

H. REZAEI<sup>1</sup>, J. GROSCLAUDE<sup>1</sup>,  
F. EGHIAIAN<sup>1, 4</sup>, T. HAERTLE<sup>2</sup>,  
M. MARDEN<sup>3</sup>, M. KNOSSOW<sup>4</sup>,  
P. DEBEY<sup>5</sup>

<sup>1</sup> INRA, Unité de Virologie et  
Immunologie Moléculaires, Domaine  
de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas  
Cedex

<sup>2</sup> INRA, Laboratoire d'Etude des  
Interactions des Molécules  
Alimentaires, Centre de recherche de  
Nantes, rue de la Géraudière,  
BP 71627, F-44316 Nantes Cedex 03

<sup>3</sup> U473, INSERM, 84 rue du Général  
Leclerc, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre  
Cedex

<sup>4</sup> CNRS, Laboratoire d'Enzymologie et  
Biologie Structurale, F-91198 Gif-sur-  
Yvette

<sup>5</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle,  
57 rue Cuvier, F-75231 Paris Cedex 05

Courriel : rezaei@jouy.inra.fr

# Lien entre type génétique et résistance des ovins à la Tremblante : une approche structurale et physico-chimique

## 1 / Un tableau génétique providentiel pour les approches structurales

Chez les ovins des mutations du gène codant pour la protéine cellulaire prion ( $\text{PrP}^c$ ) créent un polymorphisme biochimique conférant des phénotypes contrastés soit de résistance soit de sensibilité à la tremblante, dans le contexte des souches rencontrées dans la

### Résumé

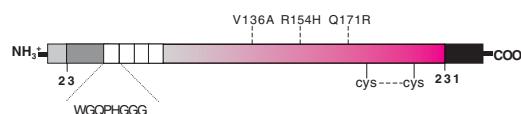
Le polymorphisme génétique de la protéine prion ovine associé à des degrés divers de résistance ou de sensibilité à la tremblante ouvre une voie féconde pour comprendre le lien entre les propriétés structurales de la protéine et le mécanisme du développement de la pathologie. Les travaux menés par les équipes de l'INRA, en collaboration avec d'autres équipes nationales, ont apporté des renseignements inattendus sur la stabilité et la convertibilité des variants naturellement rencontrés dans les troupeaux européens. Les mécanismes, au niveau atomique, sous-tendant ces caractéristiques ont pu être explicités par la détermination cristallographique de la structure tri-dimensionnelle de la protéine ovine, apportant en même temps une première information expérimentale sur la structure de la protéine pathologique. Des formes intermédiaires de repliement, sous forme d'oligomères solubles, ont pu être isolées *in vitro*, et se sont révélées neurotoxiques, ouvrant de nouvelles pistes de recherche vers les déterminants respectifs de la mort neuronale et de la réPLICATION du prion.

plupart des pays européens. Ainsi sont hautement sensibles des moutons portant en positions 136, 154 et 171 (selon la numérotation des acides aminés sur la séquence de la protéine  $\text{PrP}$  ovine) respectivement une valine (V), une arginine (R) et une glutamine (Q). A l'inverse, sont réputés résistants des moutons portant aux mêmes positions une alanine (A), une arginine (R) et une arginine (R) (figure 1). C'est une preuve de l'importance de la protéine  $\text{PrP}$  elle-même dans le développement de la pathologie, quelle que soit la nature de l'agent infectieux.

Un signe caractéristique des maladies à prions est l'apparition d'une forme modifiée de cette protéine, appelée  $\text{PrP}^{sc}$ , qui diffère de la forme normale par des propriétés structurales et physico-chimiques. Le processus de la conversion  $\text{PrP}^c \leftrightarrow \text{PrP}^{sc}$  est un problème de repliement de la protéine sous l'effet de perturbations dans l'environnement cellulaire et extra-cellulaire induites par le processus infectieux. On peut donc penser que le mécanisme même de la résistance ou de la sensibilité des animaux à la tremblante repose en grande partie sur les propriétés structurales intrinsèques des variants de la protéine et leur propension à perdre leur structure normale.

**Figure 1.** Les sites majeurs de polymorphisme de la protéine PrP ovine

La moitié N-terminale de la protéine (à gauche) est peu structurée, flexible, et porte un motif répété qui fixe des ions métalliques comme le cuivre. La moitié C-terminale (à droite) porte les trois sites de mutation principaux comptables du polymorphisme génétique des races de mouton ; c'est cette partie qui subit les modifications conformationnelles lors de la conversion de la forme normale en forme pathologique.



Parmi les différentes approches utilisées à l'INRA dans le but d'élucider les mécanismes biologiques, cellulaires et moléculaires régissant les phénomènes de sensibilité et de résistance, l'approche structurale et physico-chimique visant à comparer la dynamique conformationnelle des différents variants est donc particulièrement appropriée. Elle s'inscrit dans les approches communes à l'étude de plusieurs maladies liées au mauvais repliement d'une protéine conduisant à la formation de dépôts fibrillaires, ou « amyloïdoses », comme la maladie d'Alzheimer. C'est donc un domaine largement exploré par les structuralistes en quête de voie thérapeutique, où l'existence des variants de sensibilité et résistance à la tremblante est un atout majeur.

## 2 / Des outils biochimiques et biophysiques opportunément réunis

Pour disposer des quantités de protéine nécessaires aux approches de la Biologie Structurale nous avons fait le choix de travailler avec une protéine PrP simplifiée, facile à produire dans des bactéries recombinantes : elle est réduite à son seul squelette peptidique (c'est-à-dire ce qui est directement codé par le gène de structure), sans le motif glyco-lipidique qui l'ancre à la paroi cellulaire par son extrémité C-terminale et sans les deux chaînes glucidiques de compositions variables qui lui donnent son hétérogénéité. Il est reconnu que ces motifs ont une importance dans le transport de la protéine à l'intérieur de la cellule mais que le repliement de la molécule n'est influencé que par le comportement de la chaîne peptidique.

Ce mode d'expression permet non seulement de reproduire tous les variants rencontrés naturellement, mais aussi de produire des mutants artificiels permettant de décomposer des étapes de la conversion. Le protocole de purification (Rezaei *et al* 2000) garantit l'intégrité de la chaîne, alors que la plupart des structuralistes ont travaillé sur la seule partie C-terminale, amputée de la moitié N-terminale par des dégradations en cours de production.

Pour mettre en œuvre les techniques d'analyse structurale, de gros appareillages sont nécessaires, le plus souvent implantés dans des laboratoires de Biophysique peu habitués aux contraintes de confinement propres à la protéine prion. L'INRA a pu réunir dans un laboratoire de niveau L2 (Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas) et au Laboratoire d'Études des Interactions des Molécules Alimentaires (LEIMA - Nantes) la plupart des appareils nécessaires ou convaincre, avec l'appui de Dominique Dormont, les partenaires d'accepter de manipuler la protéine recombinante (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique, CNRS, Orsay et European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble).

## 3 / Le paradoxe de la stabilité et de la convertibilité des variants ovins

Dès les premières expériences comparatives des formes normales de la protéine (Rezaei *et al* 2000), le variant VRQ, lié à la plus grande sensibilité, apparut plus stable, plus compact, plus résistant à la protéolyse que le variant ARR, lié à la résistance. Or S. Prusiner avait prévu que la sensibilité devait être associée au variant le moins stable, le plus malléable, le plus facilement converti dans la forme pathologique.

La contradiction fut levée par l'étude des intermédiaires de repliement de chacun des variants : sous l'effet d'un traitement thermique approprié, qui fournit l'énergie nécessaire au déploiement de la protéine, VRQ évolue irréversiblement vers une forme dite « intermédiaire de repliement », mimant la protéine pathologique (de structure riche en feuillets bêta, oligomérique, résistante aux protéases) alors qu'ARR évolue de manière réversible vers un état désordonné, sans feuillets bêta. Cet intermédiaire de déploiement est amyloïdogène, c'est-à-dire qu'il conduit à la formation de fibrilles amyloïdes (Rezaei *et al* 2002).

L'étude cinétique de ce processus de conversion a permis de montrer que la vitesse de conversion est plus importante pour les variants associés au phénotype sensible (VRQ ou ARQ) que pour le variant associé à la résistance (ARR). En transposant ces résultats dans le contexte cellulaire on peut considérer que les variants « sensibles » conjuguent à l'état natif une plus grande résistance à l'action des protéases de nettoyage, donc un plus grand temps de résidence propice à des interactions avec des molécules pathogènes, et si l'environnement crée des conditions propices au déploiement, une propension plus grande à se transformer en intermédiaire amyloïdogène. Il faut souligner néanmoins que le variant ARR se transforme lui aussi en une forme amyloïdogène, et que si des facteurs de stabilisation particuliers sont réunis, alors ARR aboutit aussi à l'accumulation de protéine pathologique, ce qui peut expliquer l'appari-

tion d'animaux malades bien qu'homozygotes ARR.

L'approche structurale nous permet donc de proposer une base cinétique du degré de résistance ou de sensibilité à la tremblante fonction de la forme génétique de la protéine, selon un mécanisme « vectoriel » dans lequel la vitesse de conversion et la clearance (le temps de vie de la protéine) sont en compétition (figure 2).

## 4 / Les enseignements de la cristallographie

La cause des différences de stabilité entre les formes natives des variants réside dans les arrangements atomiques des acides aminés les constituant, favorisant des interactions stabilisatrices entre résidus, ou au contraire les empêchant. Une cartographie fine de la structure atomique des molécules peut être obtenue par cristallographie aux rayons X, sous réserve d'obtenir des cristaux de la protéine. C'est ce que nous avons réussi grâce à la co-cristallisation des différents variants avec le fragment Fab (la partie active dans la reconnaissance de l'antigène) d'un anticorps monoclonal obtenu au laboratoire (VRQ14).

Nous avons pu ainsi établir la structure tridimensionnelle cristallographique des différents variants ovins à un degré très fin de résolution (Eghiaian *et al* 2004). Cette étude a permis de mettre en évidence deux points importants :

1) Des différences locales aussi bien dans l'environnement de la position 136 que de la

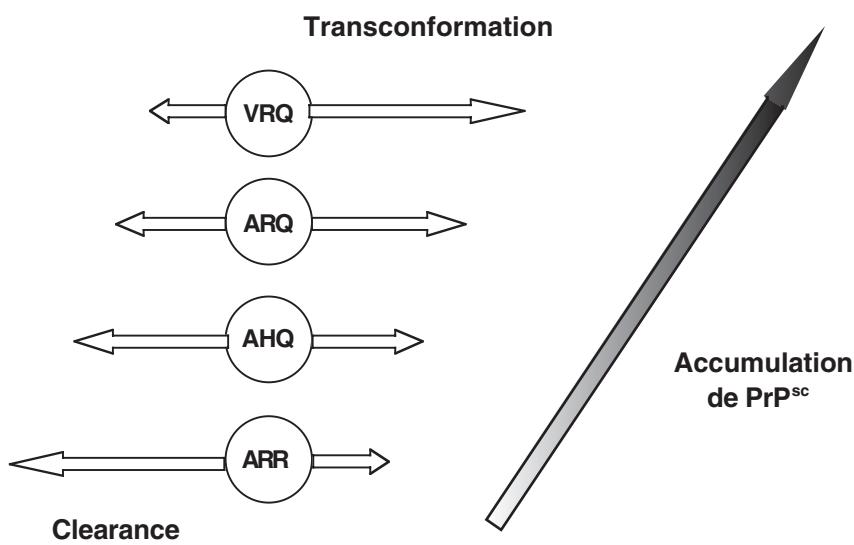
position 171 permettent d'expliquer les différences de stabilité thermodynamique entre variants (figure 3). VRQ cumule des liaisons stabilisatrices aux deux positions, alors qu'ARR ne dispose pas de ces « verrous » et que ARQ n'en a qu'un en position 171.

Ces reliefs locaux très différents peuvent jouer dans les interactions de la protéine avec les partenaires normaux ou pathologiques de la protéine PrP.

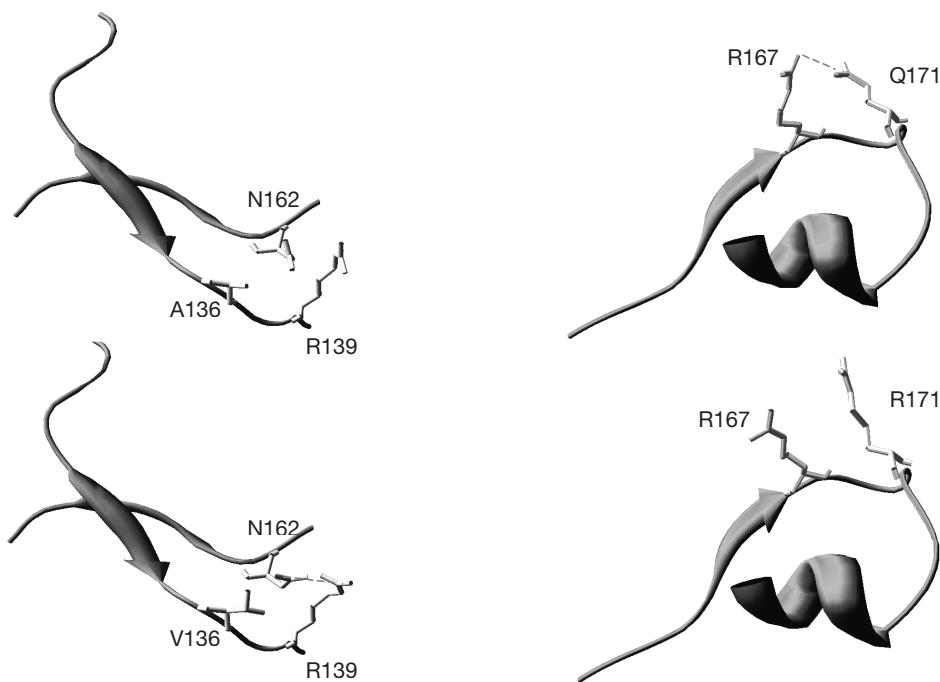
2) L'anticorps VRQ 14 reconnaît aussi bien les formes PrP<sup>c</sup> et PrP<sup>sc</sup> extractives (d'un homogénat de cerveau par exemple) que la protéine recombinante. La structure 3D du co-cristal PrP-VRQ 14 (figure 4) a permis de montrer que l'anticorps « coiffe » l'hélice H2 et sa boucle de jonction avec l'hélice H3 ce qui démontre que toute cette partie de la molécule est une région invariante durant le processus de conversion pathologique. Les modifications pathologiques ne concerneraient donc qu'une partie restreinte de la molécule.

La connaissance de la structure fine des différents variants nous permet de déterminer rationnellement quels résidus seront déterminants pour la stabilité de la protéine et son aptitude à être convertie en une forme pathologique. Nous accédons donc à la possibilité de créer des mutants soit d'hypersensibilité soit de résistance absolue à la tremblante qui pourront être exprimés dans un système cellulaire tel que les cellules Rov pour tester leur aptitude à répliquer un prion infectieux.

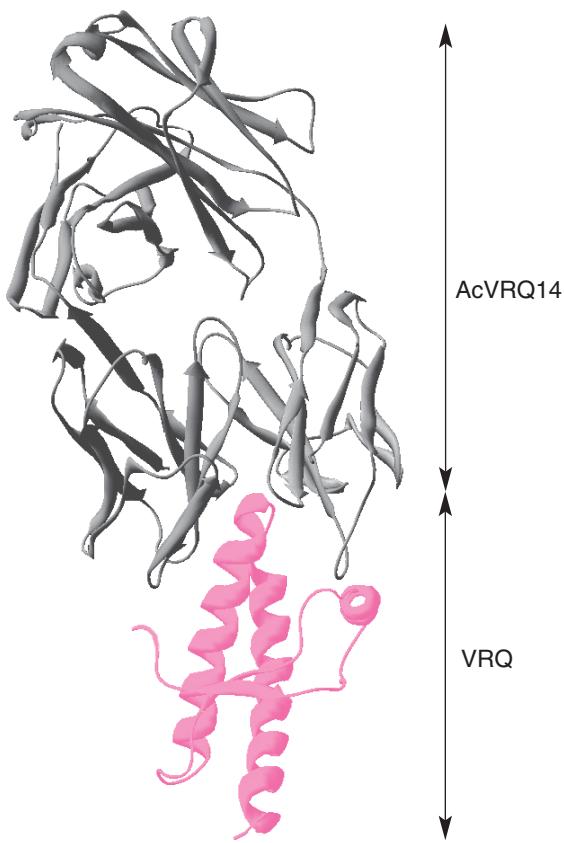
**Figure 2.** Schéma vectoriel de l'accumulation de la PrP<sup>sc</sup>. Le processus d'accumulation de la forme anormale est le résultant vectoriel de la dégradation de la protéine PrP<sup>c</sup> par les protéases endocellulaires (clearance) d'une part et du processus de conversion pathologique qui confère à la protéine une résistance à la protéolyse, d'autre part. La longueur des flèches illustre le rapport des vitesses des deux processus pour chaque variant. Le gradient de l'accumulation de protéine anormale qui en résulte correspond au classement des variants dans l'échelle de sensibilité à la tremblante des animaux porteurs des génotypes correspondants.



**Figure 3.** Structure atomique de la protéine PrP ovine au voisinage des positions 136 et 171. La substitution A136V (à gauche) permet un verrouillage du rapprochement des deux segments de la chaîne peptidique au niveau des résidus N162 et R139 (en bas). La substitution Q171R (à droite) empêche le pont entre R167 et Q171 de se former, et provoque même une répulsion entre R167 et R171, fragilisant ainsi la structure du variant ARR.



**Figure 4.** Structure 3D cristallographique du complexe VRQ- Fab VRQ14.



## 5 / De petits oligomères solubles de la protéine prion aux propriétés biochimiques et biologiques contrastées : une clef de la mort neuronale ?

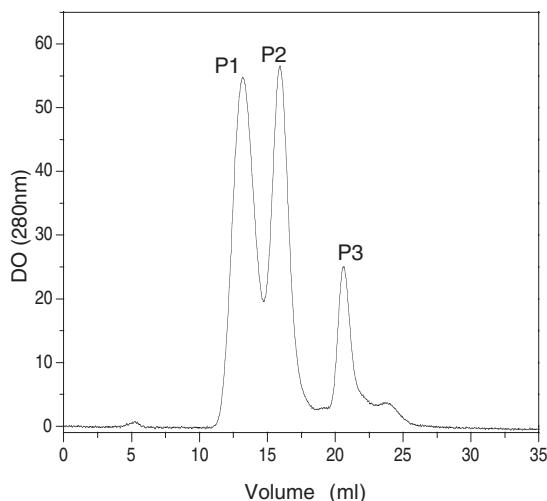
Des études récentes du chemin de dépliement/repliement de la protéine ovine, en utilisant le protocole thermique déjà mis au point pour la mise en évidence des intermédiaires de dépliement, ont permis d'isoler des oligomères solubles de petite taille (figure 5).

Leur caractérisation a fait apparaître des traits physico-chimiques, biochimiques et antigéniques très tranchés non seulement entre ces oligomères et le monomère natif, mais aussi entre les deux espèces oligomériques.

Dans les maladies amyloïdes, notamment neurodégénératives, il est de plus en plus soupçonné que ce ne sont pas les formes fibrillaires qui provoquent la mort neuronale, mais de petits oligomères des protéines en cause qui seraient toxiques. Dans le champ des maladies à prions les concepts sont en train d'évoluer : de plus en plus les événements liés à la réplication proprement dite du prion infectieux sont disjoints des facteurs provoquant la neurodégénérescence.

Les oligomères obtenus *in vitro* à partir de la protéine ovine recombinante sont des can-

**Figure 5.** Chromatographie d'exclusion en taille des oligomères produits par traitement thermique de la protéine ovine ARQ. P3 est la forme monomérique initiale ; P2 et P1 sont des oligomères solubles, stables, de petite taille (12mer et 36mer respectivement), présentant des configurations différentes de la chaîne polypeptidique.



didats de choix pour tester un éventuel rôle cytotoxique précoce qui pourrait expliquer la mort neuronale en dehors de toute accumulation décelable de protéine pathologique. En collaboration avec une équipe du CEA (Corinne Lasmezas, Fontenay-aux-Roses) nous avons pu tester leur pouvoir cytotoxique sur des neurones embryonnaires de souriceau entretenus en culture primaire : à la différence du monomère ils se sont révélés fortement toxiques, déclenchant un phénomène d'apoptose des neurones. L'équipe de S. Prusiner a récemment annoncé (Legname *et*

*al 2004) l'obtention *in vitro* de formes fibrillaires de la protéine recombinante de souris présentant un pouvoir infectieux comme les prions « naturels » : nous avons également soumis les oligomères de la protéine ovine recombinante à un test de leur pouvoir infectieux sur les souris transgéniques surexprimant la protéine PrP ovine, toujours en cours d'observation.*

Nous développons une collection de mutants artificiels de la protéine ovine à des positions qui influencent la formation de ces oligomères et qui sont en voie d'expression dans des systèmes cellulaires propres à révéler leur pouvoir apoptotique. Nous sommes donc en mesure d'identifier par des voies génétiques les déterminants responsables de la mort neuronale.

## Conclusion

Dans l'éventail des études développées à l'INRA sur la résistance génétique à la tremblante, l'approche par la Biologie structurale des différents variants (de surcroît exprimés dans un système procaryote) pouvait paraître théorique et éloignée du contexte cellulaire ou des réalités de terrain. Au-delà des données structurales, biophysiques et thermodynamiques complexes, nous avons pu faire émerger des informations qui prennent toute leur signification biologique : identification du socle moléculaire de la sensibilité à la tremblante, prédiction du comportement d'un mutant, mécanisme intime de la neuropathogénèse, information nouvelle sur la structure de la protéine pathologique. Ce sont autant de repères pour des approches thérapeutiques raisonnées ou des schémas de sélection aux risques bien circonscrits.

## Références

- Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hui Bon Hoa G., Haertle T., Grosclaude J., Debey P., 2000. High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. European Journal of Biochemistry, 267, 2833-2839.
- Rezaei H., Choiset Y., Eghiaian F., Treguer E., Mentre P., Debey P., Grosclaude J., Haertle T., 2002. Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. Journal of Molecular Biology, 322, 799-814.
- Eghiaian F., Grosclaude J., Lesceu S., Debey P., Doublet B., Treguer E., Rezaei H., Knosow M., 2004. Insight into the PrPC/PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 101, 10254-10259.
- Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O., Riesner D., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B., 2004. Synthetic mammalian prions. Science, 305, 673-676.

## Abstract

### Link between PrP genotype and sheep scrapie susceptibility: a structural and physicochemical approach

Ovine prion protein genetic variants are associated with scrapie susceptibility or resistance: they pave the

way to understanding the link between protein structural properties and pathogenesis. The studies developed by INRA teams, in association with other national groups, have brought unexpected informations on the stability and conversion of naturally occurring variants in European sheep breeds. The mechanisms underlying

these characteristics were unveiled at the atomic level owing to the crystallographic determination of ovine 3D structure, providing the first experimental insight into the structure of the pathological protein. Unfolding intermediates revealed to be small soluble oligomers,

which were purified and displayed neurotoxic effects on primary embryonic neurones. Mutational approaches are currently being developed to identify structural determinants of neuronal death on the one hand, and of prion replication on the other hand.