

Adresse actuelle :

Jeune Equipe INRA 'Morphogenèse du
système nerveux des Chordés', CNRS, UPR
2197 DEPSN, Institut Fessard, Avenue de
la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette

Courriel : joly@iaf.cnrs-gif.fr

Conservation des " prions " chez les Vertébrés

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont entrées relativement récemment, mais de manière fracassante, parmi les grands sujets d'inquiétude de notre époque. Ces maladies sont non conventionnelles en ce sens que leur agent étiologique est très certainement une protéine, le "prion". Des données récentes indiquent que bien qu'il existe des barrières d'espèces entre les différents Mammifères, elles ne sont pas strictes. Ainsi, les EST sont fortement suspectées de passer des Bovins à l'Homme par l'alimentation, posant de redoutables problèmes de santé publique. Cet article examine les données actuelles concernant l'existence de protéines de type prion chez les autres Vertébrés, en particulier les Poissons, autre source importante de l'alimentation humaine, et leur ressemblance avec les prions mammaliens, d'où pourrait découler une éventuelle dangerosité.

Le mot prion a été créé en 1982 pour nommer l'agent étiologique présumé des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), un groupe de maladies neuro-dégénératives qui affecte le système nerveux central de l'Homme et d'autres Mammifères. Il fait clairement référence au fait que cet agent est de nature protéique (*prion* = *proteïnoaceous infectious agent*). Les protéines prions présentent deux isoformes (appelées aussi conformères) : PrP^c, dite cellulaire ou normale, et PrP^{Sc}, résistante aux protéases. L'"hypothèse prion" propose que l'isoforme PrP^{Sc} a la capacité de transmettre sa conformation anormale aux PrP^c, ce qui conduit à une accumulation de PrP^{Sc} dans les cellules nerveuses et cause ainsi la maladie.

Le présent article vise à faire le point sur la conservation des gènes codant pour des protéines ressemblant structurellement aux prions, déjà isolés chez des Vertébrés non Mammifères (Oiseaux et Tortues), et à examiner la possibilité que de tels gènes soient plus largement présents chez ces animaux, en particulier chez les Poissons.

Les glissements successifs de la définition originelle des prions sont source de confusion, d'une part pour la communauté scientifique et d'autre part pour le grand public. Nous utiliserons donc dans cet article le terme prion pour désigner strictement les protéines qui sont reconnues comme étant les agents des ESST chez les Mammifères. Nous nommerons PrP les autres protéines dont il sera essentiellement question dans cet article. Elles ressemblent aux prions soit par leur séquence primaire, soit par leur propriété d'acquies et transmettre des conformations alternatives. Dans cet article, le prion sera donc une PrP infectieuse et pathogène de Mammifères, et les PrP un ensemble de protéines très hétérogènes, comme nous le discuterons.

Résumé

Le terme prion a tendance à être utilisé pour désigner un nombre de plus en plus vaste de protéines souvent très divergentes. L'état actuel des connaissances permet de conclure à l'existence de "prions" potentiellement pathogènes chez les Mammifères uniquement. Des protéines de la même famille ont été trouvées chez les Oiseaux et les Tortues. Enfin, aucun homologue des "prions" n'a pu être mis en évidence chez les Poissons, en dépit de recherches approfondies. Une révision de la nomenclature de ces molécules semble donc s'imposer, à des fins de précision scientifique et d'information claire du public.

Conservation évolutive des PrP chez les Vertébrés

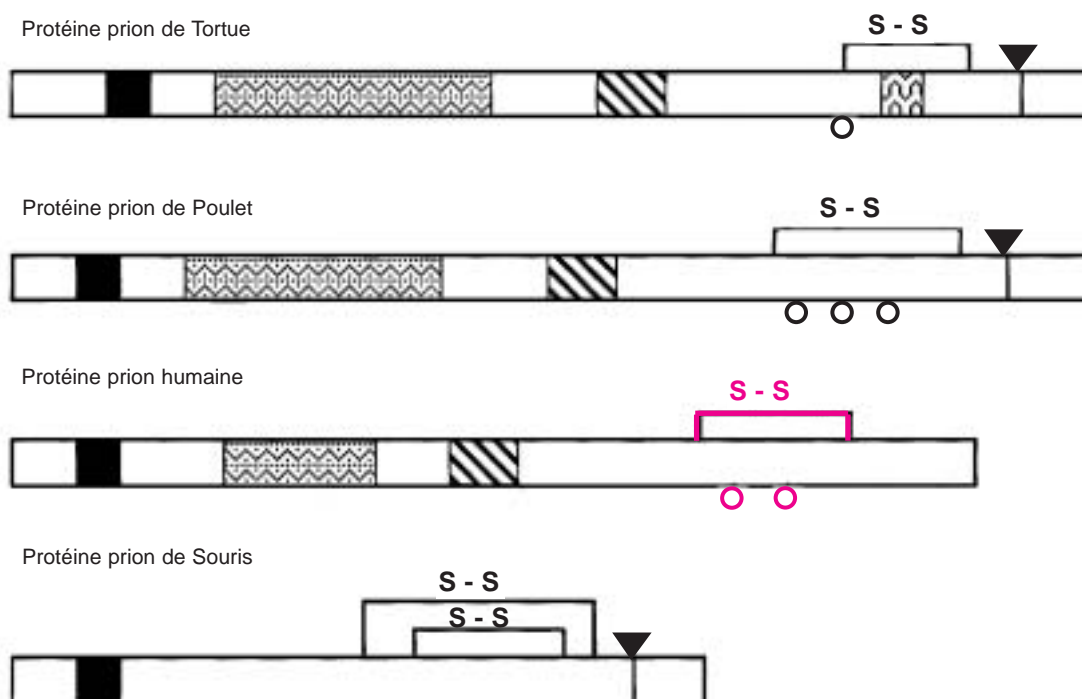
Les gènes *Prp* appartiennent à une superfamille génique qui comprend les différents orthologues *Prp* connus chez de nombreux Mammifères et Oiseaux, et les gènes *doppel*, qui sont des paralogues provenant d'une duplication en tandem, connus chez la Souris, le Rat et l'Homme. Cette duplication évolutive probablement récente a donc eu comme résultat, chez ces espèces au moins, la présence de deux gènes similaires et proches l'un de l'autre sur le même chromosome. Un seul article traite de la conservation évolutive des PrP entre plusieurs classes de Vertébrés (27 protéines de Mammifères et 9 d'Oiseaux, Wopfner *et al* 1999). Au sein des Mammifères, la conservation des PrP est forte (plus de 90 % d'identité). Entre les Mammifères et les Oiseaux, l'homologie globale est faible (environ 40 %). Cependant, malgré les quelques 130 millions d'années d'évolution divergente entre ces deux groupes d'animaux, il existe des éléments structuraux conservés entre les PrP aviaires et mammaliennes : un domaine hydrophobe fortement conservé, précédé de plusieurs motifs en tandem et une région basique amino-terminale. Plus récemment une PrP de Tortue a été isolée (Simonin *et al* 2000), ce qui permet d'inférer l'existence de protéine(s) PrP chez les espèces situées à la

L'homologie entre PrP de mammifères est voisine de 90%, elle est beaucoup plus faible avec les PrP des autres vertébrés.

base du phylum des Amniotes (c'est-à-dire des Vertébrés vraiment terrestres - à l'exclusion donc des Amphibiens, qui sont apparus il y a environ 250 millions d'années). Cette protéine de Tortue possède environ 40 % d'homologie avec les PrP de Mammifères et 60 % avec celles d'Oiseaux. Selon les auteurs, sa structure secondaire est proche de celle des prions de Mammifères (figure 1). Il existe toutefois des différences notables dans le nombre et la nature des répétitions (10 hexamères chez la Tortue, 6 à 9 chez les Oiseaux, et 5 octamères chez les Mammifères). Dans le domaine hydrophobe très conservé, supposé être à l'origine des changements de conformation, la protéine PrP de Tortue possède une histidine. Or, il a été montré que, dans certains cas au moins, les PrPc possédant cet acide aminé perdent la propriété de changer de conformation au contact d'une PrPSc (Salmona *et al* 1999). Il est donc possible que les PrP de Tortue ne possèdent pas la propriété biochimique caractéristique des prions (changement de conformation spatiale) qui les rend pathogènes.

Ce n'est pas la seule différence analysée et reconnue entre les prions mammaliens et les PrP des autres Vertébrés. Ainsi, par exemple, Marcotte et Eisenberg (1999) ont aussi démontré que la protéine PrP de Poulet ne lie pas le cuivre, alors qu'il s'agit d'une propriété caractéristique des prions mammaliens. Ceci

Figure 1. Conservation de la structure des protéines prion chez les Vertébrés (adapté d'après Simonin *et al* 2000). La structure primaire de ces protéines est peu conservée chez les Vertébrés (voir texte), cependant on retrouve des motifs semblables dans des dispositions voisines, signant l'appartenance de ces molécules à la même famille. Un point important à noter est que ces analogies ne signifient pas que les propriétés biochimiques des protéines de Mammifères, d'Oiseaux et de Tortue sont identiques, en particulier en ce qui concerne les possibilités de repliement. Il est également à souligner que les caractéristiques structurales et les propriétés n'ont été analysées en détail que chez les Mammifères (en rouge), pour les autres espèces il s'agit de sites putatifs inférés à partir de la séquence uniquement.



démontre l'existence de domaines aux fonctions différentes dans ces diverses molécules.

Par ailleurs, l'organisation structurale globale des PrP (domaine hydrophobe et répétitions en tandem) n'est pas propre à cette famille de protéines. Certaines protéines liant l'ARN possèdent aussi une organisation globale tout à fait semblable (en particulier des répétitions d'acides aminés dans la région amino-terminale) et une suite d'acides aminés hydrophobes identique ou semblable à celle que l'on trouve dans les PrP.

En résumé, il apparaît clairement que les éléments structuraux qui caractérisent les prions mammaliens ne se retrouvent pas tous dans les PrP d'autres Vertébrés, et que, en revanche, certaines des caractéristiques des prions se retrouvent dans des protéines de familles très différentes.

Des études récentes de génomique comparée (par exemple, sur des levures, Malpertuy *et al* 2000) montrent clairement que la plupart des familles de gènes sont conservées au cours de l'évolution, même si certaines espèces possèdent parfois plus de copies des gènes homologues, à la suite d'événements de duplication partielle ou totale du génome, ou, au contraire, ont un nombre inférieur de gènes d'une famille donnée. Une autre situation, relativement rare, est l'apparition d'une nouvelle famille de gènes, dont les membres se maintiennent et se multiplient dans un phylum donné. Dans l'état actuel des connaissances, il semble bien que la famille des gènes de type PrP fasse partie de ce deuxième type, et soit propre au phylum des Vertébrés ou à un sous-ensemble de ce phylum. Ces gènes sont bien conservés chez les Mammifères, et divergent très rapidement chez les autres Amniotes. Dans quel groupe va-t-on perdre leur trace ?

Une PrP chez les Poissons : état de l'art et hypothèses

Les "Poissons" : un ensemble complexe

Le terme "Poissons" (définis dans le dictionnaire Robert comme des Vertébrés nageant dans l'eau et pourvus de nageoires) est un mot du langage courant qui n'est en fait pas pertinent du point de vue du classificateur ou de l'évolutionniste, car il englobe des animaux appartenant à plusieurs groupes phylogénétiques. A l'intérieur des Poissons osseux (il ne sera pas question ici des Poissons cartilagineux ou Chondrichthyens, comme les Requins et les Raies), les Actinoptérygiens (définis par la présence de nageoires rayonnées, et dont font partie les Téléostéens qui sont les Poissons les plus couramment consommés) ont divergé des Sarcoptérygiens (définis par la présence de nageoires charnues, et dont font partie les Amniotes) il y a environ 400 millions d'années (figure 2). Des gènes *Prp* sont connus chez les Mammifères, Oiseaux, et une espèce

de Tortue. Il est donc clair qu'il eût été, d'un strict point de vue phylogénétique, plus pertinent de rechercher la présence de gènes *PrP* d'abord chez les animaux les plus proches des Mammifères, Oiseaux et Tortues, c'est-à-dire les reptiles (serpents et lézards) et les amphibiens (Tétrapodes), puis ensuite les poissons Sarcoptérygiens actuels (Dipneustes, Polyptères), car ces lignages ont divergé relativement récemment de ceux qui mènent aux Mammifères, et seulement ensuite chez les poissons Actinoptérygiens.

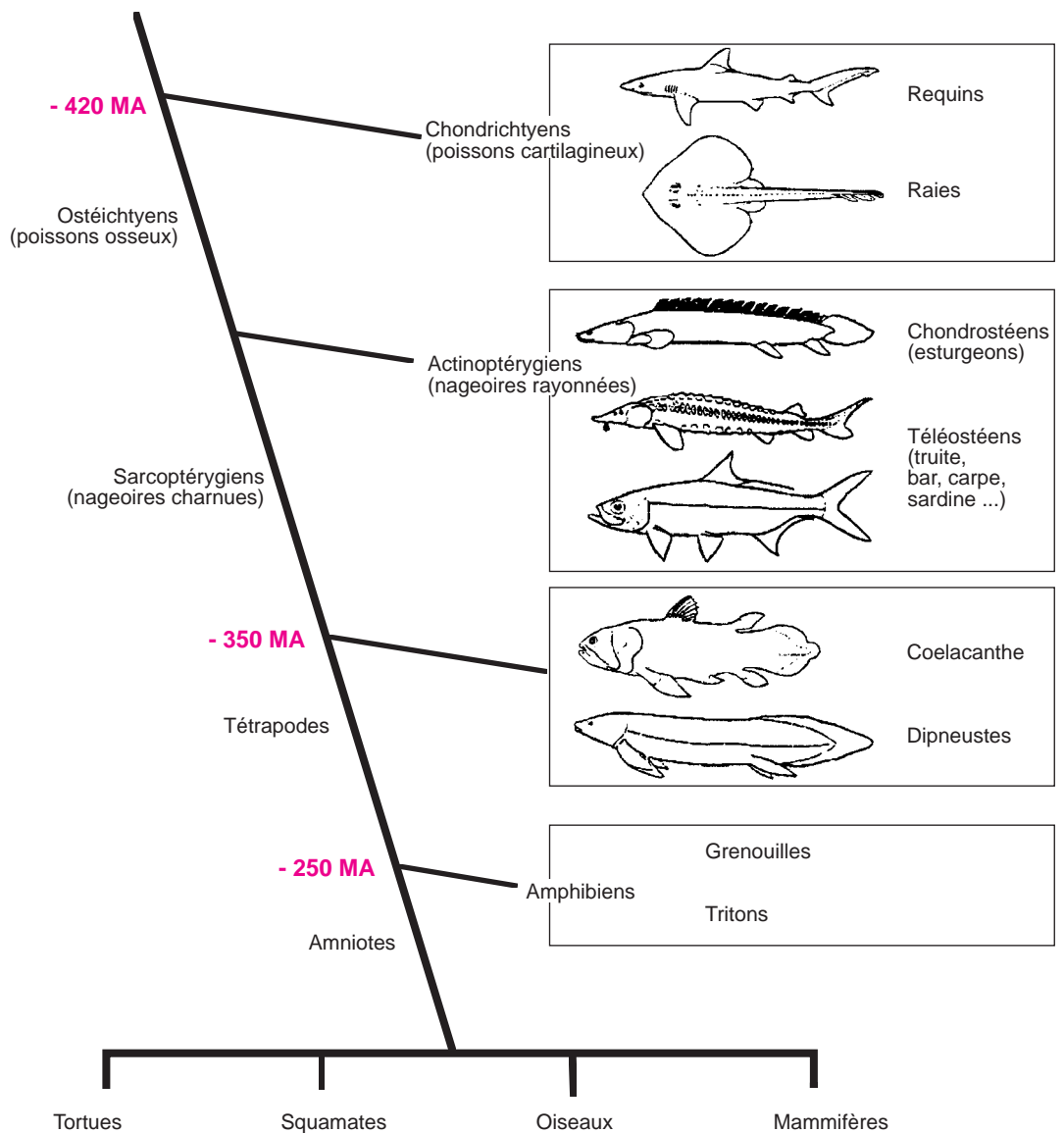
Cependant, tous les poissons d'intérêt économique en aquaculture - à l'exception des Esturgeons - appartiennent au groupe des Téléostéens. C'est surtout en raison d'une alimentation des poissons d'élevage auparavant largement assurée par des protéines provenant d'animaux terrestres, qu'il est apparu prioritaire de rechercher les *PrP* chez les Poissons Téléostéens. Une certaine émotion, dans la presse grand public, avait en effet suivi la publication d'une note rapportant la possible existence, chez une espèce non précisée de Saumon, d'une protéine de type PrP (Gibbs et Bolis 1997). Les arguments étaient toutefois très indirects puisque ce travail avait simplement montré que, en Western blot, un anticorps anti-PrP humaine (3F4) reconnaissait un épitope dans un extrait de protéines de cerveau d'une espèce de Saumon. Cela constituait toutefois une base pour rechercher des protéines de type PrP chez les Poissons, en particulier les Salmonidés.

Les recherches directes d'événements PrP de poissons

Notre équipe de recherche a commencé par reproduire cette expérience chez la Truite *Oncorhynchus mykiss* et par la suite tenté, sans succès, d'isoler une protéine PrP par plusieurs approches. En particulier, le criblage (800 000 clones) d'une banque d'expression de cerveau de Truite a été réalisé avec l'anticorps 3F4. Sur les 63 clones positifs analysés, un seul s'est montré porteur d'une séquence protéique de type RNA-binding (protéines se liant à l'ARN, de la famille EWS, et donc sans rapport fonctionnel avec les PrP) dans laquelle un motif hydrophobe de 6 acides aminés identique à celui du PrP avait pu entraîner une reconnaissance par l'anticorps 3F4. Nous suggérons donc que les résultats obtenus avec l'anticorps 3F4 sur des cerveaux de Salmonidés (hybridation croisée) n'indiquent pas nécessairement la présence d'une molécule de la famille des PrP dans le génome des Poissons. Il est à signaler, à ce propos, que d'une part l'anticorps 3F4 ne fournit pas de résultats probants chez une autre espèce de Poisson testée (le Médaka, *Oryzias latipes*, poisson utilisé comme modèle, notamment en biologie du développement et en génétique) et que, d'autre part, un autre anticorps utilisé dans la recherche de prions chez les Mammifères (2D6) donne des résultats négatifs chez la Truite comme chez le Médaka. Outre ce criblage par anticorps, nous avons également effectué des criblages d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau de Médaka

Figure 2. Arbre phylogénétique des Gnathostomes (Vertébrés à mâchoires) actuels.

La radiation entre animaux à squelette cartilagineux (Chondrichthyens) et à squelette osseux (Ostéichthyens) s'est faite il y a environ 420 millions d'années (MA). Puis les Actinoptérygiens (qui comprennent les Téléostéens et quelques autres groupes, par exemple les Chondrostéens -Esturgeons) ont divergé des Sarcoptérygiens. Les Tétrapodes sont apparus à partir d'un rameau de Sarcoptérygiens il y a environ 350 MA. Les Sarcoptérygiens actuels sont donc représentés par les Tétrapodes, et quelques autres groupes ou espèces (les Dipneustes ou poissons pulmonés, et le coelacanthe ou *Latimeria*). Noter que l'existence de protéines PrP n'est documentée que chez certains Amniotes. Les Poissons d'intérêt économique appartiennent quasi-exclusivement au groupe des Téléostéens (qui appartiennent aux Actinoptérygiens), et aucun gène PrP n'a actuellement été isolé chez des animaux de ce groupe.



avec des sondes nucléotidiques correspondant aux régions codantes des gènes *PrP* de Souris et de Mouton. Là encore, aucun signal d'hybridation probant n'a pu être obtenu. Enfin, nous avons tenté une approche par PCR : des ADN complémentaires ont été synthétisés à partir d'ARNs messagers extraits de cerveaux de Médaka adulte, et nous avons choisi des oligodéoxynucléotides dégénérés à partir des données de séquence publiées sur les gènes *PrP* (deux courtes régions conservées). Aucune bande exploitable n'a pu être obtenue après PCR. Tous nos efforts de recherche directe de gène *PrP* chez les Poissons se sont donc soldés par des échecs.

INRA Productions Animales, mai 2001

La recherche dans les banques de séquence

Les recherches informatiques dans les banques de séquences d'ADN du poisson-zèbre n'ont pas permis d'identifier de *PrP* (voir le site web <http://www.mad-cow.org>). Plusieurs centaines de milliers d'étiquettes (ou EST pour Expressed Sequence Tags : séquences partielles) ont pourtant été séquencées chez cette espèce et une bonne partie d'entre elles provient de banques construites à partir d'ARNs de cerveau adulte. Le même type d'approche effectuée chez le

Xénope n'a pas non plus conduit à identifier de gène *PrP*.

Il apparaît donc qu'aucun homologue de *Prp* ou de *doppel* n'a été retrouvé chez les Vertébrés Anamniotes ("Poissons" ou Amphibiens). Quoiqu'il en soit, le Sanger Center (important centre de séquençage basé en Angleterre) a choisi de compléter la séquence du génome du Poisson-zèbre (*Danio rerio*) en second après celui de l'Homme, et ce projet devrait être achevé vers fin 2002 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/). On pourra donc prochainement ré-examiner ce problème d'un éventuel *Prp* chez les Téléostéens à partir de données exhaustives.

Pour identifier un gène *PrP* chez ces espèces, une piste considérée comme intéressante consiste à exploiter l'homologie claire qui a été établie entre d'une part le gène *KIAA0168* humain (gène de fonction inconnue), qui est le plus proche voisin chromosomique du *Prp* et du *doppel* chez l'Homme, et d'autre part une séquence partielle (EST) du poisson-zèbre. Il semble donc que pour trouver un éventuel *Prp* de poisson-zèbre, il faille faire l'hypothèse d'une synténie (conservation des relations de voisinage entre gènes) entre les Mammifères et les Téléostéens dans cette région chromosomique, puis partir de l'homologue Poisson relativement bien conservé du gène *KIAA0168*, et rechercher les gènes voisins sur le chromosome du Poisson-zèbre. Le fait que cette approche très indirecte soit envisagée indique clairement, *a contrario*, qu'il n'existe pas d'homologue aisément reconnaissable du gène *Prp* de Mammifères chez les Poissons.

Conclusion

Toutes ces données n'excluent pas formellement l'existence d'une protéine à la structure de type *PrP* chez les Poissons, mais, s'il y en a une, son homologie globale avec les prions de Mammifères est vraisemblablement extrêmement faible. Les données scientifiques actuelles laissent à penser que, chez les Mammifères, deux prions divergents n'interagissent pas. L'interaction entre *PrP* non mammaliens et prions de Mammifères apparaît alors encore moins probable.

Une question qui semble se poser de façon urgente est celle des critères utilisés pour définir la famille "prion". Avec l'accumulation des données de séquences provenant des programmes de génomique actuellement conduits sur des espèces différentes, il semble évident que des efforts de nomenclature sont nécessaires pour optimiser la communication entre scientifiques. Les classifications actuelles des gènes se basent en effet sur des critères très hétérogènes : structure primaire de la protéine, implication dans des cascades biochimiques, localisation cellulaire ou embryologique, phénotype des mutants

nuls correspondants. Des spécialistes de classification moléculaire, génomique comparée, structure protéique devraient donc être consultés, même s'ils ne sont pas impliqués dans les recherches sur les familles de protéines concernées.

En ce qui concerne les recherches sur le prion, qui mobilisent des scientifiques d'horizons variés, un effort dans ce domaine est primordial. Pour la clarté de la communication avec le grand public, il l'est tout autant, si l'on prend en considération les angoisses parfois injustifiées générées par l'annonce de l'isolement d'un "prion" chez telle ou telle espèce. La nomenclature des prions n'a en effet jamais été réellement réévaluée. Le nom de la protéine ne fait pourtant pas référence à une propriété particulière de la molécule comme par exemple une "boîte" particulière identifiée dans sa séquence primaire. Le terme prion avait été introduit en 1982 par Prusiner pour remplacer l'expression "virus non conventionnel" préalablement employée. Comme nous l'avons vu, c'est un acronyme qui signifie "protéine infectieuse", et qui visait, selon Prusiner, à "souligner l'implication d'une protéine dans le processus d'infection". En toute logique, ce nom ne peut donc s'appliquer qu'aux protéines directement impliquées dans les encéphalopathies.

Dans son discours prononcé lors de la remise de son prix Nobel (Prusiner 1998), Prusiner reconnaît que la définition originale devra être étendue pour rendre compte d'autres situations dans lesquelles un mécanisme similaire de transfert d'information a lieu. Il est en effet sûr que la propriété biochimique des *PrP* d'acquies et propager des conformères variables est conservée sur une très large échelle évolutive. Chez la levure, des protéines, non homologues aux prions en ce qui concerne leur séquence primaire (et qualifiées d'analogues par les auteurs), ont aussi la propriété de propager des formes altérées d'elles-mêmes (Wickner 1994, Lindquist 1997). Les domaines qui sous-tendent de telles propriétés existent sans doute dans de nombreuses familles de protéines sans pour autant qu'il n'y ait interaction possible entre deux membres de familles différentes.

En ce qui concerne les protéines de vertébrés non mammaliens, ni les propriétés infectieuses, ni les propriétés de changement de conformation n'ont été démontrées expérimentalement. De plus, la faible identité en acides aminés de ces protéines avec les prions de Mammifères ne permet pas d'attribuer en confiance de telles propriétés à ces protéines. Il serait donc important que la nomenclature permette d'éviter la confusion. Prusiner emploie le terme de "déterminant ressemblant au prion" dans ses publications ("prion-like determinant"). On attend un acronyme plus court et compréhensible du grand public.

Jusqu'à présent, les différentes voies de recherche explorées n'ont pas permis de mettre en évidence de protéine de type *PrP* chez les poissons.

Références

- Gibbs C.J., Bolis C.L., 1997. Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol. Psychiatry*, 2, 146-147.
- Lindquist S., 1997. Mad cows meet Psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell*, 89, 495-498.
- Malpertuy A., Tekaiia F., Casarégola S., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., de Montigny J., Durrens P., Gaillardin C., Lépingle A., Llorente B., Neuvéglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Potier S., Saurin W., Toffano-Nioche C., Wésolowski-Louvel M., Wincker P., Weissenbach J., Souciet J.-L., Dujon B., 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 19. Ascomycetes-specific genes. *FEBS Letters*, 487, 113-121.
- Marcotte E.M., Eisenberg D., 1999. Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain. *Biochemistry*, 38, 667-676.
- Prusiner S.B., 1982. Novel Proteinaceous Infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner S.B., 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13363-13383.
- Salmona M., Malesani P., De Gioia L., Gorla S., Bruschi M., Molinari A., Della Vedova F., Pedrotti B., Marrari M.A., Awan T., Bugiani O., Forloni G., Tagliavini F., 1999. Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106-126. *Biochem. J.*, 342, 207-214.
- Simonic T., Duga S., Strumbo B., Asselta R., Cecilian F., Ronchi S., 2000. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Letters*, 469, 33-38.
- Wickner R.B., 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 264, 566-569.
- Wopfner F., Weidenhofer G., Schneider R., von Brunn A., Gilch S., Schwartz T.F., Werner T., Schatzl H.M., 1999. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.*, 289, 1163-1178.

Remerciements

Nous remercions B. Chevassus-au-Louis pour ses suggestions et la relecture de ce manuscrit, P.-M. Lledo pour le don de l'anti-corps 2D6, D. Villette pour le don des ADNc

PrP ovins et murins, C. Saligot pour le don de la banque d'expression de cerveau de Truite, et J.-V. Barnier pour l'assistance dans la réalisation des Western blots. Ce travail a été soutenu par l'INRA, l'INSERM, et le ministère de la Recherche (bourse V.N, appel d'offre ESST).

Abstract

Conservation of the prion proteins in Vertebrates

The word prion (which stands for proteinaceous infectious agent) has originally been coined in 1982 to name the presumed, and unconventional, etiological agent of the transmissible spongiform encephalopathies, a group of neurodegenerative diseases which affect the central nervous system of humans and other mammals. Since that time, this word's meaning has widened enormously, so that it is now used to designate a vast group of divergent proteins, sometimes even in unicellular organisms like the baker's yeast. This paper is aimed at reviewing the problem of the existence of "prions", or *PrP* genes in non-mammalian vertebrates. At present, definite *PrP* genes have been found in several bird species, and in one turtle. However, the proteins encoded by these genes are divergent from the mammalian ones. In fishes, there is presently no evidence for a *PrP*. Our group has looked for *PrP* gene(s)

in trout and medaka, by various means (screen of a trout expression library with an anti-PrP antibody, of a cDNA medaka brain library with mouse and sheep DNA probes, and by PCR) and never got a positive result. Searches in fish -especially zebrafish- databases were unable to detect a sequence with similarities to known prions. It can be concluded from these negative results that an eventual fish *PrP* gene is probably very divergent from those characterised in mammals; and that it would be extremely unlikely to share the pathological properties of these latter molecules. In a more general perspective, it appears that the problem of the nomenclature of the so-called "prion" proteins needs an update and a clarification.

JOLY J-S., NGUYEN V., BOURRAT F., 2001. Conservation des " prions " chez les Vertébrés. *INRA Prod. Anim.*, 14, 91-96.