysiologiques, ainsi que d'une mort prématurée des cellules de Purkinje du cervelet (*m/s n° 8-9, vol. 12, p. 1003*). Le caractère ubiquitaire et très conservé de cette protéine ne laissait en rien présager l'impact aussi limité de son absence sur la biologie de ces rongeurs. Il est possible que des phénomènes compensatoires se mettent en place dès l'embryogenèse grâce à d'autres protéines capables d'assurer tout ou partie du rôle de la PrP.

En revanche, le rôle de la PrP dans la physiopathologie des ESST est bien

mieux connu. En particulier, les expériences menées chez les souris transgéniques pour le gène de la PrP ont montré que celui-ci gouvernait la barrière d'espèce (des souris exprimant la PrP de hamster sont sensibles à des souches d'agent adaptées au hamster alors que des souris normales ne le sont pas). Par ailleurs, la susceptibilité des souris transgéniques est fonction du nombre de copies du transgène et des souris sans PrP ne développent pas la maladie après injection expérimentale de l'agent infectieux [14, 15]. Cette dernière donnée montre que la PrP, dans l'hypothèse où elle ne constitue pas tout ou partie de l'agent, joue tout au moins un rôle-clé dans son cycle d'infection et/ou de réplication, par exemple en tant que récepteur (*m/s n° 8-9, vol. 9, p. 989*) [16].

### Caractérisation des interactions protéiques de la PrP

Une stratégie de recherche consiste à identifier des protéines cellulaires capables d'interagir avec la PrP, dans le but double de mieux comprendre son rôle dans le métabolisme normal de la cellule et/ou d'identifier des facteurs intervenant dans le cycle de réplication des prions tels que, par exemple, le facteur « X » suggéré par S.B. Prusiner. La technique du double-hybride consiste à faire exprimer par la levure *Saccharomyces cerevisiae* deux protéines couplées respectivement à un site de liaison à l'ADN et un site d'activation de la transcription; une interaction entre ces deux protéines aboutit à la transcription du gène rapporteur considéré [17]. En utilisant cette technique avec la protéine PrP en tant que « leurre » et

un ensemble de protéines exprimées par une banque d'ADNc humaine comme « proie » (figure 1A), nous avons identifié deux protéines capables d'interagir avec la PrP [18, 19]: la protéine de choc thermique Hsp60 et le précurseur du récepteur de la laminine, ou LRP, de 37 kDa (le récepteur de la laminine initialement isolé a un poids moléculaire de 67 kDa, et résulte très probablement, soit d'une dimérisation de deux unités de 37 kDa, soit d'une association de cette unité avec une autre molécule). La structure exacte de cette protéine de 295 acides aminés est inconnue, mais l'analyse de la séquence primaire et les expériences d'immunofluorescence [20, 21] (Weiss *et al.*, résultats non publiés) suggèrent une localisation transmem-

branaire telle qu'elle est représentée schématiquement dans la figure 1B. Du fait de sa localisation membranaire et de sa fonction de récepteur, non seulement de la laminine mais aussi des alphavirus (virus Sindbis, virus de l'encéphalite équine vénézuélienne) [20-22], on a suspecté pour le LRP un rôle de récepteur de la PrP à la surface des neurones. L'interaction entre LRP et PrP a donc été vérifiée dans deux autres systèmes d'expression: le système baculovirus/cellules d'insecte, et les cellules de mammifère Cos-7. La cartographie du site d'interaction de la PrP sur le LRP a montré que celui-ci coïncidait avec le site de liaison de la laminine. La pertinence de cette interaction *in vivo* a alors été approchée. La protéine LRP était détec-

table par *western-blot* dans différents organes de rongeurs tels que cerveau, rate, foie et pancréas, mais non dans le muscle squelettique (qui appartient à la catégorie des organes non infectieux dans la classification de l'OMS). Chez l'animal infecté expérimentalement, les concentrations de LRP étaient augmentées uniquement dans les organes cibles de l'agent infectieux (cerveau, rate et pancréas), et cette augmentation du LRP était corrélée à la quantité de PrP<sup>res</sup> accumulée. A titre d'exemple, le cerveau des hamsters infectés contenait 5 fois plus de LRP que celui des hamsters sains, alors que celui des souris infectées par l'agent de la tremblante avait une concentration qui n'était que doublée, et multipliée par 1,1 (non significatif) chez les mêmes souris infectées par l'agent de l'ESB. Or, le modèle du hamster infecté par l'agent de la tremblante est connu pour son caractère très neuroinvasif et sa production de grandes quantités de PrP<sup>res</sup> (10 fois plus que les modèles murins), alors que la souche d'ESB utilisée dans cette étude ne provoque, chez la souris, qu'une faible accumulation de PrP<sup>res</sup>, quatre fois moins importante que la souche de tremblante [23]. Ces résultats suggèrent un rôle de la protéine LRP dans la physiopathologie des ESST directement lié à la multiplication de l'agent infectieux et à l'accumulation de protéine du prion anormale.

### Rôle hypothétique d'un récepteur de la protéine PrP

#### • Le LRP

Les conséquences potentielles de l'interaction entre LRP et PrP sont multiples et laissent envisager au moins trois différents rôles possibles pour le LRP (figure 2): (1) En tant que récepteur de la PrP normale, le LRP interviendrait dans son internalisation et serait donc un acteur du cycle cellulaire de la protéine. Dans le cas pathologique, le dérèglement du catabolisme de la PrP (convertie en PrP<sup>res</sup> qui s'accumule) conduirait à une internalisation accélérée, et donc à un apport membranaire accru de LRP; (2) le LRP pourrait constituer un récepteur pour la PrP

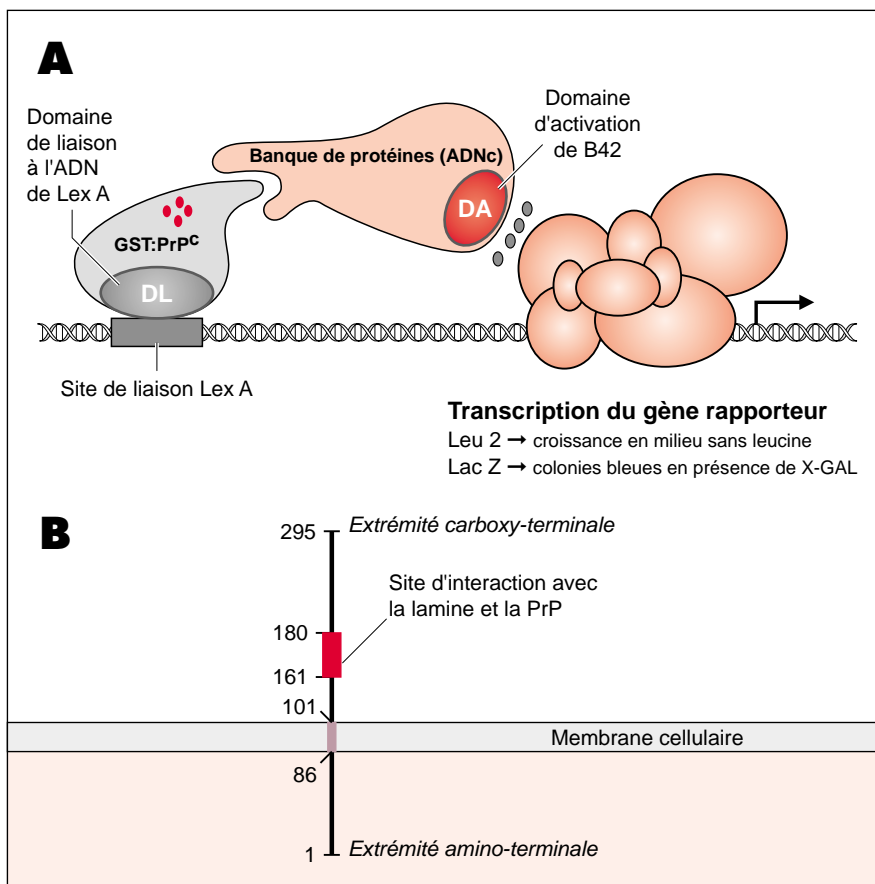


Figure 1. **Isolément et structure de protéines interagissant avec la PrP. A. Système double-hybride** permettant l'identification de protéines interagissant avec la protéine PrP. **B. Représentation théorique de la protéine LRP** de 37 kDa, précurseur du récepteur de la laminine et récepteur présumé de la protéine PrP. Le rectangle rouge marque le site d'interaction de la protéine avec la laminine, mais aussi avec la protéine PrP.

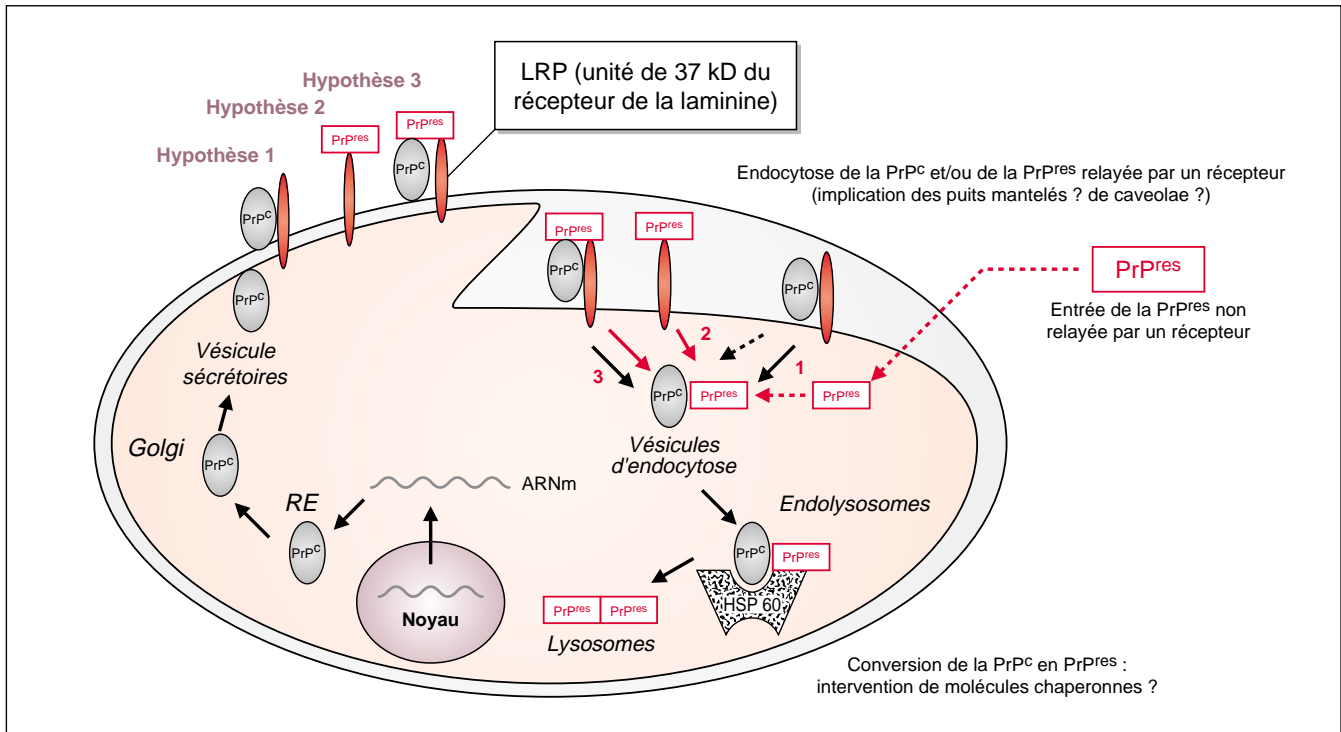


Figure 2. **Cycle cellulaire des protéines prions normales et pathologiques.** La protéine PrP normale synthétisée par la cellule (PrP<sup>c</sup>) subit des modifications post-traductionnelles (N-glycosylations, ajout d'une ancre GPI) dans le réticulum endoplasmique et les saccules de Golgi, puis est transportée à la surface cellulaire où elle reste accrochée à la membrane par son ancre GPI. Elle est ensuite réinternalisée (endocytose relayée par des puits mantelés ou des caveolae, selon les auteurs [26-28]) puis dégradée dans le compartiment lysosomal. Dans le processus pathologique survenant au cours des ESST, l'association entre des molécules de PrP<sup>c</sup> et des molécules de PrP<sup>res</sup> anormales se fait dans la seconde partie du cycle de la protéine [29-30] (soit à la surface cellulaire, soit dans les vésicules d'endocytose, soit dans les lysosomes) et conduit, avec ou sans l'intervention d'un composant de type viral, à une conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>res</sup>. Les molécules chaperonnes telles que Hsp60 jouent très probablement un rôle dans ce processus. La cellule n'est alors plus capable de dégrader ces protéines qui s'accumulent. La protéine LRP, en tant que récepteur de la PrP, peut intervenir dans le cycle cellulaire normal de la PrP et/ou dans le processus pathologique, ce qui a été résumé sous la forme des trois hypothèses représentées dans cette figure. **Hypothèse 1:** Le LRP est le récepteur permettant l'internalisation de la protéine PrP<sup>c</sup> dans son cycle cellulaire normal. L'entrée de la PrP<sup>res</sup> dans la cellule se fait par une autre voie. **Hypothèse 2:** Le LRP constitue le récepteur pour la PrP<sup>res</sup>. Il peut constituer un récepteur exclusif de cette isoforme de la PrP et n'intervient donc que lors du processus pathologique. Cependant, le LRP peut également relayer, de façon indépendante, l'entrée de la PrP<sup>c</sup> et de la PrP<sup>res</sup>, comme indiqué sur la figure. **Hypothèse 3:** Le LRP serait un co-récepteur de la PrP<sup>c</sup> pour la PrP<sup>res</sup>. Dans ce cas, l'association entre la protéine normale et son isoforme pathologique se ferait avant même l'internalisation de ces deux protéines.

pathologique, ligand « exogène » (PrP<sup>res</sup>). Dans ce cas, le LRP serait le récepteur de l'agent infectieux dans le sens classique du terme, que l'agent infectieux soit constitué uniquement de PrP<sup>res</sup>, ou qu'il s'agisse d'un « virino », c'est-à-dire d'un acide nucléique protégé par la PrP<sup>res</sup>. L'infection de la cellule conduirait à une régulation positive du LRP; (3) le LRP serait un co-récepteur de la PrP pour l'agent infectieux (PrP<sup>res</sup>, comme indiqué dans la figure 2,

« virino » ou virus classique). Dans l'hypothèse virale classique, l'interaction identifiée entre PrP et LRP correspondrait à celle d'un récepteur avec un co-récepteur, la liaison des deux molécules engendrant un site accepteur pour le virus.

Un récent article publié dans *Science* [24] fait état de différentes localisations membranaires possibles pour la PrP, étudiées dans des systèmes de traduction *in vitro* et chez des souris transgéniques pour la PrP. Il apparaît

que physiologiquement, c'est la forme « sécrétoire » de la PrP, en réalité ancrée à la membrane par un GPI, qui est la forme largement majoritaire, voire la seule à arriver au terme de sa maturation. Certaines mutations du gène de la PrP conduisent, chez les souris qui l'expriment en quantité anormalement élevée, à une localisation majoritairement transmembranaire de la PrP (alors nommée PrP<sup>cm</sup>), ainsi qu'au développement d'une maladie neurodégéné-

native. Un mécanisme du même type semble être impliqué dans la pathogénie d'une forme familiale humaine d'ESST (syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker) liée à une mutation au codon 117 de la protéine PrP. Dans la *figure 2*, seule la protéine PrP ancrée à la membrane par un GPI est représentée, puisqu'elle correspond à la topologie rencontrée chez l'individu normal.

Quoi qu'il en soit, la large distribution de la protéine LRP dans différents tissus et organes et en particulier dans les organes lymphoïdes cadre bien avec l'hypothèse qu'elle jouerait un rôle crucial dans le cycle de réplication de l'agent infectieux, et cela, dès les premières étapes de l'infection dont on sait qu'elles se déroulent en dehors du système nerveux central. La laminine est une protéine majeure de la matrice extracellulaire, présente dans les lames basales, intervenant dans les phénomènes de différenciation, d'attachement, de mobilité cellulaire (voire d'extravasation lors de processus métastatiques). Il est concevable que l'interaction de la PrP pathogène avec le LRP déplace l'équilibre de liaison de la laminine à son récepteur, provoquant une perturbation de l'environnement cellulaire de nature à favoriser, s'il s'agit des neurones, leur dégénérescence et/ou, s'il s'agit des cellules mobiles du système immunitaire, la propagation de l'agent infectieux.

#### • La piste brésilienne

Des auteurs brésiliens ont également identifié un récepteur potentiel de la protéine PrP par la méthode d'« hydrophathie complémentaire » stipulant que des peptides codés par des séquences d'ADN complémentaires l'une de l'autre interagissent entre eux [25]. Un peptide synthétique correspondant à une séquence d'ADN complémentaire de celle d'un fragment neurotoxique de la PrP a été utilisé pour immuniser des souris. L'anticorps ainsi obtenu reconnaissait un antigène à la surface des neurones primaires en culture, et le *Western-blot* a révélé qu'il s'agissait d'une protéine de 66 kDa constituant donc un récepteur candidat, mais non identifié, pour la PrP. Cette pro-

téine se fixe sur la PrP recombinante (révélée par l'anticorps correspondant) et entre en compétition avec un anticorps anti-PrP lors du marquage de la PrP à la surface de cellules de neuroblastome murin. Par ailleurs, la neurotoxicité du fragment 106-126 de la PrP est inhibée à la fois par le récepteur candidat et son anticorps, le premier agissant, dans ce cas, comme un compétiteur soluble du récepteur cellulaire en se fixant sur la PrP106-126, le second se fixant sur le récepteur cellulaire et empêchant l'action du peptide neurotoxique.

La différence de poids moléculaire entre le LRP et ce récepteur candidat semble indiquer qu'il s'agit de deux molécules différentes, suggérant l'existence d'au moins deux voies d'entrée du « prion » dans la cellule. Il est toutefois possible qu'il s'agisse d'une seule et même molécule, le récepteur candidat de 66 kDa correspondant alors au récepteur de la laminine de 67 kDa.

La fonction de récepteur de la protéine du prion n'a encore été démontrée pour aucune de ces deux protéines membranaires. C'est dans cette direction que s'inscrivent à présent les recherches : la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire et cellulaire devrait clarifier le rôle du LRP dans le cycle cellulaire des protéines prion normale et pathologique, tandis que les techniques de transgénèse chez la souris pourraient permettre de déterminer un lien entre l'expression du LRP et la susceptibilité à l'infection par les agents responsables des ESST ■

#### Remerciements

Stefan Weiss remercie le BMBF (01-KI9760), la CEE (BIOMED PL97 6054) et FAIR (T97-3314) pour leur soutien financier.

#### RÉFÉRENCES

1. Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy) : transmission to the chimpanzee. *Science* 1968 ; 161 : 388-9.
2. Chapman J, Brown P, Rabey JM, Goldfarb LG, Inzelberg R, Gibbs CJ, Gajdusek DC, Korczyn AD. Transmission of spongiform encephalopathy from a familial Creutzfeldt-

Jakob disease patient of jewish libyan origin carrying the PRNP Codon-200 mutation. *Neurology* 1992 ; 42 : 1249-50.

3. Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P, Asher DM, Brown WT, *et al.* Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* 1989 ; 106 : 204-6.

4. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, *et al.* Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie infected and uninfected brain. *Nature* 1985 ; 315 : 331-3.

5. Muramoto, T, Kitamoto T, Tateishi J, Goto I. The sequential development of abnormal prion protein accumulation in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 1992 ; 140 : 1411-20.

6. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982 ; 216 : 136-44.

7. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. *Science* 1994 ; 264 : 530-1.

8. Czub M, Braig HR, Diringer H. Replication of the scrapie agent in hamsters infected intracerebrally confirms the pathogenesis of an amyloid-inducing virosis. *J Gen Virol* 1988 ; 69 : 1753-6.

9. Manuelidis L. The dimensions of Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfusion* 1994 ; 34 : 915-28.

10. Dickinson AG, Outram GW. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* 1988 ; 135 : 63-83.

11. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell surface PrP protein. *Nature* 1992 ; 356 : 577-82.

12. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, *et al.* Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 1996 ; 380 : 528-31.

13. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 1996 ; 380 : 639-42.

14. 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.

15. Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, *et al.* Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 1990 ; 63 : 673-86.

16. Lehmann S. Le rôle de la protéine du prion dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines. *Med Sci* 1996 ; 12 : 949-58.

## RÉFÉRENCES

17. Plessis A, Camonis JH. Le système double-hybride, mode d'emploi. *Med Sci* 199 ; 10 (suppl n° 6-7) : R1-R9.
18. Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winnacker EL. Prion protein PrP<sup>Sc</sup> interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* 1996 ; 70 : 4724-8.
19. Rieger R, Edenhofer F, Lasmézas CI, Weiss S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 1997 ; 3 : 1383-8.
20. Castronovo V, Taraboletti G, Sobel ME. Functional domains of the 67-kDa laminin receptor precursor. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 20440-6.
21. Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S, Strauss JH. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol* 1992 ; 66 : 4992-5001.
22. Ludwig GV, Kondig JP, Smith JF. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. *J Virol* 1996 ; 70 : 5592-9.
23. Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Hauw JJ, Dormont D. Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 1601-9.
24. Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 1998 ; 279 : 827-34.
25. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, Souza SJD, Mercandante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 1997 ; 3 : 1376-82.
26. Shyng SL, JE Heuser DA Harris. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 1994 ; 125 : 1239-50.
27. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RGW, Taraboulos A, Prusiner SB. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 14945-9.
28. Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 2333-8.
29. Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 18217-23.
30. Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 16188-99.

**Corinne Ida Lasmézas**

**Jean-Philippe Deslys**

**Dominique Dormont**

*Service de neurovirologie CEA/DSV/DRM/SSA, 60-68, avenue du Général-Leclerc, BP6, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.*

**Stefan Weiss**

*Laboratorium für Molekulare Biologie-Genzentrum-Institut für Biochemie der LMU München, Feodor-Lynen Strasse 25, D- 81377 Munich, Allemagne.*

**TIRÉS À PART**

C.I. Lasmézas.