

INRA Prod. Anim.,
2004, Numéro
hors série, 51-54

M. MOUDJOU, E. SABUNCU,
D. VILETTE,
A. LEDUR, H. LAUDE

INRA, Virologie et Immunologie
Moléculaires, Domaine de Vilvert,
F-78352 Jouy-en-Josas Cedex

Courriel : moudjou@jouy.inra.fr

Approche immunochimique de la structure de la protéine cellulaire PrPc ovine. Caractérisation d'anticorps discriminant les glycoformes et les allèles de la protéine Prion chez le mouton

L'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), la tremblante du mouton (la scrapie), la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) font partie de la famille des Encéphalopathies

Résumé

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation dans le cerveau d'une forme anormale de la protéine prion, la PrP. La PrP cellulaire est une glycoprotéine membranaire qui a deux sites de glycosylation. La susceptibilité des moutons à la tremblante, la plus répandue des EST, est sous le contrôle d'un polymorphisme génétique en position 136, 154 et 171 de la protéine PrP. Différents travaux ont montré que l'efficacité de la conversion de la PrP normale (PrPc) en PrP anormale (PrPsc) pouvait être influencée à la fois par son degré de glycosylation et par sa séquence primaire en acides aminés. Au cours de notre travail de production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la PrP ovine, nous avons obtenu de nouveaux anticorps discriminant les différentes formes glycosylées de la PrP. Parmi ces anticorps, nous avons montré que certains présentent une affinité différentielle vis-à-vis des allèles de la PrP, essentiellement en position 171. Cette position est connue pour jouer un rôle majeur dans le contrôle de la résistance (Arginine, R171) et de la sensibilité (Glutamine, Q171) des moutons à la tremblante. Ces anticorps représentent de nouveaux outils pour étudier la relation entre le niveau de glycosylation de la PrPc et sa capacité à être convertie en PrPsc. Ils nous permettront également une analyse plus fine du profil électrophorétique des différentes glycoformes de la PrP anormale dans le cadre du typage de souches de prions. Enfin, ces anticorps peuvent être utilisés pour le génotypage rapide des moutons en vue d'une sélection d'animaux résistants à la tremblante et pour la compréhension des bases moléculaires de la résistance à la tremblante conférée par la présence de l'Arginine en position 171 de la PrP.

Spongiformes Transmissibles (EST). En l'absence d'une identification définitive de la nature biologique de l'agent causal, la transformation de la protéine normale, la PrPc, en une protéine anormale, la PrPsc, est très souvent impliquée dans cette maladie (Prusiner 1998). La PrPc est une protéine ubiquitaire, minoritaire (Moudjou *et al* 2001) et est attachée à la membrane plasmique de la cellule par une ancre Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI). Elle possède deux sites de glycosylation et un pont disulfure. Le rôle des chaînes glycosylées dans l'efficacité de conversion de la PrPc en PrPsc reste encore assez mal connu.

Le polymorphisme dans la séquence en acides aminés de la protéine prion, principalement en position 136, 154 et 171, gouverne la susceptibilité des moutons à la tremblante naturelle. Les animaux de génotype VRQ/VRQ ou ARQ/ARQ sont sensibles à la maladie contrairement à ceux de génotype ARR/ARR. Les animaux hétérozygotes en position 171 (VRQ/ARR ou ARQ/ARR) sont modérément sensibles à la tremblante (Laplanche *et al* 1993, Elsen *et al* 1999).

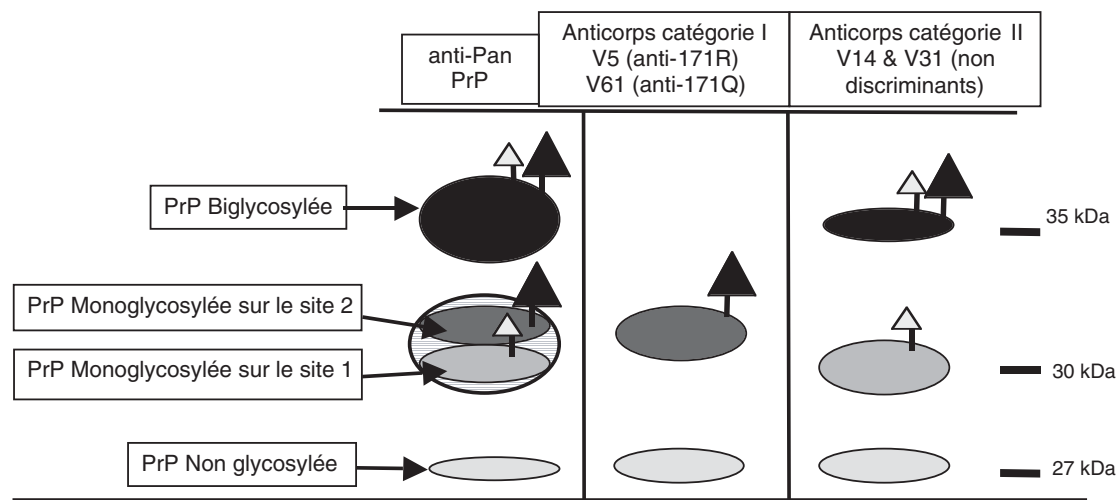
La caractérisation d'anticorps monoclonaux (AcMc) dirigés contre la PrP ovine nous a permis d'isoler une nouvelle catégorie d'anticorps qui présentent une spécificité vis-à-vis des différentes formes de glycosylation et des allèles de la PrP (Moudjou *et al* 2004). Les deux sites de glycosylation de la PrP ovine sont en position Asparagine 184 (site 1) et Asparagine 200 (site 2). Elle peut être exprimée soit sous la forme bi-, mono- (deux glycoformes) ou non glycosylée. Deux classes d'AcMc ont été obtenues, en utilisant la PrP recombinante exprimée dans la bactérie *E.coli* comme antigène (Equipe Biologie Physico-chimique des Prions, VIM, INRA, Jouy-en-Josas). Nous avons montré que ces anticorps se distinguent des AcMc classiques par un profil de reconnaissance de la PrP dépendant de son état de glycosylation. La première catégorie (catégorie I, V5 et V61) reconnaît spécifiquement la forme mono- et non glycosylée de la PrP par western blotting et par immunoprécipitation. La deuxième catégorie (catégorie II, V14 et V31) reconnaît majoritairement les bandes monoglycosylée et non glycosylée, mais possède néanmoins une faible affinité pour la forme biglycosylée de la PrP. Ces nouveaux AcMc nous ont permis de démontrer qu'au niveau de ce qui est communément appelé la bande monoglycosylée, existe en réalité deux protéines de masses moléculaires différentes (figure 1). La bande supérieure de cette bande dite monoglycosylée est détectée par les AcMc de la catégorie I et correspond à la population de la PrP monoglycosylée sur le site 2 de glycosylation (PrP-Mono2). La bande inférieure représente la population de la PrP monoglycosylée sur le site 1 de glycosylation (PrP-Mono1) et est reconnue par les AcMc de la

catégorie II. Ces résultats montrent également que la taille des chaînes des glycanes attachées sur le site 2 est plus grande que celle des polysaccharides présents au site 1 de la PrP ovine, comme cela a été montré par spectroscopie de masse à partir de la PrPsc de souris (Stimson *et al* 1999). L'utilisation d'extrait de cerveaux de souris transgéniques exprimant des mutants de glycosylation dans chacun des deux sites (Laboratoire de Martin Groschup, Allemagne) a permis de confirmer nos résultats. Les épitopes reconnus par ces deux catégories d'anticorps sont probablement conformationnels.

De plus, nous avons montré que l'un des AcMc de la catégorie I (V5) est spécifique de l'allèle ARR alors qu'un autre AcMc (V61) présente une forte affinité pour l'allèle VRQ ou ARQ de la PrP, ceci quel que soit le système d'expression des différentes protéines (chez le mouton, dans des cellules Rov en culture Vilette *et al* 2001, Sabuncu *et al* 2003 ; dans des bactéries Rezaei *et al* 2000). C'est la position 171 Q/R de la protéine PrP ovine qui est déterminante dans la spécificité de ces anticorps.

Ces réactifs représentent le premier exemple d'AcMc permettant une distinction entre les allèles de la PrP associés à la susceptibilité des moutons à la tremblante. Ils pourraient représenter un outil précieux pour différencier des moutons en fonction de l'acide aminé en position 171 (R/R, Q/Q, Q/R) dans un test rapide de sélection génétique, en complément aux tests moléculaires classiques. L'ensemble de ces résultats confirme que des changements de conformations locaux de la molécule de PrP pourraient être

Figure 1. Approche immuno-chimique de la structure de la protéine cellulaire PrPc ovine : récapitulatif des résultats obtenus par western blot et immunoprécipitation avec les anticorps anti-glycoformes et anti-allèles de la protéine PrPc. Les différentes glycoformes de la PrP sont représentées différemment. Les petits triangles clairs correspondent à la chaîne des sucres associée au site 1, alors que les triangles noirs représentent les glycanes présents sur le site 2 de glycosylation de la PrP. La taille des glycanes fixés sur le site 2 est plus importante que celle des glycanes attachés au site 1. Notre modèle propose que les chaînes de polysaccharides contrôlent l'accessibilité des anticorps à la région de la PrP située juste en amont de leur site d'attachement. Une de ces régions contient la position 171 associée à la susceptibilité des moutons à la tremblante.



associés à la substitution d'acide aminé en position 171 et montre que certains épitopes de la PrP, notamment des épitopes spécifiques d'allèles, peuvent être masqués par la présence de glycanes. Enfin, l'utilisation de ces anticorps nous permettra d'aborder les

questions relatives au rôle de chacun des deux sites de glycosylation de la PrP dans le phénomène de conversion, et de mieux caractériser les différentes souches de Prions en analysant finement leur profil glycotypique.

Références

- Elsen J.M., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andréoletti O., Eychenne F., Tien Khang J.V., Poivey J.P., Lantier F., Laplanche J.L., 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of Virology*, 144, 431-445.
- Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M., 1993. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gel electrophoresis. *Genomics*, 15, 30-37.
- Moudjou M., Frobert Y., Grassi J., Labonnardière C., 2001. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *Journal of General Virology*, 82, 2017-2024.
- Moudjou M., Treguer E., Rezaei H., Sabuncu E., Neuendorf E., Groschup M.H., Grosclaude J., Laude H., 2004. Glycan-controlled epitopes of prion protein include a major determinant of susceptibility to sheep scrapie. *Journal of Virology*, 78, 9270-9276.
- Prusiner S.B., 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 95, 13363-13383.
- Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hui Bon Hoa G., Haertlé T., Grosclaude J., Deby 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.
- Sabuncu E., Petit S., Le Dur A., Lan Lai T., Vilotte J.L., Laude H., Vilette D., 2003. PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *Journal of Virology*, 77, 2696-2700.
- Stimson E., Hope J., Chong A., Burlingame A.L., 1999. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry*, 38, 4885-4895.
- Vilette D., Andréoletti O., Archer F., Madelaine M.F., Vilotte J.L., Lehmann S., Laude H., 2001. Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 98, 4055-4059.

Abstract

Characterisation of monoclonal antibodies discriminating the glycoforms and alleles of the sheep prion protein

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are fatal neurodegenerative diseases characterised by the accumulation in the brain of an abnormal form of the host PrP protein. PrP is a cell surface protein with two glycosylation sites. Susceptibility to sheep scrapie, the most widely spread TSE, is controlled by a polymorphism of the ovine Prnp gene at amino acid positions 136, 154 and 171. Different studies have shown that the efficiency of conversion of normal PrP (PrPc) into the disease-associated form (PrPsc) is influenced by its carbohydrate moiety and also by its amino acid sequence.

In the present work, we characterised four glycoform-dependent monoclonal antibodies raised against

sheep PrP. We demonstrate that these antibodies discriminate the PrP monoglycosylated species. Interestingly, the recognition of PrP by two of these antibodies was strongly influenced by the amino acid present at position 171, i.e. either Gln or Arg. This polymorphism is known as being the main determinant of susceptibility (Glutamine, Q171) and resistance (Arginine, R171) to scrapie in sheep.

In conclusion, the monoglycoform-assigned and the allotype-restricted antibodies described here, should provide further opportunities to investigate the involvement of each glycan chain into PrP conversion in relation with prion strain diversity. They might also be of interest for fast animal genotype typing and for understanding the basis of the resistance conferred by the presence of Arginine at amino-acid 171 of PrP.