

# Propriétés infectieuses des agrégats de protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives

Luc Bousset et Ronald Melki

Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France  
Auteur correspondant : Ronald Melki, [ronald.melki@lebs.cnrs-gif.fr](mailto:ronald.melki@lebs.cnrs-gif.fr)

Reçu le 18 janvier 2013

**Résumé** – Un certain nombre de maladies neurodégénératives, par exemple les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington, l'ataxie cérébello-spinale et la sclérose amyotrophique latérale, sont la conséquence du « méplissement » (repliement erroné) de protéines et de leur agrégation. Des données expérimentales récentes indiquent que certaines de ces maladies ne sont pas « cellules-autonomes ». En effet, notre équipe, ainsi que d'autres groupes, avons montré que les agrégats protéiques impliqués dans ces maladies se propagent de cellule en cellule à la manière des agrégats de la protéine infectieuse/prion PrP dans la maladie de Creutzfeldt-Jacob. Le mécanisme de propagation et d'amplification d'assemblages protéiques impliqués dans des maladies neurodégénératives et ses conséquences physiopathologiques sont discutés ci-dessous.

**Mots clés** : Maladies neurodégénératives / Parkinson / méplissement des protéines / agrégation des protéines / protéines infectieuses-prions.

**Abstract** – Infectious properties of protein aggregates involved in neurodegenerative diseases.

Several progressive neurodegenerative disorders, e.g. Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases, cerebro-spinal ataxia and amyotrophic lateral sclerosis, are the consequence of protein misfolding and aggregation. Recent data indicates that some of these diseases are not cell autonomous as previously thought. We and others have shown that protein assemblies involved in the aforementioned diseases propagate from cell to cell in a manner akin prion high molecular weight assemblies propagation in Creutzfeldt-Jacob disease. The mechanism of propagation and amplification of protein assemblies involved in neurodegenerative diseases and its physiopathological consequences are discussed hereafter.

**Key words**: Neurodegenerative diseases / Parkinson / protein misfolding / protein aggregation / infectious proteins-prions.

---

## Le « méplissement » des protéines et ses conséquences

Plus de 100 maladies humaines sont dues à l'agrégation et l'accumulation intracellulaire ou extracellulaire de protéines, souvent dans une conformation non native. Dans ces agrégats, souvent fibrillaires, les protéines interagissent longitudinalement et latéralement. Ces agrégats peuvent par conséquent croître indéfiniment par recrutement et établissement d'interactions longitudinales et/ou latérales avec le

précurseur soluble de la protéine fibrillaire (Brundin *et al.*, 2010).

Jusqu'en 2008, seuls les agrégats fibrillaires de la protéine prion « PrP », dont l'agrégation est impliquée dans les maladies neurodégénératives de Creutzfeldt-Jacob, l'insomnie fatale familiale, le kuru et le syndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker chez l'Homme, l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine et la tremblante chez les ovins étaient considérés comme infectieux/transmissibles.

Dans les années 1980–1990, des injections de cellules embryonnaires dans le cerveau pour compenser la perte de neurones dopaminergiques ont été proposées à des patients souffrant de la maladie de Parkinson. Dans certains cas, ces greffes ont permis une rémission des symptômes de cette maladie neurodégénérative. À la mort de ces patients, deux équipes ont analysé indépendamment le sort de ces greffons dans le cerveau. Elles ont décrit dans deux rapports datant de 2008 l’envahissement des greffons par des corps de Lewy (Kordower *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008), qui sont des agrégats protéiques composés principalement par la protéine alpha-synucléine, et qui constituent la signature moléculaire de la maladie de Parkinson. Seuls des agrégats protéiques infectieux/transmissibles peuvent rendre compte d’une telle observation.

Ces observations nous ont incités, en collaboration avec les équipes du Pr Ron Kopito (Université de Stanford) et Patrik Brundin (Université de Lund), à explorer les propriétés infectieuses et la propagation d’agrégats de deux protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives de Huntington et de Parkinson.

## Propagation d’agrégats protéiques impliqués dans la neurodégénérescence

La maladie de Huntington est une terrible maladie génétique dont l’issue est fatale. Elle est la conséquence de l’agrégation d’une protéine constitutive essentielle chez les individus : la huntingtine. Dès que le gène exprimant la huntingtine comprend plus de 37 répétitions du codon CAG codant pour le résidu glutamine, la maladie se déclenche. Nous avons ainsi pu montrer que des agrégats du fragment de la huntingtine correspondant à l’exon 1 du gène de la protéine, retrouvés chez les malades, circulent de cellule à cellule. Ces agrégats sont libérés dans l’environnement à la mort des cellules et pénètrent les cellules voisines où ils amorcent l’assemblage de la huntingtine soluble (Ren *et al.*, 2009). De même, nous avons montré que les assemblages d’alpha-synucléine, qui sont associés à la maladie de Parkinson, se propagent de cellule à cellule (Hansen *et al.*, 2011).

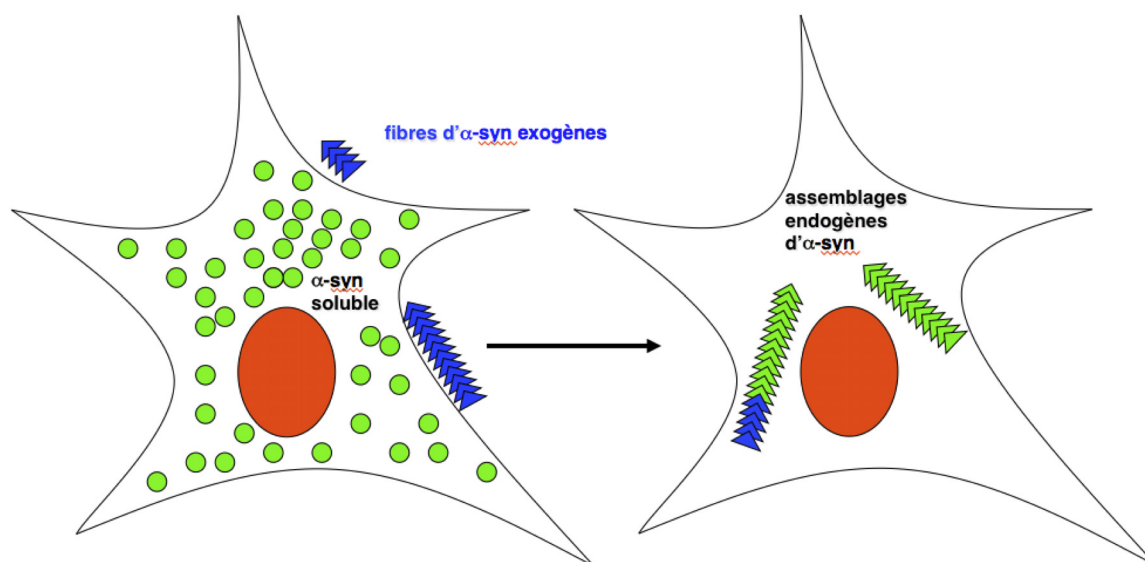
Depuis notre démonstration, selon laquelle les formes agrégées du fragment huntingtine exon 1 et de l’alpha-synucléine circulent entre cellules, il a été établi que les formes agrégées du peptide amyloïde A- $\beta$  et de la protéine Tau, impliqués tous deux dans la maladie d’Alzheimer et ceux d’un mutant de la protéine SOD1 impliqué dans la sclérose latérale amyotrophique/maladie de Charcot, voyagent entre cellules (Clavaguera *et al.*, 2009 ; Eisele *et al.*, 2009 ; Roth *et al.*, 2009 ; Munch *et al.*, 2011). Une réaction

d’amplification des agrégats protéiques s’effectue lors de leur circulation de cellules à cellules par recrutement des formes solubles endogènes de la protéine qui les constitue (figure 1). La propagation de ces agrégats et leur amplification reproduisent ce qui se passe dans le cas d’agents infectieux conventionnels (bactéries et virus). Ainsi, la notion de protéines infectieuses peut être élargie à des protéines autres que la protéine prion PrP.

Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés des agrégats protéiques qui circulent entre les cellules. Nous avons montré qu’ils interagissent à la fois avec des protéines membranaires à la surface des cellules et avec les phospholipides constituant la membrane plasmique (Trevino *et al.*, 2012). La fixation de ces agrégats aux cellules affecte l’intégrité de la membrane plasmique, la rendant perméable aux ions et induisant le déclenchement d’une réaction apoptotique (Pieri *et al.*, 2012). Un débat agite notre communauté concernant la nature des assemblages de protéines les plus toxiques associés aux maladies neurodégénératives. Certains auteurs considéraient que les agrégats fibrillaires sont les plus toxiques, alors que d’autres soutenaient que ce sont les assemblages précurseurs des fibres et de plus faible masse moléculaire. Dans toutes ces études, la toxicité relative des différents assemblages est rapportée à la concentration initiale de protéine soluble précurseur. Or, les agrégats fibrillaires et les assemblages précurseurs des fibres diffèrent très significativement par leur masse moléculaire et, à une concentration donnée de protéine précurseur soluble, la concentration de fibres ou d’oligomères précurseurs diffère de plusieurs ordres de grandeur. De fait, la toxicité est associée aux particules protéiques et non à la protéine soluble. Nous avons comparé la toxicité des fibres et des oligomères précurseurs de ces agrégats à des concentrations de particules identiques, qu’il a fallu déterminer par une multitude d’approches biophysiques et biochimiques. Cela nous a permis de montrer que les assemblages fibrillaires de l’alpha-synucléine et de l’exon 1 de la huntingtine sont 1000 à 10 000 fois plus toxiques que leurs précurseurs, mettant ainsi fin à un débat de plus de deux décennies sur la nature des assemblages protéiques impliqués dans les maladies neurodégénératives de Parkinson et de Huntington (Pieri *et al.*, 2012).

## Modulation de l’agrégation et de la circulation entre cellules de protéines impliquées dans la neurodégénérescence

L’observation, selon laquelle des agrégats protéiques fibrillaires toxiques pour les neurones et impliqués



**Fig. 1.** Représentation schématique de la fixation de fibres d'alpha-synucléine exogènes (en bleu) aux cellules. Les fibres exogènes internalisées amorcent l'agrégation de la protéine endogène en vert. Nous avons ainsi une amplification de l'agrégation de l'alpha-synucléine. Le noyau des cellules est coloré en rouge.

dans des maladies neurodégénératives circulent entre neurones, suggère que l'inhibition de la croissance des fibres ou la modification de leurs propriétés physiques, par exemple leurs propriétés de surface, pourraient constituer des pistes thérapeutiques innovantes, ayant pour objectif de ralentir la progression de ces maladies dévastatrices. Les chaperons moléculaires modulent les états conformationnels des protéines et séquestrent des polypeptides qui ont une forte propension à s'agréger. Nous avons documenté l'effet du chaperon moléculaire Hsc70, seul ou en coopération avec ses co-chaperons, sur l'assemblage de l'alpha-synucléine et avons montré que Hsc70 inhibe l'assemblage de l'alpha-synucléine en fibres en séquestrant la protéine soluble (Pemberton *et al.*, 2011). Nous avons aussi montré que Hsc70 se lie avec une plus forte affinité aux fibres d'alpha-synucléine qu'à leurs précurseurs solubles. La fixation de Hsc70 aux fibres modifie leurs propriétés. Elles deviennent nettement moins toxiques pour les cellules, probablement par le biais d'une moins bonne adhérence aux membranes cellulaires des fibres tapissées de Hsc70, comparée aux fibres nues (Pemberton & Melki, 2012). Ainsi, la modification des propriétés physiques des fibres a un effet sur leur toxicité. Cela nous a encouragés à aller plus loin dans la conception d'outils moléculaires interférant avec la formation des fibres ou affectant les propriétés des fibres, car de tels outils ont un potentiel thérapeutique innovant. Nous avons à cette fin déterminé, par une approche de pontages chimiques et d'identification des peptides pontés par spectrométrie de masse, les aires d'interaction entre

l'alpha-synucléine et deux chaperons de la famille des Hsc70 (Redeker *et al.*, 2012). Notre travail nous a permis de déterminer ce qui est nécessaire et suffisant dans les chaperons de la famille des Hsc/p70 pour lier l'alpha-synucléine et ouvert la voie qui mène à la conception de « mini-chaperons » à potentiel thérapeutique. Une approche complémentaire, faisant appel à des anticorps liant spécifiquement la forme fibrillaire de protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives, a montré une inhibition de la fixation d'agrégats couverts d'anticorps aux cellules et par conséquent le blocage de leur propagation et amplification (Kfoury *et al.*, 2012).

### Questions en suspens et pistes thérapeutiques

Il sera critique dans les années qui viennent d'identifier la ou les voie(s) d'entrée des agrégats de protéines impliqués dans des maladies neurodégénératives dans les neurones. Il s'agit plus précisément d'identifier les récepteurs protéiques permettant à ces agrégats de s'ancrer aux cellules et de préciser le rôle de la matrice extracellulaire dans ce processus. Cela permettra de concevoir des outils qui bloqueront le passage d'agrégats protéiques toxiques d'une cellule affectée à une cellule saine, où l'agrégation ne s'est pas encore produite, coupant ainsi la voie à leur amplification intracellulaire.

À la suite de leur association à la membrane cellulaire, les agrégats protéiques traversent la membrane

pour se retrouver dans le cytoplasme où ils vont agir comme amorces pour l'agrégation de la forme soluble de la protéine. Pour ralentir ce processus, il est important de déterminer comment ces agrégats protéiques infectieux diffusent dans la membrane plasmique et à quelle vitesse. Il est important aussi de déterminer s'ils se retrouvent dans des structures membranaires particulières. La toxicité de ces agrégats est la conséquence de leur élongation au détriment du réservoir de protéines solubles de la cellule. Elle peut aussi être la conséquence de perturbations de la diffusion de protéines membranaires telles que des récepteurs cellulaires, en particulier ceux impliqués dans la signalisation cellulaire. Il est par conséquent important de mesurer la dynamique des récepteurs membranaires et de déterminer ceux qui sont affectés, afin de comprendre comment ces agrégats perturbent la signalisation cellulaire.

Nous avons montré très récemment, à l'aide de neurones primaires en culture dans des chambres de culture de microfluidique, que certains de ces agrégats voyagent à une vitesse correspondant à la limite basse du transport axonal rapide, de manière rétrograde et antérograde (Freundt *et al.*, 2012). Il conviendrait de documenter la proportion d'agrégats transportés dans chaque sens et d'identifier les moteurs moléculaires qui les véhiculent à travers les neurones afin de perturber ce transport et par-là même la propagation de ces agrégats protéiques entre neurones.

Nous avons aussi montré que ces agrégats sont secrétés par les cellules infectées. L'identification de leur voie de sécrétion pourrait permettre un blocage spécifique de leur export et par conséquent de leur propagation de cellule « donneuse » à cellule « receveuse ».

Une meilleure caractérisation de la réponse cellulaire à l'agrégation de protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives permettra de stimuler cette réponse et accroîtra la résistance de la cellule vis-à-vis de la toxicité associée à ces agrégats protéiques.

Enfin, la caractérisation de la propagation des agrégats protéiques infectieux dans les cerveaux d'animaux modèles pourrait permettre d'identifier les circuits neuronaux qui sont à l'origine des profils de neurodégénérescence décrits par Braak (Braak *et al.*, 2004).

Les approches expérimentales décrites plus haut élargiront le champ des connaissances sur les maladies neurodégénératives, qui sont la conséquence du « méplissement » et de l'agrégation des protéines. Elles permettront de concevoir de manière raisonnée des moyens thérapeutiques pour ralentir, bloquer ou inverser les transformations à l'origine de ces maladies délétères qui ont un impact dramatique sur la qualité de la vie des personnes affectées.

## Références

- Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Del Tredici K., Stages in the Development of Parkinson's Disease-Related Pathology. *Cell Tissue Res*, 2004, 318, 121–134.
- Brundin P., Melki R., Kopito R., Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11, 301–307.
- Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., Fraser G., Stalder A.K., Beibel M., Staufenbiel M., Jucker M., Goedert M., Tolnay M., Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, 2009, 11, 909–913.
- Eisele Y.S., Bolmont T., Heikenwalder M., Langer F., Jacobson L.H., Yan Z.X., Roth K., Aguzzi A., Staufenbiel M., Walker L.C., Jucker M., Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A $\beta$  inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 12926–12931.
- Freundt E.C., Maynard N., Clancy E.K., Roy S., Bousset L., Sourigues Y., Covert M., Melki R., Kirkegaard K., Brahic M., Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol*, 2012, 72, 517–524.
- Hansen C., Angot E., Bergström A-L., Steiner J.A., Pieri L., Outeiro T.F., Melki R., Kallunki P., Fog K., Li J.-Y., Brundin P., Eisele Y.S., Bolmont T., Heikenwalder M., Langer F., Jacobson J.H., Yan Z.-X., Freundt E.C., Maynard N., Clancy E.K., Roy S., Bousset L., Sourigues Y., Covert M.,  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest*, 2011, 121, 715–725.
- Kfoury N., Holmes B.B., Jiang H., Holtzman D.M., Diamond M.I., Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species. *J Biol Chem*, 2012, 287, 19440–19451.
- Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Freeman T.B., Olanow C.W., Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, 2008, 14, 504–506.
- Li J.-Y., Englund E., Holton J.L., Soulet D., Hagell P., Lees A.J., Lashley T., Quinn N.P., Rehnroona S., Bjorklund A., Widner H., Tamas Revesz T., Lindvall O., Brundin P., Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*, 2008, 14, 501–503.
- Munch C., O'Brien J., Bertolotti A., Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108, 3548–3553.
- Pemberton S., Madiona K., Pieri L., Kabani M., Bousset L., Melki R., Hsc70 Protein Interaction with Soluble and Fibrillar  $\alpha$ -Synuclein. *J Biol Chem*, 2011, 286, 34690–34699.

- Pemberton S., Melki R., The interaction of Hsc70 protein with fibrillar  $\alpha$ -Synuclein and its therapeutic potential in Parkinson disease. *Commun Integ Biol*, 2012, 5, 94–95.
- Pieri L. Madiona K., Bousset L., Melki R., Fibrillar  $\alpha$ -Synuclein and Huntingtin Exon 1 Assemblies Are Toxic to the Cells. *Biophys J*, 2012, 102, 2894–2905.
- Redeker V., Pemberton S., Bienvenut W., Bousset L., Melki R., Identification of Protein Interfaces between  $\alpha$ -Synuclein, the Principal Component of Lewy Bodies in Parkinson Disease, and the Molecular Chaperones Human Hsc70 and the Yeast Ssa1p. *J Biol Chem*, 2012, 287, 32630–32639.
- Ren P.-H., Lauckner J.E., Kachirskaja I., Heuser J.E., Melki R., Kopito R.R., Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol*, 2009, 11, 219–225.
- Roth K., Aguzzi A., Staufenbiel M., Walker L.C., Jucker M., Induction of cerebral  $\beta$ -amyloidosis: Intracerebral versus systemic Abeta inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 12926–12931.
- Trevino S.R., Lauckner J.E., Sourigues Y., Pearce M.M., Bousset L., Melki R., Kopito R.R., Fibrillar Structure and Charge Determine the Interaction of Polyglutamine Protein Aggregates with the Cell Surface. *J Biol Chem*, 2012, 287, 29722–29728.