

## Les pistes pour débusquer le rôle de la protéine prion dans les cellules neuronales

*La protéine prion PrP<sup>c</sup>, dont la forme anormale PrP<sup>Sc</sup> est responsable des Encéphalopathies Subaiguës Spongiformes Transmissibles, est une protéine ubiquitaire fortement exprimée dans les neurones. Des données récentes ont montré que la PrP<sup>c</sup> a la capacité d'interagir avec différentes protéines, et l'utilisation d'un modèle cellulaire neuronal a permis de révéler une voie de transduction*

*couplée à la PrP<sup>c</sup>. La PrP<sup>c</sup>, qui est ancrée à la face externe de la membrane plasmique, semble en effet se comporter comme un véritable récepteur membranaire qui interagit avec la cavéoline et active la protéine-kinase Fyn. Ces nouvelles pistes permettront peut-être enfin de dévoiler la fonction de la PrP<sup>c</sup>, qui demeure encore inconnue.*

L'agent pathogène responsable des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles ou ESST – tremblante du mouton ou scrapie, ES bovine ou maladie de la vache folle et maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme – est composé essentiellement voire exclusivement d'une protéine nommée PrP<sup>Sc</sup> pour la forme scrapie de la protéine prion cellulaire ou PrP<sup>c</sup>. Ces deux isoformes possèdent la même structure primaire mais des conformations différentes. La conversion de la PrP<sup>c</sup>, riche en hélices  $\alpha$ , en forme scrapie repliée en feuillets  $\beta$  serait à l'origine de la maladie [1]. Le concept « prion » introduit par S. Prusiner dès le début des années 1980, qui stipule l'existence d'une protéine infectieuse dont le changement de conformation induirait un état pathologique, défie l'imagination des biologistes.

S'il est admis que les prions infectieux pourraient transmettre leur empreinte conformationnelle à la PrP<sup>c</sup> synthétisée par les neurones, les mécanismes de conversion de la PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, qui permettent l'accumulation et la propagation de l'agent transmissible, restent mystérieux. La transmission des ESST par inoculations successives chez les animaux révèle, de plus, l'existence de différentes souches de prions (plus de

20 souches répertoriées pour la tremblante du mouton) définies par le temps de latence d'incubation de la maladie et le profil des lésions cérébrales [2]. Le ciblage neuronal des diverses souches de prion soulève la question des interactions agents infectieux-cellules hôtes. Les éléments du phénotype des cellules nerveuses (nature des neuromédiateurs, des récepteurs, propriétés membranaires, polarité...), qui leur confèrent une susceptibilité ou une résistance à l'infection par telle ou telle souche de prions, n'ont pas été identifiés. Rien d'étonnant, puisque le rôle même de la protéine prion normale dans la physiologie des cellules neuronales n'a pas été élucidé.

### Que peut faire une protéine ubiquitaire ancrée sur la membrane externe ?

La fonction de la protéine prion est en effet très difficile à débusquer. La PrP<sup>c</sup> est une protéine ubiquitaire, fortement exprimée dans les neurones. Sa localisation à la surface cellulaire où elle est ancrée à la membrane externe par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) évoque un rôle dans l'adhérence cellulaire, la signalisation ou encore la liaison avec un ligand extracellulaire [3]. La PrP<sup>c</sup>

pourrait aussi exercer un rôle au cours du développement embryonnaire car elle est exprimée dès le jour 6,5 dans le sac vitellin puis au jour 13,5 dans les cellules neuronales et non neuronales de l'embryon de souris [4]. L'absence de boîte TATA dans le promoteur du gène codant pour la PrP<sup>c</sup> et son expression dans tous les types cellulaires a même conduit à proposer une fonction de « ménager » [5].

### Les lignées de souris dont le gène *Prnp* a été invalidé vivent très bien

Les souris nulles, PrP<sup>-/-</sup>, qui ont été obtenues par recombinaison homologue du gène codant pour la PrP, sont viables mais ne sont plus sensibles aux prions infectieux (*m/s* 1992, n° 6, p. 604). Elles nous ont donc appris que la présence de PrP<sup>c</sup> est nécessaire au développement des ESST et que la protéine prion n'exerce vraisemblablement pas une fonction vitale pour l'organisme. Les quatre lignées de souris produites indépendamment présentent des anomalies phénotypiques mineures qui diffèrent selon le laboratoire [6]. Seules des souris dénuées de PrP<sup>c</sup> dans lesquelles un transgène codant pour une forme tronquée de PrP<sup>c</sup>

(PrP<sup>c</sup> Δ32-121) a été introduit, montrent tôt après la naissance une ataxie et une dégénérescence neuronale [7]. Le phénotype mutant est aboli si l'expression de la PrP<sup>c</sup> endogène est rétablie. Le modèle proposé pour rendre compte de ces observations stipule qu'une autre protéine  $\pi$  exercerait une fonction redondante de celle de la PrP<sup>c</sup> qui compenserait le déficit de PrP<sup>c</sup> chez les souris nulles. L'interaction d'un ligand « Lprp » soit avec la PrP<sup>c</sup>, soit avec  $\pi$ , induirait un signal. La PrP<sup>c</sup> tronquée ( $\Delta$ 32-121) serait incapable d'induire une signalisation, mais jouerait le rôle d'un mutant dominant négatif vis-à-vis de  $\pi$  en séquestrant le ligand. Ceci est très spéculatif car ni la protéine  $\pi$ , ni le ligand « Lprp » n'ont été mis en évidence. Il est néanmoins intéressant de noter que le domaine amino-terminal déleté du transgène contient les séquences octapeptidiques répétées de la PrP<sup>c</sup> qui fixent le cuivre.

### La protéine prion fixe le cuivre

La PrP<sup>c</sup> pourrait fixer 4 ions cuivre sur des résidus histidine avec une affinité de 5 à 10  $\mu$ M [8]. L'implication du cuivre dans la conformation de la protéine prion a été évoquée [9]. Par ailleurs, des travaux récents suggèrent que la PrP<sup>c</sup> jouerait un rôle dans le métabolisme du cuivre en réglant sa concentration au niveau de la synapse. Ceci soulève la question du rôle de la PrP<sup>c</sup> sur le stress oxydant. Le niveau d'activité de la superoxyde dismutase dépendante du cuivre et du zinc (Cu-Zn SOD) serait plus faible chez les souris PrP<sup>-/-</sup>, ce qui les rendrait plus sensibles au stress oxydant que les souris sauvages [10]. La régulation de l'enzyme Cu-Zn SOD par la PrP<sup>c</sup> serait indirectement liée au transport de cuivre de la fente synaptique vers le cytosol [11]. Le lien fonctionnel entre la PrP<sup>c</sup> et le cuivre semble assez complexe puisqu'une stimulation de l'endocytose de la PrP<sup>c</sup> par le cuivre a pu aussi être observée dans des cellules de neuroblastome N2a surexprimant la PrP<sup>c</sup> [12]. Le rôle de la PrP<sup>c</sup> dans le métabolisme du cuivre reste cependant à éclaircir dans la mesure où certaines de ces observations sont actuellement controversées [13].

### Les éventuels partenaires de la protéine prion

Une des approches retenues pour rechercher la fonction de la PrP<sup>c</sup> est d'identifier des partenaires cellulaires. La technique de double hybride chez la levure a sélectionné la PrP<sup>c</sup> elle-même, la chaperone Hsp60 [14], Bcl2, une protéine impliquée dans l'apoptose [15] et un précurseur du récepteur de la laminine (LRP). Seule l'interaction de la protéine LRP (37 kD) avec la PrP<sup>c</sup> a pu être mise en évidence dans les cellules COS-7 transfectées avec les ADNc codant pour les deux protéines [16]; elle ferait intervenir des protéoglycane à héparane sulfates et pourrait être impliquée dans l'internalisation de la PrP<sup>c</sup>. Un autre candidat putatif, dont l'identité n'a pu être établie, a été prédit par la méthode « d'hydropathie complémentaire » [17]. Cette quête de partenaires n'a donc pas pour l'instant permis d'appréhender précisément la fonction de la PrP<sup>c</sup>. Une des limites de ces approches réside certainement dans le fait qu'elles ont été développées dans des systèmes hétérologues, phénotypiquement trop éloignés d'un contexte neuronal.

### La protéine prion est couplée à une voie de signalisation intracellulaire

Les cellules neuronales constituent les sites majeurs d'expression de la PrP<sup>c</sup> et la cible principale des lésions constatées chez les patients atteints d'ESST. Une des difficultés pour démasquer le rôle de la PrP<sup>c</sup> en relation avec la physiologie d'un neurone est la rareté des modèles cellulaires exprimant *ex vivo* l'ensemble des fonctions neuronales spécialisées. La lignée 1C11 dérive des cellules multipotentielles F9 [18] et possède les propriétés d'une cellule souche neuroectodermique bipotentielle. Elle présente un phénotype épithélial et indifférencié, stable en l'absence d'induction. Ces cellules précurseurs (1C11) s'engagent après induction dans un programme de différenciation, développent des extensions bipolaires, acquièrent des marqueurs neuronaux et, selon la

nature des inducteurs, expriment l'ensemble des fonctions d'un neurone sérotoninergique (1C11<sup>\*/5-HT</sup>) ou noradrénergique (1C11<sup>\*\*/NE</sup>). Les programmes sont mutuellement exclusifs et recrutent presque 100 % des cellules (*figure 1*). Les récepteurs sérotoninergiques ou adrénergiques, sélectivement induits au cours des étapes de différenciation, assurent une autorégulation des phénotypes par la sérotonine ou la noradrénaline [19]. Enfin, les cellules 1C11 expriment la PrP<sup>c</sup> de façon endogène (*figure 1*), l'étude de cette protéine peut donc se faire dans un contexte neuronal intégré, en relation avec le stade de différenciation des cellules [20].

La localisation de la PrP<sup>c</sup> à la surface des cellules évoque un rôle de récepteur. Afin de tester cette hypothèse et de rechercher une voie de signalisation couplée à la PrP<sup>c</sup>, des anticorps spécifiques de la PrP<sup>c</sup> ont été utilisés pour mimer un signal. Aucune activation des voies p21ras et PLA2, ni aucune production d'IP3 ou de NO n'ont été observées au cours des 30 minutes suivant l'addition des anticorps. En revanche, le pontage de la PrP<sup>c</sup> avec différents anticorps anti-PrP induit une déphosphorylation de Fyn, une tyrosine kinase de la famille Src. Cette modification post-traductionnelle de Fyn s'accompagne d'une augmentation de l'activité kinase de cette protéine [21]. Ce signal est observé à la fois dans les cellules sérotoninergiques (1C11<sup>\*/5-HT</sup>) et noradrénergiques (1C11<sup>\*\*/NE</sup>), mais pas dans le précurseur 1C11. Le niveau d'expression de Fyn est pourtant comparable dans les 3 états.

Fyn est une kinase intracellulaire alors que la PrP<sup>c</sup> est une protéine glypiée, ancrée du côté externe de la membrane. Il fallait donc stipuler l'existence d'intermédiaire(s) intramembranaire(s) impliqué(s) dans le couplage de la PrP<sup>c</sup> à Fyn. Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'identifier la cavéoline comme partenaire de la PrP<sup>c</sup>. L'interaction PrP<sup>c</sup>/cavéoline n'est pas révélée dans les cellules souches alors que la cavéoline est présente; elle semble spécifique des cellules 1C11<sup>\*/5-HT</sup> ou 1C11<sup>\*\*/NE</sup>. Une séquestration de la cavéoline par des anti-

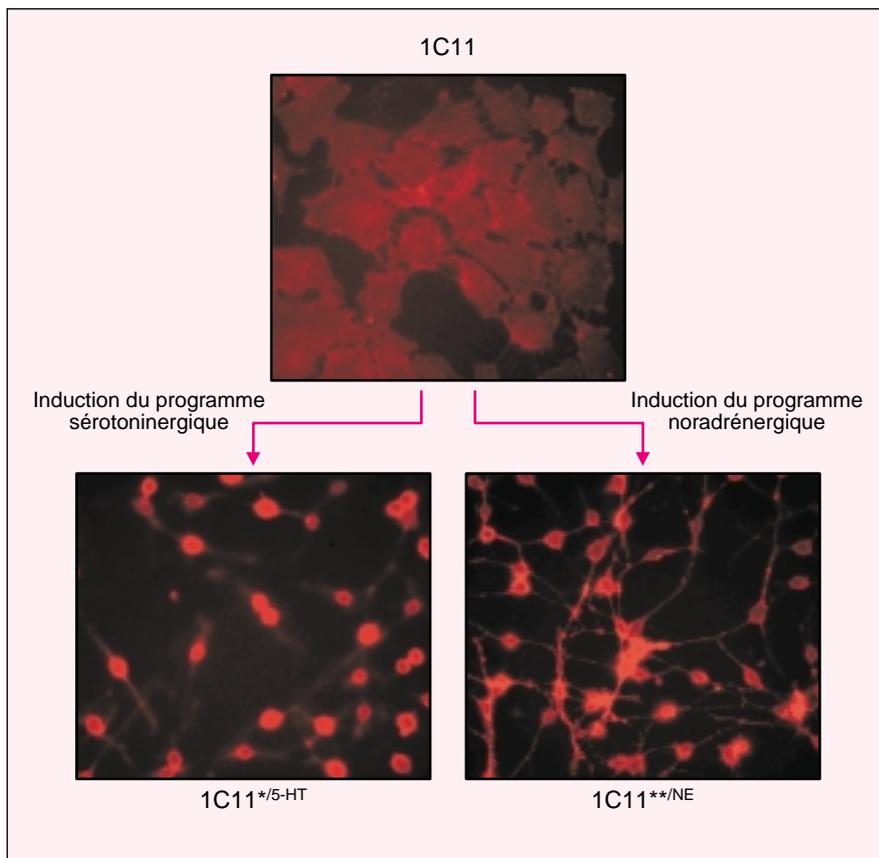


Figure 1. **Expression de la PrP<sup>c</sup> dans les cellules neuronales 1C11.** L'étude en immunofluorescence révèle que la PrP<sup>c</sup> est exprimée aussi bien par les cellules précurseurs 1C11 que dans les cellules différenciées sérotoninergiques (1C11<sup>\*5-HT</sup>) ou noradrénergiques (1C11<sup>\*\*NE</sup>).

corps empêche l'activation de Fyn en réponse au pontage de la PrP<sup>c</sup>. Ceci démontre que la cavéoline est bien un des protagonistes de la voie de signalisation induite par la PrP<sup>c</sup> dans ces cellules neuronales (figure 2).

#### Le couplage de la protéine prion dépend de la différenciation cellulaire

L'étude de l'activation de Fyn au cours de la cinétique de différenciation des cellules 1C11 révèle que seules les cellules ayant acquis un phénotype sérotoninergique ou noradrénergique complet sont compétentes pour répondre à l'activation de la PrP<sup>c</sup> par les anticorps. Pourtant tous les acteurs sont déjà présents dans la cellule souche neuronale. La mise en place d'un complexe PrP<sup>c</sup>/cavéoline/Fyn semble donc liée à la maturation phénotypique des cel-

lules: polarité des neurites, propriétés membranaires, acquisition de toutes les fonctions associées aux neuromédiateurs, présence d'autres partenaires induits en fin de programme... L'interaction PrP<sup>c</sup>/cavéoline ne semble pas être l'événement limitant car elle est observée rapidement après l'engagement des cellules vers l'un ou l'autre des 2 programmes de différenciation.

Au cours de leur cinétique de différenciation, les cellules 1C11<sup>\*5-HT</sup> ou 1C11<sup>\*\*NE</sup> acquièrent des neurites avec des varicosités décrites comme des domaines préférentiels de transduction du signal. La PrP<sup>c</sup> peut être visualisée par les techniques d'immunofluorescence, à la fois sur le corps cellulaire et sur les prolongements bipolaires des cellules. Après un fractionnement cellulaire visant à séparer les neurites des corps cellulaires, il apparaît que ce sont principale-

ment les molécules de PrP situées dans les neurites qui déclenchent l'activation de Fyn.

#### Les enjeux du futur

Un des premiers défis pour les prochaines années sera d'identifier le signal mimé par la ligation des anticorps à la PrP<sup>c</sup>. Au vu de l'interaction de la PrP<sup>c</sup> avec le récepteur de la laminine [16], l'activation de la protéine prion pourrait être liée à des processus d'adhérence cellulaire. Il n'est pas non plus exclu que le ligand soit la PrP<sup>c</sup> elle-même, dans la mesure où des interactions PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>c</sup> ont été décrites. Mais là encore le problème est complexe, car il existe plusieurs isoformes de la PrP<sup>c</sup> dont la signification fonctionnelle est inconnue: la protéine native, la protéine N-terminal tronquée, un peptide amino-terminal sécrété et des formes non glycosylées, mono- ou bi-glycosylées [22] !

Au vu des phénotypes des souris nulles pour le gène PrP<sup>c</sup>, il est peu vraisemblable que la PrP<sup>c</sup> exerce une fonction critique pour l'acquisition d'un phénotype neuronal. La PrP<sup>c</sup> pourrait néanmoins jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie des neurones. La découverte d'une voie de transduction couplée à la PrP<sup>c</sup> (figure 2) fournit un crible pour rechercher le signal et pour caractériser les cibles intracellulaires en aval de Fyn, chimiquement modifiées par l'activation de la PrP<sup>c</sup>. Y aura-t-il une relation entre les voies de signalisation recrutées par la protéine prion et le stress oxydant, comme le laissent présager les données concernant la fixation du cuivre et les dosages d'activité SOD chez les souris PrP<sup>-/-</sup> ?

Lors de l'infection, il est probable que la PrP<sup>Sc</sup> interfère avec la fonction de la PrP<sup>c</sup>. En convertissant la PrP<sup>c</sup> en forme pathogène, elle pourrait abolir sa fonction; à l'inverse, elle pourrait activer de façon constitutive la ou les voies de signalisation normalement couplées à la PrP<sup>c</sup>. Les pistes sont vraisemblablement tracées pour découvrir comment se traduit la réponse des neurones au signal médié par la protéine prion, un prérequis pour rechercher des agents

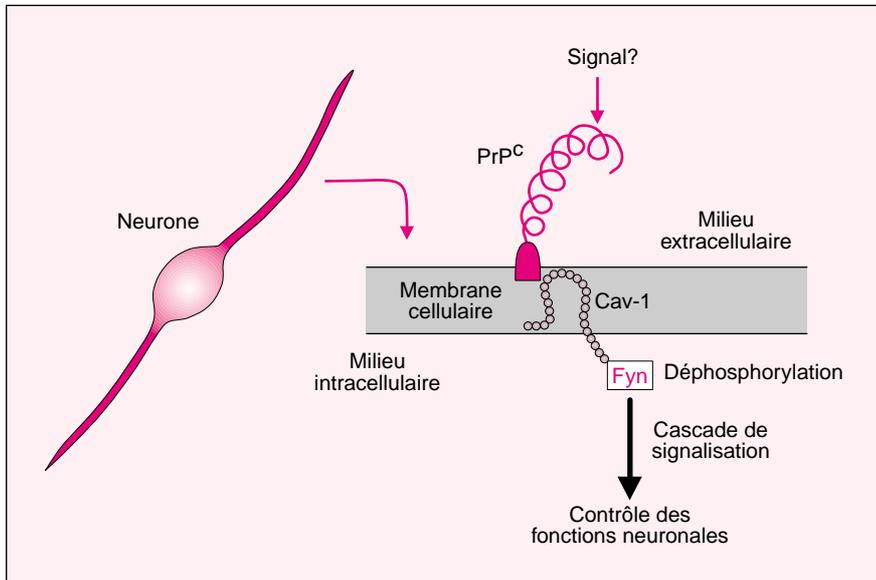


Figure 2. **Couplage de la PrP<sup>c</sup> à une voie de transduction dans les cellules neuronales.** La PrP<sup>c</sup> ancrée à la membrane externe, peut interagir avec la cavéoline et provoquer ainsi la déphosphorylation et l'activation de Fyn, une tyrosine kinase de la famille Src. On ne connaît pas encore ce qui déclenche, en amont, l'interaction de la PrP<sup>c</sup> avec la cavéoline, ni les cibles intracellulaires situées en aval de Fyn.

thérapeutiques potentiels capables d'inhiber les effets neurodégénératifs de la PrP<sup>Sc</sup> responsables des ESST tout en préservant l'intégrité des fonctions neuronales ■

#### Remerciements

Le travail personnel des auteurs a bénéficié du financement du programme de recherche sur les ESST et les prions et d'une subvention des CNP assurances.

**Sophie Mouillet-Richard**  
**Odile Kellermann**

Laboratoire de différenciation cellulaire, Cnrs, UPR1983, Institut André-Lwoff, 7, rue Guy-Môquet, 94801 Villejuif Cedex, France.

#### RÉFÉRENCES

1. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell* 1998; 93: 337-48.
2. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sia-

m/s n°3, vol. 17, mars 2001

loglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 1989; 102: 1-6.

3. Harris DA, Gorodinsky A, Lehmann S, Moulder K, Shyng SL. Cell biology of the prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 207: 77-93.

4. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 1992; 115: 117-22.

5. Basler K, Oesch B, Scott M, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986; 46: 417-28.

6. Raeber AJ, Brandner S, Klein MA, et al. Transgenic and knockout mice in research on prion diseases. *Brain Pathol* 1998; 8: 715-33.

7. Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, et al. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 1998; 93: 203-14.

8. Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 1997; 390: 684-7.

9. Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 55-9.

10. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretschmar HA. Prion protein-

deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 1997; 146: 104-12.

11. Herms J, Tings T, Gall S, et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 19: 8866-75.

12. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 33107-10.

13. Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, et al. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* 2000; 275: 7455-8.

14. Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winnacker EL. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* 1996; 70: 4724-8.

15. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 30: 165-8.

16. Rieger R, Edenhofer F, Lasmez C, Weiss S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 1997; 3: 1383-8.

17. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 1997; 3: 1376-82.

18. Kellermann O, Kelly F. Immortalization of early embryonic cell derivatives after the transfer of the early region of simian virus 40 into F9 teratocarcinoma cells. *Differentiation* 1986; 32: 74-81.

19. Mouillet-Richard S, Mutel V, Loric S, Tournais C, Launay JM, Kellermann O. Regulation by neurotransmitter receptors of serotonergic or catecholaminergic neuronal cell differentiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 9186-92.

20. Mouillet-Richard S, Laurendeau I, Vidaud M, Kellermann O, Laplanche JL. Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes Infect* 1999; 1: 969-76.

21. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, et al. Signal transduction through prion protein. *Science* 2000; 289: 1925-8.

22. Lehmann S, Milhavel O, Mange A. Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 39-46.

#### TIRÉS À PART

O. Kellermann.